Rôle du récepteur sérotoninergique de type 4 dans le traitement rapide et prophylactique de l'anxiété : implication du circuit cortex-raphé

Charlène Faye

▶ **To cite this version:**

Charlène Faye. Rôle du récepteur sérotoninergique de type 4 dans le traitement rapide et prophylactique de l'anxiété : implication du circuit cortex-raphé. Pharmacologie. Université Paris Saclay (COmUE), 2019. Français. NNT : 2019SACLS090 . tel-02682432v2

HAL Id: tel-02682432

https://theses.hal.science/tel-02682432v2

Submitted on 23 Jun 2020

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.

université PARIS-SACLAY

NNT : 2019SACLS090

Thèse de doctorat

UNIVERSITÉ PARIS SUD
Comprendre le monde, construire l'avenir

Rôle du récepteur sérotoninergique de type 4 dans le traitement rapide et prophylactique de l'anxiété : implication du circuit cortex-raphé

Thèse de doctorat de l'Université Paris-Saclay préparée à l'Université Paris-Sud
Laboratoire UMR-S1178 : dépression, plasticité et résistance aux antidépresseurs

École doctorale n°569 Innovation Thérapeutique : du fondamental à l'appliqué (ITFA)
Spécialité de doctorat: Sciences Pharmacologiques

Thèse présentée et soutenue à la Faculté de Pharmacie de Châtenay-Malabry, le 27 mars 2019, par

M^elle^ Charlène FAYE

Composition du Jury :

Dr Bruno GIROS Directeur de recherche, Univ. Pierre et Marie Curie (U8246)	Rapporteur
Pr Thomas FRERET Professeur des Universités, Univ. Caen Normandie (INSERM U1075)	Rapporteur
Pr Michel BOULOUARD Professeur des Universités, Univ. Caen Normandie (INSERM U1075)	Président
Pr Céline VERSTUYFT PU-PH, Univ. Paris-Saclay, Univ. Paris-Sud (U1184)	Examinateur
Pr Denis DAVID Professeur des Universités, Univ. Paris-Saclay, Univ. Paris-Sud (U1184)	Directeur de thèse

« C'est impossible, dit la fierté.

C'est risqué, dit l'expérience.

C'est sans issue, dit la raison.

Essayons, murmure le cœur »

William Arthur Ward

Remerciements

- **À Messieurs et Madame les membres du jury,**

Je remercie Monsieur le Professeur Thomas Freret, de l'Université de Caen-Normandie et Monsieur le Docteur Bruno Giros, de l'Université Pierre et Marie Curie, d'avoir si gentiment accepté d'évaluer et juger mon travail de thèse, en qualité de rapporteurs.
Je remercie Monsieur le Professeur Michel Boulouard et Madame le Professeur Céline Verstuyft, de me faire l'honneur de siéger dans ce jury de thèse, en qualité d'examinateurs.

- **À Monsieur le Professeur Alain Gardier,**

Je vous adresse mes sincères remerciements et toute ma reconnaissance pour m'avoir accueillie au sein de votre laboratoire dès mon Master 2, en me donnant ainsi l'opportunité de m'épanouir dans ce travail de thèse. Merci pour votre disponibilité, vos conseils avisés et surtout l'intérêt que vous avez porté à mes travaux de recherche durant ces 4 ans et demi passés dans votre laboratoire.

- **À Monsieur le Professeur Denis David,**

Denis, par où commencer, il y a tellement de choses à dire. C'est avec beaucoup d'émotions que je souhaite te remercier sincèrement pour ces années passées à tes côtés. Bien que parfois éprouvantes, elles ont été à la fois enrichissantes et passionnantes, grâce à ton dévouement et ton enthousiasme pour la recherche. Merci pour la confiance et l'autonomie que tu m'as accordées pour mener à bien ce projet, tout en m'enseignant minutieusement la pratique comme la théorie. Un merci tout particulier à ta patience, que j'ai très certainement mise à rude épreuve, ta compréhension et ta grande disponibilité. Plus qu'un directeur de thèse, j'ai trouvé en toi un véritable mentor, qui a su m'écouter, me soutenir et me remotiver dans mes innombrables moments de doute, des qualités qui font de toi une personne remarquable. Même si tu en doutes peut-être, j'ai particulièrement apprécié cette collaboration, qui a été si formatrice, tant sur le plan professionnel, que personnel. Alors, Denis, merci, merci pour tout !

- **À Messieurs les docteurs Jean-Philippe Guilloux, Laurent Tritschler et Bruno Guiard,**

JP, un merci tout particulier te revient car je dois dire que ce sont mes deux stages, que tu as merveilleusement bien encadrés, qui m'ont donné l'envie de faire de la recherche. Merci pour l'aide que tu m'as apportée quand j'en avais besoin, que ce soit dans mes travaux de recherche ou dans mes problèmes de technologie. Laurent, tout d'abord merci pour ton aide dans mon projet, notamment pour l'apprentissage de la technique d'optogénétique. Tu m'as rendu la tâche très souvent plus facile, grâce à tes idées venues de nul part ou en réparant tout ce que je cassais. Un énorme merci pour ton soutien, ton écoute, ta bonne humeur et ton humour, qui pour moi, ont été d'un réconfort incroyable tout au long de cette thèse. Bruno, merci pour tes précieux conseils et pour la réalisation des manip d'électrophysiologie.

- **Aux membres du laboratoire,**

Indira, je ne sais comment te remercier pour toute l'aide morale et physique que tu m'as généreusement apportée dans mon projet, du début à la fin. Merci aussi pour ta patience, ta disponibilité et ta gentillesse. J'ai une admiration toute particulière pour la femme que tu es. Ta force de travail et ton optimisme sont une véritable source d'inspiration. Céline, merci pour ton aide dans mes manip et dans la relecture de ma thèse, et surtout pour ta bonne humeur, qui ont rendu certaines de mes journées beaucoup moins longues. Je remercie également tes solides compétences Illustrator ;-) ! Françoise et Louise, merci pour votre convivialité qui m'a permis de me sentir pleinement intégrée dans cette équipe.

- **Aux doctorants, post-doctorants et stagiaires d'hier, d'aujourd'hui et de demain**

Aux doctorants et post-doctorants d'hier : Daniela, Flavie, Maryam et Ha, merci de m'avoir montré la voie. Sachez que vous avez ma reconnaissance éternelle pour avoir survécu à cette « douloureuse » épreuve qu'est la thèse.
Aux doctorants et stagiaires d'aujourd'hui et de demain : Julie, Karim, Loan, Sarah, Laura, Valentine et Lyès, je n'ai qu'un mot à vous dire : COURAGE ! Vous verrez, ce n'est pas aussi difficile que ça en a l'air, quoi que… Un merci tout particulier à Julie. Tu as su prendre le temps de m'écouter et de m'encourager en toutes circonstances. Merci pour tes innombrables bons plans, merci pour toutes ces sorties à l'Opéra et ces moments de rire et de joie qui resteront si précieux à mon cœur.

- **Aux chercheurs avec lesquels j'ai eu la chance de collaborer,**

To Professor René Hen, doctors Christine Denny and Mazen Kheirbek, Ina Pavlova and Josephine McGowan, a special thanks for your help and your advices in my project, especially for the optogenetic experiment.

À l'équipe de Pasteur et plus particulièrement au Docteur Gégory Jouvion pour m'avoir permis d'accéder au scanner de lame, ainsi que pour sa disponibilité et son accueil.

- **Au personnel de la plateforme Animalerie,**

Un énorme merci à Valérie Domergue, Ayma, Pauline, Julie, Olivier et Manon de s'être si soigneusement occupés de mes petites bêtes, en particulier dans les moments difficiles. Merci également pour votre soutien, tant physique que moral.

- **Aux membres de l'ADIT et de l'École Doctorale**

À Julie P, Hélène, Rami, Chloé, Doumet, Myriam, Aurélia, Maud, Kévin, Magali, Caroline, Simon, Marine et Carole, merci pour tous ces bons moments de partage et votre investissement. Continuez de faire vivre cette association !

Barbara, Charlotte et Alexander, merci pour votre écoute et nos petits rendez-vous secrets qui ont su me changer les idées dans les moments difficiles.

- **À mes ami(e)s**

À la team pharma : Rim, Romain, Marion, Mélissa, Laurine, Adèle, Carmela, Alexandre, Kévin, Mahita, Claire et notre tout petit dernier du groupe, Julien.

À la team copines de galère, pour votre soutien moral et pour m'avoir permis de relativiser un certain paquet de choses : Émilie et Clémence, mes docteurs[2].

À la team des premiers instants, pour votre soutien incommensurable, vos encouragements et votre amour si précieux : Mickaël, Marine, Marieke, Jeanne, Elsa, Cécile, Audrey, Julie E.

- **A ma belle-famille,**

À Nicole, Denis, Florence, Jérôme et Maud, merci pour vos encouragements, votre soutien moral et l'intérêt que vous avez porté à mon travail. Un merci tout particulier à Denis et Nicole pour leur énorme travail de relecture.

- **A ma famille,**

À ma sœur, Nadège, pour son incroyable soutien, sa confiance, son écoute et son réconfort
À mes grands-parents, Léa et Pierre.
À mes oncles et tantes de sang comme de cœur, Chantal, Éric, Françoise et Guy.
À mes cousins, Clélia, Flavien, Antoine, Corto, Catherine F, Martin, Alexander, Bénédict, Frédérick, Aurélie, Arthur, Pierre, Catherine R, Sophie et Julien.
À ceux qui me manquent et avec qui j'aurais aimé partager cette réussite : Tinany et Claudine.

Et surtout, aux meilleurs parents du monde. Je vous adresse mes plus profonds remerciements pour tout ce que vous avez compris et supporté, et parce que sans vous, je ne serais jamais allée bout de cette thèse. Merci pour vos sacrifices, votre soutien infaillible, vos encouragements et votre aide du début à la fin, en m'offrant toutes les conditions nécessaires pour réussir et arriver là où j'en suis. Aujourd'hui, j'espère vous avoir rendus fiers. Que vous trouviez dans la réalisation de ce travail, l'expression de ma plus affectueuse reconnaissance.

- **A mon amour, Olivier**

À toi qui n'a pas connu les meilleurs moments de cette thèse, mais qui malgré cela a su me supporter (dans tous les sens du terme), m'écouter, me rassurer et me réconforter. Merci pour ta patience, ta confiance et ton amour, qui me font avancer chaque jour. Je t'aime.

Publications scientifiques

Revue

Samuels BA, Mendez-David I, **Faye C**, David SA, Pierz KA, Gardier AM, Hen R, David DJ. (2016) Serotonin 1A and Serotonin 4 Receptors: Essential Mediators of the Neurogenic and Behavioral Actions of Antidepressants. The Neuroscientist 22(1):26-45.

Faye C*, McGowan JC*, Denny CA, David DJ. (2017) Neurobiological mechanisms of stress resilience and implications for the aged population. Special Issue Current Neuropharmacology : Brain basis of resilience and its effect on mood disorders in the aging. (**Article 1**)

Articles originaux

Faye C, Hen R, Guiard B, Denny CA, Gardier AM, Mendez-David I, David DJ. Rapid anxiolytic effects of 5-HT4 receptor agonist involves prefrontal cortex-brainstem neural circuit recruitment. (**Article 2**)

Résumés publiés

P.2.001. Rapid anxiolytic effects of a serotonin type 4 receptor agonist involve prefrontal cortex-brainstem neural circuit recruitment. **Faye C**, Mendez-David I, Guiard B, Denny CA, Hen R, Gardier AM, David DJ. European Neuropsychopharmacology 28(1): S21-S22. March 2018. https://doi.org/10.1016/j.euroneuro.2017.12.040.

T37. Rapid anxiolytic effects of a serotonin type 4 receptor agonist involve prefrontal cortex-brainstem neural circuit recruitment. **Faye C**, Hen R, Guiard B, Denny CA, Gardier AM, Mendez-David I, David DJ. Biological Psychiatry 83(9):S143. May 2018. https://doi.org/10.1016/j.biopsych.2018.02.373.

Articles issus de collaborations

Brachman RA, McGowan JC, Perusini JN, Lim SC, Pham TH, **Faye C**, Gardier AM, Mendez-David I, David DJ, Hen R, Denny CA. (2016) Ketamine as a Prophylactic Against Stress-Induced Depressive-like Behavior. Biol Psychiatry, 79(9), 776-786 (**Article 2**)

Guilloux JP, Samuels BA, Mendez-David I, Hu A, Levinstein M, **Faye C**, Mekiri M, Mocaer E, Gardier AM, Hen R, Sors A, David DJ. (2017). S 38093, a histamine H3 antagonist/inverse agonist, promotes hippocampal neurogenesis and improves context discrimination task in aged mice. Sci Rep, 7, 42946.

Tritschler L, Kheirbek MA, Le Dantec Y, Mendez-David I, Guilloux JP, **Faye** C, Doan J, Pham TH, Hen R, David DJ, Gardier AM. (2017). Optogenetic activation of granule cells in the dorsal dentate gyrus enhances dopaminergic neurotransmission in the Nucleus Accumbens. Neurosci Res.10.1016/j.neures.2017.12.002.

Communications affichées

Nationales

Faye C, Mendez-David I, Pham TH, Gardier AM, David DJ. L'activation à dose unique du récepteur de la sérotonine de type 4 induit une réponse de type anxiolytique rapide chez la souris BALB/cJRj. *Journée de la Recherche*, Châtenay-Malabry, France (DEC 2015).

Faye C, Mendez-David I, Pham TH, Gardier AM, David DJ. L'activation à dose unique du récepteur de la sérotonine de type 4 induit une réponse de type anxiolytique rapide chez la souris BALB/cJRj. *XVI^{ème} Journée de l'Ecole Doctorale*, Châtenay-Malabry, France (JUN 2016).

Faye C, Mendez-David I, Tritschler L, Pham TH, Defaix C, Kheirbek MA, Denny CA, Hen R, Gardier AM, David DJ. Rapid anxiolytic effects of 5-HT4 receptor agonist involves prefrontal cortex-brainstem neural circuit recruitment. *5ème congrès annuel du GDR 3545*, Tours, France (NOV 2016).

Faye C, Mendez-David I, Tritschler L, Pham TH, Defaix C, Kheirbek MA, Denny CA, Hen R, Gardier AM, David DJ. Rapid anxiolytic effects of 5-HT4 receptor agonist involves prefrontal cortex-brainstem neural circuit recruitment. *Journée de la Recherche*, Châtenay-Malabry, France (DEC 2016).

Faye C, Mendez-David I, Guiard B, Denny CA, Hen R, Gardier AM, David DJ. Rapid anxiolytic effects of 5-HT4 receptor agonist involves prefrontal cortex-brainstem neural circuit recruitment. *Neuroscience Workshop Saclay*, Gif-sur-Yvette, France (JUN 2017).

Faye C, Mendez-David I, Guiard B, Denny CA, Hen R, Gardier AM, David DJ. Rapid anxiolytic effects of 5-HT4 receptor agonist involves prefrontal cortex-brainstem neural circuit recruitment. 2nd *PHENO Workshop de l'ICM*, Paris, France (JUN 2017).

Faye C, Mendez-David I, Guiard B, Denny CA, Hen R, Gardier AM, David DJ. Rapid anxiolytic effects of 5-HT4 receptor agonist involves prefrontal cortex-brainstem neural circuit recruitment. *6ème congrès annuel du GDR 3545*, Paris, France (NOV 2017).

Faye C, Hen R, Guiard B, Denny CA, Gardier AM, Mendez-David I, David DJ. Rapid anxiolytic effects of 5-HT4 receptor agonist involves prefrontal cortex-brainstem neural circuit recruitment. *European College of Neuropsychopharmacology Workshop for Junior Scientists in Europe*, Nice, France (MAR 2018).

Faye C, Hen R, Guiard B, Denny CA, Gardier AM, Mendez-David I, David DJ. Rapid anxiolytic effects of 5-HT4 receptor agonist involves prefrontal cortex-brainstem neural circuit recruitment. *9th edition of Young Researchers in Life Sciences*, Paris, France (MAI 2018).

Internationales

Girard R, Maurice-Gelinas C, **Faye C**, Pare G, Monpays C, Deslauriers J, Sarret P, Grignon S. Lack of preventive effect of acute DHA and subacute EPA/DHA combination on PPI disruption in a murine juvenile two-hit model of schizophrenia. 45th *Society For Neuroscience*, Chicago, IL, USA (OCT 2015).

Faye C, Mendez-David I, Guiard B, Denny CA, Hen R, Gardier AM, David DJ. Rapid anxiolytic effects of 5-HT4 receptor agonist involves prefrontal cortex-brainstem neural circuit recruitment. *ULLA Summer School*, Leuven, Belgique (JUL 2017).

Faye C, Hen R, Guiard B, Denny CA, Gardier AM, Mendez-David I, David DJ. Rapid anxiolytic effects of 5-HT4 receptor agonist involves prefrontal cortex-brainstem neural circuit recruitment. *73rd Annual Meeting of the Society of Biological Psychiatry*, NYC, USA (MAI 2018).

Faye C, Hen R, Guiard B, Denny CA, Gardier AM, Mendez-David I, David DJ. Rapid anxiolytic effects of 5-HT4 receptor agonist involves prefrontal cortex-brainstem neural circuit recruitment. *31st European College of Neuropsychopharmacology Congress*, Barcelone, Espagne (OCT 2018).

Communications orales

Nationales

Faye C. Rapid anxiolytic effects of 5-HT_4 receptor agonist involves prefrontal cortex-brainstem neural circuit recruitment. *5th annual brainstorming seminar*, Châtenay-Malabry, France (JUL 2016).

Faye C. Rapid anxiolytic effects of 5-HT_4 receptor agonist involves prefrontal cortex-brainstem neural circuit recruitment. *ECNP Workshop for Junior Scientists in Europe*, Nice, France (MAR 2018).

Faye C. Rapid anxiolytic effects of 5-HT_4 receptor agonist involves prefrontal cortex-brainstem neural circuit recruitment. *XVIIIème Journée de l'Ecole Doctorale*, Châtenay-Malabry, France (JUN 2018).

Internationales

Faye C. Rapid anxiolytic effects of 5-HT_4 receptor agonist involves prefrontal cortex-brainstem neural circuit recruitment. *7th Focused Meeting on Cell Signalling of the British Pharmacological Society*, Nottingham, Angleterre (MAR 2018).

Prix et distinctions

Juin 2015	Allocation de recherche du Ministère de la Recherche (ED569 – Innovation Thérapeutique).
Novembre 2016	Prix « GDR-3545/Fondation Esteve – 2016 » pour le meilleur poster (*5ème congrès annuel du GDR 3545*)
Novembre 2017	Prix « GDR-3545/Fondation Esteve – 2017 » pour le meilleur poster (*6ème congrès annuel du GDR 3545*)
Décembre 2017	Travel Award (*31st European College of Neuropsychopharmacology Congress*)
Octobre 2018	Poster Award (*31st European College of Neuropsychopharmacology Congress*)

Abréviations

^{1}H-MRS : spectroscopie par résonance magnétique du proton
5-HT : sérotonine
AC : adénylate cyclase
AMPc : adénosine monophosphate cyclique
ANSM : agence nationale de sécurité du médicament et des produits de santé
APP : précurseur de la protéine amyloïde
Arch : archaerhodopsine
ATV : aire tegmentale ventrale
ATC : antidépresseur tricyclique
BA/BLA/BMA/LA : noyau basolatéral/basal/ basomédian/latéral de l'amygdale
BDNF : *brain-derivated neurotrophic factor*
BNST: noyau du lit de la strie terminale
BO : bras ouverts
BOLD : *blood oxygen level dependent*
BZD : benzodiazépine
CaMKII : Ca^{2+}/calmoduline-dépendante de type 2
CCA : cortex cingulaire antérieur
CeA/CeL/CeM : noyau central/latéral/ médian de l'amygdale
Cg : aire cingulaire antérieure
ChR2 : channelrhodopsine
CIM-11 : classification internationale des maladies
COF : cortex orbitofrontal
$CPF_{m/dl/dm/vm/vl}$: cortex préfrontal médian/dorsolatéral/dorsomédian/ventromédian/ ventrolatéral
CREB : *cAMP response element binding protein*
DSM : manuel diagnostique et statistique des troubles mentaux
ECT : électroconvulsivothérapie
EDC : épisode dépressif caractérisé
EEG : électroencéphalogramme
EPM/EZM : *elevated plus/zero maze test*
ESEMed : étude épidémiologique européenne sur les troubles mentaux
eYFP : *enhanced yellow fluorescent protein*
ESPT: état de stress post-traumatique
FDA: *Food and drug administration*
FPT : *four-plate test*
FST: *forced swimming test*
GABA : acide γ-aminobutyrique
GAD : glutamate décarboxylase
GD : gyrus denté
GFP : *green fluorescent protein*
HAM-A : échelle d'anxiété d'Hamilton
hERG : *human Ether-à-go-go related gene*
$HPC_{v/d}$: hippocampe ventral/dorsal
IL : aire infralimbique
IMAO : inhibiteur de la monoamine oxydase
IRM_f : imagerie par résonnance magnétique fonctionnelle
IRSN : inhibiteur mixte de la recapture de la sérotonine et de la noradrénaline
ISRS : inhibiteur sélectif de la recapture de la sérotonine
LDT : *light/dark test*
NAc : noyau accumbens
NCS-R : *National Comorbidity Survey-Replication*
NET : transporteur de la recapture de la noradrénaline
NMDA : N-méthyl-D-aspartate
NRD/NRM : noyau du raphé dorsal/médian
NSF : *novelty suppressed feeding test*
OF : *open field test*
OMS : organisation mondiale de la santé
ORB : aire orbitale
p-CPA : para-chlorophenylalanine
PKA : protéine kinase A
PrL : aire prélimbique
RGO : reflux gastro-œsophagien
SCP : stimulation cérébrale profonde
SERT : transporteur de la recapture de la sérotonine
SIT : *social interaction task*
SMTr : stimulation magnétique transcraniale répétée
SPECT : tomographie par émission monophotonique
ST : splash test
TAG : trouble anxieux généralisé
TAS : trouble d'anxiété sociale
TCC : thérapie cognitivo-comportementale
TEP : tomographie par émission de positons
TMT : triméthylthiazoline
TOC : trouble obsessionnel compulsif
TP : trouble panique
TpH : tryptophane hydroxylase
TST: *tail suspension test*
USV : *ultrasonic vocalizations test*
VCT : *Vogel conflict test*

Sommaire

Remerciements 2

Publications scientifiques 5

Abréviations.....10

Sommaire 11

Liste des figures.....15

Liste des tableaux 17

Résumé.....19

INTRODUCTION.....21

CHAPITRE 1 - LA PATHOLOGIE DES TROUBLES ANXIEUX.....22

1. Épidémiologie 22
2. Diagnostic clinique.....25
3. Signes et symptômes 27
   - 3.1. Le trouble anxieux généralisé 30
   - 3.2. Le trouble panique.....30
   - 3.3. L'agoraphobie 31
   - 3.4. Le trouble d'anxiété sociale 31
   - 3.5. La phobie spécifique 32
4. Modélisation des symptômes anxieux chez la souris 32
5. Les différentes approches thérapeutiques des troubles anxieux.....37
   - 5.1. Dépenses de santé.....37
   - 5.2. Prise en charge clinique : réponse, rémission, rechute, récidive.....37
   - 5.3. Les traitements non pharmacologiques 39
     - 5.3.1. Les traitements non invasifs 39
     - 5.3.2. Les traitements invasifs 40
     - 5.3.3. Les techniques de neurostimulation.....41
   - 5.4. Les traitements pharmacologiques 42
     - 5.4.1. Traitement empirique : les benzodiazépines.....42

5.4.2. Traitement actuel : les antidépresseurs 46
5.4.3. Comparaison de l'efficacité entre les benzodiazépines et les antidépresseurs 51
5.4.4. Les alternatives aux traitements antidépresseurs 53
5.4.5. Traitements novateurs 56
6. La physiopathologie des troubles anxieux 59
6.1. L'hypothèse neuro-anatomique 59
6.1.1. Le cortex préfrontal 59
6.1.1.1. Structure 59
6.1.1.2. Les études chez l'Homme 61
6.1.1.3. Les études chez l'animal 65
6.1.2. L'Amygdale 71
6.1.2.1. Structure 71
6.1.2.2. Les études chez l'Homme 72
6.1.2.3. Les études chez l'animal 74
6.1.3. L'Hippocampe ventral 76
6.1.3.1. Structure 76
6.1.3.2. Les études chez l'Homme 77
6.1.3.3. Les études chez l'animal 78
6.1.4. Le Noyau du raphé dorsal 81
6.1.4.1. Structure 81
6.1.4.2. Les études chez l'Homme 82
6.1.4.3. Les études chez l'animal 83
6.2. Les neurotransmetteurs et leurs récepteurs 85
6.2.1. Le GABA et les récepteurs GABAergiques 87
6.2.2. La sérotonine et les récepteurs sérotoninergiques 90
CHAPITRE 2 - LE RÉCEPTEUR 5-HT$_4$, UNE NOUVELLE CIBLE D'INTÉRÊT POUR TRAITER RAPIDEMENT LES TROUBLES ANXIEUX. 96
1. Localisation du récepteur sérotoninergique de type 4 96
2. Découverte du récepteur sérotoninergique de type 4 98
3. Structure du récepteur sérotoninergique de type 4 99
4. Les ligands du récepteur sérotoninergique de type 4 100

5. Le récepteur sérotoninergique de type 4 dans les troubles de l'humeur : cas particulier des troubles anxieux 103
5.1. En préclinique 103
5.2. En clinique 106
5.2.1. Les médicaments commercialisés agissant sur le récepteur 5-HT4 106
5.2.2. Les molécules en développement clinique ciblant le récepteur 5-HT_4 108
CHAPITRE 3 - LE RÉCEPTEUR 5-HT_4, UNE NOUVELLE CIBLE POUR PROMOUVOIR LA RÉSILIENCE ET PRÉVENIR L'APPARITION DES TROUBLES ANXIEUX. 114
1. La comorbidité anxio-dépressive 114
2. La résilience 116

MATÉRIELS ET MÉTHODES 155
1. Animaux 156
2. Molécules et traitements 157
3. Manipulations in vivo 161
3.1. Études des performances liées à l'émotion chez la Souris 161
3.1.1. Tests prédictifs d'un phénotype ou d'une activité de type anxiolytique 161
3.1.2. Tests prédictifs d'un phénotype ou d'une activité de type antidépressive 163
3.1.3. Tests prédictifs d'un phénotype ou d'une activité mixte 163
3.2. Technique de stéréotaxie chez la Souris 164
3.3. Étude d'électrophysiologie intracérébrale chez la Souris anesthésiée 167
3.3.1. Principe 167
3.3.2. Enregistrements extracellulaires de l'activité électrique des neurones sérotoninergiques du noyau du raphé dorsal 168
3.4. Étude d'optogénétique couplée au comportement la souris vigile 170
3.4.1. Principe 170
3.4.2. Expression neuronale des opsines chez la souris 175
3.4.3. Construction des fibres optiques 178
3.4.4. Stimulation lumineuse 180
3.4.5. Vérification de l'expression des opsines 181

4. Manipulations ex vivo 182
4.1. Mesure de la concentration en sérotonine par ELISA 182
4.2. Cartographie de l'expression d'ARNm par hybridation *in situ* 183
5. Analyses statistiques 184

RÉSULTATS EXPÉRIMENTAUX 185

ARTICLE 2 : Rapid anxiolytic effects of 5-HT$_4$ receptor agonist involves prefrontal cortex-brainstem neural circuit recruitment 188

Résultats complémentaires 241

ARTICLE 3 : Ketamine as a Prophylactic Against Stress-Induced Depressive-Like Behavior 251

Résultats complémentaires 303

DISCUSSION GÉNÉRALE 308

1. La stimulation aiguë, par voie systémique, du récepteur 5-HT$_4$ induit un effet de type anxiolytique rapide chez la souris anxieuse BALB/cJRj mâle. 310
2. L'activation aiguë du récepteur 5-HT$_4$ dans le CPF$_m$ et l'HPC$_v$ participe aux effets de type anxiolytique rapide chez la souris anxieuse BALB/cJRj mâle. 313
3. Le circuit CPF$_m$-NRD est un carrefour nécessaire mais non suffisant à l'activité anxiolytique rapide du RS 67333. 316
4. Mise en place d'un modèle murin pour l'étude des effets prophylactiques de molécules 325
5. L'administration chronique par voie systémique de RS67333 prévient l'apparition du phénotype anxio-dépressif induit par un traitement chronique par corticostérone. 327
6. La stimulation aiguë, par voie systémique, du récepteur 5-HT$_4$ est responsable d'effets qui perdurent dans le temps. 329

CONCLUSION & PERSPECTIVES 332

Liste des figures

FIGURE 1. Distribution de la sévérité des troubles anxieux dans la population américaine adulte (gauche) et adolescente (droite) selon les données issues de la National Comorbidity Survey-Replication (NCS-R).....27
FIGURE 2. Symptômes des troubles anxieux.....29
FIGURE 3. Arbre décisionnel pour la prise en charge d'un trouble anxieux.....38
FIGURE 4. Mécanisme d'action des benzodiazépines.....43
FIGURE 5. Mécanisme d'action des inhibiteurs de la recapture de la sérotonine (à gauche) et de la noradrénaline (à droite).....47
FIGURE 6. Vue de face des divisions fonctionnelles du cortex préfrontal chez l'Homme.....60
FIGURE 7. Structure du cortex préfrontal chez le rongeur.....61
FIGURE 8. Structure de l'amygdale chez le rongeur.....72
FIGURE 9. Structure de l'hippocampe ventral chez le rongeur.....77
FIGURE 10. Structure du noyau du raphé dorsal.....82
FIGURE 11. Symptômes des troubles de l'humeur régulés par leurs monoamines.....86
FIGURE 12. Structure des récepteurs GABAergiques.....89
FIGURE 13. Récepteurs sérotoninergiques et leur rôle dans les troubles de l'humeur.....92
FIGURE 14. Localisation cérébrale du récepteur 5-HT_4 chez l'Homme (en haut) et chez le Rongeur (en bas).....97
FIGURE 15. Représentation bidimensionnelle du récepteur 5-HT_4.....100
FIGURE 16. Manifestation de la réponse physiologique, susceptibilité et résilience au cours d'un stress.....117
FIGURE 17. Souris BALB/cJRj.....156
FIGURE 18. Souris C57BL/6JRj.....156
FIGURE 19. Open Field.....161
FIGURE 20. Elevated Plus Maze.....162
FIGURE 21. Splash Test.....163
FIGURE 22. Novelty Suppressed Feeding.....164
FIGURE 23. Placement de l'animal dans un cadre stéréotaxique et repères stéréotaxiques en vue d'une injection ou d'une implantation intracérébrale.....165

FIGURE 24. Schéma des différents implants utilisés pour la stéréotaxie. 167
FIGURE 25. Placement de l'électrode mesurant l'activité électrique extracellulaire d'un neurone. 169
FIGURE 26. Contrôle par optogénétique des influx électriques neuronaux par l'utilisation de pompes ou canaux photosensibles. 173
FIGURE 27. Stratégies d'expression des opsines utilisées en optogénétique chez la souris. 177
FIGURE 28. Protocole de fabrication des optrodes. 179
FIGURE 29. Schéma du couplage de l'optogénétique avec l'EPM chez la souris 180
FIGURE 30. Distribution de l'ARNm du récepteur 5-HT_4 dans le cerveau de souris BALB/cJRj. 242
FIGURE 31. Le blocage du récepteur 5-HT_4 prévient partiellement les effets anxiolytiques rapides induits par une administration intracorticale de diazépam chez la souris BALB/cJRj. 244
FIGURE 32. Une stimulation aigue du récepteur 5-HT_4 dans l'hippocampe ventral induit des effets anxiolytiques rapides chez la souris BALB/cJRj anxieuse. 246
FIGURE 33. Une stimulation aigue du récepteur 5-HT_4 induit un effet anxiolytique chez la souris BALB/cJRj anxieuse. 249
FIGURE 34. La stimulation chronique du récepteur 5-HT_4 prévient le développement des comportements de type anxieux et dépressif induits par la corticostérone chez la souris C57BL/6JRj. 305
FIGURE 35. La stimulation unique du récepteur 5-HT_4 pourrait induire des effets de type anxiolytique et antidépresseur à long-terme chez la souris BALB/cJRj. 307
FIGURE 36. Hypothèse d'un circuit partagé entre le diazépam et le RS 67333, malgré des cibles pharmacologiques différentes..... 320

Liste des tableaux

TABLEAU 1. Taux de prévalence des troubles anxieux, exprimé en nombre total de cas recensés sur une période de 12 mois à partir des différents échantillons de population depuis les années 1980 jusqu'à 2010 rapporté au nombre de sujets de la population étudiée. 24

TABLEAU 2. Échelles d'évaluation de l'anxiété utilisées en clinique chez l'adulte, l'enfant et l'adolescent. 26

TABLEAU 3. Modélisation des symptômes anxieux chez le rongeur. 34

BOX 1. Principaux tests comportementaux utilisés chez le rongeur pour évaluer un phénotype anxieux. 35

TABLEAU 4. Les benzodiazépines utilisées dans le traitement des troubles anxieux. 45

TABLEAU 5. Les antidépresseurs utilisés dans le traitement des troubles anxieux. 50

TABLEAU 6. Les autres molécules utilisées dans le traitement des troubles anxieux..... 54

TABLEAU 7. Comparaison de l'efficacité des traitements pharmacologiques et non pharmacologiques utilisés dans les troubles anxieux..... 55

BOX 2. Les traitements pharmacologiques et non pharmacologiques des troubles anxieux. 58

TABLEAU 8. Résumé des dysfonctions fonctionnelles du cortex prefrontal dans les troubles anxieux. 65

TABLEAU 9. Effets biologiques et comportementaux d'une modulation de l'activité du cortex préfrontal chez l'animal..... 69

TABLEAU 10. Résumé des dysfonctions de l'amygdale dans les troubles anxieux. 73

TABLEAU 11. Liste des principaux ligands du 5-HT_4 disponibles dans les années 2000..... 102

TABLEAU 12. Conséquences d'un traitement unique ou chronique avec des ligands du récepteur 5-HT_4 sur le phénotype anxieux. 105

TABLEAU 13. Aperçu des essais cliniques menés avec des agonistes du récepteur 5-HT4... 112

TABLEAU 14. Association des troubles anxieux avec les épisodes dépressifs caractérisés. .114

TABLEAU 15. Affinités des différents ligands pour les récepteurs 5-HT_4 et $GABA_A$ 160

TABLEAU 16. Coordonnées des différentes régions cibles selon l'Atlas du cerveau de souris en fonction de la technique utilisée a posteriori. 166

TABLEAU 17. Propriétés pharmacologiques, cinétiques et spectrales des opsines utilisées en optogénétique 171
TABLEAU 18. Virus utilisés dans les expériences d'optogénétique. 176
TABLEAU 19. Résumé des résultats comportementaux après une administration par voie systémique. 312
TABLEAU 20. Résumé des résultats comportementaux après administration locale en fonction de la structure étudiée. 314
TABLEAU 21. Résumé des résultats comportementaux (issus de la littérature) obtenus après modulation par optogénétique des différents circuits impliqués dans l'anxiété. 324
TABLEAU 22. Résumé des résultats comportementaux suite à l'administration des traitements avant et après l'exposition à un stress 328

Résumé

Les troubles anxieux constituent des désordres psychiatriques fréquents et invalidants mais heureusement sensibles aux traitements disponibles sur le marché, tels que les benzodiazépines (BZD) ou les antidépresseurs. En dépit de leur efficacité après une administration unique, les BZD ne sont plus indiquées en première intention dans le traitement des troubles anxieux, ce sont désormais les antidépresseurs, notamment les inhibiteurs sélectifs de la recapture de la sérotonine (ISRS), qui les ont remplacées. Néanmoins le développement de nouvelles stratégies est un problème de santé majeur, puisque l'efficacité des traitements antidépresseurs est limitée par un long délai d'action thérapeutique et surtout un nombre important de patients non répondeurs ou résistants. Le besoin de mettre au point de nouvelles molécules est d'autant plus urgent que récemment, il a été démontré que les BZD étaient plus efficaces que les antidépresseurs pour réduire les symptômes du TAG (Gomez *et al.*, 2018).

De ce fait, la compréhension des mécanismes impliqués dans la réponse anxiolytique rapide devrait offrir de nouvelles opportunités thérapeutiques. Il se pourrait que le récepteur 5-HT_4 soit une cible à privilégier dans ce domaine, puisqu'une administration chronique d'un agoniste du récepteur 5-HT_4, le RS 67333, induit des effets anxiolytiques chez le rat (Pascual-Brazo *et al.*, 2012), mais aussi corrige le phénotype anxio-dépressif induit par la corticostérone chez la souris C57BL/6 (Mendez-David *et al.*, 2014). De plus, le récepteur 5-HT_4 est majoritairement exprimé dans les régions limbiques du cerveau (Vilaro *et al.*, 2005), et notamment sur les neurones pyramidaux du cortex préfrontal médian (CPF_m), dont les terminaisons se projetant sur le noyau du raphé dorsal (NRD), ont été montrées pour jouer un rôle dans la régulation des troubles de l'humeur (Lucas *et al.*, 2005; Warden *et al.*, 2012; Jean *et al.*, 2017). Dès lors, ce travail avait pour but d'évaluer d'une part, les effets anxiolytiques du RS 67333, dans un modèle de souris anxieuse BALB/cJRj, après une administration aiguë, et d'autre part, d'estimer le rôle du circuit cortex-raphé dans la réponse anxiolytique rapide du RS 67333. Nos résultats rapportent que la stimulation unique du récepteur 5-HT_4 provoque une réponse anxiolytique rapide, en partie expliquée par l'activation du circuit cortex-raphé, de manière nécessaire mais non suffisante (**Article 2**).

Les troubles anxieux constituent un facteur de risque majeur dans le développement des pathologies dépressives. Traiter rapidement et à long-terme les symptômes anxieux permettrait de prévenir l'apparition des premiers symptômes de dépression, ainsi qu'une meilleure prise en charge des EDC, d'autant plus que la comorbidité anxieuse favorise la résistance au traitement antidépresseur chez ces patients (Baldwin, 2009). De plus, la majorité des personnes faisant face à des événements défavorables ou stressant au quotidien ne développe pas de troubles psychiatriques (**Article 1**). Il est donc primordial de comprendre les facteurs neurobiologiques qui caractérisent cette résilience et d'identifier des cibles thérapeutiques, qui pourraient potentiellement favoriser une telle résilience. Dans un premier temps, ce travail avait pour objectif d'établir un modèle murin de résilience (**Article 3**), puis dans un deuxième temps, de tester dans ce modèle, les effets prophylactiques du RS 67333 (**Brevet provisionnel en partenariat avec Columbia University, NYC, USA** ; **rapport d'invention #CU19088**). Nos résultats révèlent que contrairement à la fluoxétine, la kétamine et le RS 67333 sont capables d'induire des effets protecteurs à long-terme contre les effets comportementaux néfastes, induits par un stress de défaite sociale ou par un traitement chronique par corticostérone.

INTRODUCTION

CHAPITRE 1 - LA PATHOLOGIE DES TROUBLES ANXIEUX

1. Épidémiologie

Selon un rapport récent de l'Organisation Mondiale de la Santé (OMS), les troubles mentaux sont en recrudescence dans le monde entier. On estime que 38.2% de la population européenne souffre chaque année d'un trouble mental, soit environ 164.8 millions de personnes affectées (Wittchen *et al.*, 2011). Bien qu'il soit difficile de trouver des preuves fiables de ce changement du aux imprécisions dans les données épidémiologiques obtenues avant l'introduction du système de classification psychiatrique par le manuel diagnostique et statistique des troubles mentaux (DSM), le nombre de personnes souffrant d'épisode dépressif caractérisé (EDC) et/ou de troubles anxieux a augmenté de près de 50% dans le monde, entre 1990 et 2013. Les enquêtes épidémiologiques menées auprès d'un large bassin de population ont cependant permis de classer les troubles anxieux comme les désordres psychiatriques les plus fréquents au cours de la vie, juste devant les troubles de l'humeur, touchant ainsi plus de 33.7% de la population mondiale (Bandelow & Michaelis, 2015).

Selon l'étude de 2015 de Bandelow et Michaelis, regroupant les principales données issues des plus grandes études épidémiologiques nationales et internationales (**Tableau 1**), il est difficile d'estimer avec précision la prévalence des troubles anxieux (Bandelow & Michaelis, 2015). Ceci s'explique par des différences de méthodologies entre chaque étude (utilisation des critères diagnostiques, collecte des données, types d'interview), mais aussi par des divergences culturelles, ethniques ou de population cible de l'échantillon étudié. L'approche multimodale de Wittchen, fondée sur 19 études cliniques comprenant plus de 150 000 sujets de 30 pays européens, a permis d'estimer la prévalence annuelle des troubles anxieux en Europe à 14% (Wittchen *et al.*, 2011). Parmi les troubles anxieux, la phobie spécifique est la plus courante avec un taux de prévalence au cours de la vie de 6.4%. Le

trouble panique, le trouble anxieux généralisé, l'agoraphobie et le trouble d'anxiété sociale ont quant à eux, une prévalence allant de 1.7 à 2.3% (**Tableau 1**).

Bien que longtemps classés dans les troubles anxieux, le trouble obsessionnel compulsif (TOC) et l'état de stress post-traumatique (ESPT) possèdent désormais leur propre classe depuis la dernière édition du DSM-V (Association, 2013). Ces troubles atteignent respectivement, 0.7 et 0.7 à 2.5% de la population européenne chaque année (**Tableau 1**).

Tableau 1. *Taux de prévalence des troubles anxieux, exprimé en nombre total de cas recensés sur une période de 12 mois à partir des différents échantillons de population depuis les années 1980 jusqu'à 2010 rapporté au nombre de sujets de la population étudiée.*

Troubles anxieux	NCS-R (USA)[1] n = 9 282	ESEMed (Europe)[1] n = 21 425	Wittchen et al., 2011 (Europe)[2]
Troubles anxieux	21.3	8.4	14
Trouble panique	3.1	0.7	1.8
Trouble anxieux généralisé	2.9	0.9	1.7
Agoraphobie	1.7	0.3	2.0
Trouble d'anxiété sociale	8.0	1.6	2.3
Phobie spécifique	10.1	5.4	6.4
Trouble obsessionnel compulsif			0.7
Trouble de stress post-traumatique			0.7-2.5

Abréviations *: ESEMed : European Study of the Epidemiology of Mental Disorders ; NCS-R : National Comorbidity Survey-Replication.*

D'après : (Bandelow & Michaelis, 2015)[1] & (Wittchen et al., 2011)[2]

Les troubles anxieux représentent un fardeau économique et humanistique considérable dans le monde. Dans les années 1990, l'analyse des données issues de la *National Comorbidity Survey* (NCS-R) a estimé ce fardeau à environ 42,3 milliards de dollars par an aux États-Unis, puis à 63,1 milliards de dollars 8 ans plus tard, soit un coût moyen annuel par patient souffrant de troubles anxieux de 1542 $ (Greenberg *et al.*, 1999).

2. Diagnostic clinique

Le DSM-V est l'ouvrage de référence développé par l'Association américaine de psychiatrie qui décrit et classifie les troubles mentaux selon différents symptômes physiques, comportementaux et cognitifs pour permettre aux cliniciens d'homogénéiser les diagnostics. L'OMS propose également une classification des troubles mentaux et des troubles du comportement dans sa Classification Internationale des Maladies (CIM-11) (santé, 2018). Cependant le manque de spécificité des symptômes rend le diagnostic différentiel relativement complexe, surtout que la survenue d'autres troubles de l'humeur, en particulier la présence de comorbidité anxieuse chez les patients atteints d'EDC, est courante au cours de l'évolution de la maladie (Wittchen *et al.*, 2011).

Les troubles anxieux sont d'autant plus difficiles à diagnostiquer qu'ils représentent un phénomène subjectif et que les patients font rarement la démarche de consulter un spécialiste. Le recours à un professionnel de santé est souvent déclenché, non pas par l'apparition des symptômes psychiques, mais par l'apparition de troubles du sommeil, de tensions musculaires, de dyspepsies, de fatigue ou encore d'irritabilité. Pourtant, les dysfonctionnements cognitifs précèdent l'apparition des manifestations somatiques anxieuses (Baldwin *et al.*, 2012).

Il est possible d'évaluer le degré d'anxiété chez un individu grâce à différentes échelles d'évaluation couramment utilisées en clinique (Balon, 2007). Le **Tableau 2** reprend les échelles d'évaluation les plus connues, applicables à tous les troubles anxieux ou à un trouble spécifique. Certaines de ces échelles peuvent être directement utilisées par le patient, alors que d'autres requièrent l'intervention du clinicien. L'échelle d'anxiété d'Hamilton (HAM-A) reste l'un des outils le plus utilisé parmi tous ceux disponibles. Ce questionnaire regroupe 14 items évaluant quantitativement de 0 à 4 points, la sévérité des symptômes psychiques et des atteintes somatiques associées. Une personne est diagnostiquée comme anxieuse dès que son score dépasse « 14 ».

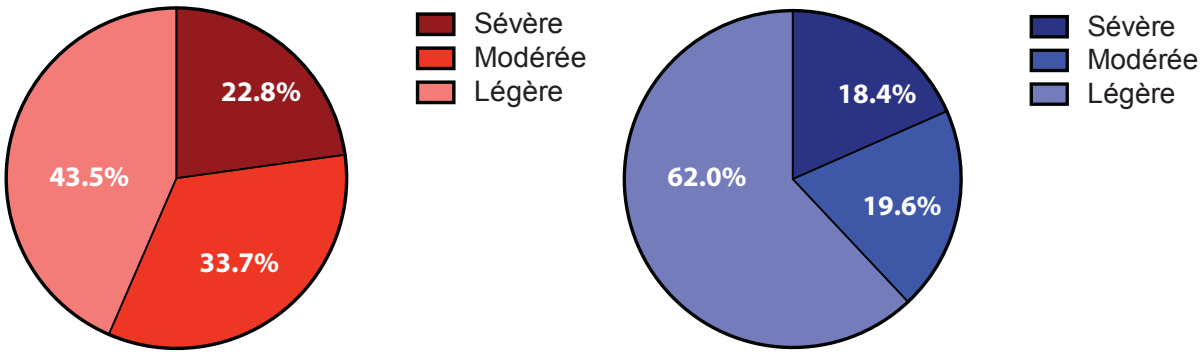
Tableau 2. *Échelles d'évaluation de l'anxiété utilisées en clinique chez l'adulte, l'enfant et l'adolescent.*

Noms	Score
Échelles généralistes	
Échelle d'anxiété d'Hamilton (HAM-A)	<17 : anxiété légère 18-24 : anxiété modérée 25-30 : anxiété sévère
Échelle d'anxiété et de dépression en milieu hospitalier (HADS)	<7 : absence de symptomatologie 8-10 : symptomatologie douteuse >11 : symptomatologie certaine
Échelle d'invalidité de Sheehan (SDS)	0 : pas d'incapacité fonctionnelle 30 : incapacité fonctionnelle
Échelle d'anxiété de Covi	>15 : anxiété sévère
Inventaire d'anxiété de Beck	56-65 : anxiété modérée 81-95 : anxiété sévère
Inventaire d'anxiété état-trait de Spielberger (STAI)	36-45 : anxiété légère 46-55 : anxiété modérée 56-65 : anxiété sévère
Échelle d'incapacité et de gravité de l'anxiété (OASIS)	
Échelles appliquées	
Questionnaire sur les inquiétudes de Penn State (PSWQ) Échelle de phobie sociale de Liebowitz (LSAS), Questionnaire pour les patients phobiques (FSS-III)	
Échelles appliquées aux enfants et aux adolescents	
Échelle d'évaluation globale des enfants (CGAS)	

D'après (Balon, 2007)

Ces échelles permettent de distinguer 3 types d'anxiété allant de légère à sévère. Selon l'HAM-A, pour un score inférieur à « 17 », on parlera d'anxiété légère, de « 18 à 24 », d'anxiété modérée et supérieur à « 25 », d'anxiété sévère. Les données issues de la *National Comorbidity Survey-Replication* indiquent que la majorité des adultes et des adolescents atteints de troubles anxieux éprouvent une anxiété légère (**Figure 1**). Parmi les adultes atteints de troubles anxieux, l'échelle d'invalidité de Sheehan estime que 22.8% souffrent d'anxiété sévère et 33.7% d'anxiété modérée. Cette différence est bien moins marquée chez les adolescents, où l'échelle d'évaluation globale des enfants a permis de déterminer que 18.4% des adolescents souffrent d'anxiété sévère et 19.6% d'anxiété modérée (Kessler *et al.*, 2012).

Figure 1. *Distribution de la sévérité des troubles anxieux dans la population américaine adulte (gauche) et adolescente (droite) selon les données issues de la National Comorbidity Survey-Replication (NCS-R).*



Adapté de (Kessler et al., 2005)

3. Signes et symptômes

Bien que les réponses émotionnelles et physiques soient similaires dans les trois états, il existe des différences plus ou moins subtiles entre le stress, la peur et l'anxiété, comme suggéré par la classification du DSM-V qui distingue les troubles anxieux des troubles liés à la peur. Toutefois, la peur et l'anxiété sont étroitement liées, l'une pouvant déclencher l'autre. C'est par exemple le cas dans l'ESPT, où une peur passée peut déclencher une anxiété présente.

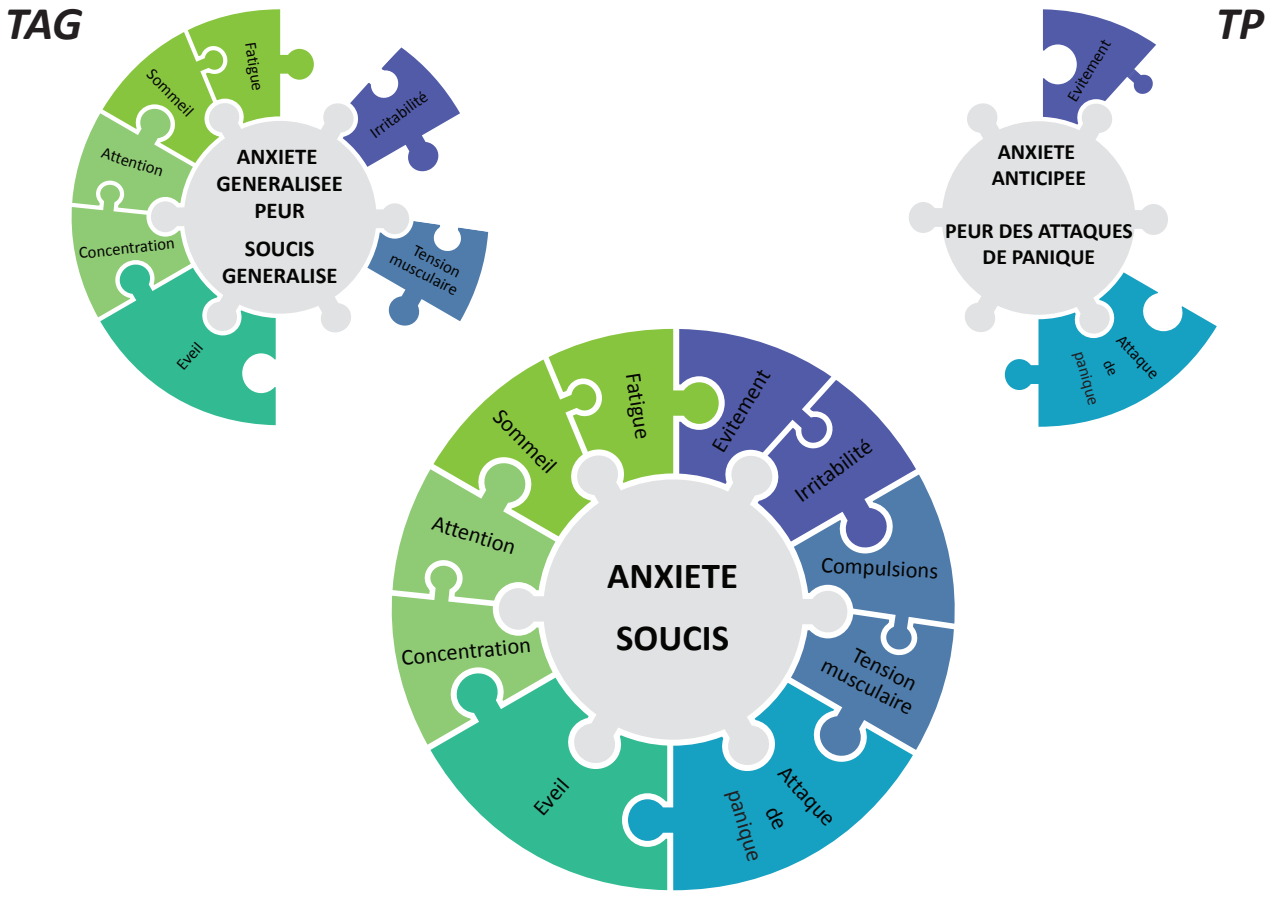
Stress	Réaction réflexe de l'organisme en réponse à une situation inattendue ou dangereuse.
Peur	Réaction de l'organisme pour rester en sécurité en répondant au danger.
Anxiété	Réaction de l'organisme pour rester en sécurité en prévoyant le danger.

Le stress constitue la réaction réflexe de l'organisme, tant sur le plan physiologique que psychologique en réponse à une menace externe inattendue et difficile de la vie quotidienne, comme par exemple un décès ou des difficultés financières. La peur est considérée comme la réponse émotionnelle à une menace imminente et définie, réelle ou perçue. La peur représente ainsi la tentative de rester en sécurité en répondant au danger et en forçant le corps à agir soit en faisant face à la menace par le déclenchement du combat, soit en évitant cette menace par le déclenchement du mécanisme de fuite (Grillon, 2008). Cette réponse, en anglais *fight-or-flight,* est associée à des changements physiques (hyperventilation, tachycardie, hypersudation). L'anxiété, quant à elle, constitue la réponse émotionnelle suite à l'anticipation d'une menace future, imprécise ou inconnue. L'anxiété, lorsqu'elle est temporaire, est une émotion considérée comme normale. Cet affect émotionnel est nécessaire et doit être ressenti par chacun, à n'importe quel moment de la vie, pour permettre de maintenir un état d'alerte face à une situation dangereuse en préparant le corps à agir et à faire face à la menace par la fuite ou le combat (Steimer, 2002). Cette séquence débute par une immobilisation subite, en anglais, *freezing*, associée à la peur mais permettant la survie dans certaines situations.

Cependant l'anxiété peut devenir pathologique quand l'exposition à un stress crée un sentiment prolongé et incontrôlable de peur disproportionnée, d'inquiétude irrationnelle ou même encore de souffrance. Selon le trouble anxieux concerné, les symptômes peuvent commencer dès l'enfance (phobie spécifique), à l'adolescence (trouble d'anxiété sociale) ou au début de l'âge adulte (agoraphobie, trouble panique, trouble anxieux généralisé) et tendent à diminuer avec l'âge. Selon la NCS-R, on estime la moyenne d'apparition des premiers symptômes à l'âge de 11 ans (Kessler *et al.*, 2005). Approximativement, il semblerait que les femmes soient deux fois plus sujettes aux troubles anxieux que les hommes (Bandelow & Michaelis, 2015).

Il existe différents types de troubles anxieux : le trouble panique (TP), le trouble anxieux généralisé (TAG), l'agoraphobie, le trouble d'anxiété sociale (TAS) ou la phobie spécifique. Le terme « troubles anxieux » décrit une gamme de phénotypes multidimensionnels et bien que ces troubles diffèrent les uns des autres, ils présentent néanmoins quelques traits communs invalidants tels qu'une peur irrationnelle et excessive, un sentiment d'appréhension impossible à surmonter ainsi que de la difficulté à accomplir les tâches de la vie quotidienne (**Figure 2**).

Figure 2. *Symptômes des troubles anxieux*



Les troubles anxieux partagent tous des symptômes fondamentaux comme la peur, les soucis et l'inquiétude, mais chaque trouble anxieux possède aussi des symptômes qui lui est propre.

Adapté de (Stahl, 2013)

3.1. Le trouble anxieux généralisé

Le TAG est décrit par le DSM-V comme la présence d'inquiétudes et/ou de soucis excessifs, persistants et incontrôlables concernant un certain nombre d'événements ou d'activités pendant une période d'au moins six mois (**Figure 2**). En plus de l'anxiété et de la contrariété, le patient doit présenter au moins trois des symptômes somatiques suivants :

1. Agitation et/ou nervosité	2. Irritabilité	3. Fatigue excessive ou perturbation du sommeil
4. Difficulté à se concentrer et/ou trouble de la mémoire	5. Tension musculaire	

Une étude clinique menée chez 6 patients caucasiens, 3 hommes et 3 femmes atteints de TAG sévère (41 < STAI < 57]) a mis en évidence que ces patients répondaient de manière excessive non pas seulement à des stimuli de peur (« je vais perdre mon emploi »), mais aussi à des stimuli neutres (« il fait beau aujourd'hui »). Ceci démontre que les patients souffrant de TAG tendent à mal interpréter voire exagérer les signaux internes ou externes (Hoehn-Saric *et al.*, 2004).

3.2. Le trouble panique

Selon le DSM-V, Les personnes atteintes de TP manifestent des attaques de panique récurrentes, définies par l'occurrence soudaine d'une appréhension intense qui atteint un pic en quelques minutes. Le DSM-V distingue les attaques de panique attendues, associées à une peur spécifique, des attaques de panique inattendues, ne possédant aucun déclencheur ou signal apparent.

Une attaque de panique est considérée comme telle, si au moins quatre ou plus, des symptômes suivants se produisent :

1. Palpitations ou accélération du rythme cardiaque	2. Transpiration	3. Tremblement
4. Sensation d'essoufflement ou d'étouffement	5. Douleur thoracique ou malaise	6. Nausées
7. Sensation d'étourdissement	8. Frissons ou sensation de chaleur	9. Paresthésies
10. Sentiment d'irréalité ou de dépersonnalisation	11. Sentiment de perdre le contrôle ou de « devenir fou »	12. Peur de mourir

En plus de ces symptômes, l'attaque de panique doit être suivie par une période d'au moins un mois d'inquiétude permanente concernant le fait de subir une nouvelle attaque de panique.

3.3. L'agoraphobie

Le DSM-V définit l'agoraphobie comme la peur de se retrouver dans des situations ou des lieux d'où il serait difficile de s'échapper. Cette angoisse est aussi fondée sur la peur de ne pouvoir trouver de l'aide facilement pour être secouru. Les individus sujets à l'agoraphobie craignent de se retrouver dans une situation réelle ou anticipée, comme quitter seul le domicile, utiliser les transports en commun, être dans des espaces ouverts ou fermés, faire la queue ou être dans une foule.

3.4. Le trouble d'anxiété sociale

Selon le DSM-V, les personnes souffrant de TAS, communément appelé phobie sociale, ont une peur marquée des situations sociales ou de performances dans lesquelles elles s'attendent à se sentir embarrassées, jugées ou rejetées par autrui. Dans ces conditions, les situations sociales sont évitées ou endurées avec une peur et une détresse intenses, qui se manifestent physiquement par un rougissement, une sudation intense, une asialie, des

tremblements et des nausées. Les peurs liées aux performances affectent généralement la vie professionnelle qui exige la prise de parole régulière en public et perturbent sérieusement les relations avec les autres.

3.5. La phobie spécifique

Le critère diagnostique de la phobie spécifique comme expliqué dans le DSM-V se caractérise par une peur intense, irrationnelle et persistante d'un objet ou d'une situation qui ne présente que peu voire aucun danger réel. L'objet ou la situation phobique qu'elle soit perceptible ou anticipée provoque immédiatement un sentiment de peur et d'anxiété intense. Le DSM-V classe la phobie spécifique en 5 catégories en fonction du stimulus phobique : la phobie ayant trait aux animaux (arachnophobie), à l'environnement naturel (acrophobie), aux sang/injections/blessures (hématophobie), à certaines situations (claustrophobie) ou à d'autres types (émétophobie).

4. Modélisation des symptômes anxieux chez la souris

Dans un souci d'amélioration constante de la qualité des soins apportés aux patients anxieux et dans le but de développer de nouveaux traitements toujours plus efficaces, de nombreux tests comportementaux relatifs à un phénotype anxieux sont couramment utilisés en préclinique chez les rongeurs. L'utilisation de ces tests permet à la fois d'apporter des connaissances sur les mécanismes à la base de la pathologie mais aussi de cribler de nouveaux composés.

Tous ces tests doivent présenter une validité prédictive c'est-à-dire être sensibles aux agents pharmacologiques qui réduisent l'anxiété chez l'homme tant sur le plan comportemental que physiologique, une validité théorique où les causes sous-jacentes de l'anxiété, à savoir les processus neurobiologiques, chez l'homme et chez l'animal sont équivalentes et enfin une validité phénoménologique ou apparente, c'est-à-dire qu'ils doivent pouvoir reproduire la condition humaine en induisant les symptômes de la pathologie (Belzung & Lemoine, 2011).

Validité prédictive	Capacité à comprendre un critère d'intérêt, un phénomène humain, à partir des performances du modèle (réponse thérapeutique)
Validité théorique	Similarité des conditions déclenchantes de la pathologie (étiologie)
Validité apparente	Similarité dans les symptômes produits (symptomatologie)

La validité apparente est souvent subjective car certains des aspects importants des troubles anxieux chez l'Homme, comme la présence d'inquiétude ou de soucis, restent inaccessibles chez l'animal. Cette dernière approche comportementale peut ainsi être contestée, en particulier de par la nature hétérogène des symptômes des troubles anxieux et des critères diagnostiques associés. Cependant, Cryan et Holmes (Cryan & Holmes, 2005) ont décrit qu'il était possible de modéliser chez les rongeurs certains des symptômes spécifiques des troubles anxieux retrouvés en clinique avec l'utilisation de paradigmes basés sur l'exploration spontanée (*Open Field, Elevated Plus Maze, Light-Dark Test, Hole-Board Test*), sur la peur conditionnée ou apprise (*Vogel Conflict Test, exposition à un prédateur, Fear Conditionning Test*) ou encore sur une situation de motivation conflictuelle (*Novelty Suppressed Feeding, Social Interaction Task*) (**Tableau 3**).

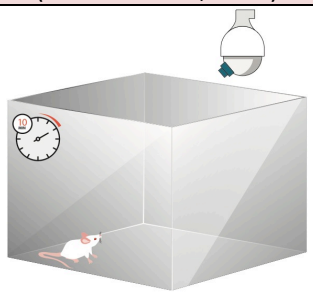
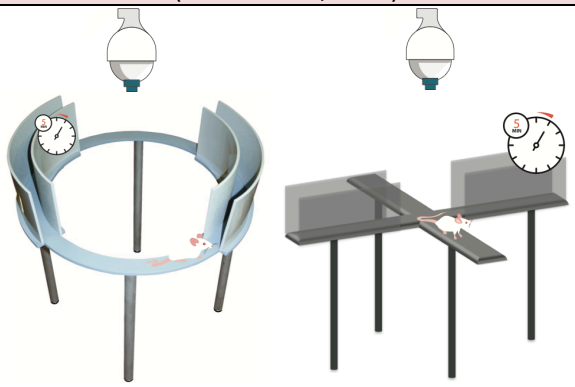
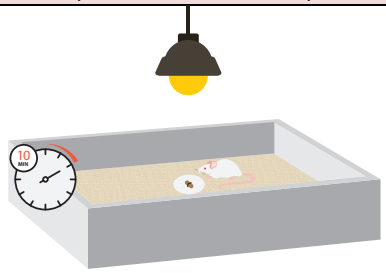
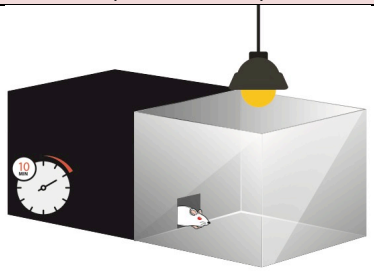
Tableau 3. *Modélisation des symptômes anxieux chez le rongeur.*

Troubles anxieux	Symptômes (DSM-IV)	Paradigmes	Phénotype chez la souris
TP	Sentiment de perdre le contrôle, peur de mourir	Non modélisable	-
TP	Tachycardie, transpiration	Radiotélémétrie, SIH	- ↑ rythme cardiaque pendant le stress - ↑ température rectale
TP	Apparition soudaine de peur intense	Resident intruder	- ↑ fuite face au prédateur
TAG	Inquiétudes et/ou soucis excessifs	USV	- ↑ vocalisations
TAG	Agitation et/ou nervosité	Resident intruder	- ↑ agressivité (combat, morsure, frétillement caudal)
TAG	Fatigue excessive ou perturbation du sommeil	Actimétrie, EEG	- Architecture anormale du sommeil
TAG	Difficulté à se concentrer et/ou trouble de la mémoire	Barnes Maze, Morris Water Maze, Y Maze, NOR	- ↓ apprentissage - ↓ mémorisation spatiale - ↓ attention
Agoraphobie, TP, TAG	Éviter les situations d'où il serait difficile de s'échapper	OF, LDT, NSF, EPM/EZM/ETM, HBT	- ↑ évitement des régions inconnues, exposées et bien éclairées
TAS	Apparition d'une peur induite par une situation sociale	SIT, SFC	- ↓ interaction sociale avec un concitoyen non familier - ↑ freezing, ↑ enfouissement
Phobie spécifique	Apparition d'une peur intense provoquée par un objet ou une situation	VCT, FC, FPT	- comportement d'évitement exagéré face au stimulus aversif
ESPT	Revivre un événement traumatisant avec évitement de la situation qui rappelle l'événement	FC	- ↑ freezing dans un contexte de réexposition à un signal
TOC	Comportements répétitifs, irraisonnés et irrépressibles	Marble burying	- ↑ enfouissement - ↑ toilettage

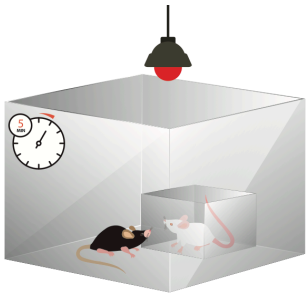
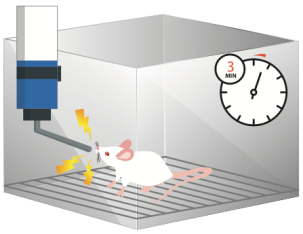
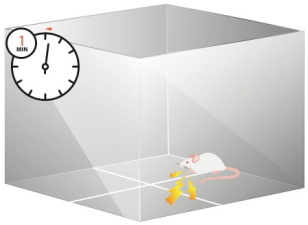
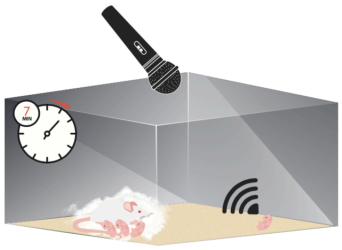
Abréviations *: ↓ : diminution, ↑ : augmentation, EEG : electroencéphalographie, EPM/EZM/ETM : Elevated Plus/Zero/T Maze, ESPT : état de stress post-traumatique ; FC : Fear Conditioning, FPT : Four-Plate Test, HBT : Hole-Board Test, LDT : Light/Dark Test, OF : Open Field, SFC : Social Fear Conditioning, SIT : Social Interaction Task, SIH : Stress-Induced Hyperthermia, TAG : trouble anxieux généralisé, TAS : trouble d'anxiété sociale, TOC : trouble obsessionnel compulsif, TP : trouble panique, USV : UltraSonic Volcalizations, VCT : Vogel Conflict Test.*

D'après (Cryan & Holmes, 2005)

BOX 1. *Principaux tests comportementaux utilisés chez le rongeur pour évaluer un phénotype anxieux.*

Open Field (OF) (Gentsch et al., 1981)	**Elevated Zero/Plus Maze (EZM/EPM)** (Pellow et al., 1985)
 Principe : évaluer le comportement exploratoire et l'activité locomotrice générale des animaux dans un nouvel environnement. Durée : 10 ou 30 minutes. Paramètres mesurés : temps passé et nombre d'entrées dans le centre de l'arène, distance ambulatoire. Interprétation : une diminution du temps passé dans le centre de l'arène sans modification de la locomotion traduit un phénotype anxieux.	 Principe : évaluer le comportement exploratoire des animaux dans un nouvel environnement aversif, non protégé, lumineux et en hauteur. Durée : 5 minutes. Paramètres mesurés : temps passé et nombre d'entrées dans les bras ouverts, ratio de la distance parcourue dans les bras ouverts/distance totale. Interprétation : une diminution du temps passé dans les bras ouverts sans modification de la locomotion traduit un phénotype anxieux.
Novelty Suppressed Feeding (NSF) (Bodnoff et al., 1988)	**Light/Dark Exploration Test (LDT)** (Aulich, 1976)
 Principe : évaluer l'anxiété induite par un stress de sevrage alimentaire (24 heures) en mesurant l'aversion des animaux pour se nourrir dans un nouvel environnement lumineux. Durée : 5 à 10 minutes maximum selon les souches Paramètres mesurés : latence pour se nourrir dans le nouvel environnement et dans l'environnement familier, quantité de nourriture consommée en environnement familier. Interprétation : une augmentation de la latence à se nourrir dans l'environnement aversif, sans modification de la consommation de nourriture dans l'environnement familier, traduit un phénotype anxieux.	 Principe : évaluer le comportement exploratoire des animaux dans un nouvel environnement aversif et lumineux. Durée : 5 minutes. Paramètres mesurés : temps passé et nombre d'entrées dans le compartiment lumineux, nombre de transitions entre les deux compartiments, temps passé à évaluer le risque. Interprétation : une diminution du temps passé et du nombre d'entrées dans le compartiment lumineux accompagnée d'une diminution du nombre de transitions entre les deux compartiments traduit un phénotype anxieux.

BOX 1. *Principaux tests comportementaux utilisés chez le rongeur pour évaluer un phénotype anxieux (suite).*

Social Interaction Task (SIT) (Nadler et al., 2004)	**Vogel Conflict Test (VCT)** (Vogel et al., 1971)
 Principe : évaluer l'interaction avec un congénère étranger dans un nouvel environnement. Durée : 2 x 2,5 minutes. Paramètres mesurés : temps d'interaction avec le congénère, durée et fréquence des comportements caractéristiques (sniffing, grooming, attaques, morsures). Interprétation : une diminution de l'interaction sociale avec le congénère traduit un phénotype anxieux.	 Principe : évaluer l'anxiété des animaux induite par un choc électrique au niveau de la langue suite à la prise de boisson après privation d'eau (48 heures). Durée : 3-5 minutes. Paramètres mesurés : nombre de coup de langue. Interprétation : une diminution de la prise de boisson au biberon traduit un phénotype anxieux.
Four plate Test (FPT) (Aron et al., 1971)	**Ultrasonic vocalizations (USV)** (Benton & Nastiti, 1988)
 Principe : évaluer l'anxiété induite par un choc électrique léger à la patte délivré lors du passage d'une plaque à l'autre dans un nouvel environnement après 15s d'habituation. Durée : 1 minute 15 secondes. Paramètres mesurés : nombre de transitions punies acceptées par l'animal et immobilité dans un cadran. Interprétation : une diminution du nombre de transitions entre deux cadrans traduit un phénotype anxieux.	 Principe : évaluer par ultrasons la fréquence des appels de détresse émis par le souriceau après séparation maternelle. Durée : 7 minutes. Paramètres mesurés : fréquence des vocalisations émises par le souriceau. Interprétation : une augmentation du nombre de vocalisations traduit un phénotype anxieux.

5. Les différentes approches thérapeutiques des troubles anxieux

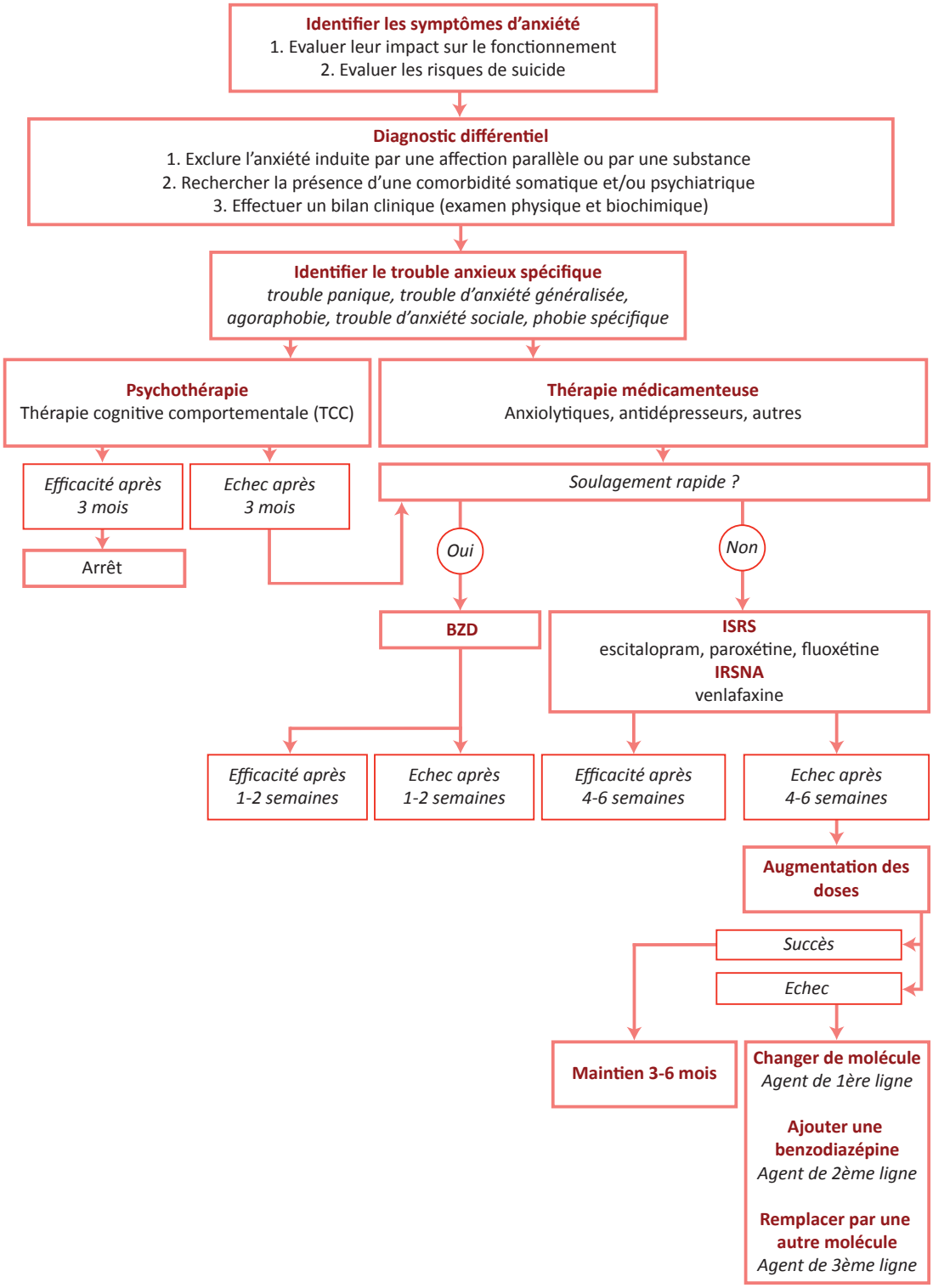
5.1. Dépenses de santé

En terme médico-économique, la distribution des coûts des troubles anxieux est la suivante : 54% de coûts directs pour les traitements médicaux non psychiatriques (traitement d'urgence), 31% de coûts directs pour les traitements médicaux psychiatriques (counseling, hospitalisation, consultation psychiatrique), 2% de coûts directs pharmaceutiques (prescriptions), 10% de coûts indirects liés au paiement compensatoire sans contrepartie (absentéisme, indemnités journalières en cas d'arrêt maladie, perte de production) et 3% de coût de mortalité (Greenberg *et al.*, 1999). Au début des années 2010, l'analyse de la base de données du *National Health and Wellness Survey* issue de 5 grands pays européens (France, Allemagne, Italie, Espagne, Royaume-Uni) a révélé des coûts directs pour le TAG de 659€ et des coûts indirects de 2 208€ par patient et par an (Toghanian *et al.*, 2014).

5.2. Prise en charge clinique : réponse, rémission, rechute, récidive

Plusieurs options thérapeutiques s'offrent aux praticiens pour traiter un trouble anxieux. Mais que la stratégie soit psychologique et/ou pharmacologique, les objectifs visés sont les mêmes, à savoir diminuer l'intensité et la fréquence des symptômes, améliorer la qualité de vie, soulager les comorbidités, obtenir une rémission et diminuer le risque de récidive. Le choix de la thérapie repose sur les facteurs de risque du patient, ses antécédents et la présence de comorbidités et suit un algorithme précis (**Figure 3**).

Figure 3. *Arbre décisionnel pour la prise en charge d'un trouble anxieux.*



Abréviations *: BZD : benzodiazépine; IRSNA : inhibiteur sélectif de la recapture de la noradrénaline ; ISRS: inhibiteur sélectif de la recapture de la sérotonine.*

Adapté de (Bystritsky et al., 2013)

5.3. Les traitements non pharmacologiques

Avant même de considérer un traitement pharmacologique, il convient de vérifier que le patient respecte certaines règles hygiéno-diététiques simples tels qu'un rythme de sommeil raisonnable, une limitation de la consommation de substances excitantes et préférable en début de journée, une pratique régulière d'un exercice physique et un maintien du contact social avec la famille et les amis.

Les traitements non pharmacologiques des troubles anxieux, bien que d'orientations variées, sont inégalement représentés dans la littérature. Mais qu'ils soient invasifs ou non, ils démontrent une certaine efficacité en complément des traitements pharmacologiques ou comme alternative lorsque ces derniers ne sont pas suffisamment efficaces.

5.3.1. ***Les traitements non invasifs***

A ce jour, la thérapie cognitivo-comportementale (TCC) est probablement la forme de psychothérapie la plus étudiée comme traitement non-invasif des troubles anxieux. Dans le TP, avec ou sans agoraphobie, la TCC consiste à exposer étape par étape, le patient aux situations imaginaires et réelles qui déclenchent habituellement une réponse anxieuse et un comportement d'évitement (Cottraux, 2002). Dans le TAG, cette technique consiste à apprendre aux patients à observer et analyser leurs inquiétudes pour reconnaître comment celles-ci contribuent à leur anxiété, pour à terme, les remplacer par des émotions plus adaptées et plus rationnelles. Une méta-analyse de 27 articles de la littérature, totalisant 1 496 patients, a confirmé les effets bénéfiques à court-terme de la TCC en monothérapie, comparativement au groupe placebo, chez l'adulte souffrant de troubles anxieux (Hofmann & Smits, 2008). Au long-terme, à savoir 1 an après la fin de la TCC, 77% des patients répondeurs et 85% des patients en rémission présentaient un maintien de leur statut respectif (DiMauro *et al.*, 2013). La combinaison de la TCC avec une stratégie médicamenteuse a montré des résultats hétérogènes ne permettant pas forcément de montrer qu'une approche est plus avantageuse que l'autre selon le type de troubles anxieux. En effet, une autre méta-analyse

de 21 études randomisées chez 625 patients souffrant d'au moins un trouble anxieux traités par TCC à court terme, comparativement aux 641 patients traités par anxiolytiques ou antidépresseurs, a montré une meilleure efficacité de la TCC chez les patients souffrant de TP ou de TAG alors, qu'en revanche, les patients souffrant de TAS sont plus sensibles aux médicaments qu'à la TCC (Roshanaei-Moghaddam *et al.*, 2011).

5.3.2. ***Les traitements invasifs***

Les thérapies pour les troubles anxieux, outre les traitements pharmacologiques conventionnelles associés ou non à la TCC, sont pour le moment essentiellement expérimentales.

Initialement développée comme traitement antiépileptique, la stimulation du nerf vague a ensuite été utilisée en psychiatrie, après que les patients atteints d'EDC avec une comorbidité anxieuse et traités par cette technique aient montré une nette amélioration de leur humeur. Une étude pilote dans laquelle un dispositif permettant la stimulation du nerf vague pendant 10 semaines a été implanté chez 7 patients avec un TOC, 2 patients avec un ESPT et 1 patient avec un TP, n'ayant répondu a aucun traitement médicamenteux ou psychologique, n'a montré une amélioration des symptômes que chez 3 patients avec un TOC (George *et al.*, 2008). En préclinique, chez le rat Sprague-Dawley, la stimulation du nerf vague augmente le temps passé dans les bras ouverts de l'EPM, sans modification de l'activité locomotrice (Noble *et al.*, 2019).

Bien que les neurochirurgies lésionnelles, comme la capsulotomie aient été utilisées pour traiter les troubles d'anxiété résistants aux traitements, les études à long-terme ont montré des effets cognitifs indésirables. En effet, un an après la procédure, 67% des patients souffrant de TP, de TAG ou de TAS enrôlés dans l'étude ont montré une amélioration de leurs symptômes, malheureusement presque ¼ des patients ont également présenté une apathie, une désinhibition et une dysfonction des fonctions exécutives (Ruck *et al.*, 2003).

Par rapport à la chirurgie ablative, la stimulation cérébrale profonde (SCP) présente l'avantage de pouvoir ajuster et personnaliser la neurostimulation. Jusqu'à ce jour, aucune étude clinique n'a été réalisée chez les patients souffrant de troubles anxieux, si ce n'est chez les patients atteints de TOC, qui montre d'ailleurs une amélioration de leurs symptômes (Lipsman *et al.*, 2007). Toutefois, chez les patients souffrant de dépression résistante aux traitements, la stimulation profonde du nucleus accumbens (NAc) induit un effet anxiolytique comme l'indique la diminution du score d'Hamilton, passant de 23,3 à 19 après 1 mois puis à 14,9 après 1 an (Bewernick *et al.*, 2010). Cette technique a également fait ses preuves chez des souris HAB mâles, naturellement anxieuses, puisque une implantation d'électrodes dans le NAc de ces animaux diminue la latence pour se nourrir dans le NSF (Schmuckermair *et al.*, 2013). Toutefois, aucun effet n'a été retrouvé chez le rat Wistar pour une même implantation dans le NAc, dans le VCT et dans l'EPM (van Dijk *et al.*, 2013).

5.3.3. ***Les techniques de neurostimulation***

L'électroconvulsivothérapie (ECT), plus couramment utilisée dans l'EDC résistant aux traitements pharmacologiques, est une procédure pratiquée sous anesthésie générale, au cours de laquelle de petits courants électriques sont appliqués au niveau du cerveau, provoquant intentionnellement une crise convulsive de courte durée. Il existe très peu de preuves qui encouragent l'utilisation d'une telle technique chez les patients anxieux, en particulier parce que la comorbidité anxieuse chez les patients présentant un EDC est la principale contrindication, conduisant parfois à l'aggravation des symptômes anxieux ou au déclenchement d'attaques de panique (Fink, 1982). En revanche, une cure d'ECT améliore le score de l'échelle de l'ESPT administrée par le clinicien (CAPS, de 90 à 59,4 après 6 séances d'ECT) chez 20 patients, hommes et femmes, tous souffrant d'ESPT associés à des symptômes dépressifs et réfractaires aux traitements et à la TCC, et ce indépendamment de l'amélioration des symptômes de la dépression (Margoob *et al.*, 2010).

La stimulation magnétique transcraniale répétée (SMTr), dont le but est de causer une dépolarisation et donc une stimulation des neurones corticaux, possède l'avantage d'être moins invasive que l'ECT puisque ne nécessitant pas d'anesthésie générale, mais présente l'inconvénient de ne pourvoir atteindre les structures cérébrales profondes, comme l'amygdale, l'hippocampe ou le CCA, des régions pourtant impliquées dans les troubles anxieux. Cette technique n'a pas encore été approuvée par les autorités de santé dans le traitement des troubles anxieux, probablement à cause du manque d'études à grande échelle. Néanmoins, la SMTr appliquée au niveau du CPF_{dl} s'avère efficace dans au moins 5 études cliniques menées dans le monde entier chez un petit nombre de patients TP (n = 1-6) avec ou sans comorbidité dépressive (Pallanti & Bernardi, 2009). Une étude préliminaire chez 10 patients atteints de TAG, ayant complété 6 sessions de SMTr en 3 semaines, a rapporté une diminution de plus de 50% du score d'Hamilton chez 60% des patients considérés à la fin de l'étude comme étant en rémission (HAM <8) (Bystritsky *et al.*, 2008).

5.4. Les traitements pharmacologiques

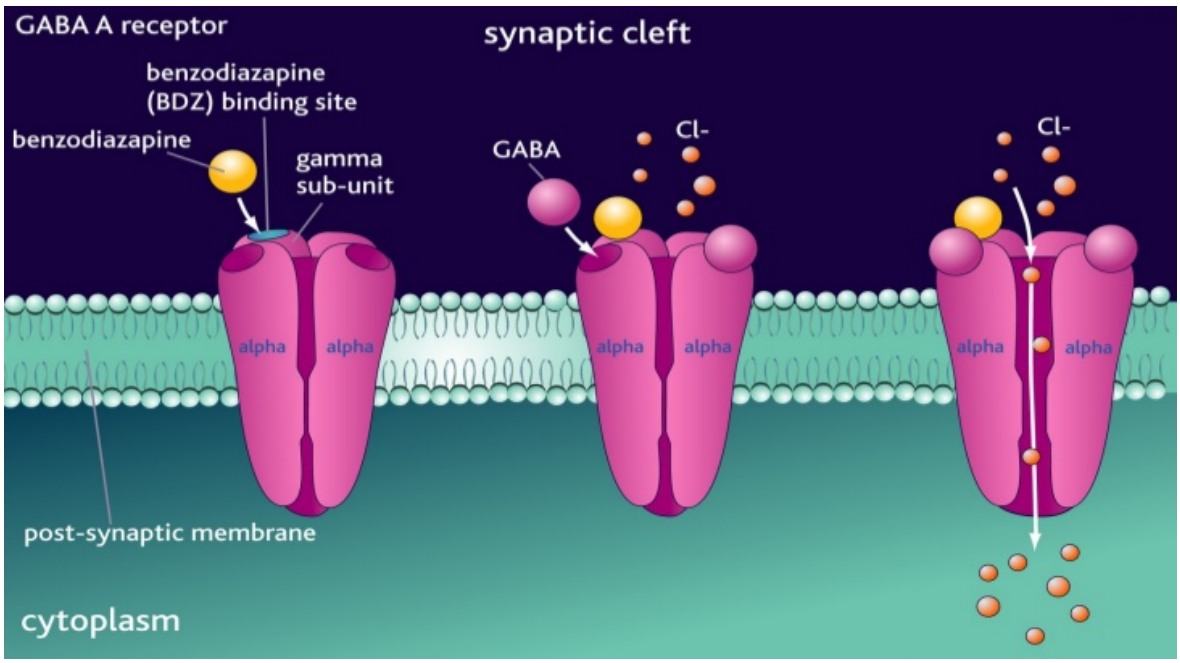
5.4.1. *Traitement empirique : les benzodiazépines*

Historiquement, les BZD ont été les premières molécules à être utilisées dans le traitement de l'anxiété puisqu'offrant la possibilité de soulager rapidement les patients. La découverte fortuite de la première BZD, le chlordiazépoxyde (Librium®) aux propriétés tranquillisantes et sédatives, remontent au début des années 1960 (Gaignault, 1983). Par la suite, via des processus d'optimisation, de nouvelles BZD avec un profil pharmacologique nouveau, à savoir anxiolytique, ont pu voir le jour (Gaignault, 1983). C'est le cas du diazépam (Valium®) qui reste à ce jour probablement la BZD la plus connue dans ce domaine pharmacologique. De nouvelles modifications structurales, notamment par l'ajout d'un cycle triazolique ont permis d'augmenter l'activité de ces molécules, conduisant ainsi au développement de molécules aux propriétés hypnotiques, appelées apparentées aux BZD (Gaignault, 1983). On l'aura donc compris, les BZD possèdent de nombreuses propriétés

pharmacologiques puisqu'elles sont à la fois sédatives, anxiolytiques et hypnotiques, mais aussi myorelaxantes et anticonvulsivantes, pour les dérivés nitrés (Gaignault, 1983).

Les BZD se fixent spécifiquement sur le site modulateur aux BZD présent sur les récepteurs de l'acide γ-aminobutyrique de type A ($GABA_A$), dont l'expression est principalement localisée au niveau du système limbique, du cortex et des noyaux gris centraux. La fixation des BZD sur leur site allostérique potentialise l'affinité du GABA pour son récepteur, augmentant ainsi la probabilité d'ouverture du canal chlore responsable d'une hyperpolarisation cellulaire et donc d'une diminution de l'excitabilité neuronale (Costa & Guidotti, 1979) (**Figure 4**).

Figure 4. *Mécanisme d'action des benzodiazépines.*



Les BZD en se liant à leur site de fixation sur la sous-unité γ *du récepteur* $GABA_A$*, entrainent une modification allostérique du récepteur, facilitant ainsi la fixation du GABA sur la sous-unité* α *de ce même récepteur. Il en résulte une augmentation de la fréquence d'ouverture du canal chlore.*

D'après (Katzung, 2001)

En 2012, les Français étaient 11,5 millions à avoir consommé au moins une fois une BZD. Sur ces consommateurs, 22% avaient même eu recours à deux BZD simultanément. Selon les directives établies par l'Agence Nationale de Sécurité du Médicament et des produits de santé (ANSM) dans son rapport de 2012 sur l'état des lieux de la consommation des BZD en France, ces dernières présenteraient de moins bons résultats à long terme et devraient donc répondre à des règles strictes de bon usage (santé, 2013). Ainsi, la prescription ne doit être envisagée qu'après un échec des approches non médicamenteuses et doit être d'une durée la plus courte possible, sans excéder les durées préconisées dans le cadre de l'autorisation de mise sur le marché, à savoir 12 semaines pour les anxiolytiques et 4 semaines pour les hypnotiques. Cette consigne n'est malheureusement pas respectée, puisqu'en 2012, le temps d'utilisation annuel des BZD anxiolytiques était proche de 5 mois. D'autre part, la prescription doit également faire l'objet d'une réévaluation régulière quant à son efficacité, d'autant plus que les BZD sont associées à de nombreux effets indésirables tels qu'une amnésie antérograde, un trouble du comportement avec irritabilité, agressivité et agitation, confusion, baisse de la vigilance, somnolence, insomnie et cauchemars, qui sont autant de raisons pour le patient d'interrompre son traitement (Gudex, 1991). De plus, les BZD, notamment les hypnotiques qui possèdent une demi-vie courte, peuvent induire une dépendance physique et psychique qui se traduit par un syndrome de sevrage ou de rebond à l'arrêt du traitement (Gudex, 1991).

Cependant, il est important de considérer le potentiel bénéfice des BZD lors de l'instauration d'un traitement puisqu'elles présentent l'avantage de soulager rapidement et efficacement les symptômes somatiques des patients. C'est pourquoi, les BZD peuvent toujours être prescrites comme thérapie complémentaire à privilégier en début de traitement, avant que l'efficacité d'un traitement plus adapté ne commence à se manifester. Le tableau 3 fournit un bref aperçu des BZD indiquées dans les troubles anxieux ainsi que les posologies classiquement utilisées dans cette indication (**Tableau 4**).

Tableau 4. *Les benzodiazépines utilisées dans le traitement des troubles anxieux.*

	DCI	Nom de spécialité	Forme	Posologie usuelle	Durée de traitement	Mécanisme d'action	Indications
BENZODIAZEPINES	alprazolam	XANAX®	Cpm 0,25-0,5-1 mg	1-2 mg/j	8-12 semaines	Modulateur allostérique du récepteur $GABA_A$	**Manifestations anxieuses sévères et/ou invalidantes** Delirium tremens et autres manifestations du sevrage alcoolique ± urgences neuropsychiatriques : crise d'angoisse paroxystique, crise d'agitation
	bromazépam	LEXOMIL®	Cpm 6 mg	6 mg/j			
	clobazam	URBANYL®	Cpm 5-10-20 mg	5-60 mg/j			
	clorazépate	TRANXENE®	Gél 5-10-50 mg Sol inj 20 mg/2ml	5-90 mg/j 20-200 mg/inj			
	clotiazépam	VERATRAN®	Cpm 5-10 mg	10-30 mg/j			
	diazépam	VALIUM®	Cpm 2-5-10 mg Sol buv 1% Sol inj 10 mg/2ml	5-20 mg/j 0,1-0,2 mg/kg/inj			
	loflazépate	VICTAN®	Cpm 2 mg	1-4 mg/j			
	lorazépam	TEMESTA®	Cpm 1-2,5 mg	2-7,5 mg/j			
	oxazépam	SERESTA®	Cpm 10-50 mg	20-60 mg/j			
	prazépam	LYSANXIA®	Cpm 10-40 mg Sol buv 15 mg/ml	10 à 30 mg/j (20-30 gouttes)			

Abréviations *: Cpm : comprimé ; DCI : dénomination commune international ; Gél : gélule ; Sol buv : solution buvable ; Sol inj : solution injectable*

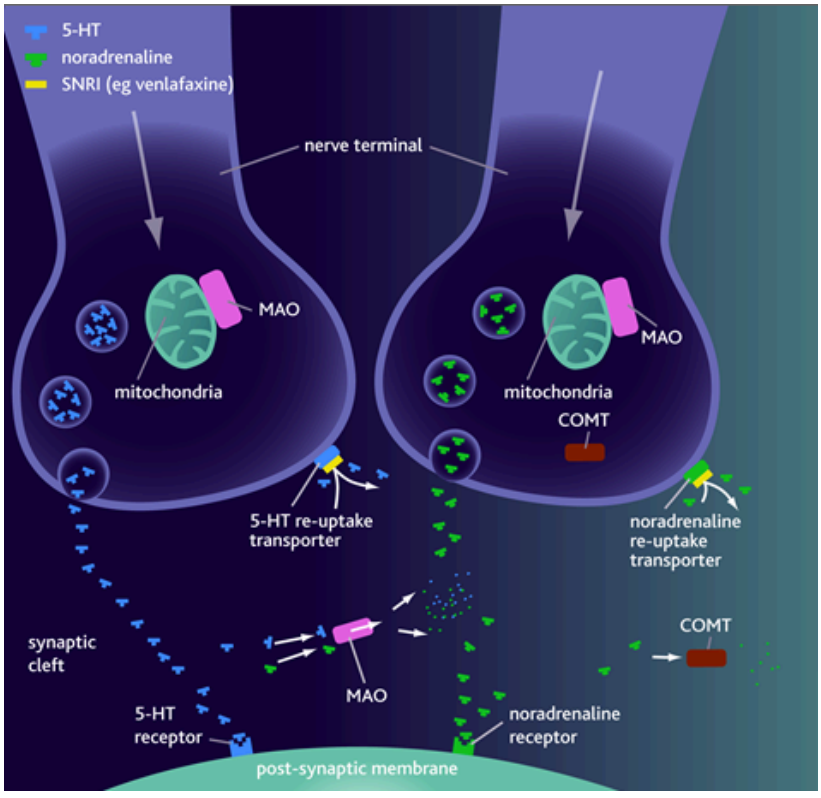
5.4.2. *Traitement actuel : les antidépresseurs*

Depuis plusieurs années, on observe une diminution des prescriptions de BZD au profit des antidépresseurs qui ont l'avantage de présenter une meilleure tolérance et un profil de sécurité amélioré, mais avec une activité thérapeutique retardée de 2 à 4 semaines.

L'iproniazide (Marsilid®), un inhibiteur de la monoamine oxydase (IMAO) et l'imipramine (Tofranil®), un antidépresseur tricyclique (ATC), découverts à la fin des années 1950, sont parmi les premières molécules à avoir prouvé leur efficacité dans le traitement des troubles dépressifs à comorbidité anxieuse. En 1959, l'étude britannique de West et Dally fut la première à souligner l'efficacité de l'iproniazide sur les symptômes phobiques et les attaques de paniques chez des patients dépressifs avec un syndrome phobique semblable à une hystérie (West & Dally, 1959). En 1962, ce sont Kein et Fink qui à leur tour démontrèrent l'efficacité de l'imipramine pour réduire les symptômes anxieux épisodiques, dont les attaques de panique liés à des phobies personnelles, chez des patients souffrant de troubles affectifs (Klein & Fink, 1962). Ces molécules ont pour but d'augmenter les transmissions monoaminergiques, dont la noradrénaline et la sérotonine, en inhibant soit l'enzyme responsable de leur catabolisme pour les IMAO, soit le transporteur responsable de leur recapture pour les ATC. Cette découverte a permis de définir le rôle des monoamines dans la pathogénèse et le traitement des EDC. Plus tard, il a été évoqué que les troubles anxieux partageaient cette hypothèse monoaminergique. C'est pourquoi depuis les années 80, il n'est pas étonnant que les antidépresseurs constituent le traitement de référence des troubles anxieux. Malheureusement, en raison de l'intervalle à observer en cas d'échec thérapeutique avant de passer à un autre antidépresseur, l'iproniazide et l'imipramine ne sont désormais plus prescrites en première intention.

La découverte de ces effets antidépresseurs et anxiolytiques, et de leurs cibles moléculaires, a conduit à la conception de médicaments de 2ème et 3ème génération, tels que les ISRS ou encore les inhibiteurs mixtes de la recapture de la sérotonine et de la noradrénaline (IRSN). Ces molécules rétablissent les niveaux de sérotonine et/ou de noradrénaline dans la fente synaptique en se liant soit exclusivement au transporteur de la recapture de la sérotonine (SERT), soit au SERT et au transporteur de la recapture de la noradrénaline (NET), empêchant ainsi la réabsorption de ces deux neurotransmetteurs. Ce blocage entraîne une accumulation de sérotonine et/ou de noradrénaline dans la fente synaptique qui peuvent ensuite aller se fixer sur leurs récepteurs post-synaptiques respectifs (**Figure 5**).

Figure 5. *Mécanisme d'action des inhibiteurs de la recapture de la sérotonine (à gauche) et de la noradrénaline (à droite).*



Les ISRS et IRSN ont pour but d'augmenter les transmissions sérotoninergique et noradrénergique en activant indirectement les récepteurs sérotoninergiques et noradrénergiques post-synaptiques, par inhibition de leur recapture.

D'après (Rang, 2001)

Les ISRS et les ISRN constituent actuellement le traitement de choix des troubles anxieux. De plus, comme les troubles anxieux sont fréquemment associés chez les patients à des EDC (Kaufman & Charney, 2000), les ISRS et les ISRN offrent l'avantage de pouvoir traiter à la fois les symptômes dépressifs et soulager les symptômes anxieux. Toutefois, tous les ISRS ne sont pas indiqués pour un seul et même type de troubles anxieux. Le **Tableau 5** fournit un aperçu des différents antidépresseurs qui possèdent une indication dans les troubles anxieux.

Une revue détaillée de tous les essais cliniques, depuis le milieu des années 80, menés en double-aveugle chez les patients souffrant de TAG, supportent la preuve d'une efficacité de nombreux ISRS, dont la paroxétine, l'escitalopram et la sertraline et IRSN, dont la venlafaxine, et la duloxétine, même si certaines de ces molécules ne possèdent pas l'indication officielle dans le TAG (Kimmel, 2015) (**Tableau 5**). Cependant, il n'existe pas de différence d'efficacité clinique démontrée entre les différents types d'antidépresseurs, comme par exemple, entre la duloxétine (60-120 mg/kg/j, 10 semaines) et la venlafaxine (75-225 mg/kg/j, 10 semaines) qui présentent un taux de réponse respectif de 56% et 58%, comparativement au placébo (Allgulander *et al.*, 2008). Bien qu'ils n'aient pas été comparés entre eux, la paroxétine, la sertraline et l'escitalopram offrent une efficacité et une tolérance semblables, avec un pourcentage de réponse de 50 à 70%, comparativement au placebo pour lequel le pourcentage de réponse est compris entre 30 et 40% (Kimmel *et al.*, 2015). L'initiation du traitement doit se faire aux doses les plus faibles car pendant la période de latence, certains patients peuvent présenter une exacerbation de leurs symptômes, d'autant plus que les antidépresseurs induisent une levée d'inhibition pouvant conduire ces patients au suicide (Sramek *et al.*, 2002).

Depuis les années 90, de nombreuses preuves ont supporté l'efficacité des SSRI dans le traitement du TP. Des essais cliniques menés en double-aveugle, utilisant des doses flexibles ou fixes de paroxétine (Pollack *et al.*, 2007), de sertraline (Londborg *et al.*, 1998), de fluoxétine (Michelson *et al.*, 2001), de citalopram et d'escitalopram (Bandelow *et al.*, 2007), ont rapporté des effets bénéfiques à court-terme (8 à 12 semaines) sur la qualité de vie des patients et sur les symptômes du TP, tels que la fréquence des attaques, l'anxiété généralisée ou les désagréments liés aux manifestations physiques. Une efficacité à long-terme a été démontrée chez les patients recevant de la paroxétine pendant 36 semaines après avoir complété un essai randomisé en double aveugle de 12 semaines, par rapport au placébo (Lecrubier & Judge, 1997). Il en est de même pour la fluoxétine avec une efficacité à plus de 24 semaines après un traitement initial de 10 semaines (Michelson *et al.*, 1999) et pour le citalopram à plus de 52 semaines après un traitement initial de 8 semaines (Lepola *et al.*, 1998). Ainsi, les patients avec un TP, pour lesquels un effet bénéfique initial avait été constaté, ont continué de montrer une amélioration de leur score d'Hamilton plusieurs semaines après l'initiation du traitement par ISRS.

Tableau 5. *Les antidépresseurs utilisés dans le traitement des troubles anxieux.*

	DCI	Nom de spécialité	Forme	Posologie usuelle	Durée de traitement	Mécanisme d'action	Indications
ANTIDEPRESSEURS	citalopram	SEROPRAM®	Cpm 20 mg Sol buv 40 mg/ml	20-40 mg/j	≥ 6 mois réévaluation régulière	ISRS	EDC Prévention du TP avec/sans agoraphobie
	escitalopram	SEROPLEX®	Cpm 5-10-15-20 mg Sol buv 20 mg/ml	10-20 mg/j			EDC TAG, TP avec/sans agoraphobie, TAS, TOCs
	fluoxétine	PROZAC®	Cpm 20 mg Gél 20 mg Sol buv 20 mg/5ml	20 mg/j 60 mg/j			EDC TOCs Boulimie
	fluvoxamine	FLOXYFRAL®	Cpm 50-100 mg	50-300 mg/j			EDC TOC
	paroxétine	DEROXAT®	Cpm 20mg Sol buv 20 mg/10ml	10-50 mg/j			EDC TAG, TP avec/sans agoraphobie, TAS, TOCs, ESPT
	sertraline	ZOLOFT®	Gél 25-50 mg	50-200 mg/j			EDC et prévention des récidives d'EDC TP avec/sans agoraphobie, TOC, TAS, ESPT
	duloxétine	CYMBALTA®	Gél 30-60 mg	30-120 mg/j	≥ 6 mois réévaluation régulière	IRSN	EDC TAG
	venlafaxine	EFFEXOR®	Gél LP 37,5-75 mg	75-375 mg/j			EDC TAG, TP avec/sans agoraphobie, TAS
	clomipramine	ANAFRANIL®	Cpm 10-25-75 mg	75-150 mg/j	≥ 6 mois réévaluation régulière	Inhibiteur non sélectif de la recapture des monoamines	EDC Trouble panique avec/sans agoraphobie, TOC

Abréviations *: Cpm : comprimé ; DCI : dénomination commune international ; EDC : épisode dépressif caractérisé ; ESPT : état de stress post-traumatique ; Gél : gélule ; IRSN : inhibiteur mixte de la recapture de la sérotonine et de la noradrénaline ; ISRS : inhibiteur sélectif de la recapture de la sérotonine ; Sol buv : solution buvable ; TAG : trouble anxieux généralisé ; TAS : trouble d'anxiété sociale ; TOC : trouble obsessionnel compulsif ; TP : trouble panique.*

5.4.3. *Comparaison de l'efficacité entre les benzodiazépines et les antidépresseurs*

En prenant l'exemple du TAG, la première étude en double aveugle, menée chez 60 patients atteints de TAG et comparant l'alprazolam à l'imipramine, a rapporté que l'alprazolam réduisait plus efficacement les symptômes somatiques du TAG alors que l'imipramine permettait une meilleure amélioration des symptômes psychiques tels que les pensées négatives (Hoehn-Saric *et al.*, 1988). La seconde étude clinique a été conduite chez 230 patients, avec un TAG (HAM-A moyen = 25,8), traités par imipramine ou diazépam pendant 8 semaines (Rickels *et al.*, 1993). Alors que les auteurs rapportent une efficacité du diazépam sur les symptômes somatiques supérieure à celle de l'imipramine lors des deux premières semaines de traitement (HAM-A = 6,4 *versus* 9,1 ; $p<0,01$), la tendance s'inverse à partir de la troisième semaine, où les deux molécules font preuve d'une efficacité équivalente, avec en moyenne 73% d'amélioration des symptômes psychiques et somatiques pour l'imipramine (respectivement, HAM-A = 6,4 et 6,7) et 66% d'amélioration des symptômes somatiques pour le diazépam (HAM-A = 6,0) (Rickels *et al.*, 1993). La troisième étude, menée chez 81 patients souffrant de TAG (HAM-A moyen = 25,5), comparant l'efficacité de la paroxétine à l'imipramine et au 2'-chlordesmethyl-diazépam, a démontré que ces trois molécules amélioraient significativement les symptômes cliniques chez deux tiers des patients (Rocca *et al.*, 1997). Tout comme l'avait observé Rickels et collaborateurs, bien que l'amélioration des symptômes soit plus rapide avec la BZD, à savoir après seulement 2 semaines de traitement, elle est statistiquement meilleure avec les deux antidépresseurs après 8 semaines de traitement ($HAM\text{-}A_{paroxétine}$ = 11,1 ; $HAM\text{-}A_{imipramine}$ = 10,8 et $HAM\text{-}A_{2'\text{-}chlordesmethyl\text{-}diazépam}$ =12,9) (Rocca *et al.*, 1997).

Dans leur étude multicentrique randomisée en double-aveugle constituée de 540 patients souffrant de TAG (HAM-A = 28), Hackett et collaborateurs ont rapporté une amélioration du score d'Hamilton après un traitement de 8 semaines par venlafaxine (HAM-A = 15,3 ou 16 en fonction de la dose) ou diazépam (HAM-A = 13,7) comparativement au placébo (HAM-A = 20,9), sans constater de différence significative en termes d'efficacité et de réponse au traitement entre la BZD et l'antidépresseur (Hackett *et al.*, 2003). Pour finir, Feltner et

collaborateurs ont évalué l'efficacité du lorazépam *versus* la paroxétine après 4 semaines de traitement chez 169 patients atteints de TAG. Il en ressort que les deux traitements sont efficaces sur la réduction des symptômes psychiques du TAG, mais que seul le lorazépam améliore significativement les symptômes somatiques (Feltner *et al.*, 2009).

L'efficacité des antidépresseurs dans le traitement des troubles anxieux, et notamment du TAG, est maintenant bien démontrée et confirmée par l'ensemble des résultats des essais cliniques. Toutefois, une méta-analyse de 56 essais cliniques de pharmacothérapie, randomisés et contrôlés, a attiré l'attention sur l'efficacité moyenne voire faible des ISRS, des IRSN et des BZD par rapport au placébo, et ce quel que soit l'âge et le sexe des participants ou la durée du traitement (Gomez *et al.*, 2018). De plus, dans cette étude, il semblerait même que les BZD fassent preuve d'une meilleure efficacité concernant l'amélioration des scores des différentes échelles utilisées pour estimer la sévérité des symptômes anxieux (Gomez *et al.*, 2018). Ceci contraste donc avec les directives actuelles en matière de prescription qui ne recommandent pas les BZD comme traitement de première intention dans le TAG. Toutefois, il est à noter qu'une autre méta-analyse de 23 essais cliniques, randomisés et contrôlés en double aveugle, dont 12 évaluant l'efficacité du diazépam, 7 du lorazépam et 4 de l'alprazolam, chez des sujets diagnostiqués avec un TAG, vient contredire ces précédents résultats (Martin *et al.*, 2007). Effectivement, basée sur le taux d'abandon des patients, sans rapport avec l'efficacité du traitement reçu, cette étude n'a pas montré de preuve évidente de l'efficacité supérieure des BZD à court terme, soit 4 semaines, par rapport au placébo. Cette hétérogénéité dans les résultats s'explique probablement par une différence des outils utilisés pour caractériser l'efficacité du traitement. En d'autres termes, pour évaluer l'efficacité des BZD, Martin et collaborateurs ne se basent pas sur des échelles d'évaluation de l'anxiété mais sur le taux d'abandon du traitement pour des raisons quelconques. Or, cette étude rapporte que ce taux est statistiquement comparable à celui généré dans le groupe recevant le placebo (Martin *et al.*, 2007).

5.4.4. *Les alternatives aux traitements antidépresseurs*

Lorsque la réponse désirée n'est pas obtenue après 8 semaines de traitement par un ISRS voire un IRSN, il est nécessaire de changer de stratégie thérapeutique. Le médecin généraliste peut alors choisir de changer d'antidépresseurs en remplaçant la molécule de départ par un autre ISRS ou bien ajouter un agent de second ou de troisième recours, parmi ceux décrits dans le **Tableau 6**.

Tableau 6. *Les autres molécules utilisées dans le traitement des troubles anxieux.*

	DCI	Nom de spécialité	Forme	Posologie usuelle	Durée de traitement	Mécanisme d'action	Indications
AUTRES MOLÉCULES	buspirone	BUSPAR®	Cpm 10 mg	15-60 mg/j	4-6 semaines	Agoniste du récepteur 5-HT_{1A} présynaptique	TAG, ESPT, anxiété réactionnelle, anxiété associée à une affection somatique sévère
	cyamemazine	TERCIAN®	Cpm 25-100 mg Sol buv 40 mg/ml	25-100 mg/j	4 semaines	Antipsychotique antagoniste du récepteur D_2	EDC Traitement symptomatique de courte durée de l'anxiété de l'adulte en cas d'échec des thérapeutiques habituelles
	haloperidol	HALDOL®	Cpm 1 mg Sol buv 2mg/ml	1 mg/j	4 semaines	Antipsychotique neuroleptique antagoniste du récepteur D_2	Traitement symptomatique de courte durée de l'anxiété de l'adulte en cas d'échec des thérapeutiques habituelles
	hydroxyzine	ATARAX®	Cpm 25 mg Sol inj 100 mg/2ml	50-300 mg/j	courte	Antihistaminique antagoniste du récepteur H1	Manifestations mineures de l'anxiété
	pregabaline	LYRICA®	Gél 25-50-75-100-150-200-300 mg Sol buv 20 mg/ml	150-600 mg/j	réévaluation régulière	Antiépileptique se liant à une sous-unité auxiliaire des canaux Ca_v	TAG
	sulpiride	DOGMATIL®	Gél 50 mg Sol buv 0,5 g/100ml	50-150 mg/j	4 semaines	Antipsychotique neuroleptique antagoniste du récepteur D_2	Traitement symptomatique de courte durée de l'anxiété de l'adulte en cas d'échec des thérapeutiques habituelles

Abréviations *: Cpm : comprimé ; DCI : dénomination commune international ; EDC : épisode dépressif caractérisé ; ESPT : état de stress post-traumatique ; Gél : gélule ; Sol buv : solution buvable ; TAG : trouble anxieux généralisé.*

En conclusion, hormis leur innocuité et leur rapidité d'action, les différents types de traitements existants ne montrent pas de différence d'efficacité en terme d'amélioration de la sévérité des symptômes des troubles anxieux (**Tableau 7**).

Tableau 7. *Comparaison de l'efficacité des traitements pharmacologiques et non pharmacologiques utilisés dans les troubles anxieux.*

Traitements	TP	TAG	TAS	Phobie spécifique
NON PHARMACOLOGIQUES				
TCC	++	++	++	++
ECT	-	-	-	-
SMTr	+	+	?	?
Stimulation du nerf vagual	-	?	?	?
capsulotomie	+	+	+	
SCP	?	?	?	?
PHARMACOLOGIQUES				
Benzodiazépines				
Court-terme	+	+	+	-
Long-terme	-	-	-	
ISRS	++	++	++	++
IRSN	+	++		

Abréviations *: + : efficace ; ++ : très efficace ; - : pas d'effet ; ECT : électroconvulsivothérapie ; IRSN : inhibiteur mixte de la recapture de la sérotonine et de la noradrénaline ; ISRS : inhibiteur sélectif de la recapture de la sérotonine ; SCP : stimulation cérébrale profonde ; SMTr : stimulation magnétique transcraniale répétée ; TAG : trouble anxieux généralisé ; TAS : trouble d'anxiété sociale ; TCC : thérapie cognitivo-comportementale ; TP : trouble panique.*

5.4.5. *Traitements novateurs*

Malgré les bénéfices évidents apportés par les antidépresseurs actuellement disponibles, 30 à 60% des patients ne répondent toujours pas de manière adéquate et souffrent toujours de symptômes résiduels incapacitants. Cet inconvénient, associé au nombre important de rechutes et à une activité thérapeutique retardée, fait l'objet d'une attention croissante et pousse les industries pharmaceutiques à développer de nouvelles thérapies qui agiraient aussi rapidement que les BZD avec une efficacité, une tolérance et une innocuité comparables à celles des ISRS ou IRSN.

Début 2016, la vortioxétine, a été commercialisée en France sous le nom de Brintellix® par les laboratoires Lundbeck et Takeda. Initialement mise au point pour le traitement des troubles dépressifs, la vortioxétine un antidépresseur multimodal, c'est-à-dire que son activité d'ISRS est complétée par des antagonismes des récepteurs 5-HT_{1D}, 5-HT_3 et 5-HT_7, un antagonisme partiel du récepteur 5-HT_{1B} et un agonisme partiel du récepteur 5-HT_{1A} (Bang-Andersen *et al.*, 2011). Une méta-analyse, de 2 essais cliniques de phase II et 5 de phase III a confirmé la supériorité d'efficacité de la vortioxétine dans le traitement des troubles anxieux, d'autant plus qu'elle semble montrer une sécurité d'emploi et une tolérance satisfaisante comparativement au placébo (Yee *et al.*, 2018). Un essai clinique mené chez 27 patients souffrant de TP, a montré qu'une administration de vortioxétine à doses flexibles (5, 10 et 20 mg) pendant 10 semaines diminue le score de l'échelle de sévérité du trouble panique (PDSS), une échelle permettant d'évaluer, entre autres, la fréquence d'apparition des attaques, l'état d'anxiété pendant l'attaque et le comportement d'évitement face au stimulus phobique (Shah & Northcutt, 2018). Dans le TAG, une méta-analyse de 37 essais cliniques a fourni une preuve supplémentaire de l'efficacité de la vortioxétine, administrée à 5 mg/kg/j pendant 8 semaines, entraînant une amélioration du score d'Hamilton, sans que celui-ci n'atteigne pour autant une rémission significative par rapport au placébo (Pae *et al.*, 2015).

La vilazodone (Viibryd®) ne possède pas encore d'autorisation de mise sur le marché en France, mais elle a été approuvée et commercialisée dans le traitement des EDC aux USA depuis 2011. Ses propriétés pharmacologiques associent une inhibition de la recapture de la sérotonine et un agonisme partiel du récepteur 5-HT_{1A}, une combinaison pertinente pour obtenir une élévation à la fois rapide et robuste de la sérotonine dans la fente synaptique. Si l'efficacité de la vilazodone (40 mg/kg) sur la composante anxieuse des patients atteint d'EDC est déjà établie, notamment avec une amélioration significative du score d'Hamilton chez les patients souffrant de comorbidité anxio-dépressive après 8 semaines de traitement (Thase *et al.*, 2014), son éventuel bénéfice dans le TAG est actuellement recherché dans le cadre d'essais cliniques (*NCT01844115, NCT01712321*). Néanmoins, une étude clinique de phase III menée chez des patients souffrant de TAG, a rapporté que 62% des patients étaient répondeurs à un traitement de 10 semaines par vilazodone, se traduisant par une différence significative du changement moyen du score d'Hamilton par rapport aux valeurs initiales (Gommoll *et al.*, 2015).

BOX 2. *Les traitements pharmacologiques et non pharmacologiques des troubles anxieux.*

Traitements non pharmacologiques	Traitements pharmacologiques
Non invasifs La Thérapie cognitivo-comportementale (TCC) : consiste à apprendre aux patients à reconnaître comment leurs pensées contribuent à l'anxiété et à percevoir leurs inquiétudes de façon plus rationnelle. La durée du traitement peut varier mais comprend généralement 4 à 24 séances hebdomadaires. L'électroconvulsivothérapie (ECT) : consiste à administrer des courants électriques de faible intensité à travers le cerveau, sous anesthésie générale, pour provoquer une crise convulsive. Ce traitement s'étale sur 6 à 8 semaines à raison de 2 à 3 séances par semaine. Stimulation magnétique transcraniale répétitive (SMTr) : consiste à appliquer une impulsion magnétique à travers le crâne du patient éveillé au niveau des neurones corticaux dans le but de créer une dépolarisation de ces neurones pour modifier la sécrétion des monoamines. La stimulation magnétique varie en fonction de la localisation, de l'intensité et de la fréquence des pulses. Elle est appliquée quotidiennement ou plusieurs fois par semaine	Les antidépresseurs Les inhibiteurs sélectifs de la recapture de la sérotonine (ISRS) : bloquent la recapture de la sérotonine au niveau présynaptique par le SERT, permettant d'augmenter les taux de sérotonine au niveau de la fente synaptique. De par la présence d'autorécepteurs, exerçant un rétrocontrôle négatif sur la synthèse et la libération de sérotonine, ils présentent un délai d'action de 4 à 6 semaines. Exemple : fluoxétine, paroxétine Les inhibiteurs mixtes de la recapture de la sérotonine et de la noradrénaline (IRSN) : présentent une action similaire aux ISRS, en agissant également sur la recapture de la noradrénaline, avec des effets indésirables moindres. Exemple : venlafaxine Les antidépresseurs multimodaux : combinent plusieurs modes d'action distincts en associant le blocage du transporteur et la modulation de différents sous-types de récepteurs sérotoninergiques. Exemple : vortioxétine, vilazodone
Invasifs Stimulation du nerf vague : consiste à stimuler par intermittence le nerf vague dont les efférences dans le noyau du tractus solitaire permettent l'activation du système limbique. La capsulotomie : consiste à léser les fibres connectant le CPF au thalamus, à l'hippocampe et à l'amygdale. Stimulation cérébrale profonde : consiste à stimuler le cerveau via un stimulateur cérébral implanté sous la peau près de l'épaule et connecté à des électrodes placées dans	Les anxiolytiques Les benzodiazépines : favorisent l'ouverture du canal chlore par leur propriété de modulateur allostérique positif du site aux benzodiazépines du récepteur $GABA_A$. Elles possèdent de nombreux effets indésirables d'ordre neurologique (amnésie) et psychiatrique (confusion, agitation) et une pharmacodépendance, notamment en cas d'utilisation prolongée. Exemple : alprazolam, bromazépam, diazépam

différentes régions.	

6. La physiopathologie des troubles anxieux

Le développement de nouvelles stratégies thérapeutiques repose avant tout sur une meilleure compréhension des structures et circuits neuronaux impliqués dans la physiopathologie des troubles anxieux. L'hétérogénéité phénotypique des troubles anxieux s'explique probablement par l'hétérogénéité de la littérature sur la mécanistique neuronale de l'anxiété. À ce jour, plusieurs hypothèses physiopathologiques ont été proposées pour expliquer les causes sous-jacentes des troubles anxieux [*neuro-anatomie, monoamines, neuroplasticité (Hill et al., 2015), neuroendocrinologie (Jacobson, 2014), immunité et inflammation (Salim et al., 2012)*]. La partie qui suit en exposera deux en particulier ; l'hypothèse neuro-anatomique et l'hypothèse monoaminergique, dont la compréhension est davantage en accord avec la thématique de ce travail. De nombreuses régions comme l'amygdale, le cortex ou encore l'hippocampe sont des régions désormais bien connues pour être impliquées dans les troubles anxieux. Mais plus qu'un dysfonctionnement d'une seule ou plusieurs régions, il est fort à parier que les troubles anxieux résultent plutôt d'une perturbation des réseaux de communication entre ces régions interconnectées, servant normalement à détecter et traiter le flux de signaux de danger provenant du monde extérieur, comme dignes d'une vigilance accrue.

6.1. L'hypothèse neuro-anatomique

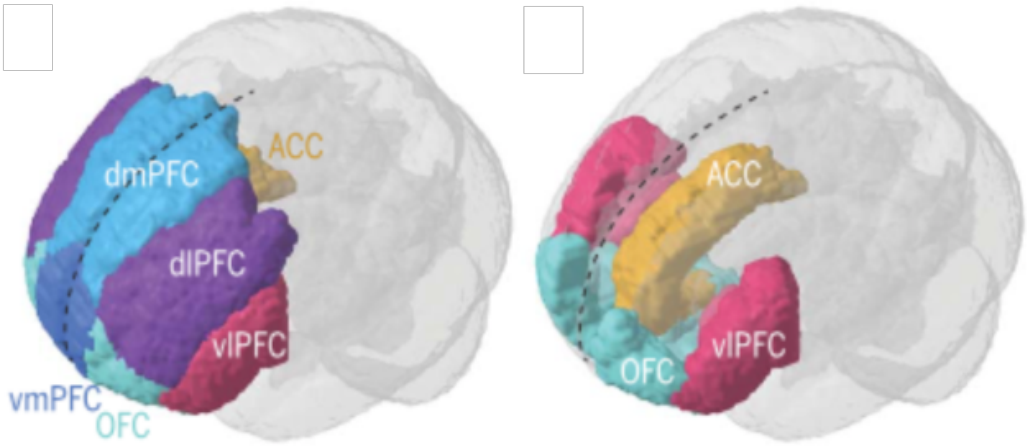
6.1.1. ***Le cortex préfrontal***

6.1.1.1. Structure

Chez l'Homme et le primate, le cortex préfrontal (CPF) correspond à la partie antérieure du cortex du lobe frontal. Différentes terminologies sont utilisées pour décrire l'organisation du CPF. Ainsi, il peut être divisé en aires de Broadmann (BA), allant de BA 8 à 14 et de BA 44 à 47 pour la partie corticale granulaire et en BA 24 et BA 32 pour la partie corticale

agranulaire. Il peut aussi être divisé de manière fonctionnelle, en 6 sous-régions ; 1) le cortex dorsolatéral (CPF_{dl}), 2) le cortex dorsomédian (CPF_{dm}), 3) le cortex ventromédian (CPF_{vm}), 4) le cortex ventrolatéral (CPF_{vl}), 5) le cortex orbitofrontal (COF) et 6) le cortex cingulaire antérieur (CCA) (Carlen, 2017) (**Figure 6**).

Figure 6. *Vue de face des divisions fonctionnelles du cortex préfrontal chez l'Homme.*



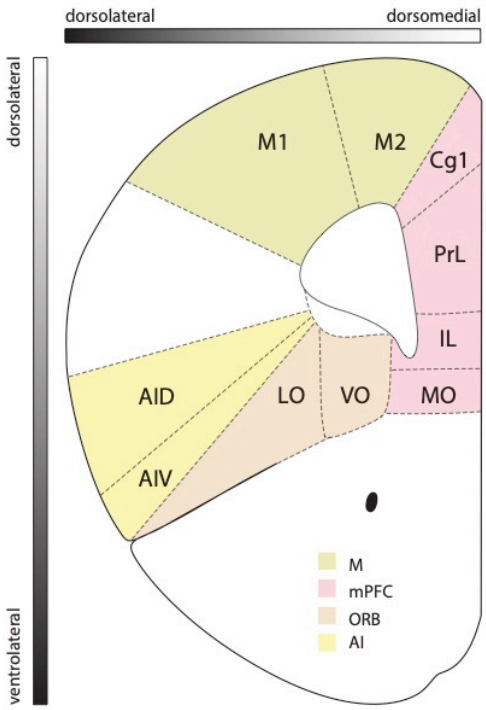
Abréviations *: ACC : cortex cingulaire antérieur ; dlPFC : cortex préfrontal dorsolatéral ; dmPFC : cortex préfrontal dorsomédian ; OFC : cortex orbitofrontal ; vlPFC : cortex préfrontal ventrolatéral ; vmPFC : cortex préfrontal ventromédian*

D'après (Carlen, 2017)

Chez le rongeur, actuellement, il n'existe toujours pas de consensus précis pour décrire l'organisation du CPF. Néanmoins, les chercheurs s'accordent pour dire qu'il existe 4 sous-régions principales : 1) l'aire moteur secondaire (M), 2) l'aire insulaire agranulaire (IA), comprenant une partie dorsale (AID) et ventrale (AIV), 3) l'aire orbitale (ORB), comprenant une partie latérale (LO) et ventrale (VO) et 4) le cortex préfrontal médian (CPF_m), lui-même organisé en aire cingulaire antérieure (Cg), en aire prélimbique (PrL), en aire infralimbique (IF) et en aire orbitale médiane (MO) (**Figure 7**). Chacune de ces structures est fonctionnellement différente, ce qui leur permet de générer des patterns de comportement distincts. Le CPF_m se

compose à 80-90% de neurones pyramidaux excitateurs et à 10-20% d'interneurones inhibiteurs.

Figure 7. *Structure du cortex préfrontal chez le rongeur.*



Coordonnées :
- Bregma : +1,98 mm
- Interaural : 5,78 mm

Abréviations *: AID/AIV : aire insulaire agranulaire ; Cg1 : aire cingulaire antérieure ; IL : aire infralimbique ; LO/MO/VO : aires orbitales ; M1/M2 : aire moteur secondaire ; mPFC : cortex préfrontal médian ; PrL : aire prélimbique.*

Adapté de (Paxinos, 2007)

6.1.1.2. Les études chez l'Homme

Parce que de plus en plus d'études de neuro-imagerie rapportent une perturbation anatomo-fonctionnelle du CPF en lien avec les symptômes des troubles anxieux, il est primordial de comprendre le rôle exact de cette structure dans ces pathologies. Chez des volontaires sains, Chua et collaborateurs ont suggéré une association entre la peur conditionnée anticipée induite par l'attente de recevoir des chocs électriques et une

augmentation de l'activité du CCA et du COF (Chua *et al.*, 1999). De même, une méta-analyse a mis en évidence une activation systématique de la partie rostrale du CPF_{dm} lors d'une peur conditionnée anticipée, alors que la partie postérieure du CPF_{dm} et du CCA seraient beaucoup plus sollicités lors d'une peur conditionnée non anticipée (Mechias *et al.*, 2010). Les données d'imagerie cérébrale de Straube et collaborateurs chez la femme, sans antécédent psychiatrique, apportent des arguments supplémentaires en faveur d'une modification de l'activité du CPF en fonction du niveau d'anxiété ressentie. Ainsi, ils confirment que lorsque la peur anticipée de recevoir un choc électrique est intense, l'activité du CPF_{dm} est positivement corrélée avec le niveau d'anxiété ressentie alors que celle du CCA l'est négativement. Toutefois, lorsque la peur de recevoir ce choc est modérée, la corrélation entre l'activation du CCA et le niveau d'anxiété éprouvée devient positive (Straube *et al.*, 2009).

Il est donc normal de retrouver une hyperactivation du CCA et du COF chez des patients souffrant de TP et n'ayant reçu aucune médication, en condition de peur anticipée (Boshuisen *et al.*, 2002) ou lorsqu'il leur était demandé de se remémorer des situations personnelles plus ou moins anxieuses (Bystritsky *et al.*, 2001). Une étude d'imagerie par résonnance magnétique fonctionnelle (IRM_f) a également permis de montrer qu'après présentation de mots évoquant la peur, les patients souffrant de TP exhibent une activité accrue du CCA et du CPF_m (Maddock *et al.*, 2003) (**Tableau 8**).

Contrairement aux autres troubles anxieux, peu de données d'imagerie cérébrale sont disponibles pour les patients souffrant de TAG. Néanmoins, les quelques études qui s'y sont intéressées ont mis en évidence plusieurs anomalies dans le CPF de ces patients. Chez les adolescents souffrant de TAG, des études d'IRM_f rapportent une activation plus importante du CPF_v et du CCA en réponse à des expressions faciales de peur comparativement aux sujets sains (Monk *et al.*, 2006; McClure *et al.*, 2007). Chez l'adulte avec un TAG, on observe une augmentation de l'activation du CCA dorsal en réponse à des stimuli verbaux amenant à ressentir une anxiété (*je vais perdre mon travail*) par opposition à des stimuli verbaux neutres (*aujourd'hui est un bon jour*) (Hoehn-Saric *et al.*, 2004). En outre, cette hyperactivité est significativement diminuée après un traitement de 7 jours par un antidépresseur, le citalopram (Hoehn-Saric *et al.*, 2004). Une étude d'IRM_f conduite chez 27 patients atteints de

TAG, avec un score moyen de 67,37 dans le questionnaire sur les inquiétudes de Penn State (PSWQ), a mis en évidence une diminution de l'activité du CPF_{vm} en réponse à des signaux faisant référence à un sentiment de sécurité *versus* des signaux de peur, comparativement aux sujets sains (Via *et al.*, 2018). Les patients avec un TAG présenteraient donc un défaut dans le traitement des signaux de sécurité assuré par le CPF_{vm}, qui de manière intéressante est négativement corrélé avec la sévérité des inquiétudes prédite par un score de PSWQ plus élevé (Via *et al.*, 2018). Enfin, la spectroscopie par résonance magnétique du proton (^{1}H-MRS), basée sur la mesure de différents métabolites présents naturellement dans le cerveau, indique une augmentation de la viabilité neuronale dans le CPF_{dl} (Mathew *et al.*, 2004), ce qui est pertinent avec l'hypermétabolisme glucidique retrouvé dans le CPF de ces patients et mesuré grâce à la tomographie par émission de positons (TEP) (Wu *et al.*, 1991) (**Tableau 8**).

Une méta-analyse regroupant 32 études d'imagerie cérébrale adressées aux patients souffrant de TAS, associées à l'utilisation de stimuli spécifiques de type expressions faciales ou verbales ou une mise en situation sociale angoissante a permis de mettre en évidence de nombreux dysfonctionnements fonctionnels dans le CPF (Bruhl *et al.*, 2014). Ainsi, une majorité des études basées sur ces stimuli décrivent une plus grande activation de toutes les régions du CPF, excepté pour le CPF_{dl} où les résultats sont plus mitigés, avec un rapport d'activation/inhibition de de 5 pour 4 études (**Tableau 8**).

Enfin, dans la phobie spécifique, les résultats concernant l'état d'activation du CPF sont très contradictoires selon la région concernée. Dans la littérature, on retrouve aussi bien une augmentation de l'activation du CCA, suite à la présentation de mots spécifiques relatifs à la phobie animale (Straube *et al.*, 2007; Britton *et al.*, 2009), qu'une diminution de l'activation du COF chez les patients arachnophobes suite à la présentation de photo d'araignées (Schienle *et al.*, 2007). Au niveau du CPF_m, Hermann et collaborateur ont observé une diminution de l'activité de la partie dorsale et de la partie ventrale après exposition à des images en lien avec le sang chez des patients souffrant d'hématophobie (Hermann *et al.*, 2007). Cette dernière observation est cohérente avec le fait de retrouver une amélioration de l'efficacité du traitement par exposition à la réalité virtuelle chez les patients souffrant d'acrophobie après

des stimulations magnétiques transcraniennes répétées du CPF_m (Herrmann *et al.*, 2017) (**Tableau 8**).

Tableau 8. *Résumé des dysfonctions fonctionnelles du cortex préfrontal dans les troubles anxieux.*

TP	TAG	TAS	Phobie spécifique
↑	↑	↑↓	↑↓

Abréviations *: ↓ : diminution de l'activité, ↑ : augmentation de l'activité, TAG : trouble anxieux généralisé, TAS : trouble d'anxiété sociale, TP : trouble panique.*

6.1.1.3. Les études chez l'animal

Les études *in vivo* n'apportent guère de réponses supplémentaires sur le rôle du CPF dans les troubles anxieux puisque, comme chez l'Homme, des résultats contradictoires ont été obtenus dans les études visant à étudier le rôle de cette structure dans la réponse anxieuse.

La première preuve d'une implication du cortex dans l'anxiété a été retrouvée en 1984 chez le rat Sprague-Dawley, chez lequel un stress de manipulation induit une diminution du nombre total de sites de liaison de faible affinité pour le GABA radiomarqué, suggérant ainsi une plus forte activité des neurones pyramidaux, habituellement contrôlés négativement par les interneurones GABA (Biggio *et al.*, 1984). Pour confirmer ou infirmer cette hypothèse, des rats génétiquement sélectionnés pour leur forte anxiété ont été utilisés à cet effet. Encore une fois, les résultats se sont révélés contradictoires selon la souche de rats utilisée. Bien qu'en condition basale aucune différence n'ait été retrouvée au niveau du nombre de cellules c-FOS positives du CPF_m, un gène d'expression précoce, entre les rats HAB (pour *high anxiety-related behavior*) et les rats avec une faible anxiété (LAB, pour *low anxiety-related behavior*), les HAB démontrent toutefois une plus faible activation de la Cg1, mais pas du Prl ni de l'IL en conditions de stress de défaite sociale (Kalisch *et al.*, 2004). A l'inverse, on observe une plus forte expression de c-Fos dans le CPF_{dm} des rats Fischer F344, comparativement à des rats Sprague-Dawley, synonyme d'une activité accrue (Prinssen *et al.*, 2012) (**Tableau 9**).

Pour essayer de comprendre ces différences de résultats, de nombreuses équipes se sont intéressées aux conséquences d'une modulation de l'activité du CPF_m sur le comportement anxieux. Mais une fois encore, toutes ne s'accordent pas sur une seule et même conclusion, ce qui pourrait s'expliquer par des différences dans la souche animale employée, la région du CPF_m modulée, le type de modulation réalisée ou encore les tests de comportement utilisés. De nombreuses études montrent qu'une suppression de l'activité du CPF_m aurait des effets anxiolytiques. Par exemple, chez le rat Wistar mâle, une lésion excitotoxique du CPF_m à l'aide de l'acide iboténique augmente le temps passé et le nombre d'entrées dans les bras ouverts (BO) de l'EPM et augmente le temps passé et le nombre d'entrées dans le centre de l'OF (Lacroix *et al.*, 1998; Lacroix *et al.*, 2000), alors qu'une lésion du CPF_l n'a aucun effet sur ces paramètres. Une transsection du CPF_m augmente également ces paramètres dans l'EPM, et en plus, potentialise les effets anxiolytiques du diazépam (1 mg/kg) administré en intrapéritonéal avant une seconde exposition dans l'EPM (Gonzalez *et al.*, 2000). Une inactivation temporaire du CPF_{vm} par une injection de lidocaïne 2% ou de $CoCl_2$ 1mM, 10 minutes avant le test, augmente le nombre de punitions dans le VCT. Enfin, une lésion électrolytique du PrL (Maaswinkel *et al.*, 1996) ou une inactivation de cette région par du $CoCL_2$, 1 minute avant le test (Stern *et al.*, 2010), augmente le temps passé dans les BO de l'EPM sans affecter le temps d'enfouissement de la sonde dans le test d'enfouissement défensif ou *shock probe burrying* (Maaswinkel *et al.*, 1996). Chez le rats SD mâle, une lésion excitotoxique du CPF_m se traduit par une augmentation du temps passé et du nombre d'entrées dans les BO de l'EPM et une diminution du temps d'enfouissement de la sonde dans le test d'enfouissement défensif (Shah & Treit, 2003). Une inactivation pharmacologique du CPF_m par des injections intracorticales de midazolam (5 µg/côté), une BZD (Shah & Treit, 2004) ou de muscimol (4 nmol) (Shah *et al.*, 2004), un agoniste du récepteur $GABA_A$, augmente le temps passé dans les BO de l'EPM. Chez le rat Long-Evans mâle, une lésion excitotoxique de l'IL droit augmente le temps passé dans les BO de l'EPM, alors qu'une même lésion mais dans l'IL gauche n'a aucun effet sur ce paramètre (Sullivan & Gratton, 2002). Chez le rat Fischer F344 mâle, une lésion du CPF_{dm}, incluant les Cg1 et Cg2, avec de l'acide iboténique (10 µg/µl), 10 jours avant le test, augmente le temps d'interaction sociale dans le test d'interaction sociale (SIT) (Prinssen *et al.*, 2012). Pour finir, chez la souris C57BL/6J femelle adulte, une lésion cytotoxique du CPF_m augmente le temps passé et le nombre d'entrées dans les BO de

l'EPM et dans les couloirs successifs du *successive alleys test*, sans affecter les paramètres mesurés dans trois tests différents d'hyponéophagie (Deacon *et al.*, 2003) (**Tableau 9**).

D'autres études laissent supposer qu'une suppression de l'activité du CPF_m provoquerait des effets anxiogènes. De nouveau, chez le rat Wistar mâle adulte, une inactivation transitoire du CPF_m par une injection de muscimol (0,1 nmol) et de baclofène (1,0 nmol) réduit le temps passé dans les BO de l'EPM (de Visser *et al.*, 2011). De même, une injection intracorticale de 8-OH-DPAT (5, 10 et 50 ng), un agoniste du récepteur 5-HT_{1A}, localisé sur les neurones pyramidaux du CPF_m, a pour effet de diminuer le temps passé et le nombre d'entrées dans les BO de l'EPM (Solati *et al.*, 2011). A l'inverse, une administration intracorticale d'un antagoniste du récepteur 5-HT_{1A} (NAN-190, 0,25, 0,5 et 1 µg) augmente ces deux paramètres (Solati *et al.*, 2011). Une inactivation du CPF_{vm} par du $CoCl_2$ (1 mM) diminue le nombre d'entrées, sans affecter le temps passé, dans les BO de l'EPM et diminue le temps passé dans le compartiment lumineux du LDT (Lisboa *et al.*, 2010). Enfin, une lésion du PrL ou de l'IL diminue le temps passé dans les BO de l'EPM et dans le centre de l'OF, en prenant note toutefois que la distance ambulatoire est également diminuée (Jinks & McGregor, 1997). Chez le rat Sprague-Dawley mâle, une inactivation bilatérale du CPF_{vm} par une injection intracorticale de muscimol (500 ng/côté) diminue le temps d'interaction sociale chez les animaux ayant reçu un choc électrique inévitable au niveau de la queue, alors qu'à l'inverse, une activation du CPF_{vm} par la picrotoxine (100 ng/côté) prévient la diminution du temps d'interaction induit par le choc électrique (Christianson *et al.*, 2009). Bien qu'une inactivation de l'IL par injection de lidocaïne 2% n'entraîne aucun effet sur le *freezing,* un comportement d'immobilité protecteur retrouvé typiquement chez le rongeur, conditionné par la triméthylthiazoline (TMT), un composant des fèces de renard, une inactivation du PrL, quant à elle, diminue ce comportement typique au contact du prédateur (Fitzpatrick *et al.*, 2011) (**Tableau 9**).

Beaucoup d'études se sont donc intéressées aux effets d'une modulation négative de l'activité du CPF_m, mais peu ont investigué les effets d'une stimulation de cette région. Chez le rat Sprague-Dawley mâle adulte, des stimulations électriques délivrées dans l'IL augmentent le temps passé et le nombre d'entrées dans les BO de l'EPM comparativement aux stimulations dans le PrL (Shimizu *et al.*, 2018). Chez la souris C57BL/6J mâle adulte, une activation par optogénétique des neurones pyramidaux du CPF_m n'a d'effet ni dans le SIT, ni dans l'EPM (Covington et al., 2010). Cependant cette stimulation lumineuse augmente le temps d'interaction sociale chez les animaux ayant subi un stress chronique de défaite sociale (Covington et al., 2010). Il en est de même pour la stimulation chronique des cellules pyramidales de la couche V du CPF_m qui n'a aucune conséquence dans l'EPM chez les souris non stressées, alors qu'elle entraîne une augmentation du temps passé dans les BO de l'EPM chez les souris socialement défaites (Kumar et al., 2013). De manière intéressante, cette stimulation induit une activité anxiolytique à long-terme puisque ces effets sont toujours présents 10 à 14 jours après la dernière session de stimulation (Kumar et al., 2013) (**Tableau 9**).

En conclusion, les résultats contradictoires des lésions, des inactivations pharmacologiques ou des stimulations du CPF s'expliquent probablement par une différence de connectivité de chaque région, nécessitant le recrutement d'autres structures impliquées dans la régulation de la peur et de l'anxiété. C'est pourquoi, il est désormais plus pertinent d'étudier non plus une région, mais un ensemble de régions interconnectées.

Tableau 9. *Effets biologiques et comportementaux d'une modulation de l'activité du cortex préfrontal chez l'animal.*

Espèces	Sexe/âge	Modèle	Traitement	Stress	Résultats	Références
rats SD	♂		diazépam	Manipulation avant sacrifice	Site de liaison dans cortex cérébral : ↓ Site de liaison dans cortex cérébral : ↑	(Biggio et al., 1984)
rats	♂	HAB (vs LAB)	diazépam/i.v./0.2-1 mg/kg	IRM_{ph}, EPM, défaite sociale	Site de liaison dans Cg1, PrL, IL : Ø IRM_{ph} : ↓ diminution signal BOLD dans CPF_{dm} ROXY : ↓ activation CPF_{dm} Fos-IR : ↓dans Cg1, Ø in PrL/IL	(Kalisch et al., 2004)
rats F344	♂	HAB (vs LAB)			Perfusion CPF_{dm}/CPF_{vm} : ↑ c-FOS in CPF_{dm} : ↑	(Prinssen et al., 2012)
rats Wistar	♂ 3 mois	lésion excitotoxique CPF_l		-	OF : Ø EPM : Ø	(Lacroix et al., 2000)
rats Wistar	♂ 3 mois	lésion excitotoxique CPF_m		-	OF : ↑ temps/entrées centre EPM : ↑ temps/entrées BO	(Lacroix et al., 1998; Lacroix et al., 2000)
souris C57BL/6J	♀ 14-20 sem	lésion cytotoxique CPF_m		-	Black/White alley : Ø EPM : ↑ temps/entrées BO Successive alleys : ↑ temps/entrées couloirs successifs Hyponéophagie : Ø	(Deacon et al., 2003)
rats Wistar	♂	transection CPF_m	diazépam/i.p./1 mg/kg	- -	EPM ($1^{ère}$ exposition) : ↑ temps/entrées BO EPM (2^{nde} exposition) : Ø EPM (2^{nde} exposition) : ↑ temps BO	(Gonzalez et al., 2000)
rats SD	♂	lésion excitotoxique CPF_m		-	EPM : ↑ temps/entrées BO Shock probe burying : ↓ temps enfouissement	(Shah & Treit, 2003)
rats SD	♂	inactivation pharmaco CPF_m	midazolam muscimol	- -	EPM : ↑ temps BO Shock probe burying : Ø	(Shah et al., 2004; Shah & Treit, 2004)
rats Wistar	♂ 12-13 sem	inactivation pharmaco CPF_m	muscimol + baclofene	-	EPM : ↓ temps BO	(de Visser et al., 2011)
rats Wistar	♂	activation pharmaco CPF_m inactivation pharmaco CPF_m	NAN-190/0,25-0,5-1 µg 8-OH-DPAT/ 5-10-50 ng	- -	EPM : ↑ temps/entrées BO EPM : ↓ temps/entrées BO	(Solati et al., 2011)
souris C57BL/6J	♂ 9-10 sem	activation optogénétique CPF_m (vs mCherry)		CSDS (10 j) -	SIT : ↑ interaction sociale SIT : Ø EPM : Ø	(Covington et al., 2010)
rats SD	♂ 60-70 j	activation pharmaco CPF_{vm} inactivation pharmaco CPF_{vm} (vs veh)	picrotoxine 100 ng/côté muscimol 500 ng/côté	- chocs queue - chocs queue	SIT : Ø SIT : ↓ comportement anxieux induit par le stress SIT : Ø SIT : ↓ social exploration	(Christianson et al., 2009)

Tableau 9. *Effets biologiques et comportementaux d'une modulation de l'activité du cortex préfrontal chez l'animal (suite).*

Espèces	Sexe/âge	Modèle	Traitement	Stress	Résultats	Références
rats Wistar	♂	inactivation pharmaco CPF_{vm}	$CoCl_2$	-	EPM : ↓ entrées BO LDT : ↓ temps compartiment lumineux	(Lisboa et al., 2010)
rats Wistar	♂	inactivation pharmaco CPF_{vm}	lidocaine (2%) CoCl2 (1 mM)	-	VCT : ↑ nombre coups de langue punis	
rats SD	♂	inactivation pharmaco IL	lidocaine HCL	-	Freezing induit par TMT : Ø OF : Ø	(Fitzpatrick et al., 2011)
		inactivation pharmaco PrL		-	Freezing induit par TMT : ↑ OF : Ø	
rats Wistar	♂	lésion IL		-	OF : ↓ temps centre, ↓ distance ambulatoire EPM : ↓ temps BO	(Jinks & McGregor, 1997)
		lésion PrL		-	OF : ↓ temps centre EPM : ↓ temps BO	
rats SD	♂ adulte	stimulation électrique IL Stimulation électrique PrL			EPM : ↑ temps BO EPM : Ø	(Shimizu et al., 2018)
rats Wistar	♂	lésion électrolytique PrL		-	EPM : ↑ temps BO Shock probe burying : Ø	(Maaswinkel et al., 1996)
Rats Wistar	♂ 14-16 sem	inactivation pharmaco PrL	CoCl2/1 min avant test	-	EPM : ↑ temps BO	(Stern et al., 2010)
souris C57BL/6J	♂ 4-8 mois	activation optogénétique PrL (Thy1-Chr2 vs WT)		- CSDS (15 j)	EPM : Ø EPM : ↑ temps BO	(Kumar et al., 2013)
rats Long Evans	♂ 3 mois	lésion excitotoxique IL doit		-	EPM : ↑ temps BO	
		lésion excitotoxique IL gauche		-	EPM : Ø	
F344 rats	♂	lésions CPF_{dm} (Cg1 and Cg2)	acide ibotenique/10 µg/µl	-	SIT : ↑ temps compartiment social, ↓ temps compartiment non-social	(Prinssen et al., 2012)

Abréviations *: ↑ : augmentation ; ↓ : diminution : Ø : pas d'effet, Cg : cortex cingulaire ; BO : bras ouvert ; $CPF_{m, dm, vm, l}$: cortex préfrontal médian/dorsomédian/ventromédian/latéral ; CSDS : stress chronique de défaite sociale ; EPM : elevated plus maze ; HAB : comportement anxieux élevé ; IL : cortex infralimbique ; i.p. : intrapéritonéal ; IRM_{ph} : imagerie par résonnance magnétique pharmacologique iv : intraveineux ; LAB : comportement anxieux bas ; LDT : light/dark test ; OF : open field ; PrL : cortex infralimbique ; SD : sprague-Dawley ; sem : semaine ; SIT : social interaction test ; TMT : triméthylthiazoline ; VCT : Vogel conflict test ; veh : vehicule ; WT : wild type.*

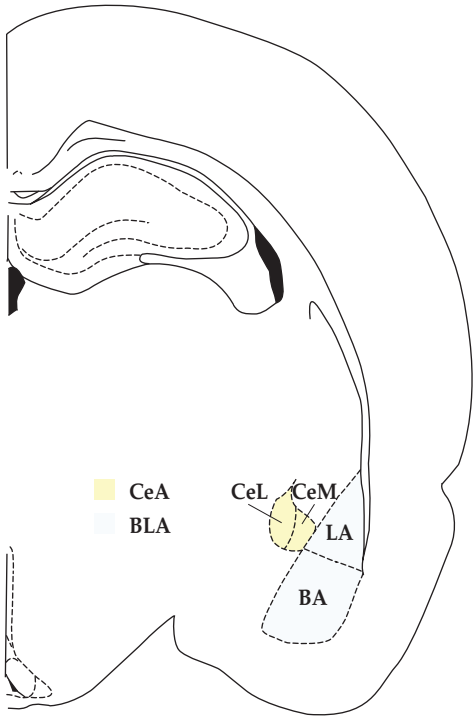
6.1.2. *L'Amygdale*

6.1.2.1. Structure

A ce jour, l'amygdale est certainement la région cérébrale la mieux documentée sur son rôle dans la peur et l'anxiété. L'amygdale, située dans le lobe temporal médial du cerveau, se compose du noyau basolatéral (BLA), lui-même constitué par les noyaux latéral (LA), basal (BA) et baso-médian (BMA) et du noyau central (CeA), lui-même constitué par les noyaux latéral (CeL) et médian (CeM) (Janak & Tye, 2015) (**Figure 8**). Chaque noyau possède des connexions anatomiques distinctes avec d'autres régions du cerveau remplissant différentes fonctions. La BLA est majoritairement constituée de neurones glutamatergiques excitateurs mais possèdent également des interneurones GABAergiques inhibiteurs, alors que les neurones de la CeA sont principalement GABAergiques (Janak & Tye, 2015).

L'amygdale joue un rôle fondamental dans l'intégration des données comportementales, végétatives et endocrines face à des peurs innées ou acquises. En intégrant ces informations sensorielles, envoyées par le cortex et le thalamus, l'amygdale est alors capable d'initier et de maintenir une réponse comportementale appropriée, physique et physiologique, liée à la peur et à l'anxiété. Elle est aussi impliquée dans la formation et la récupération des souvenirs émotionnels liés à la peur.

Figure 8. *Structure de l'amygdale chez le rongeur.*



Coordonnées :
- Bregma : -1,70 mm
- Interaural : 2,10 mm

Abréviations *: BA/LA : parties basale et latérale du noyau basolatéral ; BLA : noyau basolatéral de l'amygdale ; CeA : noyau central de l'amygdale ; CeL/CeM : parties médiane et latérale du noyau central.*

Adapté de (Paxinos, 2007)

6.1.2.2. Les études chez l'Homme

De nombreuses études d'imagerie cérébrale ont montré qu'une exposition à des stimuli évoquant la peur, comme des visages exprimant des émotions ou des sons non-verbaux liés à une situation de peur, était associée à une activation de l'amygdale chez des sujets sains, sans antécédent psychiatrique (Phillips *et al.*, 1998; Whalen *et al.*, 2001; Morris *et al.*, 2002; Fonzo *et al.*, 2015). Qu'en est-il chez des patients anxieux, souffrant donc de peur excessive ?

Dans le TP et le TAG, les résultats relatifs à l'activité de l'amygdale sont pour le moins contradictoires (**Tableau 10**). Ainsi, chez des patients souffrant de TP, une hyper-activation de l'amygdale, se traduisant par une augmentation du signal BOLD (de l'anglais *blood oxygen level dependent*) mesurée par IRM_f, a été rapportée en réponse à des mots liés à la panique (*i.e.* crise cardiaque, foule, évanouissement) (van den Heuvel *et al.*, 2005). Comparativement aux sujets sains, les patients atteints de TAG montrent également une activité accrue de l'amygdale lors d'une exposition à une épreuve d'anxiété anticipée non prévisible, relative à un stimulus sonore suggérant la peur (Buff *et al.*, 2017). De même, ces patients montrent une réponse exagérée de l'amygdale lorsqu'il leur est demandé de discriminer des visages craintifs versus des visages neutres ou heureux par rapport au groupe contrôle (Fonzo *et al.*, 2015; Fitzgerald *et al.*, 2017; Neumeister *et al.*, 2018). En revanche, deux études de IRM_f ont révélé une diminution de l'activité de l'amygdale chez les patients souffrant de TP par rapport aux sujets contrôle, face à des visages exprimant une crainte ou face à une anxiété anticipée (Boshuisen *et al.*, 2002; Pillay *et al.*, 2006). De la même manière, l'étude de Blair n'a pas réussi à mettre en évidence une hyperactivité de l'amygdale dans le TAG et suggère même une réactivité anormalement réduite en réponse à des expressions faciales de crainte (Blair *et al.*, 2008).

Dans le TAS et la phobie spécifique, une méta-analyse des données de la littérature de 2000 à 2007, utilisant l'IRM_f et la TEP, a suggéré une hyperactivité constante de l'amygdale (Etkin & Wager, 2007). Une seconde méta-analyse basée sur des études d'imagerie de 2007 à 2014 a confirmé ce dysfonctionnement (Bruhl *et al.*, 2014) (**Tableau 10**).

Tableau 10. *Résumé des dysfonctions de l'amygdale dans les troubles anxieux.*

TP	TAG	TAS	Phobie spécifique
↑↓	↑↓	↑	↑

Abréviations *: ↓ : diminution de l'activité, ↑ : augmentation de l'activité, TAG : trouble anxieux généralisé, TAS : trouble d'anxiété sociale, TP : trouble panique.*

6.1.2.3. Les études chez l'animal

Chez l'animal, et plus précisément chez les singes et les rongeurs, des travaux mécanistiques utilisant divers outils (lésions locales, traitements pharmacologiques, optogénétique) ont confirmé les études menées chez l'homme en démontrant que l'amygdale contribue à la détection des menaces et à l'initiation et au maintien d'un phénotype anxieux. En premier lieu, il a été montré que l'exposition à un nouvel environnement anxiogène, comme l'OF, en conditions de forte ou faible luminosité, augmente l'expression de c-FOS dans certaines subdivisions de l'amygdale et notamment dans la BLA (Hale *et al.*, 2006). Puisque chez l'animal, l'amygdale semble être également hyperactive dans les situations anxiogènes, il y a fort à penser qu'une lésion de l'amygdale pourrait rétablir un phénotype normal. Cependant, peu d'études rapportent cela. Chez le rongeur naïf, dans le VCT ou encore dans le *fear-potentiated startle response*, il semblerait qu'une lésion excitotoxique bilatérale de la BLA ou de la CeA induise respectivement une augmentation du nombre de punitions (Moller *et al.*, 1997; Tripathi *et al.*, 2019) et une diminution de l'amplitude du sursaut (Ventura-Silva *et al.*, 2013), indicatif d'un effet anxiolytique. De même, chez le macaque rhésus, la lésion bilatérale de la CeA diminue le *freezing* des animaux lors de l'introduction d'un intrus ou d'un prédateur (Kalin *et al.*, 2004). Mais plus intéressant encore, chez le rat mâle adulte stressé par un stress chronique de contention ou par un stress chronique léger et imprédictible, une lésion bilatérale de la BLA ou de la CeA par lésions excitotoxiques ou électriques, corrige et prévient le phénotype anxieux induit par le stress dans l'EPM (Moller *et al.*, 1997; Jang *et al.*, 2011; Ventura-Silva *et al.*, 2013), l'OF (Ranjbar *et al.*, 2017) et le VCT (Tripathi *et al.*, 2019). Enfin, une seule étude contredit ces résultats puisqu'elle rapporte qu'une lésion bilatérale excitotoxique de la BLA chez le rat diminue le temps passé et le nombre d'entrées dans les bras ouverts de l'EPM, suggérant un effet anxiogène de la lésion (Izumi *et al.*, 2012). En conclusion, l'intégrité de l'amygdale est requise pour prévenir les comportements anxieux induits par un stress chronique mais ne semble pas être directement responsable des altérations du comportement en situation anxiogène, du moins chez l'animal.

Les traitements pharmacologiques apportent également des informations sur le rôle de l'amygdale dans l'anxiété. En effet, chez le rat Wistar, une injection bilatérale de 8-OH-DPAT, dans la BLA augmente le nombre de coups de langue dans le VCT et le temps passé dans le compartiment lumineux dans le LDT, représentatif d'un effet anxiolytique (Strauss *et al.*, 2013). L'inactivation de l'amygdale par une administration locale et bilatérale de midazolam ou de flurazépam, deux BZD, augmente respectivement le temps passé dans le compartiment lumineux et le nombre de transitions entre les deux compartiments dans le LDT (Strauss *et al.*, 2013), ainsi que le temps d'interaction sociale dans le SIT (Higgins *et al.*, 1991), évoquant un effet anxiolytique de ces molécules. De la même manière chez le rat Wistar, une injection de muscimol dans la BLA a pour conséquence d'augmenter le temps passé dans le compartiment lumineux du LDT (Bueno *et al.*, 2005) et le temps passé ainsi que le nombre d'entrées dans les BO de l'EPM (Hajizadeh Moghaddam *et al.*, 2008). A l'inverse, une injection de muscimol dans la CeL diminue le temps passé et le nombre d'entrées dans les BO de l'EPM chez le rat (Zarrindast *et al.*, 2008) et augmente le *freezing* non conditionné chez la souris C57BL6/J (Ciocchi *et al.*, 2010), alors que la bicucculine, un antagoniste compétitif du récepteur $GABA_A$, injectée dans la CeA produit l'effet opposé (Zarrindast *et al.*, 2008).

L'optogénétique a permis une approche plus sélective pour établir les relations de causalité entre l'activité neuronale et les comportements anxieux chez l'animal, grâce à la dissection d'un réseau neuronal précis. De ce fait, nous savons désormais, que chez la souris, la stimulation sélective des corps cellulaires des neurones pyramidaux de la BLA diminue le temps passé dans les BO de l'EPM, reflet d'un phénotype anxieux, sans affecter les paramètres de l'OF (Tye *et al.*, 2011). Cependant, l'activation des projections glutamatergiques de la BLA dans la CeL produit l'effet inverse, en augmentant le temps dans les BO de l'EPM et le centre de l'OF (Tye *et al.*, 2011). Il est donc normal de constater que l'inhibition de ces projections induit un effet anxiogène dans l'EPM et dans l'OF (Tye *et al.*, 2011). Au niveau de la CeL, l'activation des neurones PKC-δ^+ (*OFF*), rendus photosensibles grâce à l'injection d'un adénovirus Cre-dépendant, induit un effet anxiolytique dans trois tests différents ; l'EPM, l'OF et le LDT (Cai *et al.*, 2014). Toutefois, ces résultats ont été contestés par Botta et collaborateurs (Botta *et al.*, 2015). En effet, ces derniers ont montré qu'une activation des neurones PKC-$\boldsymbol{\delta}^+$ chez des souris C57BL6/J, diminue le temps passé dans les BO de l'EPM et

dans le centre de l'OF, alors que l'inhibition produit l'effet inverse (Botta *et al.*, 2015). Cependant, il est probable que ces effets soient la conséquence d'une diminution de l'activité locomotrice. Enfin, l'activation des neurones de la CeM, sous contrôle inhibiteur tonique des neurones de la CeL, engendre un *freezing* non conditionné chez la souris C57BL6/J, suggérant un effet anxiogène (Ciocchi *et al.*, 2010).

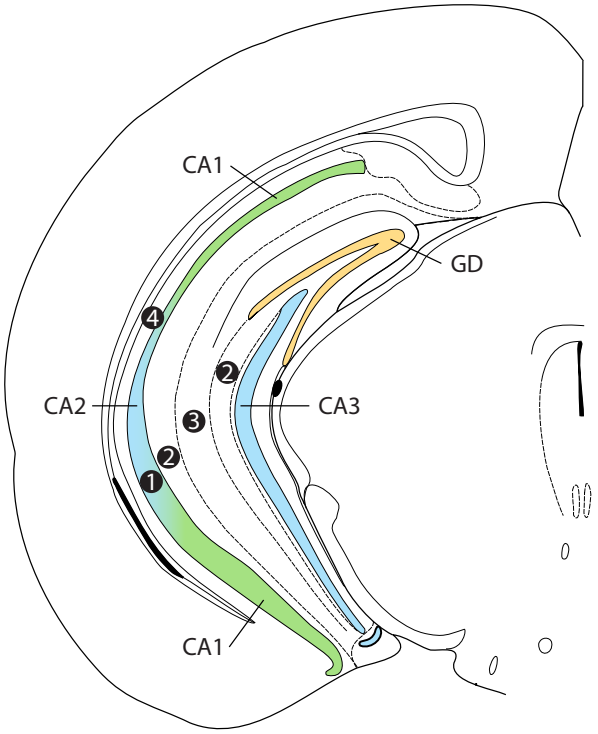
En conclusion, les différents types de neurones (pyramidaux excitateurs ou interneurones inhibiteurs), en fonction de leur expression des récepteurs et de leurs projections associées, peuvent jouer sur la réponse anxieuse de manière opposée, dépendant de la sous-région de l'amygdale où ils sont exprimés.

6.1.3. ***L'Hippocampe ventral***

6.1.3.1. Structure

L'hippocampe est une structure sous-corticale enroulée sur elle-même, occupant la face médiane du lobe temporale. Il est bien connu pour être composé de 2 sous-régions, le gyrus denté (GD) et la corne d'Ammon, elle-même subdivisée en 3 parties (CA3, CA2 et CA1) (**Figure 9**). L'hippocampe contient 4 couches cellulaires : l'*alveus*, dont les axones des cellules pyramidales sont dirigés vers le subiculum, le *stratum oriens* (4) contenant les cellules en corbeille, le *stratum pyramidale* (1), formé par les corps cellulaires des cellules pyramidales glutamatergiques, le *stratum radiatum* (2) et le *stratum lacunosum moleculare* (3). Trois couches de cellules composent également le GD ; la couche granulaire, la couche moléculaire et la couche polymorphique. Le GD et la corne d'Ammon communiquent entre elles grâce aux projections axonales, appelées fibres moussues, des cellules granulaires du GD qui se projettent sur le *stratum radiatum* de la CA3. L'hippocampe communique ensuite avec les différentes régions cérébrales via les neurones pyramidaux de la CA1, qui constituent la principale voie de sortie de l'hippocampe (Toni & Schinder, 2015).

Figure 9. *Structure de l'hippocampe ventral chez le rongeur.*



Coordonnées :
- Bregma : -2,92 mm
- Interaural : 0,88 mm

Abréviations *: 1 : stratum pyramidale ; 2 : stratum radium ; 3 : lacunosum moleculare ; 4 : stratum oriens ; CA1/CA2/CA3 : cornes d'Ammon; GD: gyrus denté.*

Adapté de (Paxinos, 2007)

6.1.3.2. Les études chez l'Homme

Depuis les 10 dernières années, il a été mis en évidence que la partie dorsale de l'hippocampe (HPC_d) est impliquée dans les processus cognitifs, alors que la partie ventrale (HPC_v) joue plutôt un rôle dans la régulation de l'humeur. Selon une revue de la littérature sur la dissociation régionale de l'hippocampe, ceci pourrait s'expliquer par une différence de connectivité anatomique entre les deux sous-régions (Bannerman *et al.*, 2004). Alors que l'HPC_d envoie des projections vers le subiculum ou le CCA, l'HPC_v émet plutôt des efférences vers le CPF_m, l'amygdale et le noyau du lit de la strie terminale (BNST), des régions associées à l'axe hypothalomo-hypophysaire-surrénalien et impliquées dans les troubles anxieux. Ce

constat vient surtout des travaux menés chez l'animal, car peu d'études d'imagerie sont à ce jour disponibles concernant l'état d'activation de l'hippocampe dans les différents troubles anxieux. Toutefois, on retrouve une augmentation du signal BOLD dans l'hippocampe, reflet d'une activation accrue, chez les patients souffrant de TP avec ou sans agoraphobie après visualisation de situations où le sujet a l'impression d'un péril imminent (foules, lieux étroits, transports en commun) (Engel *et al.*, 2016) ou lors d'un souvenir d'une situation angoissante (Bystritsky *et al.*, 2001). Ces observations ont été infirmées par une étude de ^{1}H-MRS, où la viabilité neuronale de l'hippocampe des patients avec un TP est plus faible que chez les volontaires sains, suggérant une diminution de l'activité de cette structure (Trzesniak *et al.*, 2010). Ces travaux ne sont pas les seuls à suggérer une hyperactivation de l'hippocampe dans cette pathologie puisque que la TEP a montré une élévation du métabolisme glucidique dans l'hippocampe de patientes sujettes à un TP (Bisaga *et al.*, 1998). On retrouve également une diminution de l'activité hippocampique chez les patients souffrant de TAS, en corrélation avec l'anxiété déclenchée par une tâche arithmétique mentale dans laquelle le patient doit donner le résultat d'une opération mathématique sous la pression de l'investigateur (Kilts *et al.*, 2006). Pour finir, l'exposition des patients arachnophobes à des images, en rapport avec des araignées, suscite une augmentation de l'activité de l'hippocampe, comparativement aux sujets sains (Michalowski *et al.*, 2017).

6.1.3.3. Les études chez l'animal

Un certain nombre d'expériences menées chez l'animal a montré que l'hippocampe joue un rôle essentiel dans la régulation des émotions et dans la réponse au traitement antidépresseur.

D'une part, l'hippocampe intervient dans la neurogenèse adulte, un processus de division des cellules souches neurales présentes dans la zone sous-granulaire du GD, qui se différencient en progéniteurs neuronaux aboutissant à la production de 700 jeunes neurones par jour chez l'Homme et 8 000 à 10 000 chez le rongeur, et ce tout au long de la vie (Toni & Schinder, 2015). En utilisant un modèle de souris transgénique iBax, il a été montré que la

délétion génétique du gène pro-apoptotique Bax, permettant d'augmenter sélectivement la production hippocampique de nouveaux jeunes neurones, n'affecte pas la réponse anxieuse des animaux naïfs dans l'OF et dans l'EPM (Hill *et al.*, 2015). En revanche, l'ablation de la neurogenèse hippocampique adulte, que ce soit dans un modèle murin génétiquement modifié ou suite à l'irradiation du GD par des rayons X, est suffisante pour prévenir les effets comportementaux délétères d'une administration chronique de corticostérone (David *et al.*, 2009; Hill *et al.*, 2015). De plus, la neurogenèse hippocampique adulte est un processus nécessaire à la réponse comportementale induite par un traitement chronique aux antidépresseurs, puisque cette réponse est partiellement affectée par une irradiation du GD (David *et al.*, 2009).

D'autre part, l'hippocampe est directement impliqué dans la régulation des émotions. D'abord, parce qu'il participe aux processus cognitifs en lien avec la mémorisation et la peur conditionnée, donc apprise. Ensuite, parce qu'il intervient dans la peur non conditionnée, donc innée. Dans le cas de la peur apprise, plusieurs études rapportent qu'une lésion de l'hippocampe perturbe l'acquisition et/ou l'expression du *freezing* en réponse à un stimulus conditionné associé à un stimulus aversif non conditionné (Bannerman *et al.*, 2004). Dans ce type de test, comme le *fear conditioning*, il est demandé à l'animal d'associer un contexte neutre (son, odeur, lumière) à un signal aversif (choc électrique) puis, la réponse de peur conditionnée de l'animal, à savoir le *freezing*, est évaluée. Ainsi, ce type d'approche permet d'évaluer l'apprentissage associatif de la peur et de la mémoire et permet donc d'être transposé chez l'Homme afin de mieux comprendre les symptômes retrouvés chez les sujets souffrants d'ESPT, où l'anxiété ressentie par le patient fait appel à un souvenir d'un événement traumatisant vécu dans le passé. Dans le cas de la peur innée, une lésion de l'HPC_v affecte les paramètres mesurés dans l'EPM, le NSF, le SIT ou le LDT, des tests qui n'incluent aucun apprentissage ou conditionnement préalable. Toutes les études s'accordent à dire qu'une lésion de l'HPC_v produit des effets anxiolytiques. Chez le rat Lister hooded mâle, une lésion excitotoxique de l'HPC_v, induite par des injections locales multiples de N-methyl-D-aspartate (NMDA, 10 mg/ml), diminue la latence pour se nourrir dans un test d'hyponéophagie, augmente le temps d'interaction sociale dans le SIT, tend à augmenter le temps passé dans les BO de l'EPM, diminue la latence pour entrer dans le compartiment

lumineux du LDT et augmente le temps passé dans la section 2 du *successive alleys test* (Bannerman *et al.*, 2002; McHugh *et al.*, 2004). Les mêmes conclusions ont pu être faites chez le rat Dark Agouti mâle, où la lésion de l'HPC_v réduit la latence pour se nourrir dans un test d'hyponéophagie et la latence pour rentrer dans le compartiment lumineux du LDT (Bannerman *et al.*, 2003). Les rats Long Evans mâles présentant une lésion de l'HPC_v, provoquée par l'acide iboténique (10 mg/ml), passent également plus de temps et rentrent plus fréquemment dans les BO de l'EPM (Kjelstrup *et al.*, 2002). Chez ces animaux, la lésion de l'HPC_v réduit également le temps de *freezing* après exposition à une odeur de chat mais n'a aucun effet lorsque le prédateur est visuellement présenté aux rats, à travers une vitre en plexiglas (Pentkowski *et al.*, 2006). Ceci suggère que l'HPC_v, en plus de jouer un rôle dans le comportement anxieux, aide à moduler les comportements défensifs non conditionnés liés à des stimuli spécifiques menaçants. Cette diminution du comportement défensif face à un prédateur, comme un serpent en caoutchouc, est aussi retrouvée chez le singe rhésus présentant une lésion excitotoxique de l'hippocampe (Chudasama *et al.*, 2008).

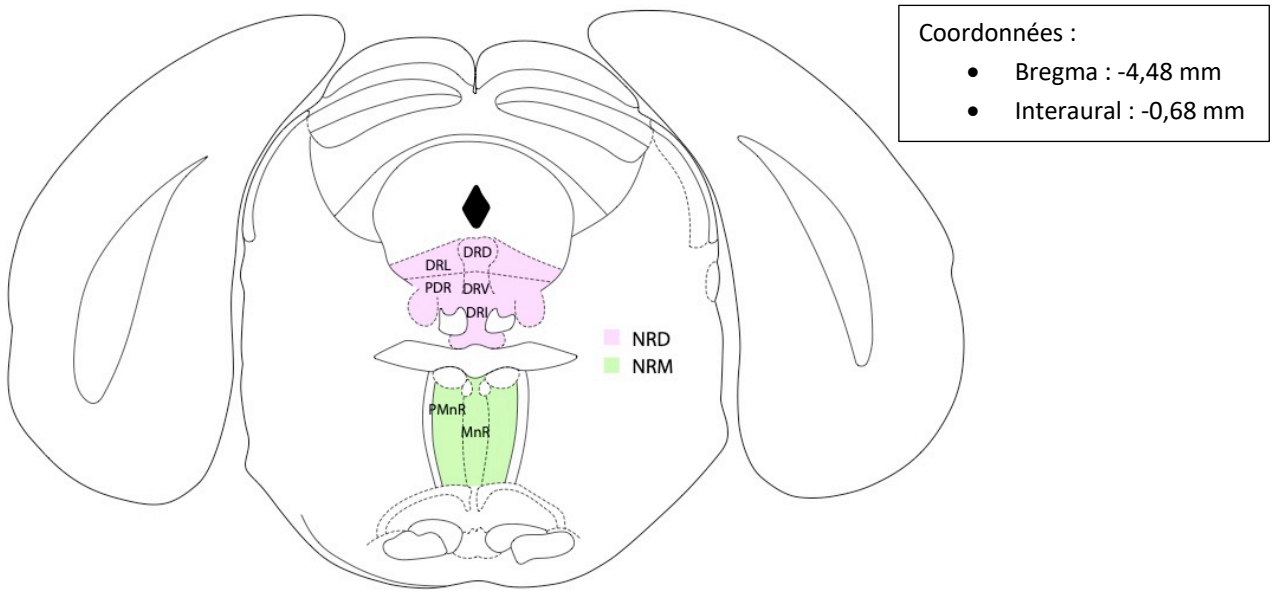
Ces résultats indiquent que certains comportements de type anxieux pourraient être régulés par une hyperactivité de l'hippocampe, laissant à penser qu'une inhibition de cette structure pourrait être anxiolytique. D'une part, l'inhibition des cellules granulaires du GD ventral chez les souris POMC-eNpHR3.0, génétiquement modifiées pour exprimer des récepteurs photosensibles dans cette région, n'a aucun effet sur les paramètres mesurés dans l'EPM et dans l'OF, ce qui suggère qu'une brève suppression de l'activité du GD n'a aucun impact sur le niveau d'anxiété basal (Kheirbek *et al.*, 2013). D'autre part, la stimulation lumineuse de ces cellules chez les souris POMC-ChR2, n'induit pas de phénotype anxieux comme on aurait pu l'imaginer, mais au contraire augmente le temps passé dans les BO de l'EPM et le centre de l'OF (Kheirbek *et al.*, 2013). Les résultats dépendent donc de la zone de l'hippocampe étudiée. Malheureusement, aucune expérience n'a à ce jour évalué les effets d'une stimulation ou d'une inhibition des neurones des cornes d'Ammon dans l'anxiété innée. De plus, il est important de souligner que les études sur les lésions sont difficiles à interpréter car il est possible que des mécanismes de récupération post-chirurgie ou des systèmes de compensation, tels que le recrutement d'autres structures cérébrales se mettent en place.

6.1.4. *Le Noyau du raphé dorsal*

6.1.4.1. Structure

Ensemble de structures sous-corticales, le noyau du raphé est divisé en parties dorsale (NRD) et médiane (NRM). Le NRD est lui-même divisé en plusieurs sous-parties : 1) la partie dorsale (DRD), innervant le CPF_m, l'amygdale, l'HPC_v, le NAc, le BNST, l'habenula latérale et l'hypothalamus 2) la partie ventrale (DRV), se projetant sur le noyau caudé, le putamen et les cortex visuels et moteurs, 3) la partie latérale (DRL), émettant des projections vers le thalamus et l'hypothalamus 4) la partie postérodorsale (PDR) ou caudale se projetant sur l'hippocampe et 5) la partie interfasciculaire (DRI) innervant le thalamus, l'HPC_d, le cortex entorhinal et le cortex frontal (Monti, 2010) (**Figure 10**). Toutes ces sous-régions se composent majoritairement de neurones sérotoninergiques mais contiennent également des neurones non sérotoninergiques exprimant entre autres de la dopamine, du GABA et du glutamate. La majeure partie de l'innervation sérotoninergique des structures cortico-limbiques provient donc du NRD (Hornung, 2003). Enfin, le NRD reçoit préférentiellement des afférences des structures du système limbique, comme les projections glutamatergiques de l'habenula latérale, de l'hypothalamus, de l'aire tegmentale ventrale ou du cortex PrL (Hornung, 2003).

Figure 10. *Structure du noyau du raphé dorsal.*



Abréviations *: DRD/DRL/DRV/DRI : parties dorsale, latérale, ventrale et interfasciculaire du noyau du raphé dorsal ; NRD : noyau du raphé dorsal ; NRM : noyau du raphé médian ; PDR : partie postérodorsale du noyau du raphé dorsal ; PMnR/MnR : parties médiane et paramédiane du noyau du raphé médian*

Adapté de (Paxinos, 2007)

6.1.4.2. Les études chez l'Homme

On ne retrouve que peu ou pas d'étude d'imagerie dans la littérature concernant les altérations fonctionnelles et structurelles du NRD dans les troubles anxieux. Cependant, une étude d'association réalisée chez 213 patients atteints de TP avec ou sans comorbidité affective, a échoué à déceler une quelconque association entre les différents polymorphismes (rs1386494 A/G ou rs1386483 C/T) du gène codant pour la tryptophane hydroxylase de type 2 (TpH2), l'une des deux isoformes de l'enzyme limitante de la biosynthèse de la sérotonine préférentiellement exprimée dans les tissus neuronaux, et la prédisposition au TP (Maron *et al.*, 2007). En outre, il semblerait que le polymorphisme rs1386494 A/G soit moins fréquent chez les femmes atteintes de TP sans comorbidité, suggérant ainsi un possible effet sexe-dépendant de certains variants du gène de la TpH2 dans la susceptibilité au TP. De manière

intéressante, le polymorphisme rs1386494 A/G serait également associé à une diminution de la synthèse de sérotonine, estimée par TEP et tryptophane radiomarqué, dans le COF gauche de patients souffrant d'affections psychiatriques et porteurs de ce polymorphisme (Booij *et al.*, 2012).

6.1.4.3. Les études chez l'animal

Si les preuves de l'implication du NRD dans l'anxiété chez l'Homme sont limitées, de plus en plus de données chez l'animal suggèrent que ce noyau module les réactions de stress et d'anxiété.

Premièrement, une étude récente utilisant la photométrie chez des souris Vgat::GCaMP6s a montré que l'activité neuronale du NRD d'un animal naïf n'est pas la même selon le niveau de peur ressentie dans un environnement plus ou moins menaçant. Plus précisément, l'activité des neurones sérotoninergiques du NRD diminue à l'initiation du mouvement dans des environnements à menace faible ou modérée, comme l'OF, alors que les environnements à menace élevée, comme le *tail suspension test* (TST), inverse cette réponse en provoquant un mouvement de fuite (Seo *et al.*, 2019). De plus, si l'activation des neurones sérotoninergiques du NRD par optogénétique a tendance à supprimer l'initiation du mouvement dans l'OF, une stimulation de ces neurones la facilite dans le TST (Seo *et al.*, 2019), suggérant ainsi que les neurones sérotoninergiques du NRD sont capables de modifier leur action sur l'initiation du mouvement, passant ainsi d'une suppression à une facilitation du mouvement dans des conditions où la menace est élevée. Les interneurones GABAergiques du NRD sont également impliqués dans la régulation du mouvement, mais pour autant il semblerait qu'ils ne possèdent pas cette même capacité d'adaptation spécifique à l'environnement. En effet, la stimulation de ces neurones chez la souris Vgat-ires-Cre n'a un impact sur la régulation du mouvement que spécifiquement dans les environnements à valence négative, facilitant alors la fuite des animaux (Seo *et al.*, 2019).

Deuxièmement, la revue de Hale et collaborateurs, faisant état des différentes études d'immunohistochimie menées chez le rat, nous révèle qu'une exposition à un stress de type défaite sociale ou qu'une administration d'un agent anxiogénique augmente le nombre de cellules c-FOS positives dans les neurones sérotoninergiques du NRD (Hale *et al.*, 2012). D'autres études rapportent qu'une augmentation des concentrations en dioxyde de carbone ou en lactate de sodium, des molécules reconnues pour précipiter les attaques chez les patients atteints de TP, augmente préférentiellement l'expression de c-FOS dans les neurones sérotoninergiques du DRV, du DRL et du DRI mais pas du DRD (Johnson *et al.*, 2005). De ce fait, tout comme pour l'hippocampe, il existe très certainement une dissection fonctionnelle du NRD dans la régulation de l'anxiété. Cette hypothèse se confirme au niveau comportemental puisqu'une stimulation cérébrale profonde appliquée dans le DRD de rats Wistar mâles diminue la latence d'évitement dans le labyrinthe en T surélevé (ETM), un comportement considéré comme anxiolytique, alors qu'une même stimulation appliquée dans le DRL augmente la latence pour s'échapper, un comportement considéré comme panicolytique (Wscieklica *et al.*, 2017). De ce fait, les neurones du DRD seraient donc plutôt impliqués dans les comportements et les états anxieux, quand ceux du DRL seraient responsables des comportements liés aux attaques de panique. Étonnamment, ces résultats ne sont pas en accord avec les expériences de pharmacologie qui montrent qu'une inactivation des neurones sérotoninergiques du NRD via l'activation du récepteur 5-HT_{1A} (8-OH-DPAT ; 20 et 100 ng) ou du récepteur $GABA_A$ (muscimol ; 5 ng) induit une réponse de type anxiolytique avec une augmentation du temps d'interaction sociale (Higgins *et al.*, 1988). De même, l'activation DREADD-dépendante des neurones sérotoninergiques du NRD, génétiquement modifiés pour exprimer des récepteurs muscariniques couplés à des protéines G (Gi inhibitrice ou Gq activatrice) activables par la clozapine (CNO), diminue le nombre d'entrées dans le centre de l'OF et le temps passé dans les BO de l'EPM chez des souris RC::PDq;Pet1-cre (Teissier *et al.*, 2015). Toutefois, ces observations sont à interpréter avec précaution puisque cette activation diminue également la distance ambulatoire totale, suggérant que la diminution du temps passé dans les BO pourrait être la conséquence d'une diminution de l'activité locomotrice et non pas un effet directement lié à une activité anxiolytique. De manière intéressante, ce phénotype anxieux est corrigé par une inhibition DREADD-dépendante des neurones sérotoninergiques du NRD chez des souris RC::PDi;Pet1-

cre (Teissier *et al.*, 2015). Cette différence de résultat entre les modulations pharmacogénétiques et électriques s'expliquerait du fait que la DBS requière l'activation du récepteur $GABA_A$ puisque le blocage de ce récepteur par la bicuculline (10 µM) bloque les effets moléculaires du DBS (Moser *et al.*, 2003). Une telle stimulation dans le NRD diminuerait donc l'activité des neurones sérotoninergiques, qui d'une part expriment des récepteurs $GABA_A$ et d'autre part sont sous le contrôle inhibiteurs des interneurones GABAergiques.

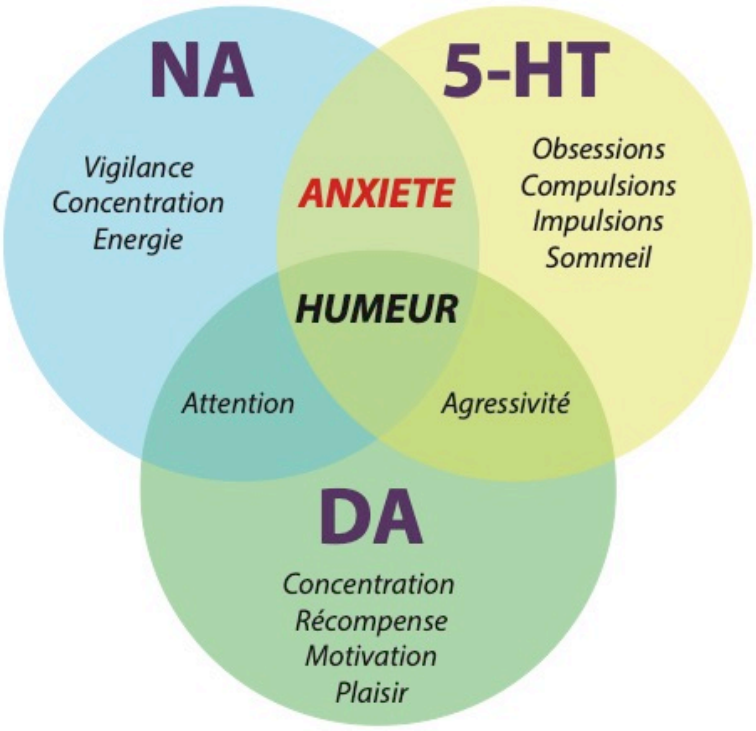
Tout laisse donc à penser qu'une diminution de l'activité des neurones sérotoninergiques du NRD pourrait avoir des effets anxiolytiques. Paradoxalement, les ISRS ont pour but d'augmenter la sérotonine disponible dans la fente synaptique et d'activer indirectement les récepteurs sérotoninergiques post-synaptiques.

6.2. Les neurotransmetteurs et leurs récepteurs

Les divers dysfonctionnements anatomiques décrits précédemment expliquent donc en partie la manifestation des symptômes anxieux, mais ils n'en sont pas la seule cause sous-jacente. En effet, certaines altérations moléculaires au niveau cérébral peuvent aussi être à l'origine des symptômes des troubles anxieux, comme nous allons le voir dans le chapitre qui suit. Cependant, les données actuelles ne permettent pas de distinguer l'implication d'une voie plutôt qu'une autre.

De plus, l'activité des médicaments anxiolytiques et antidépresseurs, désormais bien documentée, a permis de mettre en évidence une implication principale des systèmes sérotoninergique et GABAergique, bien que le rôle de la noradrénaline ou encore du glutamate ne soit pas à négliger dans la physiopathologie des troubles anxieux (**Figure 11**).

Figure 11. *Symptômes des troubles de l'humeur régulés par leurs monoamines.*



Une bonne balance de la sérotonine (5-HT), de la noradrénaline (NA) et de la dopamine (DA) a des effets bénéfiques, respectivement, sur le sommeil, sur la répression des obsessions, des compulsions et des impulsions, sur la socialisation, la vigilance et la concentration et sur la motivation et le plaisir. A l'inverse un déséquilibre de la 5-HT conduit à des pensées négatives, à la rumination et une faible estime de soi, un déséquilibre de la NA est responsable des troubles obsessionnels compulsifs (TOC) et du trouble de l'attention et hyperactivité (TDHA) et un déséquilibre de la DA induit des hallucinations, une addiction et une anhédonie. Un déséquilibre dans ces 3 neurotransmetteurs conduit à des troubles de l'humeur avec une instabilité émotionnelle et des pensées désorientées. Les troubles anxieux pourraient être causés par un déséquilibre de la balance 5-HT/NA, alors qu'un déséquilibre de la balance 5-HT/DA serait responsable d'une dysphorie agressive.

Adapté de (Kim & Abdi, 2014)

6.2.1. *Le GABA et les récepteurs GABAergiques*

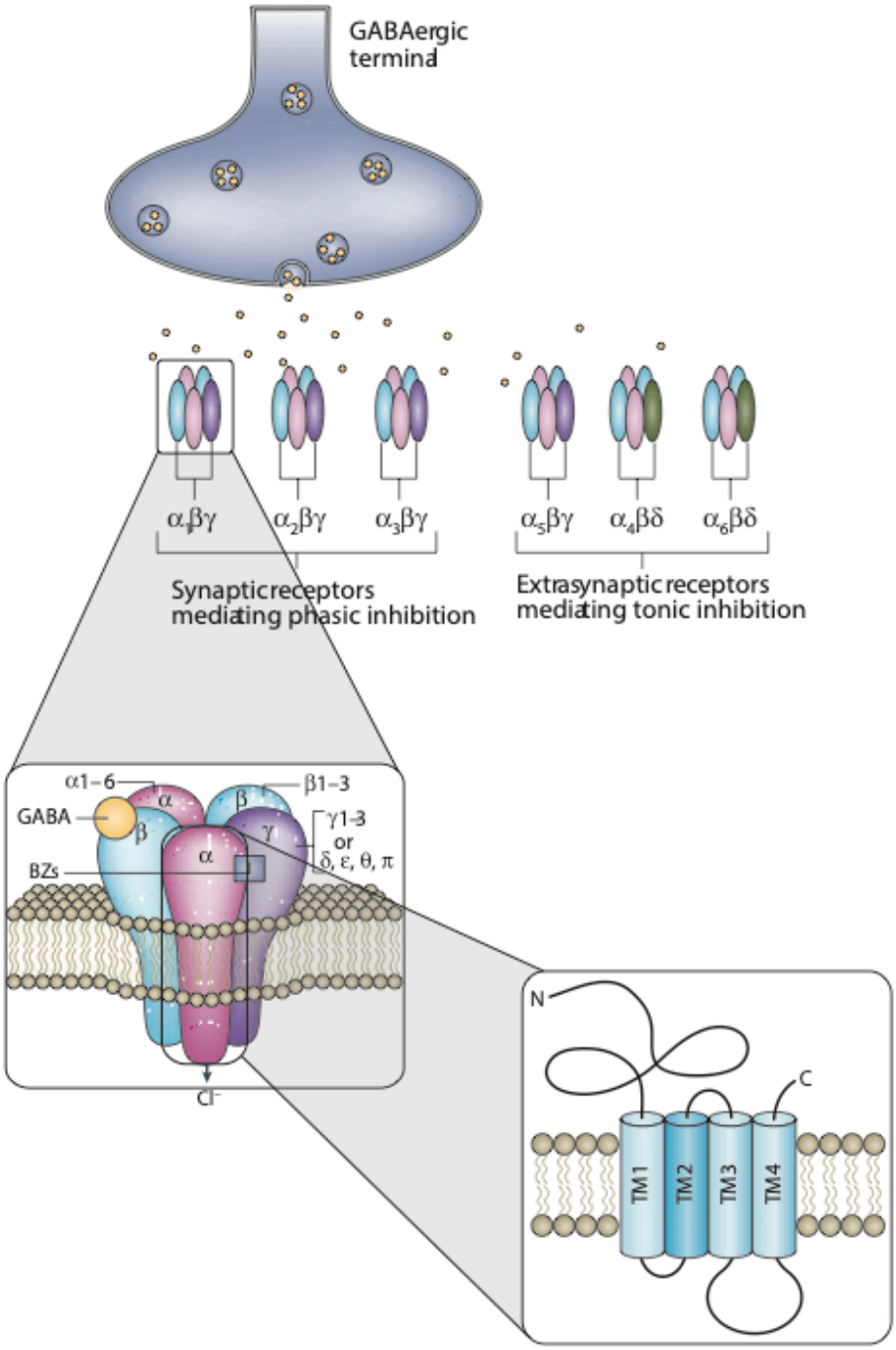
L'acide γ -amino-butyrique (GABA) est présent en fortes concentrations dans de nombreuses régions du cerveau, où dans une même région sa concentration peut atteindre jusqu'à 1 000 fois la concentration de neurotransmetteurs monoaminergiques classiques. Le GABA est synthétisé à partir de précurseurs issus du métabolisme du glucose, transformés en glutamate qui part l'action de la glutamate décarboxylase (GAD) se transforme à son tour en GABA (Olsen RW, 1999).

Le GABA est le principal neurotransmetteur inhibiteur du système nerveux central. On estime qu'environ $^1/_3$ des neurones du cerveau l'utilisent comme neurotransmetteur, la majeur partie de ces neurones étant des interneurones contrôlant l'excitabilité des circuits locaux dans une région cérébrale donnée (Bloom & Iversen, 1971). L'inhibition GABAergique est essentielle pour le maintien de la balance excitation/inhibition. Par ailleurs, les troubles anxieux pourraient être la conséquence d'un déséquilibre entre les influx excitateurs, principalement dus aux neurones glutamatergiques et les influx inhibiteurs GABAergiques dans toutes les régions cérébrales puisqu'un déficit de l'activité GABAergique entraînerait, entre autre, un état d'alerte, une anxiété et une agitation (Nutt & Malizia, 2001). En outre, dans une étude de ^{1}H-MRS , 12 des 14 patients non traités et diagnostiqués avec un TP ont montré une réduction des taux de GABA dans le cortex occipital, confirmant ainsi que les déficits de la fonction GABAergique contribueraient au processus physiopathologique du TP (Goddard *et al.*, 2001; Goddard *et al.*, 2004). Cette diminution est également retrouvée dans la matière grise du CCA et dans les noyaux gris centraux des patients atteints de TP (Ham *et al.*, 2007).

L'inhibition neuronale induite par le GABA est médiée par deux classes distinctes de récepteurs GABAergiques : le récepteur $GABA_A$ ionotropique, responsable de l'inhibition rapide et le récepteur $GABA_B$ métabotropique, responsable de la réponse inhibitrice prolongée. Le récepteur $GABA_A$ est un hétéro-oligomère composé de 5 sous-unités protéiques qui traversent la membrane neuronale, en formant un canal perméable au chlore (**Figure 12**). La majorité des récepteurs $GABA_A$ se composent de deux sous-unités α,, deux sous-unités β et une sous-unité γ.

Il est maintenant clairement reconnu que le complexe macromoléculaire $GABA_A$-canal chlore joue un rôle majeur dans la neurochimie de l'anxiété et du stress. Les premières preuves remontent aux années 80 où il a été montré qu'un stress induit par une contention ou des chocs électriques au niveau des pattes diminue la densité des récepteurs GABA de faible affinité dans diverses régions du cerveau de rat (Biggio *et al.*, 1984; Concas *et al.*, 1984). Par la suite, des études d'imagerie, utilisant la TEP, la tomographie par émission monophotonique (SPECT) ou encore la MRS ont confirmé cette hypothèse. Chez les patients non médicamentés souffrant de TP, une réduction globale de la densité des récepteurs $GABA_A$ avec un site de liaison aux BZD a été observée majoritairement dans le COF droit et dans le cortex insulaire droit, par PET en utilisant du flumazenil radiomarqué (Malizia *et al.*, 1998). Une autre étude, cette fois avec du iomazenil, a rapporté une diminution de la densité de récepteurs $GABA_A$ dans les lobes temporal et frontal, en comparaison avec les patients présentant une dysthymie sans comorbidité anxieuse (Kaschka *et al.*, 1995). Toutefois ces résultats sont à interpréter avec précaution puisque ces études ont été conduites dans un petit groupe de patients (n=7-9). Pour finir, l'hyperactivité du système limbique, souvent retrouvée chez les patients avec un TAG, résulte probablement de la diminution de la neurotransmission inhibitrice puisque ces patients affichent une régulation négative des récepteurs $GABA_A$ dans leur lobe temporal médian (Tiihonen *et al.*, 1997). Il est possible qu'une altération de l'expression de la GAD65 en soit aussi la cause. En effet, dans un modèle murin déficient en GAD65, le phénotype anxieux est augmenté dans l'OF et dans l'EZM et les concentrations de GABA cortical sont diminuées par rapport aux souris contrôles (Kash *et al.*, 1999).

Figure 12. *Structure des* récepteurs *GABAergiques*



*Le récepteur $GABA_A$, appartenant à la super famille des canaux ioniques ligand-dépendants, est constitué de 4 domaines transmembranaires, dont la partie extracellulaire N-terminale correspond au site de liaison du GABA. Le domaine extracellulaire contient également le site de liaison des BZD. Le récepteur $GABA_A$ est un hétéropentamère de cinq sous-unités (*α, β, γ, δ, ε, θ et π*) qui s'assemblent pour former un canal perméable au chlore. Malgré l'hétérogénéité considérable des sous-unités, la plupart des récepteurs $GABA_A$ exprimés dans le cerveau sont constitués de deux sous-unité* α, de deux sous-unités β et d'une sous-unité γ, cette dernière pouvant être remplacée par δ, ε, θ ou π.

Adapté de (Jacob *et al.*, 2008)

6.2.2. *La sérotonine et les récepteurs sérotoninergiques*

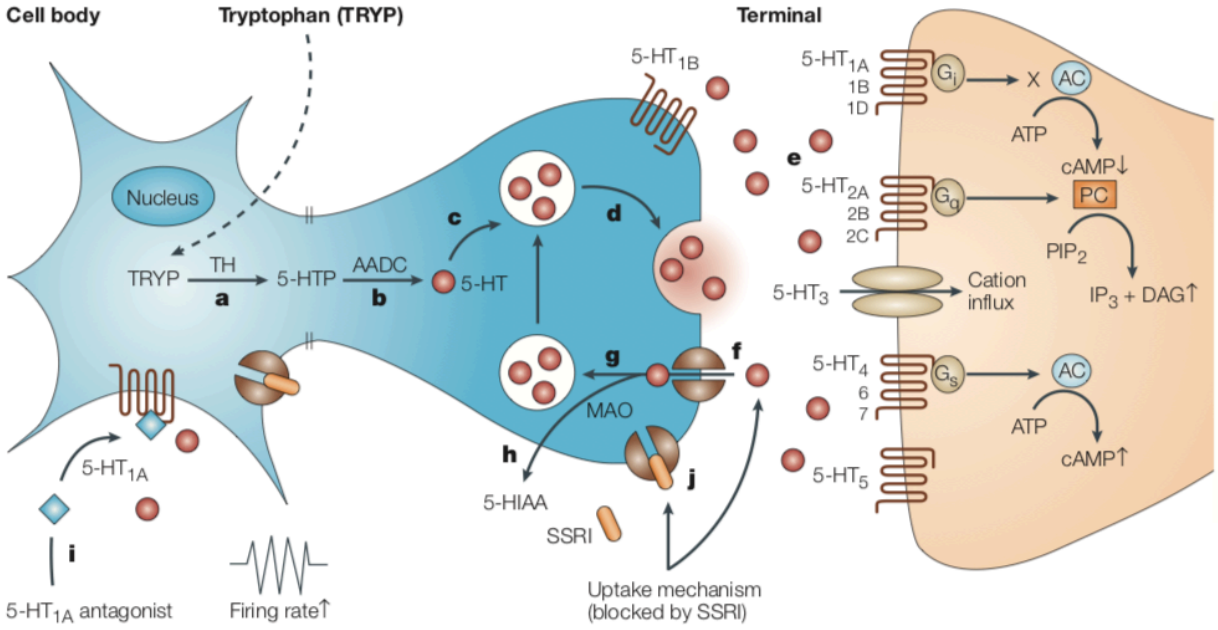
La sérotonine (5-HT) est synthétisée à partir du L-tryptophane au niveau périphérique par les cellules entérochromaffines de l'intestin et au niveau central par les neurones du raphé. Il existe deux théories pour le moins opposées concernant le rôle de la 5-HT dans les troubles anxieux.

La première hypothèse décrit une synthèse excessive de 5-HT ou une hyperactivité des récepteurs sérotoninergiques. En effet, chez les patients souffrant de TP, en absence de stimulus déclencheur de l'attaque, on retrouve un turn-over de la 5-HT cérébrale, estimé à partir de la veine jugulaire, quatre fois plus important que chez les sujets sains, ce qui s'avère positivement corrélé avec la sévérité de la pathologie (Esler *et al.*, 2007). Une étude de PET a aussi révélé une augmentation de la synthèse de 5-HT et de la disponibilité du transporteur de la 5-HT (SERT) chez les patients TAS, comparativement aux sujets sains, dans l'amygdale, le NRD et le CCA, également corrélé positivement avec la sévérité des symptômes (Frick *et al.*, 2015). Cette augmentation chez ces patients, intervenant lors d'une épreuve stressante de prise de parole en public, est cependant corrigée par l'administration de citalopram (40 mg) pendant 4 semaines, réduisant par la même occasion l'activité neurale, reflet d'une diminution du flux sanguin cérébral régional (Frick *et al.*, 2016). Cela se confirme en préclinique, où les souris $TPh2^{-/-}$, génétiquement modifiées pour présenter une diminution drastique des concentrations en 5-HT cérébrale avec une formation et une différenciation normales des neurones 5-HT, montrent un comportement de type anxiolytique dans l'EPM, le NSF et le *marble burrying test* (Mosienko *et al.*, 2012). Ce phénotype se retrouve également dans d'autres modèles animaux transgéniques, générés pour évaluer les conséquences d'une déplétion spécifique en 5-HT induite par destruction des neurones 5-HT du NRD ou inactivation des gènes des acteurs impliqués dans la synthèse de 5-HT (Fernandez & Gaspar, 2012).

La deuxième hypothèse est principalement basée sur l'efficacité des ISRS dans le traitement des troubles anxieux et penche donc en faveur d'un déficit en 5-HT. C'est le cas par exemple chez les femmes souffrant de TAG, chez lesquelles on retrouve une diminution des concentrations en 5-HT dans le liquide céphalo-rachidien, mesurées par une méthode immuno-enzymatique (Brewerton, 1995). De nouveau, cette observation se confirme en préclinique chez les souris Tph2KI, présentant des concentrations tissulaires en 5-HT réduites de 60 à 80% sans affecter l'expression génique de TpH2 et du SERT, qui montrent une augmentation de l'anxiété dans le LDT et dans le *marble burrying test* (Jacobsen *et al.*, 2012) (Beaulieu *et al.*, 2008).

Les anomalies du système sérotoninergique, retrouvées dans les troubles anxieux, peuvent également être la conséquence d'altérations fonctionnelles des divers récepteurs sérotoninergiques. La 5-HT possède de nombreux récepteurs dont la classification s'avère être très hétérogène (Filip & Bader, 2009). Les récepteurs sérotoninergiques sont classés en différentes familles dont chacune possède des propriétés qui lui sont propres (affinité pour la 5-HT, mécanisme de transduction) (**Figure 13**). Les récepteurs à 7 domaines transmembranaires couplés à des protéines G constituent la majorité des récepteurs de la 5-HT, que les études pharmacologiques ont permis de classer en $5\text{-HT}_{1\ (1A,\ 1B/1D,\ 1E,\ 1F)}$, $5\text{-HT}_{2\ (2A,\ 2B,\ 2C)}$, 5-HT_4, $5\text{-HT}_{5\ (5A,\ 5B)}$, 5-HT_6, 5-HT_7 (Hoyer *et al.*, 2002). Le récepteur $5\text{-HT}_{3\ (3A,\ 3B,\ 3C)}$ est le seul récepteur ionotropique, dont la structure en pentamère permet la formation d'un canal cationique. Le récepteur 5-HT_1 est celui qui possède la meilleure affinité pour la 5-HT, par opposition aux récepteurs 5-HT_2 et 5-HT_4, dont l'affinité pour le ligand est environ 1000 fois plus faible (Hoyer *et al.*, 2002). Tous les sous-types de récepteurs 5-HT_1 sont des récepteurs couplés à une protéine G*i* inhibitrice induisant une diminution de l'activité de l'adénylate cyclase (AC) conduisant à une réduction de la production d'adénosine monophosphate cyclique (AMPc) (Hoyer *et al.*, 2002). Le récepteur 5-HT_2 est couplé à une protéine G*q* qui interagit avec la phospholipase C et les récepteurs 5-HT_4, 5-HT_6 et 5-HT_7 sont couplés à une protéine G*s* activatrice qui active l'AC aboutissant à une production accrue d'AMPc (Hoyer *et al.*, 2002).

Figure 13. *Récepteurs sérotoninergiques et leur rôle dans les troubles de l'humeur.*



La nomenclature actuelle des récepteurs sérotoninergiques révèle une multitude de sous-types différents, classés en 7 familles (5-HT$_1$ à 5-HT$_7$). A part le récepteur 5-HT$_3$, constituant un canal cationique ligand-dépendant, tous les autres récepteurs de la sérotonine sont des récepteurs métabotropiques couplé à des protéines G (Gi, Gs ou Gq), caractérisées par des systèmes de transduction du signal intracellulaire différents, au niveau du neurone post-synaptique.

D'après (Wong *et al.*, 2005)

De larges preuves rapportent que les récepteurs sérotoninergiques, largement exprimés dans le système nerveux central, sont impliqués dans le contrôle de l'anxiété. La partie qui suit résumera brièvement le rôle de certains récepteurs de la 5-HT dans l'anxiété, à l'exception du récepteur 5-HT$_4$ qui fera l'objet d'une description ultérieure, davantage en accord avec la thématique de ce travail.

Le récepteur 5-HT_{1A} a été le premier récepteur sérotoninergique entièrement séquencé à la fin des années 1980 (Kobilka et al., 1987). Présent sous forme d'autorécepteur au niveau des corps cellulaires et des dendrites des neurones sérotoninergiques des noyaux du raphé, on le retrouve également sous forme d'hétéro-récepteur post-synaptique dans les régions cérébrales impliquées dans la régulation de l'anxiété, comme le CPF, l'hippocampe et l'amygdale. En utilisant la TEP, il a été observé que les patients non traités souffrant de TP démontrent une plus faible liaison des récepteurs 5-HT_{1A} pré- et post-synaptiques avec leur ligand radiomarqué dans le COF, le CCA, l'amygdale et le noyau du raphé, comparativement aux sujets contrôles (Neumeister *et al.*, 2004; Nash *et al.*, 2008). De même, les patients atteints de TAS non traité, affichent une diminution du potentiel de liaison du récepteur 5-HT_{1A} de 21% dans l'amygdale et de 24% dans le CCA, indiquant une altération de la neurotransmission sérotoninergique dans plusieurs régions limbiques, à l'exception de l'hippocampe (Lanzenberger *et al.*, 2007). En préclinique, les souris (5-HT_{1A} KO) présentant une délétion générale du gène du récepteur 5-HT_{1A} (auto- et hétéro-récepteurs), développent un phénotype anxieux, comme indiqué par une réduction du temps passé dans le centre de l'OF et une diminution du temps passé et du nombre d'entrées dans les BO de l'EPM et de l'EZM (Heisler *et al.*, 1998; Ramboz *et al.*, 1998). Pour plus de précision, l'utilisation d'une lignée double transgénique, dite « lignée de secours » a montré que la réexpression ectopique du récepteur 5-HT_{1A} dans le cerveau antérieur, y compris l'hippocampe et le cortex, corrige le comportement anxieux des souris 5-HT_{1A} KO, dans l'OF, l'EPM et le NSF (Gross *et al.*, 2002). L'utilisation du système tTS/tetO, permettant une délétion spécifique de l'expression du récepteur 5-HT_{1A} chez la souris ($Htr1a^{tetO}$), a mis en évidence que la suppression des autorécepteurs 5-HT_{1A} endogènes, en période de développement post-natal (entre PN14 et PN30) ou à l'âge adulte, suffit à augmenter l'anxiété à long-terme chez les animaux adultes (PN>90), alors qu'à l'inverse la suppression des hétéro-récepteurs 5-HT_{1A}, tout au long de la vie, ne modifie pas le comportement anxieux des animaux (Richardson-Jones *et al.*, 2011; Donaldson *et al.*, 2014). Enfin, dans l'EPM, que ce soit dans un modèle d'anxiété murin (souris DBA/2) (Cole & Rodgers, 1994) ou chez des rats naïfs (Griebel *et al.*, 1997), l'administration unique intrapéritonéale de buspirone augmente le temps passé dans les BO de l'EPM. De même, une injection de 8-OH-DPAT directement dans le NRD augmente le temps d'interaction sociale (Andrews *et al.*, 1994; Hogg *et al.*, 1994). En revanche, une injection de 8-OH-DPAT

dans l'HPC_V, dans la zone de projection des neurones sérotoninergiques du NRD, n'a aucune influence sur ce paramètre (Hogg *et al.*, 1994). Ces données supportent donc l'importance des autorécepteurs 5-HT_{1A} somatodentritiques du NRD dans la suppression des comportements anxieux, alors que les hétéro-récepteurs post-synaptiques ne seraient pas forcément impliqués dans la régulation de l'anxiété.

De nombreuses études précliniques supportent l'idée que le récepteur 5-HT_2 jouerait un rôle dans la régulation de l'anxiété. En effet, toutes les études menées chez le rongeur avec le m-chloro-phenylpiperazine (mCPP), un agoniste non sélectif du récepteur 5-HT_2 s'accordent sur ses effets anxiogènes dans divers tests d'anxiété (Quesseveur *et al.*, 2012). D'autre part, les souris 5-HT_{2A} KO constitutives montrent une réduction de leur anxiété dans l'EPM, l'OF et le LDT, alors que la réexpression de ce récepteur dans le cortex normalise l'état anxieux chez ces animaux (Weisstaub *et al.*, 2006). Dans l'EPM, le 2,5-dimethoxy-4-iodoamphetamine (DOI), un agoniste sélectif du récepteur 5-HT_{2A} produit un effet anxiolytique lorsqu'il est injecté par voie systémique chez la souris (Onaivi *et al.*, 1995; Nic Dhonnchadha *et al.*, 2003). Un effet qui est également retrouvé dans le FPT (Nic Dhonnchadha *et al.*, 2003). Le rôle du récepteur 5-HT_{2B} dans l'anxiété n'a que très peu été étudié, probablement expliqué par le manque de composé hautement sélectif. Cependant, la stimulation du récepteur 5-HT_{2B} par un agoniste, le BW723C86 administré par voie systémique, augmente le nombre de coups de langue punis dans le VCT chez le rat (Kennett *et al.*, 1998) et augmente le temps passé dans les BO de l'EPM et le nombre de transitions punies dans le FPT chez la souris (Nic Dhonnchadha *et al.*, 2003), indicatif d'un effet anxiolytique.

En ce qui concerne le récepteur 5-HT_3, la revue d'Oliver et collaborateurs, où le rôle de ce récepteur dans l'anxiété est largement mis en exergue, décrit des résultats cliniques et précliniques très controversés, concernant l'efficacité des antagonistes du récepteur 5-HT_3 (Olivier *et al.*, 2000). De plus, les études cliniques menées dans les années 1990 étant basées sur la classification du DSM-III, les résultats ne sont malheureusement pas toujours attribués à la bonne pathologie. Les résultats en préclinique sont tout aussi mitigés. Il en ressort que les antagonistes du récepteur 5-HT_3 induisent une activité anxiolytique dans le LDT et dans le test du *fear-potentiated startle*, alors qu'ils ne présentent aucune efficacité dans les tests des

vocalisations ultrasoniques conditionnées, de l'enfouissement défensif (*defensive burying*) et de l'hyperthermie induite par le stress (*stress-induced hyperthermia*) et que les effets dans l'EPM et le SIT sont largement contestés (Olivier *et al.*, 2000). Néanmoins, un nouvel antagoniste du récepteur 5-HT_3 pourrait redonner de l'espoir. En effet, le 6k (N-(benzo[*d*]thiazol-2-yl)-3-ethoxyquinoxalin-2-carboxamide), administré chez la souris Swiss albinos mâle à différentes doses, induit une réponse de type anxiolytique chez ces animaux dans l'OF, l'EPM, le LDT et le test du *Hole-Board* (Kurhe *et al.*, 2014).

L'hypothèse de l'implication du récepteur 5-HT_6 dans l'anxiété est elle aussi tout aussi discutée. Chez le rat Sprague Dawley, l'administration d'une dose unique de WAY-208466, 30 minutes avant le test, réduit le temps d'enfouissement défensif et la latence pour se nourrir dans le test de l'hypophagie induite par la nouveauté, suggérant un effet anxiolytique (Carr *et al.*, 2011). Cet effet est également retrouvé dans trois autres tests d'anxiété, l'OF, l'EPM et le SIT, après une administration d'un agoniste (EDM 386088) directement dans le CPF_{dm} chez la souris C57BL/6J mâle adulte (Geng *et al.*, 2018). Paradoxalement, l'inactivation du récepteur 5-HT_6 n'induit pas forcément l'effet inverse comme on aurait pu l'imaginer. Effectivement, chez le rat Wistar, l'administration d'un antagoniste du récepteur 5-HT_6 (SB 399885, 1-3 mg/kg) augmente le nombre de coups de langue punis dans le VCT, augmente le temps passé et le nombre d'entrées dans les BO de l'EPM et augmente le nombre de transitions punies dans le FPT, des effets comparable à ceux du diazépam (2,5-5 mg/kg) (Wesolowska & Nikiforuk, 2007). Des résultats qui ont récemment étaient infirmés chez la souris C57BL/6J, où l'administration intracorticale d'un antagoniste du récepteur 5-HT_6 (SB 271046, 0,6-2,4 µg) diminue le temps passé dans le centre de l'OF et dans les BO de l'EPM (Geng *et al.*, 2018).

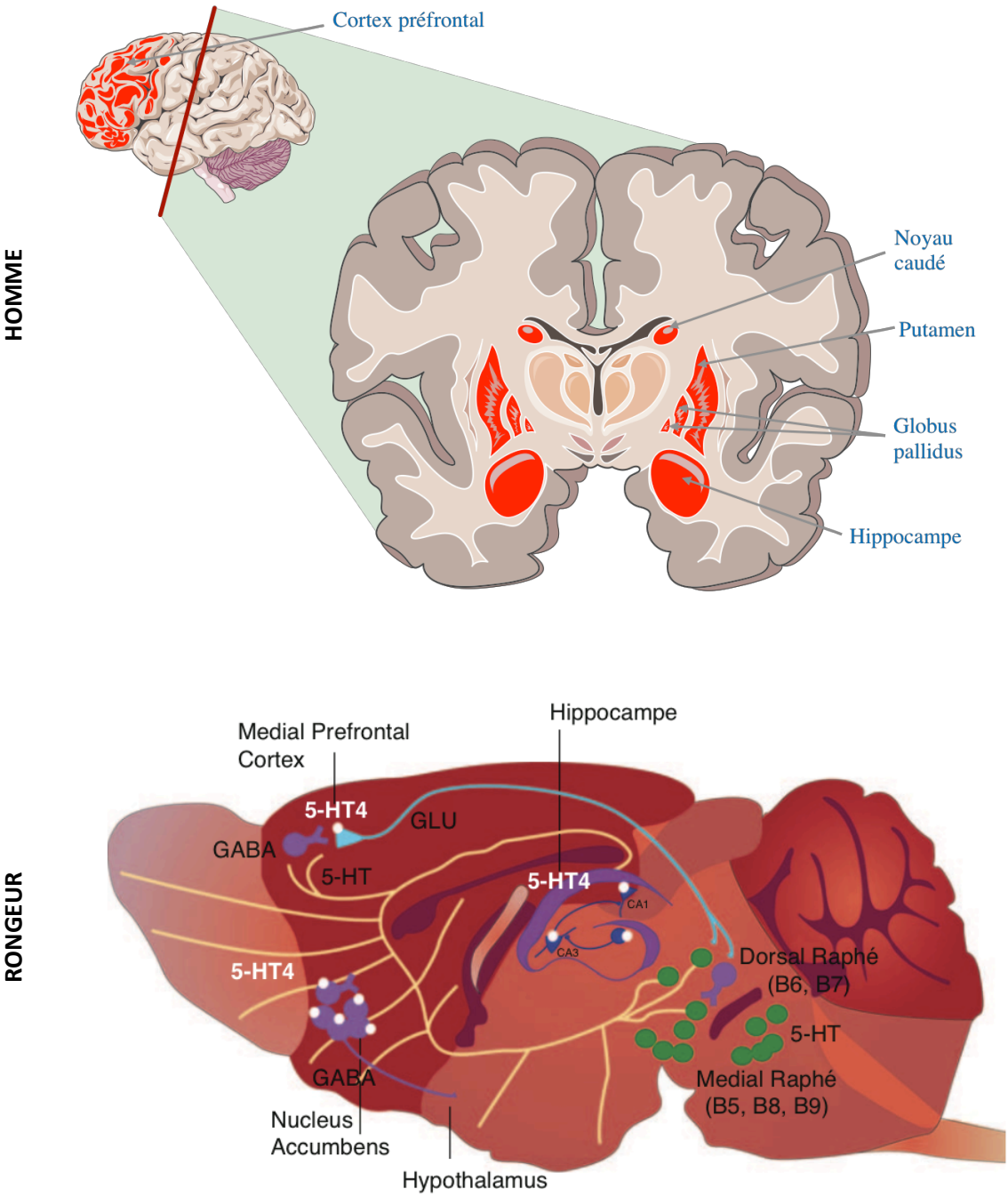
CHAPITRE 2 - LE RÉCEPTEUR 5-HT$_4$, UNE NOUVELLE CIBLE D'INTÉRÊT POUR TRAITER RAPIDEMENT LES TROUBLES ANXIEUX.

Depuis quelques années, l'intérêt pour le récepteur 5-HT$_4$ a gagné un essor considérable. Le récepteur 5-HT$_4$ constitue désormais une cible d'intérêt majeur à privilégier dans diverses pathologies, grâce à sa capacité à corriger les troubles cognitifs (Lecoutey *et al.*, 2014) et anxio-dépressifs (Mendez-David *et al.*, 2014).

1. Localisation du récepteur sérotoninergique de type 4

Le récepteur sérotoninergique de type 4 (5-HT$_4$) serait une cible de choix car, que ce soit chez l'Homme ou chez le rongeur, l'expression du récepteur 5-HT$_4$ est retrouvée dans les régions limbiques (CPF$_m$, HPC et NAc), structures impliquées dans les pathologiques psychiatriques comme l'anxiété et la dépression (Bockaert *et al.*, 2004; Samuels *et al.*, 2016) (**Figure 14**). Les premières études d'autoradiographie ont été réalisées en 1993 chez le cochon d'Inde et le rat (Grossman *et al.*, 1993), dans le but de déterminer la distribution régionale du récepteur 5-HT$_4$ dans le cerveau. En plus des structures limbiques dans lesquelles on retrouve la plus forte densité de récepteurs 5-HT$_4$ (Eglen *et al.*, 1995b; Penas-Cazorla & Vilaro, 2015), les ganglions de la base, à savoir le noyau caudé et le noyau lenticulaire (putamen et pallidum), la substance noire et l'amygdale expriment également le récepteur 5-HT$_4$ quelle que soit l'espèce étudiée (Bockaert *et al.*, 2004; Penas-Cazorla & Vilaro, 2015) (**Figure 14**). Plus précisément, le récepteur 5-HT$_4$ est exprimé au niveau somatodendritique et au niveau des terminaisons axonales des neurones épineux efférents GABAergiques du striatum (Cai *et al.*, 2002), des cornes d'Amon (CA1 et CA3) de l'hippocampe, des cellules granulaires du gyrus dentelé (Roychowdhury *et al.*, 1994; Vilaro *et al.*, 2005; Penas-Cazorla & Vilaro, 2015) et des neurones glutamatergiques du cortex, de l'hippocampe et de l'amygdale (Bockaert *et al.*, 2004; Penas-Cazorla & Vilaro, 2015).

Figure 14. *Localisation cérébrale du récepteur 5-HT$_4$ chez l'Homme (en haut) et chez le Rongeur (en bas).*



Que ce soit chez l'Homme ou chez le rongeur, le récepteur 5-HT$_4$ est majoritairement localisé dans le cortex, l'hippocampe et le striatum.

Adapté de (Bockaert *et al.*, 2004)

Le récepteur 5-HT_4 est également retrouvé au niveau périphérique, en particulier au niveau cardiaque où son activation exerce un effet inotrope positif, au niveau du tractus gastro-intestinal où il est impliqué dans la motilité intestinale, au niveau des glandes surrénales où il joue un rôle dans la sécrétion de la corticostérone et enfin au niveau de la vessie où il induit une contraction des muscles lisses.

2. Découverte du récepteur sérotoninergique de type 4

Découvert en 1985 grâce à sa structure originale et unique parmi tous les sous-types de récepteurs sérotoninergiques connus, le récepteur 5-HT_4 a été initialement apparenté au récepteur 5-HT_3. Ces deux récepteurs présentaient notamment un profil pharmacologique similaire, avec une forte affinité pour des ligands communs, notamment pour le topisetron (Bockaert *et al.*, 2004). Finalement en 1992, le récepteur 5-HT_4 a été classé comme un nouveau sous-type de récepteur sérotoninergique puisqu'insensible aux antagonistes connus des récepteurs sérotoninergiques 5-HT_1, 5-HT_2 et 5-HT_3 (Dumuis *et al.*, 1988), mais aussi grâce à la découverte de puissants agonistes sélectifs, comme le metoclopramide ou le cisapride. Ces molécules prokinétiques ont également permis de mettre en évidence l'expression du récepteur 5-HT_4 périphérique, insensible aux antagonistes du récepteur 5-HT_3.

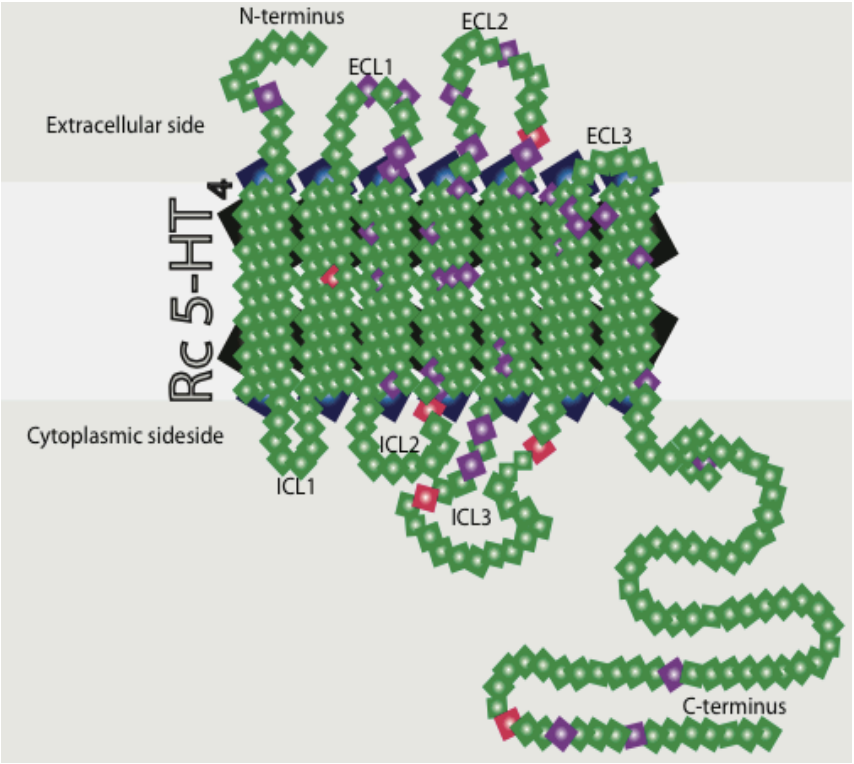
Plus tard, une autre étude de liaison ligand-récepteur (Hegde & Eglen, 1996) a montré que le récepteur 5-HT_4 était également exprimé au niveau cardiaque, gastro-intestinal, surrénalien et urinaire. Par la suite, la caractérisation du gène codant le récepteur 5-HT_4, exceptionnellement long (700 kb, 38 exons) a permis de confirmer que le récepteur 5-HT_4 pouvait être classé comme un nouveau sous-type de récepteur sérotoninergique. Ce gène complexe, codé dans deux espèces différentes, le rat et la souris (Gerald *et al.*, 1995; Claeysen *et al.*, 1996) conduit après épissage alternatif à plusieurs isoformes différentes aux propriétés fonctionnelles distinctes. Ces variants ne diffèrent qu'au niveau de la partie C-terminale, pourtant leur localisation et leurs propriétés fonctionnelles spécifiques impactent l'ensemble du couplage et de la régulation du récepteur 5-HT_4, et par conséquent le potentiel de ce récepteur à être une cible thérapeutique (Marin *et al.*, 2012). Dans le cerveau et les tissus

périphériques, les Hommes expriment six variants du récepteur 5-HT_4 (a, b, c, g, i et n), contre quatre chez la souris (a, b, e et f) (Claeysen *et al.*, 1999).

3. Structure du récepteur sérotoninergique de type 4

Le récepteur 5-HT_4 est un récepteur à 7 domaines transmembranaires possédant trois boucles intracellulaires et trois boucles extracellulaires. Le domaine N-terminal est orienté vers le milieu extracellulaire alors que le domaine C-terminal, couplé à une protéine Gs est orienté vers le cytoplasme (**Figure 15**). Son activation, par un agoniste, entraine le recrutement de la protéine Gs qui stimule l'adénylate cyclase (AC), responsable de la production d'AMPc (Dumuis *et al.*, 1988). La protéine kinase A (PKA) ainsi activée par l'AMPc module différents courants ioniques et en particulier les courants potassiques dont l'inhibition génère une hyperexcitabilité neuronale. La PKA est également capable de phosphoryler la protéine liant l'élément de réponse de l'AMPc (CREB, de l'anglais *cAMP response element binding protein*), ce qui a pour conséquence d'augmenter la transcription des gènes du facteur neurotrophique cérébral (BDNF, de l'anglais *brain-derivated neurotrophic factor*), impliqué dans la cognition, l'humeur et la survie cellulaire (Pascual-Brazo *et al.*, 2012).

Figure 15. *Représentation bidimensionnelle du récepteur 5-HT$_4$.*



Le récepteur 5-HT$_4$ est un récepteur métabotropique à 7 domaines transmembranaires, de 3 boucles intracellulaires et 3 boucles extracellulaires. Le domaine N-terminal est extracellulaire et constitue le site d'interaction avec les ligands, alors que le domaine C-terminal est intracellulaire, en interaction avec la protéine Gs.

D'après (Samuels *et al.*, 2016)

4. Les ligands du récepteur sérotoninergique de type 4

Les ligands du récepteur 5-HT$_4$ sont regroupés, à quelques exceptions près, en 5 classes chimiques principales : les indoles, les benzamides, les benzoates, les arylcétones et les benzamides (**Tableau 11**).

La classe des benzamides a donné lieu à de très nombreux représentants, dont les plus connus ont été, ou sont encore, commercialisés en tant que médicament. Parmi tous les agonistes disponibles, on en retrouve un particulièrement intéressant, le RS 67333 ou (1-(4-amino-5-chloro-2-methoxy phenyl)-3-[1(n-butyl)-4-piperidinyl]-1-propanone HCl), de la classe des arylcétones. L'incorporation d'un groupement n-butyl sur la piperidine a permis d'améliorer l'activité agoniste avec une efficacité maximale, une sélectivité optimale, une biodisponibilité excellente et surtout a permis d'augmenter l'hydrophobicité, rendant ainsi possible le passage de la barrière hématoencéphalique et la pénétration dans le cerveau (Eglen *et al.*, 1995a). Les études de liaison utilisant des radioligands marqués, révèlent toutefois une affinité comparable à celle du récepteur 5-HT_4, pour les récepteurs σ1 et σ2 (Eglen *et al.*, 1995a).

Au niveau des antagonistes, le GR 113808, de la classe des indoles, fut le premier à être identifié en tant que tel, avec une forte affinité pour le récepteur 5-HT_4 et une faible affinité pour le récepteur 5-HT_3, donnant lieu à un modèle de pharmacophore pour la recherche d'autres antagonistes. Son analogue estérifié, le GR 125487 est encore plus puissant dans le système nerveux central et en périphérie, où il présente une biodisponibilité plus élevée, la liaison ester l'ayant rendu plus stable (Bockaert *et al.*, 2004).

Tableau 11. *Liste des principaux ligands du 5-HT$_4$ disponibles dans les années 2000.*

	pKI	pEC$_{50}$	Efficacité	Sélectivité
		AGONISTES		
5-HT	7,1 – 7,5	7,4 - 8	entier	Ø
5-MeOT	6,2	7 – 7,7	entier	5-HT$_4$ >> 5-HT$_3$
tegaserod	8	8,8	partiel	oui
cisapride	7,1	7,25	entier/partiel	5-HT$_2$, hERG
SC53116	7,5 – 8,1	7,64	entier	+
prucalopride	8 – 8,6	7,5 – 7,8	partiel	++
mosapride	6,8 – 7	7,1	partiel	+
ML10302	7,9 – 9	7,7 – 8,6	partiel	++
LS 650155	8,78	6,7 – 8,3		++
RS 67333	**8,7**	**8,4**	**partiel**	**++**
RS 67506	8,8	8,6	partiel	++
BIMU-1	6,4 – 7	6,5 – 8,4	entier/partiel	±
BIMU-8	7 - 7,5	7,1 – 8,1	entier	±
		ANTAGONISTES		
GR 113308	9,2 – 9,8	8,8 – 9,5		+
GR 125487	**10 – 10,4**	**9,75 – 10**		**++**
SB 203186	9	8,3 – 8,7		++
SB 204070	9,2	10,5		++
ML 10375	8,5 – 9	9		++
ATBI 221	8,54	8,3		++
RS 39606	9,1	9,3		++
RS 100302	10,5	11		++
		AGONISTES INVERSES		
RO 116-2617	9,6	10,5		++
RO 116-0086	9,5	9,5		++

Abréviations *: pEC$_{50}$: logarithme négatif de la concentration produisant 50% de l'effet maximal ; pKi :logarithme négatif de la constante d'affinité.*

D'après (Bockaert *et al.*, 2004)

5. Le récepteur sérotoninergique de type 4 dans les troubles de l'humeur : cas particulier des troubles anxieux

5.1. En préclinique

Chez le rongeur, des études ont cherché à mettre en évidence le rôle du récepteur 5-HT_4 dans la réponse comportementale de type anxiolytique des ISRS (**Tableau 12**). Ainsi Costall et Naylor ont montré chez la souris que l'effet de type anxiolytique dose-dépendant du diazépam, après une administration unique, dans le LDT était bloqué par les antagonistes du récepteur 5-HT_4 (SDZ 205-557, GR 113808 et SB 204070) suggérant ainsi que l'activation du récepteur 5-HT_4 intervenait dans ces effets anxiolytiques mais aussi dans la transmission GABAergique corticale (Costall & Naylor, 1997). Toutefois, ils ne rapportent pas d'effet de type anxiolytique des antagonistes administrés seuls, contrairement à d'autres études qui ont mentionné des effets de type anxiolytique dans l'EPM chez le rat, après une administration unique de ces antagonistes (Silvestre *et al.*, 1996; Kennett *et al.*, 1997) (**Tableau 12**).

Par ailleurs, des résultats précliniques récents ont indiqué que l'activation du récepteur 5-HT_4 pourrait constituer une nouvelle stratégie thérapeutique non seulement dans le traitement des EDC mais aussi dans celui de l'anxiété généralisée (**Tableau 12**) (Pascual-Brazo *et al.*, 2012; Mendez-David *et al.*, 2014). Ces études ont été réalisées chez des animaux naïfs et dans des modèles d'anxiété-dépression, dont le modèle CORT, basé sur une élévation des taux de glucocorticoïdes chez la souris (David *et al.*, 2009) et dans lequel on retrouve une modification de la densité du récepteur 5-HT_4 dans les régions limbiques (Chen *et al.*, 2012). Ainsi, dans le modèle CORT, l'administration d'un agoniste sélectif du récepteur 5-HT_4, le RS67333 (pKi = 8.7) à la dose de 1,5 mg/kg/j, a montré que 7 jours de traitement suffisaient à corriger le phénotype anxio-dépressif contre 28 jours pour la fluoxétine (**Tableau 12**). D'autre part, en utilisant un antagoniste sélectif du récepteur 5-HT_4, le GR 125487 (pKi = 10.6), il a été mis en évidence dans un modèle d'anxiété/dépression chez la souris que les effets de type anxio-dépressif de la fluoxétine, impliquaient une activation du récepteur 5-HT_4 (Mendez-David *et al.*, 2014). Enfin, une étude de microdialyse a montré que l'activation du récepteur 5-HT_4 potentialisait les effets d'une administration aiguë de paroxétine, un ISRS, sur les taux

de sérotonine extracellulaire dans l'hippocampe ventral de rat (Licht *et al.*, 2010). Les données de la littérature sur les effets des agonistes du récepteur 5-HT_4 montrent qu'ils présentent en plus de propriétés antidépressives, des propriétés anxiolytiques à action rapide.

Tableau 12. *Conséquences d'un traitement unique ou chronique avec des ligands du récepteur 5-HT$_4$ sur le phénotype anxieux.*

Espèces/ modèle	Nom	Propriétés pharmacologiques	Admin	Dose	Tests	Effets	Références
Rat	SB 204070	Antagoniste	Aigue	0.3, 1, 3 mg/kg s.c.	EPM	↑ temps passé dans BO	(Silvestre et al., 1996)
	GR 113808	Antagoniste					
	SB 204070	Antagoniste		0.01– 10 mg/kg p.o.	SIT	↑ temps d'interaction sociale	(Kennett et al., 1997)
				0.01 – 1 mg/kg s.c.	EPM	↑ temps passé dans BO	
	SB 207266A	Antagoniste		0.001 – 0.1 mg/kg s.c.	SIT	↑ temps d'interaction sociale	
				0.01 – 1 mg/kg s.c.	EPM	↑ temps passé/nombre d'entrées dans BO	
	GR 125487	Antagoniste		3 mg/kg s.c.	Vocalisation ultrasonique	Ø effet	(Schreiber et al., 1998)
Rat OBX	RS 67333	Agoniste partiel	3j et 14j	1.5 mg/kg i.p.	NSF	↓ latence pour se nourrir après 7j	(Pascual-Brazo et al., 2012)
	RS 67333	Agoniste partiel	3j et 14j	1.5 mg/kg i.p.	Activité locomotrice	↓ hyperlocomotion induite par OBX après 14j	(Lucas et al., 2007)
Souris	SDZ 205557	Antagoniste	Aigue	1 – 100 µg/kg i.p.	LDT	↓ effet désinhibiteur du DZ	(Costall & Naylor, 1997)
	GR 113808	Antagoniste		1 – 10 µg/kg i.p.		↓ effet désinhibiteur du DZ	
	SB 204070	Antagoniste		1 – 10 µg/kg i.p.		↓ effet désinhibiteur du DZ	
Souris CORT	RS 67333	Agoniste partiel	7j et 28j	1.5 mg/kg mini-pompes	OF EPM NSF	↑ temps passé et nombre d'entrées dans centre ↑ temps passé et nombre d'entrées dans BO ↓ latence pour se nourrir	(Mendez-David et al., 2014)
	GR 125487	Antagoniste	7j	1.0 mg/kg mini-pompes	OF EPM NSF	Prévient les effets anxiolytiques de la flx	(Mendez-David et al., 2014)

Abréviations *: Admin : administration ; BO : bras ouverts ; CORT : corticostérone ; DZ : diazépam ; EPM : elevated plus maze ; flx : fluoxétine ; GR 113808 : 1-[2-methylsulphonylamino)ethyl]-4-piperidinyl]methyl-1-methyl-1H-indole-3-carboxylate maleate ; GR 125487 : [1-[2-[(methylsulfonyl)amino]ethyl]-4-piperidinyl]methyl-5-fluoro-2-methoxy-1H-indole-3-carboxylate ; i.p. : intra-péritonéal ; NSF : novelty suppressed feeding ; OBX : bulbectomie olfactive ; OF : open field ; p.o. : per os ; RS 67333 : (1-[4-amino-5-chloro-2-methoxyphenyl]-3-[1-butyl-4-piperidinyl]-1-propanone) ; SB 204070 : 8-amino-7-chloro-(N-butyl-4-piperidyl)-methylbenzo-1,4-dioxan-5-carboxylate hydrochloride ; SB 207266A : 2H-(1,3)oxazino(3,2-a)indole-10-carboxamide, N-((1-butyl-4-piperidinyl)methyl)-3,4-dihydro-, monohydrochloride ; s.c. : sous-cutané ; SDZ 205-557 : 2-methoxy-4-amino-5-chloro-benzoic acid 2-(diethylamino ester).*

5.2. En clinique

À ce jour, trois études cliniques laissent penser que le récepteur 5-HT_4 pourrait jouer un rôle dans les EDC. La première étude d'association menée sur un panel d'hommes et de femmes japonais âgés de 27 à 77 ans, atteints de dépression majeure récurrente, a rapporté l'existence d'un lien entre les polymorphismes des variants issus de l'épissage alternatif du gène codant le récepteur 5-HT_4 et la dépression unipolaire (83097C/T, 83159G/A, 83164(T)9-10 et 83198A/G) (Ohtsuki *et al.*, 2002). La seconde étude, réalisée en post-mortem sur des cerveaux de victimes de suicide violent, a révélé une augmentation de l'expression du récepteur 5-HT_4, associée à une élévation des taux d'AMPc dans le cortex frontal et le noyau caudé des victimes (Rosel *et al.*, 2004). La troisième étude a évalué l'association entre les génotypes (allèle S et/ou allèle L) de la région polymorphe du gène codant pour le transporteur de la sérotonine (5-HTTLPR) et la liaison du récepteur 5-HT_4, en associant un radioligand ([^{11}C]SB207145) à la technique de TEP *in vivo* (Fisher *et al.*, 2012). Il a été montré que la liaison du radioligand au récepteur 5-HT_4 dans le néocortex était plus faible chez les homozygotes pour l'allèle S ou les hétérozygotes que chez les homozygotes pour l'allèle L, ce qui est consistant avec le fait que l'allèle S conduit à une diminution de la transcription du SERT, menant à une diminution de l'expression du récepteur 5-HT_4 (Fisher *et al.*, 2012). Néanmoins, aucune étude n'a étudié l'influence des variants du gène codant le récepteur 5-HT_4 dans l'anxiété, ni sur la réponse au traitement antidépresseur ou anxiolytique.

5.2.1. *Les médicaments commercialisés agissant sur le récepteur 5-HT4*

A l'heure actuelle, on recense un certain nombre de composés qui sont, ont été ou vont être commercialisés dans le monde en tant que médicaments sur la base de leurs propriétés agonistes du récepteur 5-HT_4. Du fait de leurs propriétés prokinétiques, l'activation du récepteur 5-HT_4 dans le tractus gastro-intestinal, stimule la motilité intestinale, à savoir le réflexe péristaltique et la sécrétion intestinale, tout en inhibant la sensibilité viscérale. Ce n'est

donc pas étonnant que ces molécules soient majoritairement indiquées dans les troubles gastro-intestinaux (reflux gastro-œsophagien (RGO), parésie intestinale).

Le premier médicament de cette classe est le tégaserod (ZELNORM®), qui a été approuvé par la *Food and Drug Administration* (FDA) en 2002, avant d'être retiré du marché en 2007, en raison d'inquiétudes concernant d'éventuels effets cardiovasculaires indésirables. Il avait été commercialisé par Novartis, dans le traitement du syndrome du côlon irritable et de la constipation. En plus de ces propriétés d'agoniste partiel du récepteur 5-HT_4, le tegaserod possède une affinité modérée pour les récepteurs 5-HT_1 (agoniste) et 5-$HT2_{A-C}$ (antagoniste).

Le cisapride (PREPULSID®), commercialisé en France depuis 1988 par les laboratoires Janssen Cilag, est un parasympathomimétique qui via l'activation du récepteur 5-HT_4, augmente l'acétylcholine libérée dans le système nerveux entérique. La prise de cisapride est associée à une plus forte probabilité de développer un syndrome du QT long, prédisposant à des arythmies. De ce fait il a été retiré dans de nombreux pays, dont le Canada et a fait l'objet, en Europe, d'une réevaluation bénéfice/risque, limitant sa prescription à deux indications : les manifestations aiguës et sévères de la gastroparésie chronique idiopathique ou diabétique et le RGO pathologique chez le nourrisson. Ses modalités de délivrance ont également été revues par l'ANSM, avec une prescription initiale hospitalière annuelle réservée aux spécialistes.

Le prucalopride (RESOLOR®), développé par Shire Development LLC et approuvé en Europe en 2009 et aux USA en décembre 2018, est un dérivé de la famille des benzofuranes qui présente une sélectivité élevée pour le récepteur 5-HT_4 mais aucune affinité pour les canaux hERG (*human Ether-à-go-go Related Gene*). Ceci explique certainement qu'il soit l'un des seuls à être encore commercialisé, dans la mesure où il empêche les effets indésirables cardiaques observés en raison des effets non ciblés des autres agonistes du récepteur 5-HT_4. Il est indiqué dans le traitement de la constipation chronique idiopathique chez l'adulte.

Le cinitapride (CINTAPRO®), commercialisé en Espagne et au Mexique est une benzamide qui agit comme agoniste des récepteurs 5-HT_{1A} et 5-HT_4 et antagoniste du récepteur 5-HT_{2A}. Il est indiqué dans le traitement des troubles gastro-intestinaux associés à des troubles de la motilité, tels que le RGO, la dyspepsie non ulcéreuse et la vidange gastrique retardée.

Le mosapride (PRONAMID®) est commercialisé au Japon comme agent prokinétique accélérateur de la vidange gastrique et du transit intestinal. Cet agoniste sélectif du récepteur 5-HT_4, dont le principal métabolite actif agit comme antagoniste du récepteur 5-HT_3, est utilisé dans le traitement de la gastrite, du RGO, de la dyspepsie fonctionnelle et du syndrome du côlon irritable

Le métoclopramide (PRIMPERAN®), commercialisé en France et dans de nombreux pays, est un agoniste des récepteurs 5-HT_4 et 5-HT_{3A}, mais n'est pas utilisé en clinique pour cette propriété-là. C'est avant tout un antagoniste du récepteur D2 indiqué dans la prévention des nausées et vomissements retardés induits par chimio- ou radiothérapie ou déclenchés par une crise migraineuse. C'est aussi un agoniste du récepteur muscarinique M1 et un inhibiteur de l'acétylcholinestérase qui stimule la réponse cholinergique du muscle lisse gastro-intestinal, se traduisant par une augmentation de la vidange gastrique et du transit intestinal.

5.2.2. *Les molécules en développement clinique ciblant le récepteur 5-HT_4*

Selon le site *clinicaltrials.gov*, on retrouve une vingtaine d'études impliquées dans les effets du récepteur 5-HT_4 dans des pathologies variées, que ce soit par l'administration d'un nouvel agoniste du récepteur 5-HT_4 ou par l'évaluation des conséquences d'un traitement quelconque sur l'expression du récepteur 5-HT_4. Six études sont terminées et fournissent des résultats, 8 ont été complétées, 5 sont en cours de recrutement et 1 a été retirée. Parmi les essais cliniques sur les nouvelles molécules ciblant le récepteur 5-HT_4 dans le traitement des troubles intestinaux, quelques études se sont intéressées à l'efficacité de ces molécules dans

le soulagement des symptômes et plusieurs études se sont concentrées sur l'évaluation de la sécurité d'emploi et la tolérance de ces molécules.

Le naronapride (ATI-7505), pensé pour avoir une activité similaire au cisapride sans effets indésirables cardiaques, a complété avec succès les études de phase I, puisque 9 jours de traitements à différentes doses, augmente la vidange gastrique et intestinale et augmente le transit intestinal chez les volontaires sains, comparativement au placébo (Camilleri *et al.*, 2007). Le naronapride est désormais en phase II pour le traitement du syndrome de détresse postprandiale avec RGO et de la constipation idiopathique chronique (**Tableau 13**).

Le velusetrag (TD-5108), après avoir brillamment complété les études de phase II chez les patients souffrant de constipation chronique idiopathique, en augmentant la fréquence des selles spontanées hebdomadaires, est présentement en étude de phase I, chez le volontaire sain âgé. Le but de cette étude étant de déterminer sa sécurité d'emploi et sa tolérance, ainsi que ses caractéristiques pharmacocinétiques et pharmacodynamiques, en vue d'établir un nouveau traitement chez les patients souffrant de la maladie d'Alzheimer. En effet, le velusetrag ayant montré des effets pro-cognitifs chez le rat Sprague-Dawley dans la piscine de Morris, en reversant le déficit d'apprentissage spatial induit par la scopolamine, pourrait constituer une approche intéressante pour réguler la sécrétion du précurseur de la protéine amyloïde (APP) (Shen *et al.*, 2011) (**Tableau 13**).

Le renzapride (ATL-1251) est actuellement en essai clinique de phase III aux États-Unis, dans une étude de 12 mois, menée chez plus de 1800 patients atteints du syndrome du côlon irritable prédominant avec constipation. Malheureusement, le renzapride n'est pas supérieur au placebo en termes d'efficacité pour soulager les symptômes de la maladie, et de surcroît provoque une augmentation significative d'abandon du traitement en raison d'effets indésirables chez les patients, tels que des diarrhées (Mozaffari *et al.*, 2014). Le revexepride (SSP-002358), a atteint les essais cliniques de phase II, en association avec des inhibiteurs de la pompe à protons dans le traitement des RGO persistants avec régurgitations et avec ou sans brûlure d'estomac. Son inefficacité à réduire les symptômes de la maladie a poussé à l'abandon de son développement (**Tableau 13**).

Enfin, le RQ-00000010 est en essai clinique de phase I, en cours de recrutement, pour le traitement de la gastroparésie et de la constipation dans la maladie de Parkinson, des symptômes non-moteurs communément retrouvés dans cette pathologie neurodégénérative (**Tableau 13**).

Comme suggéré par les résultats encourageants de nombreuses études précliniques, la modulation du récepteur 5-HT_4 dans les pathologies du système nerveux central est une véritable piste thérapeutique pour le développement de molécules efficaces et rapides à visée antidépresseur et pro-cognitive. Avant même d'envisager de nouvelles molécules, le prucalopride, déjà commercialisé et indiqué dans le traitement de la constipation chronique va fait l'objet d'un essai clinique de phase I. Chez des volontaires sains sans antécédents psychiatriques, leur compétence à discriminer les expressions faciales positives (joie) des expressions faciales négatives (peur, colère), leur sensibilité à la récompense, leur capacité à se remémorer des mots positifs et négatifs, ainsi que la réponse fonctionnelle de l'amygdale et de l'hippocampe, mesurée par IRM seront évalués après 7 jours de traitement (NCT03572790) (**Tableau 13**).

Le PF-04995274 a fait l'objet de plusieurs études de phase I, complétées ou en cours de recrutement. Deux études visaient à explorer chez le volontaire sain après administration d'une dose unique par voie orale de PF-04995274, la relation entre les taux plasmatiques et la liaison aux récepteurs 5-HT_4 dans le cerveau en utilisant la tomographie par émission de positons (NCT01173757) et les effets sur les concentrations de fragments solubles d'APP et de ß-amyloïdes dans le liquide céphalo-rachidien (NCT01193062). Toujours chez le volontaire sain, une étude de phase I, conçue pour examiner le potentiel du PF-04995274 à inverser les déficits mnésiques et les altérations des capacités d'apprentissage observés chez les personnes atteintes de la maladie d'Alzheimer et induits temporairement par la co-administration de scopolamine n'a malheureusement pas aboutie, du fait de changements dans la stratégie organisationnelle du promoteur (NCT01345864). Deux études visent à explorer chez des patients atteints d'EDC, soit dans un contexte de dépression résistante aux traitements conventionnels (NCT03515733), soit dans un contexte de dépression non traitée

(NCT03516604), les effets d'un traitement de 7 jours par PF-04995274 sur leurs performances dans des tests cognitifs (**Tableau 13**).

Le SUVN-D4010 a été intégré dans deux études de phase I chez le volontaire sain, après avoir montré des effets positifs sur les déficits de la mémoire épisodique dans le test de la reconnaissance d'un nouvel objet et de la mémoire de travail dans le test du labyrinthe radial chez le rat traité à la scopolamine (Nirogi, 2012). Ces études avaient pour but d'évaluer sa sécurité d'emploi et ses caractéristiques pharmacocinétiques par rapport à un placébo ou à divers paramètres interindividuels, comme la nourriture, le sexe ou l'âge. Il en ressort que le SUVN-D4010 est un agoniste partiel du récepteur 5-HT_4 puissant, sélectif, présentant une bonne biodisponibilité par voie orale et efficace qui semble prometteur pour traiter les symptômes de la maladie d'Alzheimer (**Tableau 13**).

Enfin, la dernière étude ne porte pas directement sur les effets d'un agoniste du récepteur 5-HT_4, mais s'efforce à étudier l'état du système sérotoninergique à l'aide de la tomographie par émission de positons, l'IRMf et l'électroencéphalographie, avant et après une intervention pharmacologique (escitalopram ou duloxétine) de 8 semaines, afin d'identifier des facteurs prédictifs de la réponse à un traitement par antidépresseur chez des patients avec un EDC (NCT02869035). Les hypothèses étant que ces patients présenteraient une plus forte densité de récepteurs 5-HT_4, qu'une densité de récepteurs 5-HT_4 plus élevée avant traitement serait associée à une meilleure réponse pharmacologique, avec une amplitude de changement plus importante du score d'Hamilton et que les patients en rémission afficheraient une diminution de la densité de récepteurs 5-HT_4 après le traitement, comparativement aux patients non-répondeurs (**Tableau 13**).

Après l'échec clinique du RS 67333 en 1998 dans le traitement du syndrome du côlon irritable et des troubles cognitifs, 2 ans après son développement préclinique, toutes ces études cliniques et précliniques montrent donc un regain d'intérêt général pour le récepteur 5-HT_4 et relance l'espoir de trouver de nouvelles thérapies pour le traitement d'un grand éventail de pathologie, tant au niveau central que périphérique.

Tableau 13. Aperçu des essais cliniques menés avec des agonistes du récepteur 5-HT4.

ID	Phase	N (âge, sexe)	Critères d'inclusion	Molécule (dose, durée)	Comparateur	Effets / Paramètres mesurés
NCT01644240 (*terminé*)	I	16 (18-45, ♂/♀)	Volontaires sains	TD-8954 (IV, 2 doses)	placébo (sol saline)	Données PK (Cmax, Tmax, $t_{1/2}$, AUC)
NCT01094821 (*terminé*)	I	48 (18-55, ♂/♀)	Volontaires sains	ATI-7505 (3, 10, 20 mg, 3x/j, 9 j)	placébo	↑ vidange gastrique (20 mg) et intestinale (10 mg) ↑ transit intestinal
NCT01472939 (*terminé*)	II	480 (18-70, ♂/♀)	RGO avec régurgitation persistante avec ou sans brûlure d'estomac	SSP-002358 + IPP (0.1, 0.5, 2 mg, 3x/j, 5-8 sem)	placébo + IPP	Ø changement du nombre de jour sans régurgitation ↑ nombre de jour sans brûlure d'estomac (0.5 mg)
NCT00391820 (*terminé*)	II	360 (18-64, ♂/♀)	Constipation chronique idiopathique	TD-5108 (15, 30, 50 mg/j, 4 sem)	placébo	↑ fréquence des selles spontanées hebdomadaires
NCT00268879 (*terminé*)	III	1821 (18-65, ♀)	Syndrome du côlon irritable prédominant avec constipation	ATL-1251 (2, 4 mg, 2x/j, 12 mois)	placébo	Ø différence d'efficacité sur l'amélioration des symptômes
NCT00663897 (*terminé*)	IV	329 (> 20 ans, ♂/♀)	Dyspepsie fonctionnelle	mosapride (5 mg, 3x/j, 2 sem)	lansoprazole (30 mg/j, 2 sem)	Ø différence d'efficacité sur les douleurs épigastriques et le syndrome de détresse postprandiale
NCT01173757 (*complété*)	I	8 (18-55, ♂/♀)	Volontaires sains	PF-04995274 (5 mg)	Ø	Relation entre taux plasmatiques de PF-04995274 et occupation des récepteurs 5-HT_4 dans les régions cérébrales d'intérêt par PET
NCT01193062 (*complété*)	I	18 (18-55, ♂/♀)	Volontaires sains	PF-04995274 (0.1, 10, 15, 40 mg)	placébo	Sécurité et tolérance (effets indésirables, signes vitaux, ECG) Données PK (Cmax, Tmax, AUC, $t_{1/2}$)
NCT03031574 (*complété*)	I	28 (18-80, ♂/♀)	Volontaires sains	SUVN-D4010	Nourriture, sexe, âge	Données PK (Cmax, AUC)
NCT02575482 (*complété*)	I	64 (18-45, ♂)	Volontaires sains	SUVN-D4010	placébo	Sécurité et tolérance évaluées par ECG, télémétrie, examens physiques, signes vitaux, prise de sang et effets indésirables Données PK (AUC, Cmax, clairance, $t_{1/2}$)
NCT01467726 (*complété*)	I	40 (65-85, ♂/♀)	Volontaires sains âgés	TD-5108 (3 sem)	placébo	Sécurité et tolérance d'administrations répétées Données PK (Cmax, Tmax, AUC, clairance) et PD (fréquence hebdomadaire des selles)
NCT01718938 (complété)	II	34 (18-64, ♂/♀)	Gastroparésie idiopathique ou d'origine diabétique	TD-5108 (5, 15, 30 mg, 3 sem)	Placébo	Vidange gastrique
NCT00730665 (complété)	II	81 (18-65, ♂/♀)	RGO	PF-00885706 (100, 300 µg, 1, 3 mg, 2x/j, 6 sem)	placébo + esomeprazole	Nombre de jour sans régurgitation ni brûlure d'estomac
NCT00630370 (complété)	II	6 (18-75, ♂/♀)	Syndrome de détresse postprandiale supérieur à 6 mois	ATI-7505 (20, 40, 80 mg, 3x/j, 58 j)	placébo	Efficacité, sécurité et tolérance
NCT00501241 (complété)	II	214 (18-75, ♂/♀)	Constipation idiopathique chronique supérieure à 6 mois	ATI-7505 (20, 40, 80, 120, 4 sem)	placébo	Nombre total de selles spontanées au cours des 7 premiers jours

Tableau 13. *Aperçu des essais cliniques menés avec des agonistes du récepteur 5-HT$_4$ (suite).*

ID	Phase	N (âge, sexe)	Critères d'inclusion	Molécule (dose, durée)	Comparateur	Effets / Paramètres mesurés
NCT02869035 (recrutement)	I	100 estimés (18-65, ♂/♀)	Dépression sévère à modérée non traitée dans les 2 derniers mois (HAMD >17)	escitalopram (10-20 mg/j, 8 sem) duloxetine (doses flexibles)	Ø	Expression du récepteur 5-HT$_4$ basée sur la quantification de la liaison au récepteur 5-HT$_4$ dans les régions cérébrales d'intérêt (néocortex, noyau caudé, putamen, hippocampe) par PET
NCT03572790 (recrutement)	I	50 estimés (18-40, ♂/♀)	Volontaires sains sans antécédents psychiatriques	Prucalopride (1 mg, 7 j)	placébo	Capacité à distinguer les expressions faciales positives des négatives, sensibilité à la récompense, capacité à se remémorer des mots positifs et négatifs, réponse de l'amygdale aux visages émotionnels mesurée par IRM, réponse de l'hippocampe à des scènes nouvelles et familières
NCT03515733 (recrutement)	I	50 estimés (16-65, ♂/♀)	Dépression unipolaire ou résistante traitée par ISRS ou IRSN	PF-04995274 (5 mg, 3x/j, 7 j)	placébo	Capacité à distinguer les expressions faciales basées sur des émotions basiques, reconnaissance et rappel de mots affectifs
NCT03516604 (recrutement)	I	75 estimés (16-65, ♂/♀)	Dépression unipolaire non traitée dans les 6 dernières semaines	PF-04995274 (15 mg, 7 j)	placébo citalopram	Capacité à distinguer les expressions faciales basées sur des émotions basiques, réponse de l'amygdale aux visages émotionnels mesurée par IRM, réponse de l'hippocampe à des scènes nouvelles et familières
NCT02838797 (recrutement)	I	75 estimés (> 18 ans, ♂/♀)	Gastroparésie et constipation dans la maladie de Parkinson	RQ-00000010 (2, 50, 200 µg, 1j ou 10, 50, 100, 200 µg, 14 j)	placébo	Sécurité et tolérance Données PK Vidange gastrique et constipation

Abréviations *: ↑ : augmente, Ø : pas d'effet/pas de comparateur, AUC : aire sous la courbe, HAMD : échelle de dépression d'Hamilton, ID : identifiant d'essai clinique, IPP : inhibiteur de la pompe à protons, IRM : imagerie par résonnance magnétique, IRSN : inhibiteur mixte de la recapture de la sérotonine et de la noradrénaline, ISRS : inhibiteur sélectif de la recapture de la sérotonine, n : nombre de personne, PD : pharmacodynamie, PET : tomographie par émission de positons, PK : pharmacocinétique, sem : semaine.*

CHAPITRE 3 - LE RÉCEPTEUR 5-HT$_4$, UNE NOUVELLE CIBLE POUR PROMOUVOIR LA RÉSILIENCE ET PRÉVENIR L'APPARITION DES TROUBLES ANXIEUX.

1. La comorbidité anxio-dépressive

Les troubles anxieux pourraient être décrits comme des facteurs de risque pour le développement d'un EDC, puisque 50 à 60% des patients souffrant d'EDCs rapportent des antécédents d'un ou plusieurs épisodes anxieux (Kaufman & Charney, 2000) (**Tableau 14**). En effet, selon une étude prospective et longitudinale menée sur une cohorte d'adolescents et de jeunes adultes, le risque de survenue d'un EDC serait deux à quatre fois supérieur à celui attendu pour les sujets sans antécédents de troubles anxieux (Wittchen *et al.*, 2000). Il en ressort que le risque de dépression secondaire à 5 ans est 3,9 fois plus important pour les patients souffrant d'un TAG et 1,7 fois plus important pour les patients souffrant de phobie spécifique, comparativement à une personne ne présentant aucun trouble anxieux.

Tableau 14. *Association des troubles anxieux avec les épisodes dépressifs caractérisés.*

Troubles anxieux	Troubles anxieux précédant l'apparition d'EDC	Troubles anxieux associés à un trouble psychiatrique	Troubles anxieux associés à un EDC
TP	29%	74-90%	56-73%
TAG	63%	80-90%	62-67%
TAS	65%	67-92%	15-21%

Abréviations *: EDC : épisode dépressif caractérisé ; TAG : trouble anxieux généralisé ; TAS : trouble d'anxiété sociale ; TP : trouble panique*

D'après (Kaufman & Charney, 2000)

Bien que les troubles anxieux et les EDC constituent deux pathologies distinctes, il est désormais reconnu que les symptômes anxieux font partie intégrante des EDCs. Les troubles anxieux sont donc rarement isolés et même au contraire sont souvent associés à d'autres manifestations psychiatriques, tels que les EDCs (**Tableau 14**) (Kaufman & Charney, 2000). Malheureusement, la comorbidité anxio-dépressive est source d'une importante altération de la qualité de vie des patients puisqu'elle renforce la sévérité et la persistance des symptômes, diminue la réponse et accroît la résistance aux traitements antidépresseurs. Par exemple, la comparaison des antécédents psychiatriques et des caractéristiques cliniques de 276 patients américains dépressifs, en soin primaire, avec ou sans comorbidité anxieuse au cours de leur vie a montré que la présence d'un TP était associée à une sévérité accrue des symptômes dépressifs, à une altération plus marquée du fonctionnement psychosocial et à un plus grand risque d'interrompre prématurément le traitement (Brown *et al.*, 1996b). Dans un autre exemple, basée sur l'étude préliminaire d'une population de 78 patients atteints d'EDC et traités par différents antidépresseurs, la présence de symptômes anxieux est associée à des idées suicidaires plus fréquentes, un retard psychomoteur plus important et un accroissement des variations diurnes des symptômes dépressifs (Altamura *et al.*, 2004). De plus, bien que tous les patients aient montré une amélioration significative de leurs symptômes grâce au traitement par antidépresseur, les patients avec une comorbidité anxio-dépressive ont montré une réponse thérapeutique plus longue avec une moindre amélioration de la gravité des symptômes (Altamura *et al.*, 2004). Il en est de même chez les patients souffrant d'EDC et de TAG, qui font preuve d'une moins bonne observance et présentent un taux de récupération plus long que les patients sans comorbidité (Brown *et al.*, 1996a). Enfin, une étude centrée sur les déterminants de la non-réponse chez les patients atteints de dépression résistante a révélé que la comorbidité anxieuse était le facteur clinique le plus fortement associé à la non-réponse (Souery *et al.*, 2007).

Ensemble, ces résultats suggèrent que traiter rapidement les symptômes anxieux pourraient induire une résilience et ainsi prévenir l'apparition des EDC à long terme pour permettre une meilleure prise en charge et une évolution plus favorable des pathologies psychiatriques.

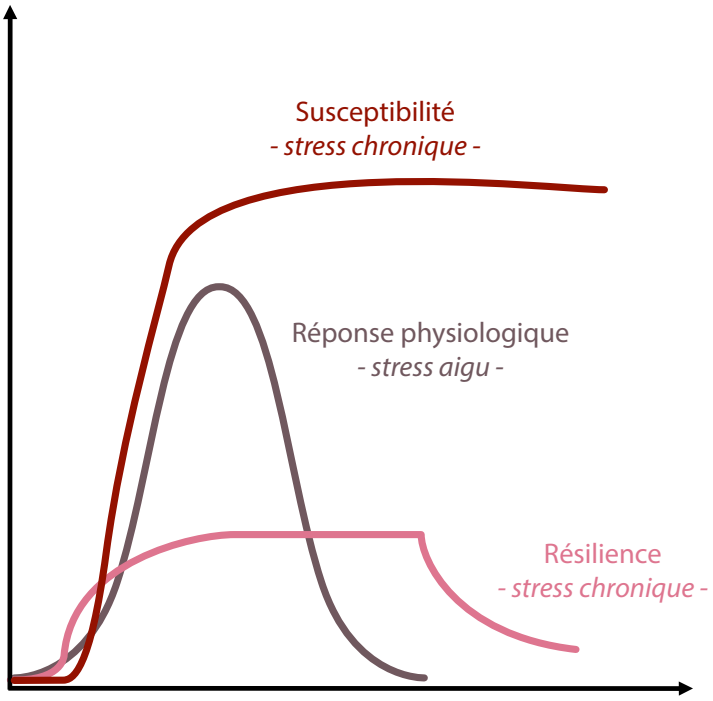
2. La résilience

Chez chaque individu, un stress aigu et inattendu induit, en temps normal, une réponse physiologique et comportementale. Cette réponse fondamentale aboutissant à la capacité d'adaptation d'un organisme est caractérisée par l'activation de l'axe hypothalomo-hypophysaire-surrénalien et donc à la sécrétion de cortisol, suivie d'un rétablissement rapide (**Figure 16**). Cependant, l'exposition prolongée à des événements stressants peut entraîner des séquelles persistantes, en fonction de la capacité de chaque personne à s'adapter à ces facteurs de stress. En effet, tous les individus ne perçoivent pas les événements stressants de la même manière et lorsque la réaction au stress devient trop importante, les mécanismes de récupération peuvent échouer à rétablir les niveaux de base, ce qui accroît la vulnérabilité au stress.

Il est bien connu que la combinaison de facteurs de stress comme la prédisposition génétique, l'héritage familiale, l'environnement social, le stress précoce, les émotions négatives et les maladies chroniques peuvent favoriser le développement de maladies mentales telles qu'un EDC ou des troubles anxieux. Tous les individus qui expérimentent ces facteurs de stress ne développement pourtant pas de troubles psychiatriques et sembleraient donc être moins vulnérables au stress que d'autres. Ils sont alors considérés comme résilients. Face à l'adversité, les personnes peu résilientes, dites susceptibles, sont plus exposées au risque de développer ces pathologies.

On remarque que les personnes résilientes sont plus à même de se développer socialement, mentalement (pensées positives, capacité à faire face activement aux événements stressants, flexibilité cognitive) ou physiquement (pratique d'un exercice), malgré une exposition au stress, contrairement aux personnes susceptibles, ce qui expliquerait les différences développementales. Mais les facteurs socio-environnementaux ne sont pas les seuls à rentrer en ligne de compte. Les individus résilients au stress montrent également des différences au niveau génétique et épigénétique ainsi qu'au niveau de la structure et la fonctionnalité de certaines régions cérébrales et des circuits impliqués dans la réponse adaptative au stress.

Figure 16. *Manifestation de la réponse physiologique, susceptibilité et résilience au cours d'un stress.*



Adapté de (Faye *et al.*, 2018)

De ce fait, augmenter la résilience au stress chez des sujets à risque, comme les soldats qui souffrent bien souvent d'ESPT au retour de leur mission, offrirait la possibilité de prévenir le développement des troubles psychiatriques chez ces personnes sensibles. Élucider les mécanismes sous-jacents de la résilience, tant sur le plan génétique que biologique, est d'une importance capitale pour permettre l'élaboration de nouvelles stratégie thérapeutique de prévention.

La revue ***"Neurobiological mechanisms of stress resilience and implications for the aged population"*** (**Article 1**) qui suit, présente dans un premier temps les facteurs psychosociaux et neurobiologiques qui contribuent à la résilience au stress chez les rongeurs, les primates puis les humains. Dans un deuxième temps, les effets du stress au cours du vieillissement, ainsi que les facteurs de risque et les modifications biologiques qui augmentent la vulnérabilité aux stress dans la population vieillissante seront discutés.

Send Orders for Reprints to reprints@benthamscience.ae

234 *Current Neuropharmacology,* **2018**, *16*, **234-270**

REVIEW ARTICLE

Neurobiological Mechanisms of Stress Resilience and Implications for the Aged Population

Charlène Faye[1,*], Josephine C. McGowan[2,*], Christine A. Denny[3,4,#] and Denis J. David[1,#]

[1]*CESP/UMR-S 1178, Univ. Paris-Sud, Fac Pharmacie, Inserm, Université Paris-Saclay, 92296 Chatenay-Malabry, France;* [2]*Doctoral Program in Neurobiology and Behavior, Columbia University, New York, NY, USA;* [3]*Department of Psychiatry, Columbia University, New York, NY, USA;* [4]*Division of Integrative Neuroscience, New York State Psychiatric Institute/Research Foundation for Mental Hygiene, Inc., New York, NY, USA*

Abstract: ***Background*:** Stress is a common reaction to an environmental adversity, but a dysregulation of the stress response can lead to psychiatric illnesses such as major depressive disorder (MDD), post-traumatic stress disorder (PTSD), and anxiety disorders. Yet, not all individuals exposed to stress will develop psychiatric disorders; those with enhanced stress resilience mechanisms have the ability to adapt successfully to stress without developing persistent psychopathology. Notably, the potential to enhance stress resilience in at-risk populations may prevent the onset of stress-induced psychiatric disorders. This novel idea has prompted a number of studies probing the mechanisms of stress resilience and how it can be manipulated.

***Methods*:** Here, we review the neurobiological factors underlying stress resilience, with particular focus on the serotoninergic (5-HT), glutamatergic, and γ-Aminobutyric acid (GABA) systems, as well as the hypothalamic-pituitary axis (HPA) in rodents and in humans. Finally, we discuss stress resiliency in the context of aging, as the likelihood of mood disorders increases in older adults.

***Results*:** Interestingly, increased resiliency has been shown to slow aging and improved overall health and quality of life. Research in the neurobiology of stress resilience, particularly throughout the aging process, is a nascent, yet, burgeoning field.

***Conclusion*:** Overall, we consider the possible methods that may be used to induce resilient phenotypes, prophylactically in at-risk populations, such as in military personnel or in older MDD patients. Research in the mechanisms of stress resilience may not only elucidate novel targets for antidepressant treatments, but also provide novel insight about how to prevent these debilitating disorders from developing.

ARTICLE HISTORY

Received: April 27, 2017
Revised: June 25, 2017
Accepted: July 27, 2017

DOI:
10.2174/1570159X15666170818095105

Keywords: Stress, resilience, aging, serotonin, glutamate, γ-aminobutyric acid, hypothalamic–pituitary–adrenal axis.

1. INTRODUCTION

Brain disorders and particularly psychiatric disorders, comprising affective disorder [major depression (MDD), and anxiety disorders [panic disorders (PD) with and without agoraphobia, generalized anxiety disorder (GAD), panic bipolar disorder (BP), and cyclo- and dysthymic disorders] or social phobias, PTSD and obsessive-compulsive disorder (OCD)] are among the leading causes of disease and disability in the world. MDD was ranked as the fourth leading contributor to the global burden of disease and is the leading cause of disability worldwide as measured by Years Lived with Disability (YLDs) [1]. Mental disorders amounted to €240 billion and hence constitute 62% of the total annual cost of brain disorders in Europe [2]. In the United States, the total annual cost of depressive disorders was estimated to be $83.1 billion [3] and more than $42 billion for anxiety disorders [4], among the most prevalent mental disorders.

*Address correspondence to this author at the CESP/UMR-S 1178, Univ. Paris-Sud, Fac Pharmacie, Inserm, Université Paris-Saclay, 5, rue Jean-Baptiste Clément, 92290 Chatenay-Malabry, France; Tel: +33146835968; Fax: +33146835355; E-mail; denis.david@u-psud.fr

*co-first author, #co-last author

1570-159X/18 $58.00+.00 ©2018 Bentham Science Publishers

Since the 2000s, an increasing prevalence of mental health problems, and consequently an increasing annual financial burden, has spurred an investigation into brain mechanisms of resilience that may protect against the development of psychiatric disorders.

In this review, we will first describe the psychosocial and neurobiological factors that contribute to stress resilience in rodents, nonhuman primates, and humans. The effects of stress throughout aging will then be discussed, as well as the potential risk factors and biological changes that increase susceptibility to mood disorders in older populations. There is an emerging field of research focused on resilience in the context of aging, as several studies have shown that the risk for developing mood disorders, particularly anxiety disorders, is increased with age [5-7]. Current behavioral methods to improve resilience in the aged will be considered, as well as suggestions for novel possibilities of fostering resilient phenotypes in this population and throughout life based on pre-clinical studies. Though these avenues of resilience enhancement are still in their infancy, there is great potential to refine these techniques to be administered to individuals who are most susceptible to stress, particularly as they age, in order to increase resiliency and prevent stress-induced disorders from occurring at any point in one's lifetime.

2. DEFINITION OF RESILIENCY

An external, unexpected stressor can induce a normal physiological and behavioral stress response. This normal and basic response resulting in an organism's adaptive capacity is characterized by activation of the hypothalamic-pituitary-adrenal (HPA) axis, with a relative peak of serum cortisol or corticosterone 30 minutes following stress exposure, followed by a quick recovery either in human or rodent, in 60-80 minutes after the stress [8, 9]. But prolonged exposure to stressful events (*i.e*., over weeks) can lead to chronic stress and persistent sequelae, depending on the ability of each person to adapt to potent stressors. Indeed, individuals perceive stressful events differently, and when the stress response becomes overactive, the recovery mechanisms fail to achieve, leading to increased susceptibility to stress. Yet, some individuals are less vulnerable to stress than others, and are deemed resilient. When faced with adversity, people with low resilience are at risk of mental illnesses such MDD or anxiety disorders. Conversely, people who are able to effectively develop well socially, mentally or physically despite exposure to stress or adversity demonstrate resiliency; elucidating the underlying mechanisms of this resilience may lend insight into methods to prevent mood disorders in susceptible individuals.

3. PSYCHOSOCIAL FACTOR-ASSOCIATED STRESS VULNERABILITY AND RESILIENCY

It is well established that the combination of genetic predisposition, familial heritage, socio-environmental factors, early life stress (ELS), and chronic illness or treatment largely determine vulnerability to psychiatric disorders such as MDD or anxiety disorders (Fig. **1**). Whereas stressful life events such as the loss of a loved one are related to the development of MDD and GAD, combat-associated injury and traumatic experiences are associated with the development of PTSD. Since the majority of people who experience such stressful events do not develop psychopathology, increasing interest has been directed at potential resilience factors that may provide mental resistance. Developing novel therapeutics targeted at these factors is one avenue to decrease the incidence of mental illnesses.

The idea that increasing stress resilience could protect against the development of psychiatric disorders is appealing. Currently, five basic psychosocial resilience factors where listed based on enormous body of published research: positive emotions and optimism, cognitive flexibility, religion and spirituality, life meaning, social support and active coping style to be protective psychosocial factors that have been associated with stress resilience [10]. A study using a sample of 200 post-doctoral fellows indicated that resilience moderated the impact of stress on trait depressive and anxiety symptoms [11]. Besides revealing a positive association between positive emotions and resilience, this study also indicated that coping strategies partially mediated the link between positive emotions and resilience [11]. Moreover, findings from a prospective longitudinal study provide evidence that individual differences in stress resilience are predicted by both lower levels of negative emotions and higher levels of responsiveness in a positive direction before

Fig. (1). Factors associated with stress-induced emotional disorders and those believed to characterize stress resilience. Combination of psychosocial environment, genetics and early life stress largely determine vulnerability to MDD and anxiety disorders. In contrast, the strategy to improve positive emotions, cognitive flexibility, optimism and active coping leads to promote stress resilience.

stressor exposure [12]. Overall, these findings suggest that coping strategies are essential to minimize the impact of stress.

The coping strategies that have been studied so far have focused their efforts on adolescent and youth populations. For instance, the Protection for Adolescent Depression Study (PADS) developed a vulnerability-resilience stress model for mood disorders, based on the principle that vulnerability and resilience in the face of stress inform an accurate prediction of psychopathology [13]. Using this model in a cohort of 283 healthy adolescents and 119 from a mood disorder clinic, they found two productive coping strategies-focusing on the positive and working hard to achieve-which moderate the impact of stress and predict lower levels of light-to-severe depression and suicidal behavior. Interestingly, girls who focused on the positive were more protected than boys against light-to-severe depression. Finally, self-discovery from the spirituality scale was the only protective factor in the community and reached the significance level only for boys in the clinical population. Thus, this study suggests targeting different factors for men and women to increase or restore protection in the presence of chronic stress conditions. The Early Prediction of Adolescent Depression (EPAD), a longitudinal study of parents with a history of recurrent MDD and their high-risk adolescent offspring, provide evidence that higher executive functioning, such as inhibition and mental flexibility, may confer protection against depressive symptoms to the adolescent offspring of depressed parents as compared to adolescents with poorer performance on these measures [14].

4. PERSONAL STRATEGIES FOR BUILDING STRESS RESILIENCE

Since it was reported that resilient individuals showed an increase in protective psychosocial factors, a group psychosocial resilience-training program was developed to promote resilience and psychosocial well-being in adults who are at risk for stress-induced depressive symptoms, but are otherwise generally healthy. The REsilience and Activity for every DaY (READY), targeting positive emotions, problem solving, life purpose and cognitive flexibility, demonstrated favorable intervention effects on measures of cognitive flexibility (acceptance and mindfulness), environmental mastery, positive emotions and personal growth, as well as moderate effects on measures of stress, self-acceptance, valued living and autonomy [15]. Other studies investigating the effectiveness of resilience training showed positive change occurring at post-intervention compared with baseline or control group [16, 17].

Further, regular exercise is frequently associated with general well-being and lower rates of mood disorders, probably in enhancing resilience to stress. Indeed, among young healthy men and women, individuals who exercise regularly showed smaller decline in positive affect after an acute stressor than those who did not reported regular physical exercise [18]. These findings suggest that regular exercisers are more resistant to the emotional effects of acute stress and might protect them against diseases related to chronic stress burden.

Overall, resilience is an active process that involves a set of neural and cellular mechanisms leading to avoid some of the negative consequences of extreme stress in individuals. The social environmental as well as the genetic and the biological backgrounds of an organism fundamentally influence the balance between risk and resilience to stress (Fig. **1**). Nevertheless, the identification of biological resiliency factors for mood disorders is an important challenge facing biological psychiatry today and the key leading to the development of new pharmacologic treatments for preventing mental illnesses.

5. NEUROBIOLOGICAL FACTORS IN STRESS RESILIENCE

While there has been extensive research on psychosocial factors promoting susceptibility or resilience to psychiatric illnesses, studies published on genetic or biological mechanisms of human resilience are still in their infancy. The development of animal models is necessary not only to appreciate the various aspects of human pathology, such as physiological or behavioral changes, but also to understand the dynamics of therapeutic effects. It is therefore essential to evaluate mechanisms underlying stress resilience processes in animal models expressing symptoms of anxiety-depression pathologies.

6. RODENTS-ANIMAL MODEL OF STRESS RESILIENCY

Despite the complexity in designing and validating animal models in psychiatric research, the animal models [chronic mild stress (CMS), social defeat (SD), learned helplessness (LH), prenatal restraint stress, maternal separation and daily corticosterone administration (CORT)] we have chosen to use in this review were developed and are most often used to model affective disorders relevant to humans, as well as to screen a large panel of molecules with putative anxiolytic- and antidepressant-like activities. These models showed predictive validity in terms of depression or anxiety. However, even though they are inbred strains, a remarkable inter-individual variation in developing anxio-depressive symptoms has been noted. Recognizing the existence of this variation led to the classification of susceptible versus resilient animals that have varying degrees of depressive or anxiety. Work in animal models has suggested that stress resilience is mediated through active neurobiological processes, and has identified a number of protective psychosocial factors.

7. THE SEROTONERGIC SYSTEM

7.1. The Tryptophan Hydroxylase (TPH)

Tryptophan (TRP) is the precursor of peripheral and central serotonin (5-HT) synthesis. Thus, low TRP leads to low 5-HT levels, which contributes to mood state impairments and induces stress vulnerability (reviewed in [19]). Indeed, TRP-depleting drink administration-induced 5-HT depletion made healthy volunteers more susceptible to the effects of uncontrollable stress. These subjects showed more robust negative mood responses, particularly in sadness-related ratings, compared with TRP-supplemented group [20].

5-HT is produced from TRP *via* the rate-limiting enzyme TPH, which exists in two different isoforms. Whereas TPH1 mRNA is mainly expressed in peripheral tissues and in the pineal gland, the TPH2 isoform gene, recently discovered, is predominantly expressed in the brain. Although TPH2 is mainly responsible for the synthesis of brain 5-HT, studies to establish an association between the TPH2 gene and psychiatric disorders or stress resilience are still under investigation. One study demonstrated that in male Tph2 knockout (KO) mice, which completely lacked brain 5-HT synthesis while 5-HT raphe neurons remained functional, the 5-HT deficiency resulted in reducing anxiety-like behavior in the elevated plus maze (EPM) and open field (OF) [21] (Table **1**). Discrepant results were reported for gene-by-environment interactions (GxE). A 3-week CMS was deleterious in Tph2 KO mice resulting in anxiety-like behavior in the EPM, but surprisingly, 5-HT dysfunction provided protective effect against chronic mild stress (CMS) in the OF [21] (Table **1**).

From a clinical perspective, it appears counterintuitive that 5-HT deficiency results in anxiolytic effects, but similar results were found in resilient rats exposed to ELS [22]. Indeed, when MS15 rats, which are normally used as a model of decreased stress sensitivity**,** were subjected to a 10-day social defeat (SD) experience, the mean of Tph2 mRNA expression throughout the dorsal raphe nucleus (DRN) was decreased and conversely, MS180 rats, regarded as a model of vulnerability to depressive-like symptoms, elicited a two-fold increase in Tph2 mRNA as compared to MS15 rats [22] (Table **1**). Interestingly, effects of ELS on Tph2 mRNA expression were only apparent in rats exposed to SD during adulthood [22]. These data suggested that MS15 resilient rats are resistant to SD-induced changes in Tph2 mRNA expression. However, it is important to note that this study lacks a complete behavioral analysis and that the mRNA results should be correlated with the measurement of social interaction in defeated rats. Moreover, these data contradict those obtained in highly stress-resilient (HSR**)** cynomolgus monkeys submitted to a 5-day exposure of a combined moderate stress paradigm. It has been shown that the HSR group had significantly higher average Tph2-positive cells than the stress sensitive (SS) group, suggesting that an upregulation of serotonin-related genes is protective against stress (Table **1**). Unfortunately, no comparison with control animals was made in this study. In conclusion, TPH impairment leading to decreased brain 5-HT synthesis subsequently compromises one's ability to cope with uncontrollable stress.

7.2. The Serotonin Transporter (SERT)

The 5-HT transporter (SERT) gene (SLC6A4), another actor of the neurotransmission homeostasis, may play a modulating role in rendering individuals vulnerable or resilient to stress. A common polymorphism, resulting in insertion or deletion, called, respectively, long (l) and short (s) forms have been identified in the SERT gene-linked polymorphic region (5-HTTLPR) of the SLC6A4. It has been argued that individuals carrying two copies of the long-allele (l/l) are relatively protected against mood disorder development [23, 24], and have increased cognitive emotional control and higher inhibition of negative information [25]. Individuals with 1 or 2 copies of the short-allele (s/l or s/s) are less resilient, and exhibited increased depressive symptoms following stressful life experiences [26-28]. Yet, these alleles are fundamentally neutral because in the absence of stress, no direct association between the SERT gene and depression was observed among members of the Dunedin Multidisciplinary Health and Development Study [26]. Thus, instead of viewing the s-allele as a risk-allele for vulnerability and the l-allele as a protective-allele for resiliency, functional polymorphisms in the 5-HTTLPR was only predisposing to mood disorders when interacting with environmental stress factors. For example, a study in U.S. Army soldiers with no prior war zone exposition who were scheduled to deploy to Iraq confirmed that s-allele carriers, interacted with levels of stressful exposure to predict the development of PTSD, anxiety, and depressive symptoms [29].

In order to model the human allelic variation in SERT function and for a better understanding of its behavioral consequences, heterozygous SERT-deficient mice were generated. In the absence of stress exposure, SERT KO offspring displayed lower levels of anxiety in the elevated zero maze (EZM), and in addition, developed a resilient phenotype to prenatal restraint stress (PS), compared to wild-type (WT) offspring [30] (Table **1**). However, while, SERT KO offspring showed antidepressant-like behavior in the forced swim test (FST) compared to WT offspring, distance swum was decreased in restrained SERT KO offspring [30]. In this way, a decrease in SERT expression may protect against ELS. Indeed, SERT expression seems to be related to the levels of the vulnerability or resiliency of the animals. After isolating CMS-resilient animals, Couch and colleagues reported that unlike resilient mice, mRNA-encoding SERT was upregulated in vulnerable mice in the prefrontal cortex (PFC), striatum, and hippocampus, but not in the DRN [31] (Table **1**). Similarly, Zurawek and collaborators found significantly decreased SERT protein level in the ventral tegmental area (VTA), but not in the DRN or PFC of CMS-resilient animals as compared to anhedonic and control rats [32] (Table **1**).

With the idea still being that female macaques with different stress sensitivity exhibit different adaptive biological mechanisms from those set up in rodent in response to stress, the Bethea study also looked at the SERT-positive cell number in the DRN of HSR and SS female monkeys, but no difference was found [33]. Nevertheless, these results should be interpreted with caution, since this same team has earlier shown that although SERT mRNA are significantly lowered in non-stressed SS monkeys compared with non-stressed HSR monkeys in the caudal regions of the raphe [34], the ratio of the HSR/SS groups for the SERT gene was similar in the presence or absence of stress, implying that there is no adjustment in the 5-HT system after 5 days of moderate stress [33].

7.3. The Serotonin Receptors

5-HT released from serotoninergic neurons in the DRN throughout the brain modulates the acute stress response *via* its impact on a diverse group of serotonin receptors (for review, see [35]). Among the serotoninergic receptors, the 5-HT_{1A} receptor (5-HTR_{1A}), located either on the presynaptic (autoreceptor) or postsynaptic (heteroreceptor) terminals of

Table 1. Role of the different 5-HT pathway-related key players in the stress-vulnerability and resilience in animals.

	Species	Strain	Sex/Age	Model/Treatment	Stress	Duration	Results (*vs* Control)	Refs.
Tph2	Rat	Long Evans	♂ 10 weeks	Vulnerable (MS180 - maternal separation)	SD	12 days	Tph2 mRNA in DRN: ↑	Gardner *et al*., 2009
				Resilient (MS15 - early handling)			Tph2 mRNA in DRN: ↓	
	Monkey	Cynomolgus	♀ 7-9 years	Resilient (normal ovulatory cyclicity) (vs anovulatory vulnerable monkeys)	Mild psychosocial stress + mild diet ± moderate exercise	5 days	Tph2-positive cells in DR: ↑	Bethea *et al*., 2013
	Mouse	ND	♂ Adult	Tph2 KO	Ø	acute	SPT: ↑ EPM: ↓ time in CA, ↑ distance/entries in OA OF: ↑ time in center FST: no difference	Gutknecht *et al*., 2015
					CMS	3 weeks	EPM: ↑ time in CA OF: ↑ entries in center FST: no difference	
SERT	Mouse	B6.129(Cg)-Slc6a4tm1Kpl/J	♂ ND	Heterozygous 5-Htt KO	Ø		EZM: ↑ time/entries in OA FST: no difference	van den Hove *et al*., 2011
					Prenatal RS	5 days	EZM: ↑ time in OA FST: no difference	
	Rat	Wistar Han	♂ ND	Vulnerable (↓ sucrose consumption >20%)	CMS	2 weeks	SERT expression: no difference	Zurawek *et al*., 2016
				Resilient (no difference in sucrose consumption)			SERT expression: ↓ in VTA	
	Mouse	C57BL/6J	♂ 3.5 months	Vulnerable	CMS	10 days	SERT expression: ↑ in PFC, hippocampus, striatum	Couch *et al*., 2013
				Resilient (> 65% preference for sucrose)			SERT expression: no difference	
5-HT$_{1A}$	Mouse	mixed 129S6/Sv; C57B6; CBA	♂ 11-13 weeks	1A-Low mice (vs 1A-High mice)	Ø	acute	OF/LDT/TST: no difference FST: ↓ immobility 5-HT levels: no difference in PFC, hippocampus	Richardson-Jones *et al*., 2010
					Oral gavage	4 weeks	OF/FST: no difference TST: ↓ immobility	
	Monkey	Cynomolgus	♀ 7-9 years	Resilient (normal ovulatory cyclicity) (vs anovulatory vulnerable monkeys)	Mild psychosocial stress + mild diet ± moderate exercise	5 days	5-HT$_{1A}$-positive cells in DR: ↑	Bethea *et al*., 2013
Drugs	Rat	Lewis	♂ 8-9 weeks	Fluoxetine (7.5 mg/kg/d, 21 days)	SD		EPM: reverse defeat-induced ↓ entries/time in OA	Berton *et al*., 1999
	Mouse	129S6/SvEvTac	♂ 8-10 weeks	Fluoxetine (18 mg/kg/d, 21 days)	SD	2 weeks	EPM/FST: did not reverse defeat-induced ↑ time in CA and ↑ immobility	Brachman *et al*., 2016
	Mouse	C57BL/6NTac			CORT	3 weeks	EPM/NSF/FST/ST: did not reverse CORT-induced ↑ time in CA, ↑ latency to feed, ↑ grooming latency and ↑ immobility	
	Mouse	129S1/SvImJ	10 weeks	Escitalopram (4 mg/kg, 14 days)	CMS	14 days	HBT: ↑ time in center, ↓ head dipping FST: ↑ immobility	Binder *et al*., 2011

Abbreviations: 5-HT: serotonin; CA: closed arms; CMS: chronic mild stress; CORT: corticosterone; DR: dorsal raphe; EPM/EZM: elevated plus/zero maze; FST: forced swim test; HBT: hole board test; KO: knock-out; LDT: light/dark test; ND: non-determined; NSF: novelty suppressed feeding; OA: open arms; OF: open field; PFC: prefrontal cortex; SD: social defeat; RS: restraint stress; SERT: serotonin transporter; ST: splash test; SPT: sucrose preference test; Tph: tryptophan hydroxylase; TST: tail suspension test; VTA: ventral tegmental area.

5-HT neurons, is one of the main actors responsible for the therapeutic delay of SSRIs. For this reason, 5-HTR_{1A} has been a matter of interest for its role in the etiology of both anxiety and depression. Plenty of human genetic and imaging studies demonstrated that differences in regulation and binding potential of 5-HTR_{1A} are associated with depression and anxiety (reviewed in [36]). While many studies in humans report an association of the G variant of the C(-1019)G 5-HTR_{1A} promoter gene polymorphism with higher expression of 5-HTR_{1A} and higher susceptibility to depression, no studies have focused on the effect of carrying the C(-1019) allele on vulnerability or resilience to mood disorders. Recently, Lemonde and colleagues postulated that carrying the C(-1019) allele, unlike the G(-1019), leads to a marked decrease in 5-HT_{1A} mRNA, protein, and binding sites in the DRN, which could confer behavioral resilience to stressful situations [37]. Similarly, to provide a mechanistic model of one of the predicted consequences of the recently identified human Htr1a C(-1019)G polymorphism, a new strategy to manipulate 5-HT_{1A} autoreceptors in raphe nuclei without affecting 5-HT_{1A} heteroreceptors, generating mice with higher (1A-High) or lower (1A-Low) autoreceptor levels, has been performed [38]. Adult 5-HT_{1A}-Low mice with 5-HT_{1A} autoreceptor deficiency in DRN neurons as compared to 5-HT_{1A}-High mice, exhibited reduced susceptibility to daily mild stressors (gavage) in the tail suspension test (TST) but not in the FST [38] (Table **1**). However, in basal state, 1A-Low mice displayed less behavioral despair in the FST, suggesting an active coping mechanism to stress over time [38] (Table **1**). Overall, these data suggest that reduced 5-HTR_{1A} expression correlates with stress resiliency, even if opposite results in female monkeys were reported with higher 5-HT_{1A}-positive cell numbers in the DRN of HSR individuals [33, 34] (Table **1**).

5-HT_{2A} receptors (5-HTR_{2A}) were also implicated in pathophysiology of emotional disorders, since brain imaging studies revealed a decrease in 5-HTR_{2A} binding in cortical [39-41] and hippocampal [42, 43] regions of depressed patients, and an increase in 5-HTR_{2A} binding in the caudate nucleus of unmedicated patients with OCD [44]. Regarding the role of 5-HTR_{2A} in stress resilience specifically, the data remain poor. A 3-fold increase in 5-HTR_{2A} expression in the PFC of CMS-resilient mice relative to control mice have been reported, even though this change was also observed in the PFC of CMS-vulnerable mice, with no significant difference between resilient and vulnerable groups [31]. In addition, higher 5-HTR_{2A} binding was also observed in the cortex of CMS rats [45]. The difference reported between CMS-resilient and CMS-vulnerable mice was an increase in 5-HTR_{2A} expression in the striatum of susceptible compared to control mice, whereas resilient mice did not show any change [31]. However, Farhang and collaborators did not find any difference in levels of 5-HTR_{2A} in either cerebral hemispheres of resilient rats to CMS [46], indicating that the connection between these receptors and stress resilience is not well-established.

7.4. The Serotonin Antidepressants in Preventing Stress Resilience

Antidepressants are typically used to treat existing depressive symptoms, but chronic antidepressant treatment also protects against subsequent depressive episodes [47]. Clinical practices recommend a 6 to 24 month antidepressant maintenance therapy to prevent recurrence, once an acute episode and the continuation treatment phase are over [48]. Placebo-controlled, double blind and randomized studies designed in patients with unipolar major depression demonstrated the efficacy of fluoxetine (20 mg/d) for the prevention of new depressive episodes, since treated patients were symptom-free for a longer period of time than patients assigned to placebo [49, 50]. In the same way, one-year treatment with paroxetine (20-30 mg/d) was effective in preventing the reappearance of depression for one year in depressed patient with more than two previous episodes in the preceding four years [51]. Citalopram (20 or 40 mg/d) treatment for 24 weeks in patients with MDD provided evidence for preventing relapse as compared to placebo [52]. Additionally, a 52-week treatment with sertraline in depressed patients conferred significantly greater prophylaxis against depression relapse and recurrence than did placebo [53]. In order to evaluate the efficacy of the different SSRIs in relapse prevention and prophylaxis of depression, Peselow and colleagues conducted a 3-year follow-up of MDD patients who had initially responded to SSRIs. Escitalopram and fluoxetine had the highest numerical prophylactic efficacy with 36% and 33.3% of the patients remained recurrence-free, respectively, although these differences were not statistically significant [54]. These results confirm the potential benefit of long-term pharmacotherapy for treating depressive illness.

However, one critical question emerges from these studies on the potential protectiveness of SSRIs: would these drugs confer similar prophylaxis if administered to healthy patients who are at-risk for developing mental illnesses such MDD or anxiety disorders? For example, fluoxetine (7.5 mg/kg/d, 21 days) pretreatment before SD seemed to prevent the defeat-induced anxiety-like behavior in Lewis rats, a highly stress-sensitive strain [55] (Table **1**). However, these results must be interpreted with caution, since no comparison was made between defeated rats pretreated with vehicle and defeated rats pretreated with fluoxetine. Moreover, chronic fluoxetine (20 mg/kg/d, 14 days) treatment in C57BL/6J non-stressed mice has been shown to suppress depression-related behaviors in the TST, but impair anxiety and stress-coping ability in the EPM and in the OF [56]. Recently, it was demonstrated that administration of fluoxetine (18 mg/kg/d, 3 weeks) before the start of SD in 129S6/SvEvTac mice did not consistently protect against stress-induced depressive- and anxiety-like behavior, respectively, in the FST and in the EPM [57] (Table **1**). However, fluoxetine pretreatment (18 mg/kg/d, 3 weeks) in C57BL/6NTac mice prevented the CORT-induced immobility in the FST, but did not protect against CORT-induced depressive- and anxiolytic-like behavior in the other paradigms [57] (Table **1**). These latest results may be related to the antidepressant-like effects of fluoxetine more than a prophylactic effect, since the FST has originally been developed to screen drugs based on acute administration before the swim stress. Systemic administration of escitalopram (4 mg/kg/d, 14 days), concurrent with a CMS procedure in 129S1/SvImJ mice, prior to testing in the hole-board test (HBT) appeared to increase the time spent in the center of the hole-board, which is assumed to be aversive

to rodents, but reduced the number of head dipping compared with saline-treated mice, which may reflect anxiogenic behavior [58] (Table **1**). Moreover, escitalopram failed to reverse the depressive-like symptoms induced by CMS; rather, it increased immobility in the FST in treated stressed mice compared to non-treated stressed mice [58] (Table **1**). In conclusion, prophylactic SSRI administration, at least in rodents as a protective strategy for stress-induced anxiety/depression-like behavior, is not fully efficient, but as we will describe later, other drugs may be more useful.

8. THE GLUTAMATERGIC SYSTEM

8.1. The *N*-methyl-D-aspartate (NMDA) Receptor

In the early 1990s, the glutamatergic pathway emerged as one of the most promising approaches for developing new antidepressant therapies, since an acute N-methyl-*D*-aspartate (NMDA) receptor blockade has been shown to improve behavioral deficits induced by inescapable stressors in NIH-Swiss and C57BL/6J mice [59]. Several years later, postmortem and magnetic resonance spectroscopy (MRS) studies reported region-dependent findings concerning glutamate or glutamine levels in MDD and BP patients, with higher levels in the frontal [60] and occipital [61] cortices and lower levels in the prefrontal [62, 63] and the anterior cingulate cortices [64, 65]. The literature so far provides contradictory results for glutamate levels in the hippocampus [66-68]. In rodents, exposure to stress produced an increase in glutamate release in regions mediating emotional behavior, as measured by intracerebral microdialysis [69]. In regards to specific glutamate receptors, some but not all studies have found a reduced NMDA binding affinity and expression in different brain regions of patients with MDD (for review, see [70]). Moreover, animal studies confirmed that dysfunctional subunits of the NMDA receptor may contribute to the pathophysiology of mood disorders, as mice lacking NR2A [71], NR2B in principal cortical neurons [72], or NR2D [73] NMDA receptor subunits exhibited strong anxiolytic- and antidepressant-like phenotypes relative to littermate control or heterozygous mice (Table **2**). Nevertheless, a recent study invalidated these observations for NR2D knockout (KO) mice, which displayed anhedonic- and depressive-like behaviors in the sucrose preference test (SPT) and TST [74] (Table **2**).

Overall, consistent with a promisingly significant role of NMDA receptors in mood disorders, a number of clinical trials demonstrated that targeting NMDA receptors with antagonists may be efficacious for treating mood disorders, as exemplified by the rapid and persistent antidepressant effect induced by ketamine, an NMDA receptor antagonist, following a single injection at sub-anesthetic doses in MDD or BP with or without treatment-resistance patients [75-79]. Clinical antidepressant efficacy of ketamine is clear, but studies in other psychiatric illnesses, like anxiety disorders, are more limited, although ketamine seems to persistently improve anxiety-like symptoms in anxious patients [80, 81], reduce PTSD symptom severity [82], or decrease OCD symptoms [83]. While ketamine given after a stressor did not protect against stress-induced depressive-like behavior for some preclinical studies [57, 84], it is an excellent candidate for plausible resilience-enhancing pharmaceuticals. Indeed, in mice, a single injection of ketamine (30 mg/kg) one week before an SD stress procedure protected mice against depressive-like behavior in the FST but did not prevent anxiety-like behavior in the EPM [57] (Table **2**). Furthermore, a single injection of ketamine (30 mg/kg) in mice 1 week before LH training protected against LH-induced coping deficits to deal with inescapable shocks [57] (Table **2**). In the CORT model, a single injection of ketamine (90 mg/kg) before a 3-week CORT treatment was protective against depressive-like behaviors in the splash test (ST) and the novelty suppressed feeding (NSF), but not against anxiety-like phenotype in the EPM [57] (Table **2**). Finally, in male Sprague Dawley rats, administration of ketamine (10 mg/kg), 2 weeks, 1 week, or 2 hours before inescapable tail shocks (IS) blocked the IS-induced decrease in time spent in social juvenile exploration at any of time intervals between ketamine and testing [85] (Table **2**). However, ketamine (30 mg/kg) buffered fear expression only when administered 1 week before contextual fear conditioning (CFC), but not 1 month, 24 hours, or 1 hour prior to CFC in 129S6/SvEvTac mice [86] (Table **2**). Interestingly, a single injection of ketamine 1 hour following a 3-shock reinstatement decreased subsequent fear expression but did not prevent fear reinstatement when administered 1 week prior to 1- or 3-shock reinstatement [86]. Together, these results suggest a long-lasting protective effect of ketamine prior to stressful events that persist up to 3 weeks, but that the timing of administering ketamine relative to a stressor is critical for its effectiveness.

8.2. The α-Amino-3-Hydroxy-5-Methyl-4-Isoxa-Zolepropionic Acid (AMPA) Receptors

In addition to NMDA receptors, α-amino-3-hydroxy-5-methyl-4-isoxazolepropionic acid (AMPA) receptors have also been proposed to be a major factor in the pathophysiology and treatment of mood disorders, but their role has been largely neglected. AMPA receptor activation is required for the antidepressant effects of ketamine, since blockage of AMPA receptor with NBQX antagonist pretreatment attenuated ketamine-induced antidepressant-like behavior in the FST [87]. Autoradiography in post-mortem brains of mood disorder-suffering subjects found increased AMPA binding density in the anterior cingulate cortex (ACC) of MDD patients [88] whereas GluR1 and GluR3 subunits of AMPA receptors were downregulated in the perihinal cortex of MDD and BP individuals [89]. In preclinical studies (summarized in [90]), acute or chronic stress exposure in animal models resulted in conflicting data concerning changes in AMPA receptor gene expression, depending on brain areas, especially for the GluR1 subunit. Numerous studies agree that the non-specific deletion of the GluR1-containing AMPA receptors in forebrain neurons reduced immobility in the FST and in the TST, increased time into the open arms in the EPM, and increased entries in the center in the OF as well as in the light compartment in the light dark test (LDT), suggesting that GluR1 deletion protects against acute stressors [91, 92] (Table **2**). However, others studies reported depressive-related behavior in GluR1 KO mice with true coping deficits in the LH paradigm, not caused by an altered pain sensitivity [93] (Table **2**). Thus, the protective effects of GluR1 deletion might only be due to exaggerated increases in locomotor activity during exposure to a novel environment

Table 2. Role of the different glutamatergic pathway-related key players in the stress-vulnerability and resilience in animals.

Species	Strain	Sex/Age	Model/Treatment	Stress	Duration	Results (*vs* Control)	Refs.
Mouse	C57BL/6J	♂ Adult	Vulnerable (↓ social avoidance vs non-stressed)	SD	10 days	GluR1 expression: ↑ in NAc GluR2 expression: ↓ in NAc	Vialou *et al*., 2010
			Resilient (no difference in social avoidance vs non-stressed)			GluR1 expression: no difference in NAc GluR2 expression: ↑ in NAc	
Mouse	mixed 129S1/Sv-p+Tyr+KitlSl−J/+; 129X1/SvJ	♂♀ 2-10 months	GluR1 KO (vs WT)	Ø	acute	EPM: ↑ entries in OA, ↓ times in CA LDT: ↑ entries in light FST: ↓ immobility	Fitzgerald *et al*., 2010
Mouse	B6N.129-Gria1tm2Rsp/J	♂♀ 15-30 weeks		Ø	acute	EPM/OF: ↑ time in OA/center FST/TST: ↓ immobility Social interaction: ↑ interaction	Maksimovic *et al*., 2014
Mouse	C57BL/6	♂ 3-6 months		Ø	acute	LH testing: ↑ latency to escape, ↑ escape failure	Chourbaji *et al*., 2008
Mouse	C57BL/6	♂ 12 weeks	GluR1 KO (glutamatergic neurons) (vs WT)	Ø	acute	EZM: no difference LH testing: no difference	Vogt *et al*., 2014
Mouse	C57BL/6N	♂ Adult	GluR1 KO 5-HT neurons) (vs WT)	Ø	acute	EZM/LDT: ↓ time/entries in OA/light FST/TST: no difference LH testing: no difference	Weber *et al*., 2015
Mouse	mixed C57BL/6J; 129Sv	♂ ND	GluR1 KO	Ø	acute	EPM: ↓ time in OA	Mead *et al*., 2006
Mouse	C57BL/6J	♂ Adult	Vulnerable (↓ social avoidance vs non-stressed)	SD	10 days	GluR2 expression: ↓ in NAc	Vialou *et al*., 2010
			Resilient (no difference in social avoidance vs non-stressed)			GluR2 expression: ↑ in NAc	
Mouse	CD1	♂ ND	GluR2 KO	Ø	acute	EPM: ↑ time in OA, ↓ entries in CA	Mead *et al*., 2006
Mouse	C57BL/6J	♂ Adult	mGluR2 KO	Ø	acute	EPM/B&W Alley/OF: no difference	De Filippis *et al*., 2015
Mouse	C57BL/6J	♂ 6 weeks	Vulnerable (↓ sucrose preference/↑ immobility in FST vs non-stressed)	CMS	28 days	mGluR2 expression: ↓ in PFC	Nasca *et al*., 2015
			Resilient (no difference in sucrose preference/immobility vs non-stressed)			mGluR2 expression: ↓ in PFC/hippocampus	
Mouse	ND	ND	mGluR2 KO			FST: ↑ immobility Coat-state: ↑ deterioration	
Mouse	mixed C57BL/6; 129Sv/Ev	♂ Adult	GluK2 KO (vs WT)	Ø	acute	EPM/OF:↑ time/entries in OA/center FST: ↓ immobility	Shaltiel *et al*., 2008
Mouse	C57BL/6J	♂ Adult	mGluR3 KO (vs WT)	Ø	acute	EPM/B&W Alley/OF: no difference	De Filippis *et al*., 2015
Mouse	mixed C57BL/6J; 129Sv	♂ Adult	GluK4 KO (vs WT)	Ø	acute	EZM: ↑ time/distance in OA Marble burying: ↓ marble NSF: ↓ latency to feed FST: ↓ immobility	Catches *et al*., 2012

(Table 2) contd….

Species	Strain	Sex/Age	Model/Treatment	Stress	Duration	Results (*vs* Control)	Refs.
Mouse	C57BL/6J	♂ 12-20 weeks	Vulnerable (↓ social avoidance vs non-stressed)	SD	12 days	mGluR5 expression: ↓ in NAc	Shin *et al*., 2015
			Resilient (no difference in social avoidance vs non-stressed)			mGluR5 expression: no difference in NAc	
			mGluR5 KO (vs WT)	LH	3 days	LH testing: ↑ latency to escape, ↑ escape failure FST/TST: ↑ immobility	
				SD	3 days	Social interaction: ↑ social avoidance	
				RS	3 days	SPT: ↓	
Mouse	C57BL/6J	♂ ND	mGluR5 KO (vs WT)	Ø	acute	FST: ↓ immobility	Li *et al*., 2006
Mouse	C57BL/6J	ND 10-14 weeks	mGluR7 KO (vs WT)	Ø	acute	FST/TST: ↓ immobility LDT: ↑ transitions EPM: ↑ time/entries in OA	Cryan *et al*., 2003
Mouse	mixed 129Sv; C57BL/6J; ICR	♂ 12 weeks	mGluR8 KO (vs WT)	Ø	acute	EPM: ↓ time/entries in OA	Linden *et al*., 2002
				RS	30 min	EPM: no difference	
Mouse	C57BL/6J	♂♀ > 10 weeks	NR2A KO (vs WT)	Ø	acute	EPM/LDT: ↑ time/entries in OA/light OF: ↑ time in center FST/TST: ↓ immobility	Boyce-Rustay & Holmes, 2006
Mouse	ND	♂ 50-70 days	NR2B KO (cortical neurons) (vs WT)	Ø	acute	EPM: ↑ time in OA FST/TST: ↓ immobility SPT: no difference	Miller *et al*., 2014
Mouse	C57BL/6J	ND 3 months	NR2D KO (vs WT)	Ø	acute	EPM: ↑ time/entries in OA LDT: ↑ time in light FST: ↓ immobility	Miyamoto *et al*., 2002
Mouse	ND	♂ Adult		Ø	acute	NSF/Marble burying: no difference TST: ↑ immobility SPT: ↓	Yamamoto *et al*., 2017
Mouse	129S6/SvEvTac	♂ 8-10 weeks	Ketamine (30 mg/kg) 1 week before stress	SD	2 weeks	EPM: did not reverse defeat-induced ↑ time in CA Social interaction: ↓ social avoidance FST: reverse defeat-induced ↑ immobility CFC/NSF: no difference	Brachman *et al*., 2016
			Ketamine (30 mg/kg) 1 week before stress			LH testing: ↓ latency to escape	
Mouse	C57BL/6NTac		Ketamine (90 mg/kg) 1 week before stress	CORT	3 weeks	EPM: did not reverse CORT-induced ↑ time in CA NSF/ST/FST: reverse CORT-induced ↑ latency to feed, ↑ grooming latency, ↑ immobility,	
Mouse	129S6/SvEvTac	♂ 8 weeks	Ketamine (30 mg/kg) 24 hours, 1 week, 1 month before stress	3-shock CFC		Fear extinction: ↓ freezing at 1 week Fear reinstatement: no difference	McGowan *et al*., 2017
Rat	Sprague Dawley	♂ ND	Ketamine (10 mg/kg) 2 hours, 1 week, 2 weeks before stress	IS		Social interaction: reverse IS-induced social avoidance at any of time	Amat *et al*., 2016
Mouse/Rat	NIH-Swiss mice Sprague–Dawley rats	♂ ND	LY392098 (0.5, 1 mg/kg) 1 hour before testing			FST: ↓ immobility	Li *et al*., 2001

Abbreviations: 5-HT: serotonin; B&W: black & white; CA: closed arms; CFC: contextual fear conditioning; CMS: chronic mild stress; CORT: corticosterone; EPM/EZM: elevated plus/zero maze; FST: forced swim test; IS: inescapable shock; KO: knock-out; LDT: light/dark test; LH: learned helplessness; ND: non-determined; NAc: nucleus accumbens; ND: non-determined; NSF: novelty suppressed feeding; OA: open arms; OF: open field; PFC: prefrontal cortex; RS: restraint stress; SD: social defeat; SPT: sucrose preference test; ST: splash test; TST: tail suspension test; WT: wild-type.

reported by all the studies. Interestingly, restricted ablation of GluR1 in glutamatergic neurons did not result in behavioral changes associated with mood disorders [94], whereas KO mice lacking GluR1 specifically in 5-HT neurons of the DRN, showed increased anxiety-like behavior [95] (Table **2**). This discrepancy between global and 5-HT DRN neuron-specific GluR1 KO might be related to a reduction in THP2 expression and activity in the DRN as well as reduction in tissue levels of 5-HT in GluR1 KO mice [95].

Hence, data concerning the association between the GluR1 subunit and stress resilience or vulnerability are not clear for now, but other subunits of AMPA receptors might be involved in protective action against adverse experience. For instance, mice resilient to a 10-day SD showed increased GluR2 mRNA expression compared to control mice, while susceptible mice displayed a decrease in GluR2 levels in the nucleus accumbens (NAc) [96] (Table **2**). Moreover, in adult male mice, overexpression of ΔFosB, a transcription factor targeting GluR2-containing AMPA receptors, specifically in the NAc reduced the propensity to develop social avoidance in mice subjected to chronic SD. Conversely, blockade of ΔFosB function promoted stress susceptibility [96]. Thus, induction of GluR2 in resilient mice appeared to reflect a direct effect of ΔFosB on the GluR2 gene, as ΔFosB binding to the GluR2 promoter is increased in these mice [96]. Yet, mice lacking the GluR2 subunit showed reduced anxiety in the EPM, but the markedly impaired motor competence of these mice precludes a definitive conclusion [97] (Table **2**).

Despite contradictory outcomes from GluR1 and GluR2 studies, AMPA potentiating agents might be a promising new approach for increasing stress resilience and preventing stress-induced depressive-like states. For example, AMPA potentiator agents administered 1 hour before an acute stressor (FST and TST paradigms) induced antidepressant-like effects in both rats and mice [98] (Table **2**). They also prevented against chronic stress-induced increases in corticosterone levels and stress-induced increases in latency to feed in NSF as compared with vehicle-treated mice [99]. Consequently, there is some evidence pointing to AMPA receptors as one potential molecular cause for individual stress vulnerability but also as a novel therapeutic targets for inducing resiliency for stress-related disorders.

8.3. The Kainate Receptors

Kainate receptors, a third glutamate ionotropic receptor, have also been implicated in anxiety and depression physiopathology, but still remain poorly explored. Among all the kainate receptor subunits (GluK1-5, previously called GluR5-7 and KA1-2), only the GluK5 subunit mRNA was decreased in the PFC of individuals with MDD or BP [100]. Also, decreased GluK2 mRNA expression in the entorhinal cortex has been found to correlate with MDD [89] as well as treatment-emergent suicidal ideation during treatment with escitalopram [101]. Moreover, genetic variations in the intronic region of the GluK2 gene suggested a potential association with somatic anxiety [102]. Further, a GluK3 gene polymorphism has been shown to be associated with recurrent MDD [103], while 2 single nucleotide polymorphisms (SNPs) in the GluK4 gene is associated with a protective effect against BP [104].

As previously mentioned, clinical evidences suggest that GluK2 may be a potential candidate gene in mood disorder susceptibility [89, 101]. Preclinical data are consistent with them because mice with genetically deleted GluK2 receptors exhibited less anxiety-like behavior in the OF and EPM and displayed an antidepressant-like phenotype in the FST, though these effects may be confounded by an increase of spontaneous locomotor activity [105] (Table **2**). Finally, GluK4 KO mice showed a reduction in anxiety-like behavior in the EZM, the marble-burying test, and the NSF paradigm, as well as an antidepressant-like phenotype in the FST and the SPT, without effects on locomotor activity [106] (Table **2**). In conclusion, progress remains to be made regarding involvement of kainate receptors in stress vulnerability or resiliency.

8.4. The Glutamatergic Metabotropic Receptors (mGluRs)

mGluRs are subclassified into three groups, based on sequence homology, G-protein coupling and ligand selectivity. In Group I, $mGluR_1$ is associated with schizophrenia, while $mGluR_5$ may play an important role in mood disorders [107]. In postmortem tissue, magnetic resonance spectroscopy (MRS) and positron emission tomography (PET) studies found reduced $mGluR_5$ expression in MDD patients, whereas $mGluR_5$ binding was increased in OCD patients. Moreover, in Flinders Sensitive Line (FSL) rats, proposed to be a model of retarded depression, lower densities of $mGluR_5$ in the brain limbic structures were observed as compared to control Flinders Resistant Line (FRL) rats [108]. In two other models of anxiety and depression in male rats, elevated glucocorticoids and prenatal restraint stress, $mGluR_5$ protein expression was reduced in the hippocampus [109, 110]. Finally, segregation of chronically stressed mice into susceptible and resilient subpopulations showed that susceptible mice exhibited less $mGluR_5$ in the NAc than either resilient or control mice [111] (Table **2**). Moreover, after a 3-day exposure to LH, SD, or restraint stress, $mGluR_5$ KO mice exhibited enhanced susceptibility to stress-induced depression, social avoidance, and anhedonia [111] (Table **2**). However, both social avoidance and anhedonia in $mGluR_5$ KO was reversed by lentiviral rescue of $mGluR_5$ in the NAc [111]. Hence, $mGluR_5$-deficient mice failed to deploy effective defenses against chronic stress-induced depression, although Li and collaborators found a reduction of despair behavior in the FST [112] (Table **2**). Due to the outcomes variation, the role of $mGluR_5$ in stress resilience remains uncertain.

In Group II, clustering $mGluR_2$ and $mGluR_3$, the clinical data first suggested a strong increase in $mGluR_{2/3}$ level in the postmortem PFC of MDD subjects [113]. However, these data were later refuted by Muguruza's group which reported no changes in expression and density in the PFC of MDD subjects [114]. Based on the preclinical data, a decrease in $mGluR_{2/3}$ gene expression in the hippocampus and an increase in the frontal cortex was a hallmark of rats exhibiting depressive-like behavior [115, 116]. Indeed, vulnerable and

resilient mice to unpredictable chronic stress (UCMS) had a decreased hippocampal $mGluR_2$ expression, but only resilient mice exhibited 82% lower $mGluR_2$ expression within the PFC [117] (Table **2**). No consistent difference in anxiety-like behavior was found between mice lacking $mGluR_2$ and/or $mGluR_3$ and their respective controls [118] (Table **2**). Yet, $mGluR_2$ is essential for promoting resilience to stress, since $mGluR_2$ KO mice subjected to 28-day UCMS resulted in higher immobility in the FST, as well as a severe deterioration of the coat-state rating scale [117] (Table **2**).

In Group III, $mGluR_4$, $mGluR_6$, $mGluR_7$ and $mGluR_8$ have been suggested to be involved in mood disorder physiopathology. Due to the lack of specific ligands for these receptor subtypes, various studies have been conducted in genetically modified mice. Thus, $mGluR_7$ KO mice exhibited an antidepressant-like phenotype and anxiolytic-like behavior [119] (Table **2**). In contrast, naïve 12-week-old $mGluR_8$ KO mice displayed higher anxiety-related state in the EPM [120] (Table **2**). Interestingly, when $mGluR_8$ KO mice were tested in more stressful conditions or immediately after a 30-minute restraint stress in the EPM, no difference was observed between WT and KO mice, suggesting that the anxiety-like state of WT mice, but not KO mice, increases under more stressful conditions (Table **2**). In conclusion, Group III receptors might play a role in acute stress resilience, but their protective potential against chronic stress still need further consideration.

With the exception of the clear long-lasting protective effect of ketamine, many studies have reported discrepant results depending on the target glutamatergic receptors. However, it is clear that the glutamatergic pathway is involved in stress resilience, though further research is needed for understanding how it can modulate stress vulnerability or resiliency.

9. THE γ-AMINOBUTYRIC ACID (GABA) SYSTEM

GABAergic neurotransmission is currently considered a key player in the control of fear and anxiety, but the role of the glutamate-GABA balance is becoming increasingly relevant in the development and treatment of stress-induced mood disorders. Abnormalities in the benzodiazepine (BZD) site, localized on the $GABA_A$ receptor, have been associated with the etiology and modulation of anxiety from imaging studies (see, *e.g.*, the review of [121]). The GABAergic hypothesis in anxiety disorders has been well established, particularly in regards to successful efficacy of BZD in treating anxious patients. A recent meta-analysis of the existing MRS GABA studies across psychiatric disorders described lower GABA levels in MDD patients, but not in remitted MDD patients compared with healthy controls, and no significant difference in individuals with BP, panic disorder, or PTSD [122]. However, road traffic accident victims who developed PTSD had lower GABA-plasma levels 6 weeks after their accident. Interestingly, 75% of victims who had plasma GABA levels above 0.20 mmol/ml immediately after the accident and met criteria for PTSD 6 weeks after their accident were remitted at the 1-year follow-up, indicating that higher levels of GABA after a traumatic event may protect against chronic PTSD [123]. Seven-week CMS non-anhedonic rats developed a significant increase in cholecystokinin- and neuropeptide Y-positive GABAergic neurons density in the orbitofrontal cortex, as compared to anhedonic rats [124] (Table **3**). Thus, alterations in GABAergic transmission may represent some aspects of the pathophysiology of depression (reviewed in [125]).

9.1. The GABAergic Receptors

The development of more selective agents has led to the identification of two distinct classes of GABA receptors: $GABA_A$ and $GABA_B$. The pentameric $GABA_A$ receptor has been shown to have a critical role in the etiology of anxiety disorders, as patients with panic disorders or GAD show a reduction in BZD binding throughout the brain (for review, see [121]). A genetic association study revealed that common polymorphisms in the $GABA_A$ receptor α2, α3, α6, and γ2 genes do not play a major role in liability to anxiety disorders and MDD [126]. Feusner and collaborators reported an association between polymorphisms in the $GABA_A$ receptor ß3 subunit and higher symptom severity in anxiety and depression symptoms in a population of PTSD patients [127]. On the preclinical side, exposing juvenile rats to early postnatal stress resulted in an anxiety-like phenotype in adulthood associated with a decrease in the $GABA_A$ receptor α1/α2 ratio in both the amygdala and hippocampus, and α1/α3 ratio in the amygdala, suggesting that the α2 and α3 subunits might confer vulnerability to stress. As expected, specific deletion of the $GABA_A$ α1 subunit in corticotrophin-releasing hormone neuron enhance anxiety-like phenotype in the EPM and in the OF, impaired extinction of conditioned fear, but did not impact depressive-like behavior [128] (Table **3**). It is noteworthy that genetic inactivation of α2-containing $GABA_A$ receptors results in a depressive-like phenotype, as indicated by increased immobility in the FST and the TST and a trend for increased latency to feed in the NSF [129] (Table **3**). If $GABA_A$ α3 KO mice showed an enhance in swimming behavior, there is no evidence for an increase in the SPT [130] (Table **3**). However, α2 or α3 deletion, in global brain or in intra-hippocampal areas of adult mice, did not affect baseline anxiety-like behavior in the EPM or in the OF [130-132] (Table **3**). Finally**,** as homozygous $GABA_A$ γ2 KO is lethal in the perinatal period, heterozygous γ2 KO mice, with markedly attenuated expression of γ2 gene, was used to assess the protective role of this subunit in mood disorders. It appeared that $GABA_A$ γ2 plays a protective role, as γ2 KO mice had enhanced anxiety-related reactivity to natural aversive stimuli in the EPM and the LDT [133, 134] (Table **3**). Collectively, the findings on various KO mice $GABA_A$ receptors identify α1- and γ2-containing $GABA_A$ receptors as key subtypes mediating resilience against acute stressors, but the role of all subunits of $GABA_A$ receptors should also be studied in chronic stress conditions, with applications to the stressful life events in humans leading to mental disorders.

$GABA_B$ receptors are emerging therapeutic targets for treating stress-related disorders since deficits in cortical $GABA_B$ receptors has been observed in MDD and treatment resistant MDD (TRD) patients [135]. A recent study suggested that the $GABA_{B(1)}$ receptor subunit isoforms differentially regulate resilience or vulnerability to either early life

Table 3. Role of the different GABAergic pathway-related key players in the stress-vulnerability and resilience in animals.

	Species	Strain	Sex/Age	Model/Treatment	Stress	Duration	Results (*vs* Control)	Refs.
GABAergic neurons	Rat	Wistar rats	♂ 5–6 weeks	Resilient (< 10% within subject ↓ sucrose intake) (vs vulnerable)	CMS	7 weeks	CCK-positive GABAergic neurons: ↑ in ventral orbitofrontal cortex NPY-positive GABAergic neurons: ↑ in lateral orbitofrontal cortex	Varga *et al*., 2017
GABA(A) receptors	Mouse	mixed C57BL/6; FVB	ND	α1 KO (CRH neurons) (vs WT)	Ø	acute	EPM/OF: ↓ time in OA/center TST: no difference Fear extinction: ↑ freezing	Gafford *et al*., 2012
	Mouse	129×1/SvJ	♂ ND	α2 KO (vs WT)	Ø	acute	FST: ↑ immobility in first 2 minutes, no difference in last 4 minutes TST: ↑ immobility NSF: trend to increase latency	Vollenweider *et al*., 2011
			♀ ND				FST: ↑ immobility in first 2 minutes TST/NSF: no difference	
	Mouse	mixed C57BL/6J; 129X1/SvJ	♂ 12 weeks	α3 KO (vs WT)	Ø	acute	FST: ↓ immobility Sucrose preference: no difference	Fiorelli *et al*., 2008
	Mouse	mixed C57BL/6; 129/SvJ	ND	γ2 KO (vs WT)	Ø	acute	EPM/LDT: ↓ time/entries in OA/light CFC: no difference	Crestani *et al*., 1999
	Mouse	mixed C57BL/6J; 129S1/X1	ND Adult	γ2 KD (vs WT)	Ø	acute	EPM: ↓ time/entries in OA	Chandra *et al*., 2005
GABA(B) receptors	Mouse	BALB/c	♀♂ Adult	1A KO (vs WT)	Ø	acute	Sucrose preference: no difference FST: ↓ immobility TST: ↑ immobility Social interaction: ↓	O'Leary *et al*., 2014
					MS	14 days	Sucrose preference: ↓ FST: no difference TST: ↑ immobility EPM: no difference	
					SD	10 days	Social interaction/sucrose preference: ↓	
				1B KO (vs WT)	Ø	acute	Sucrose preference: no difference FST/TST: ↓ immobility Social interaction: no difference	
					MS	14 days	Sucrose preference: no difference FST/TST: ↓ immobility EPM: no difference	
					SD	10 days	Social interaction/sucrose preference: no difference	
GAT	Mouse	ND	♂ 6-8 weeks	GAT-1 KO (vs WT)	Ø	acute	OF/EZM: ↑ time/entries in center	Gong *et al*., 2015
	Mouse	C57BL/6J	♂ 12–18 weeks		Ø	acute	FST/TST: ↓ immobility EPM/LDT: ↑ time/entries in OA/ light	Liu *et al*., 2007
GAD	Mouse	mixed C57BL/6; CBA2	♂ Adult	GAD65 KO (vs WT)	Ø	acute	LDT: ↓ entries/distance in light FST: ↓ immobility	Stork *et al*., 2000
	Mouse	C57BL/6	♂ > 3 months		Ø	acute	OF/EZM: ↓ time in center/OA	Kash *et al*., 1999
	Mouse	C57BL/6	ND 8-12 weeks		Ø	acute	Fear extinction: ↑ freezing	Sangha *et al*., 2009

(Table 3) contd….

	Species	Strain	Sex/Age	Model/Treatment	Stress	Duration	Results (*vs* Control)	Refs.
GAD	Mouse	C57BL/6NTac	♂ 8-12 weeks	GAD65 haplodeficiency (vs WT)	Ø	acute	Generalized contextual fear and anxiety: no difference Pre-conditioning anxiety: no difference Depression-like behavior: no difference	Muller *et al.*, 2014
					juvenile stress	3 days	Generalized contextual fear and anxiety: no difference Pre-conditioning anxiety: ↑ emotionality score Depression-like behavior: no difference	
					isolation stress	for months	Generalized contextual fear and anxiety: ↑ emotionality score Pre-conditioning anxiety: no difference Depression-like behavior: no difference	
					JS + IS	ND	Generalized contextual fear and anxiety: ↑ emotionality score Pre-conditioning anxiety: no difference	
BZD	Rat	Wistar	♂ Adult	midazolam (1.5 mg/kg) 5 minutes before stress	RS	30 minutes	CFC: reverse stress-induced ↑ freezing	Maldonado *et al.*, 2011
				midazolam (1.0 µg in amygdala) 5 minutes before stress			CFC: reverse stress-induced ↑ freezing	
	Rat	Wistar	♂ ND	midazolam (0.25 mg/kg) 30 minutes before re-exposure to stress			Fear reinstatement: no difference in high-anxiety Fear reinstatement: ↓ re-conditioning freezing in low-anxiety	Skorzewska *et al.*, 2015

Abbreviations: BZD: benzodiazepine; CCK: cholecystokinin; CMS: chronic mild stress; CRH: corticotrophin-releasing hormone; EPM/EZM: elevated plus/zero maze; FST: forced swim test; GAD: glutamate decarboxylase; GAT: GABA transporter; IS: isolation stress; JS: juvenile variable stress; KD: knockdown; KO: knock-out; LDT: light/dark test; MS: maternal separation; ND: non-determined; NPY: neuropeptide Y; OA: open arms; OF: open field; RS: restraint stress; SD: social defeat; TST: tail suspension test; WT: wild-type.

maternal separation or 10-day SD stress [136]. Indeed, the authors reported that in the absence of chronic stress, $GABA_{B(1a)}$ KO and $GABA_{B(1b)}$ KO mice displayed antidepressant-like behavior in the FST, but no difference in the SPT [136] (Table **3**). Interestingly, following chronic SD, $GABA_{B(1a)}$ KO mice showed a decrease in social interaction and the SPT, while $GABA_{B(1b)}$ KO mice exhibited resilience as compared to WT stressed littermates (Table **3**). Similarly, after maternal separation, $GABA_{B(1a)}$ KO mice exhibited increased anhedonia in the SPT, whereas $GABA_{B(1b)}$ KO mice maintained the reduction of immobility in the FST (Table **3**). Anxiety levels in adulthood were unaffected either by genotype or chronic stress procedure in the EPM [136]. In conclusion, $GABA_{B(1a)}$ KO mice are more susceptible whereas $GABA_{B(1b)}$ KO mice are more resilient to both stress-induced anhedonia and psychosocial stress-induced social withdrawal.

9.2. The GABA Transporter (GAT)

The GABA transporter (GAT) also many play a major role in GABAergic transmission, as it participates in GABA homeostasis in the synaptic cleft. Because anxious and depressed individuals seem to have a deficit in inhibitory GABAergic activity, GAT may be involved in the pathogenesis of depression and anxiety. Nevertheless, there is little evidence concerning this hypothesis. A case-control association study found a link between two genetic variants located on the 5' region of the GAT-1 gene and severity of panic attacks in anxiety disorder patients [137]. Furthermore, individuals with an anxiety disorder display a positive clinical response to tiagabine, a selective GAT-1 inhibitor [138]. Preclinical studies in GAT-1 deficient mice support the role of GAT-1 in mood disorders, as they demonstrate an increase in resilience to acute stress in several behavioral paradigms related to antidepressant- and anxiolytic-like activity [139, 140] (Table **3**).

9.3. The Glutamic Acid Decarboxylase (GAD)

Another potential mechanism for the observed decrease in GABA levels in psychiatric disorders may involve abnormalities in the GABA synthesizing enzyme, glutamic acid decarboxylase (GAD) 65/67. Indeed, postmortem studies in patients with MDD revealed a significant reduction in GAD_{65} in the PFC [141] or in $GAD_{65/67}$ density in the hypothalamic paraventricular nucleus (PVN) [142]. Similarly, in both mice and rat models of depression, GAD_{67} expression was downregulated in the PFC [143, 144]. Preclinical data from mice lacking GAD_{65} confirmed the necessity of functional GAD_{65} for preventing anxiety-like behavior and fear generalization to neutral stimuli and resistance to fear extinction in the cued fear conditioning test [145-147] (Table **3**). But, surprisingly, deletion of the GAD_{65} gene elicited a reduction of stress-induced immobility associated with an enhancement of the swimming activity in the FST [145] (Table **3**).

Unlike homozygous GAD_{65} mutants, GAD_{65} haplodeficient ($GAD_{65}^{+/-}$) mice, which show a delayed postnatal increase in tissue GABA content in limbic and cortical brain areas, do not display an anxiety- or depressive-like phenotype, but rather exhibited similar emotionality to WT mice [148] (Table **3**). In order to investigate the importance of the GAD_{65}-mediated postnatal maturation of the GABA system in the development of PTSD, Muller and collaborators subjected $GAD_{65}^{+/-}$ mice to either juvenile variable stress, isolation stress, or a combination of both stressors before testing their adulthood emotionality in a behavioral test battery [148]. In generalized contextual fear and anxiety, stressed WT mice showed an increased emotionality score following all stress procedures, whereas $GAD_{65}^{+/-}$ mice were susceptible to isolation stress but resilient to variable stress [148] (Table **3**). In contrast, in pre-conditioning anxiety in the OF and EPM, $GAD_{65}^{+/-}$ mice were resilient to isolation stress but susceptible to variable stress [148] (Table **3**). Altogether, these data suggest that GAD_{65} haplodeficiency confers resilience to ELS-induced development of contextual fear generalization, which is commonly observed in PTSD patients.

9.4. Benzodiazepines in Promoting Stress Resilience

The fast anxiolytic effects of BZDs are well documented, and their use for prophylactic purposes have also been studied. Indeed, male Sprague-Dawley rats treated for 6 days with diazepam (5 mg/kg) and tested 1 hour after the last injection, displayed an attenuation of FST-induced enhancement of plasma corticosterone levels [149]. Similarly, pretreatment with midazolam (1.5 mg/kg), administered 5 minutes prior to a restraint stress, in male Wistar rats prevented stress-induced enhanced conditioned freezing response through activation of ERK1/2 pathway into basolateral amygdala [150] (Table **3**). Moreover, a single injection of midazolam (0.25 mg/kg) in low-anxiety but not in high-anxiety male rats 30 minutes prior to re-exposure to the CFC context reduced freezing levels and prevented fear reinstatement [151] (Table **3**). Thus, stimulation of the GABAergic pathway prior to stress exposure or re-exposure may be relevant pharmacotherapy in regards to PTSD prevention.

9.5. THE HYPOTHALAMIC-PITUITARY-ADRENAL AXIS (HPA)

The HPA axis is a key controller of endocrine and behavioral adaptation to stress by facilitating responses to threat. Perception of physically or psychologically stressful situations is followed by activation of the HPA axis, leading to a secretion of the neuropeptide corticotrophin-releasing hormone (CRH) from the PVN, which in turn activates the secretion of adrenocorticotrophic hormone (ACTH) from the pituitary. Finally, ACTH stimulates the adrenal cortex, resulting in the secretion of glucocorticoids. Susceptible individuals exhibit persistently altered stress responses, acting principally upon a dysregulation of the negative feedback by endogenous glucocorticoids through the glucocorticoid receptors (GR), leading to chronic enhanced activity of the HPA axis and hypersecretion of glucocorticoids (for review, see [152, 153]). When glucocorticoids are hypersecreted over extended periods of time, the initially beneficial effects of HPA axis activation reverse into increased risk to develop a mood disorder. This may explain the increased pituitary and adrenal gland volume, as well as the elevated circulating levels of stress hormones, found in patients diagnosed with stress-related emotional disorders. These observations had even led to the development of the corticosterone (CORT) model in rodents, in which long-term exposure to exogenous glucocorticoids induced anxiety- and depressive-like phenotype, reversed by antidepressant administration [154]. Thus, effective therapeutics to improve stress resilience might be possible by targeting different levels of the HPA axis, such as CRH or GR.

9.6. The Corticotrophin-Releasing Hormone (CRH) and Its Receptors

Several studies have established that patients with mood disorders or PTSD present overactivity in CRH transmission. They contain higher CRH-positive neurons and CRH receptor density [152], though the contribution of CRH levels in the cerebrospinal fluid are still under investigation [155]. The preclinical data support this hypothesis, as adult mice susceptible to 10 consecutive days of SD showed increased CRH mRNA levels in the PVN, while no difference was reported in resilient mice [156] (Table **4**). Therefore, it is reasonable to expect that reduced CRH transmission may confer resilience to stress and protect against mood disorder development.

CRH predominantly acts through CRH_1 receptor to produce anxiety- and depressive-like symptoms; targeting the CRH_1 receptor might be relevant for preventing stress-related disorders. One study found that CRH_1-deficient mice spent a longer time in the light compartment in the LDT and in the open arms in the EPM as compared to WT mice [157] (Table **4**). Interestingly, leaving basal and stress-induced activation of the HPA axis intact after postnatal inactivation of CRH_1 receptor in mouse limbic structures, but not in the pituitary, induces an anxiolytic-like phenotype in the LDT and the EPM [158] (Table **4**). These data are consistent with the downregulation of CRH_1 receptors observed in the locus cœruleus (LC) and amygdala adult male Sprague-Dawley rats resilient to unpredictable and inescapable stress [159] (Table **4**). Thus, it is not surprising to observe an anxiolytic/antidepressant-like effect of CRH_1 receptor antagonism either in preclinical or in clinical studies (see, *e.g*., the review of [152]). In addition, a protective polymorphism formed by 3 SNPs located in intron 1 of the CRH_1 receptor, which either decreased sensitivity of the CRH_1 receptor or increased negative feed-back regulation of its functioning, was identified to lower effects of child abuse on adult depressive symptoms [160].

9.7. Cortisol and Its Receptors

A meta-analysis of 354 studies including 18,374 subjects across both depressed and control groups have reported greater cortisol levels in approximately two-thirds of depressed patients [155]. This observation was confirmed in an animal study in which adult male C57BL/6 mice were stratified into resilient or vulnerable subpopulations after a 10-day SD exposure [161]. Unlike control or resilient mice,

Table 4. Role of the different HPA axis-related key players in the stress-vulnerability and resilience in animals.

	Species	Strain	Sex/Age	Model/Treatment	Stress	Duration	Results (*vs* Control)	Refs.
CRH	Mouse	C57BL/6	♂ 8 weeks	Vulnerable (↑ social avoidance vs non-stressed)	SD	10 days	Crh mRNA levels: ↑ in PVN	Elliott *et al*., 2010
				Resilient (no difference in social avoidance vs non-stressed)			Crh mRNA levels: no difference in PVN	
CRH1	Rat	Sprague–Dawley	♂ Adult	Vulnerable (mean escape latency times > 2 SD vs non-stressed)	IS	2 hours	CRH1 expression: no difference in LC, amygdala, striatum CRH1 expression: ↓ in cortex	Taneja *et al*., 2011
				Resilient (escape latency times within 2 SD vs non-stressed)			CRH1 expression: ↓ in LC, amygdala, cortex CRH1 expression: no difference in striatum	
	Mouse	C57BL/6	♂♀ Adult	CRH1 KO (in pituitary)	Ø	acute	LDT: ↑ time in light EPM: ↑ time/entries in OA	Smith *et al*., 1998
	Mouse	mixed 129/Sv; C57BL/6	♂ 3-5 months	CRH1 KO (in anterior forebrain and limbic structures)	Ø	acute	LDT: ↑ time/entries in light EPM: ↑ entries in OA	Muller *et al*., 2003
CORT	Mouse	C57BL/6	♂ 8-12 weeks	Vulnerable (↑ social avoidance vs non-stressed)	SD	10 days	CORT level after DEX challenge: ↑	Jochems *et al*., 2015
				Resilient (no difference in social avoidance vs non-stressed)			CORT level after DEX challenge: no difference	
GR	Mouse	mixed C57BL/6; 129SV; CBA	ND 6 months	FBGRKO (forebrain-specific GR KO) (vs WT)	Ø	acute	FST/TST: ↓ immobility SPT: ↓	Boyle *et al*., 2005
	Mouse	mixed C57BL/6; FVB/N	♂ 3-6 months	GR-heterozygous KO (50% reduced GR gene)	Ø	acute	EZM/LDT/CFC: no difference FST: no difference CORT level after DEX challenge: ↑	Ridder *et al*., 2005
					LH	2 days	LH testing: ↑ latency to escape, ↑ escape failure	
					RS	30 min	CORT level: ↑	
				YGR (two-fold increased GR gene)	Ø	acute	EZM/LDT/CFC: no difference FST: no difference CORT level after DEX challenge: ↓	
					LH	2 days	LH testing: ↓ latency to escape, ↓ escape failure	
					RS	30 min	CORT level: ↓	
	Mouse	mixed 129/SvJ; C57BL/6	ND 17-22 months	FKBP5 KO (vs WT)	Ø	acute	EPM/LDT: no difference FST/TST: ↓ immobility	O'Leary *et al*., 2011
					RS	10 min	CORT level: ↓	
	Mouse	mixed 129/SvJ; C57BL/6	♂ 10-16 weeks	FKBP5 KO (vs WT)	Ø	acute	EPM/LDT/FST: no difference CORT level: no difference	Hartmann *et al*., 2012
					SD	21 days	EPM: no difference FST: ↑ swimming CORT level: ↓	

(Table 4) contd….

	Species	Strain	Sex/Age	Model/Treatment	Stress	Duration	Results (*vs* Control)	Refs.
GR	Mouse	C57BL/6	♂ 8-12 weeks	Vulnerable (interaction ratio < 100)	SD	10 days	CORT level after DEX challenge: ↑ Nuclear GR protein expression/GR-Hsp90 interaction: ↑ Hsp90 acetylation: ↓	Jochems *et al*., 2015
				Resilient (interaction ratio ≥ 100)			CORT level after DEX challenge: no difference Nuclear GR protein expression/GR-Hsp90 interaction/Hsp90 Acetylation: no difference	
				viral overexpression of acetyl-mimic Hsp90 mutant (in DRN) (vs WT)	SD	10 days	Social interaction: no difference	
	Mouse	129/Sv	♂ 3-12 months	HDAC6 KO	Ø	acute	OF: no difference EPM: ↑ time/entries in OA TST: ↓ immobility	Fukada *et al*., 2012
	Mouse	C57BL/6	♂ 8-12 weeks	$HDAC6^{Pet1Cre}$ KO (in 5-HT neurons)	Ø	acute	FST/TST: ↓ immobility	Espallergues *et al*., 2012
					SD	10 days	Social interaction: no difference	
MR	Mouse	C57BL/6J	♂ 3 months	MR overexpressing (vs WT)	Ø	acute	OF: ↑ time/entries in center LDT: ↓ latency to enter in light, ↑ entries in light CORT level (before and after stress): no difference	Lai *et al*., 2007
	Rat	Wistar	♂ 10 weeks	MR overexpressing (in BLA) (vs WT)	Ø	acute	EPM: ↑ entries in OA, ↑ time in OA (trend)	Mitra *et al*., 2009
					RS	2 hours	CORT level: ↓ EPM: ↑ entries in OA, ↑ time in OA (trend) OF: ↑ time in center	
Drugs	Mouse	129/Sv	♂ 3-12 months	NCT-14b (HDAC6 inhibitor)	Ø	acute	TST: ↓ immobility	Fukada *et al*., 2012
	Mouse	C57BL/6	♂ 8-12 weeks	ACY-738 (selective HDAC6 inhibitor, 5 mg/kg) 10 days before stress and 10 days throughout the stress	SD	10 days	Social interaction: reverse stress-induced ↑ social avoidance	Jochems *et al*., 2015

Abbreviations: 5-HT: serotonin; CORT: corticosterone; BLA: basolateral amygdala; CFC: contextual fear conditioning; CORT: corticosterone; CRH: corticotrophin-releasing hormone; DEX: dexamethasone; DRN: dorsal raphe nucleus; EPM/EZM: elevated plus/zero maze; FKBP5: FK506-binding protein 51; FST: forced swim test; GR: glucocorticoid receptor; HDAC: histone deacetylase; HPA: hypothalamic-pituitary-adrenal; Hsp90: heat shock protein; IS: inescapable stress; KO: knock-out; LC: locus cœruleus; LDT: light/dark test; LH: learned helplessness; MR: mineralocorticoid receptor; ND: non-determined; OA: open arms; OF: open field; PVN: paraventricular nucleus; RS: restraint stress; SD: social defeat; SPT: sucrose preference test; TST: tail suspension test; WT: wild-type.

vulnerable mice were characterized by plasma CORT non-suppression following the dexamethasone suppression test, a synthetic glucocorticoid which can be used to evaluate the function of the negative feedback control of the HPA axis [161] (Table **4**). Conversely, a meta-analysis of 17 studies reported lower cortisol levels in PTSD patients when compared to controls without previous exposure to trauma [162]. However, no difference was found between PTSD patients and resilient trauma-exposed controls [162]. The variable findings of glucocorticoid levels in MDD and PTSD subjects have posed challenges for understanding the role of the glucocorticoid receptors (GR) and mineralocorticoid receptors (MR) in risk and resilience to the development of stress-related disorders.

GRs are expressed widely in the brain, principally in the PVN and hippocampus, and play a key role in stress-related homeostasis through an inhibitory feedback response. In absence of its ligand, GR is inactive and resides in the cytoplasm where it associates with the heat shock protein 90 (Hsp90) and its co-chaperone FK506-binding protein 51 (Fkbp5). This heterocomplex lowers the affinity for glucocorticoid affinity and reduces the efficiency of the nuclear translocation, but upon binding its ligand, the GR dissociates from its chaperone, becomes activated and translocates into

the nucleus for specific transcription. It appeared that some polymorphisms in the GR (Nr3c1) and Fkbp5 genes in combination with ELS strongly increases the risk of suffering from mood disorders in adulthood [163].

Clinical evidence suggests a reduced GR sensitivity to glucocorticoids in patients with depression, suggesting the impairment of GR-mediated negative feedback on the HPA axis [164]. Unlike the nuclear expression of GR, an increase in cytosolic GR protein expression in the PFC and the ventral hippocampus was observed in anhedonic adult Sprague-Dawley rats, induced by CMS [165]. This may be explained by the enhanced Fkbp5 protein expression [165], resulting in reduced function and translocation of GR to the nuclear compartment. Similarly, in a single prolonged stress model of PTSD, male Sprague-Dawley rats had a greater PFC and dorsal hippocampal GR levels than non-stressed animals but a decreased sensitivity to glucocorticoids [166]. Thereby, mice that underexpress functional GR may mimic patients with affective disorders, while in contrast, mice overexpressing GR may demonstrate stress resilience. In fact, forebrain-specific GR KO (FBGRKO) mice exhibited increased despair in the FST and the TST and increased anhedonia in the SPT [167] (Table **4**). The GR-heterozygous mice displayed normal behavior under basal conditions in a test battery for anxiety- and depression-like behavior, but exhibited coping deficits after a stressful challenge caused by the LH paradigm [168] (Table **4**). Moreover, these mice are non-suppressors in the dexamethasone suppression test or after a 30-minute restraint stress, suggesting that mice underexpressing GR have a predisposition for depression [168] (Table **4**). Conversely, mice carrying 2 additional copies of the GR gene are more resistant to developing helplessness [168] (Table **4**).

Because genome-wide association studies (GWAS) correlate variants in Fkbp5 to susceptibility to mood disorders [163], the emotional behavior of mice lacking this co-chaperone was assessed. Under basal conditions, ablation of Fkbp5 in young adult mice have no effect on emotional behavior, but after a 21-day SD paradigm, mice spent more time swimming in the FST [169] (Table **4**). Yet, aged Fkbp5-deficient mice (17-20 months old) exhibit an antidepressant-like phenotype [170] (Table **4**). Taken together, these data confirm that Fkbp5 is involved in stress vulnerability, since individuals with Fkbp5 deletion are less responsive to the adverse effects of acute or chronic stress.

Besides Fkbp5, the GR heterocomplex also needs Hsp90 for maintaining competent conformation for ligand binding. In a recent study, GR binding to Hsp90 was significantly elevated in SD vulnerable mice, coinciding with reduced Hsp90 acetylation and increased nuclear GR, while resilient mice did not show any difference compared to the control group [161] (Table **4**). Moreover, viral overexpression of a mutant protein mimicking the hyperacetylated state of Hsp90 was sufficient to promote resilient phenotype after SD [161] (Table **4**). Specifically, Hsp90 is under the control of the cytoplasmic histone deacetylases (HDACs). It is known that inhibition or depletion of HDAC6 leads to hyperacetylation of Hsp90, resulting in GR assembly impairment [171]. Consequently, targeting HDAC6 may be considered a novel key regulator of stress resilience. Under acute inescapable stressors condition, deletion of HDAC in the global brain or specifically in 5-HT neurons in male mice promotes an anxiolytic- and antidepressant-like phenotype [172, 173] (Table **4**). Interestingly, $HDAC6^{Pet1Cre}$ KO mice exposed to SD for 10 consecutive days failed to display the typical SD-induced increase in social avoidance [173] (Table **4**). It should be noted that acetylation of Hsp90 through pharmacological inhibition of HDAC6 may offer a possible method to mediate stress resilience in an at-risk population. Indeed, treating non-stressed mice with systemic injection of the HDAC6-selective inhibitor NCT-14b caused an antidepressant-like effect in the TST [172] (Table **4**). More interestingly, treating mice with a systemic injection of the selective HDAC6 inhibitor, ACY-738, 10 days prior to SD procedure, prevented the enhancement of SD-induced social avoidance [161] (Table **4**). In conclusion, preventative strategies targeting the GR heterocomplex may be quite effective, but to our knowledge, none of these molecules were clinically tested for MDD or anxiety disorders.

GRs and MRs operate in balance to coordinate stress-induced HPA axis activity. Compared to the GRs, the MRs hold a 10-fold higher affinity for cortisol and are predominantly expressed in limbic areas. Interestingly, dexamethasone-resistant depressed patients showed normal cortisol suppression by prednisolone, a glucocorticoid that binds to both the GR and the MR, suggesting a clear dissociation between GR and MR function in patients with depression [164]. Like GRs, there are numerous studies linking MRs with susceptibility for psychiatric disorders. Generally, MDD patients showed a decrease in MR mRNA expression in several brain regions (as reviewed in [174]). This is consistent with the findings of 3 independent studies, including data from a GWAS that looked at reduction of MR activity and correlated this with susceptibility to MDD, as well as hopelessness and rumination [175]. Conversely, women, but not men, carrying the functional MR haplotype 2, which is associated with higher MR activity, exhibited enhanced resilience to depression and displayed higher dispositional optimism and fewer thoughts of hopelessness [175]. Hence, men's susceptibility or resilience to depression does not seem to be modulated by the MR gene variability. This observation has led to the hypothesis that high MR levels confer resilience to stress-related psychopathologies. Indeed, genetic forebrain-specific MR-overexpression in mice present an anxiolytic-like phenotype [176] (Table **4**). More specifically, overexpression of MRs in the basolateral amygdala in adult male Wistar rats reduced restraint stress-induced corticosterone secretion 48h post-virus injection and reduced anxiety in non-stressed and restraint stress-exposed rats [177] (Table **4**). Such results have yet to be validated in the clinic, but recent data has shown that MR stimulation with fludrocortisone may improve cognitive deficits in depressed patients [178].

In conclusion, the data presented are strong evidence that the HPA axis through CRH, GRs, and MRs are important in mediating stress that may lead to mood disorders. Modulating these receptors using novel therapeutics may promote resilience to stressful events.

10. OTHER NEUROTRANSMITTER SYSTEMS

10.1. The Dopaminergic System

Insight into the biological variations in susceptibility and resilience can be gained by studying the mesolimbic dopaminergic system, particularly VTA dopamine (DA) neurons in the brain's reward circuit, which play a crucial role in mediating stress responses. Dysregulation of DA release or alterations in DA receptor expression has also been associated with depression, though some postmortem and imaging studies have provided conflicting results [179]. The Nestler laboratory supports the idea that resilience to chronic stress is mediated by diminished dopaminergic neurotransmission, as they showed that the VTA DA neuron firing rate was upregulated in SD susceptible mice, while there was no effect in SD resilient mice [180, 181]. But, reducing the firing rate of VTA DA neurons by overexpressing voltage-gated potassium (K^+) channels was sufficient to reverse susceptible mice into a resilient phenotype [180]. Likewise, phasic stimulation of the VTA DA neurons made SD-resilient mice susceptible [182]. Conversely, Tye and colleagues found that selective optogenetic inhibition of VTA DA neurons in non-stressed mice induced depressive-like behavior in the TST and the SPT [183]. However, phasic optogenetic stimulation of VTA DA neurons rescued unpredictable CMS-induced increase in immobility in the TST as well as the decrease in the SPT [183].

10.2. The Norepinephrine System

A large body of evidence points to deficiencies in brain norepinephrine (NE) neurotransmission as a key player in the pathogenesis of anxiety and depressive disorders. Specifically, an increase in NE neurotransmission through blockade of α2-adrenergic autoreceptor or NE transporter alleviates anxious and depression symptoms. Acute and chronic stress elicits dysregulation of the NE pathway, specifically through close interactions with the HPA axis and cortisol secretion. Thus, chronic traumatic stress leads to an hypoactivity of the NE system in brains of depressed subjects, resulting in decreased in NE turnover in limbic areas and increased α2-adrenergic binding sites in the LC [184].

NE neurotransmission also plays a key role in stress resilience. Ten days after SD, resilient mice exhibited increased NE levels in the VTA, but not in other limbic areas [185]. Interestingly, the susceptible phenotype of SD mice was reversed into a resilient phenotype after a 1-week daily treatment with a serotonin norepinephrine reuptake inhibitor (SNRI) or an α2-adrenergic receptor antagonist [185], suggesting that α2-adrenergic receptors might be a target of interest to increase stress resilience. Specifically, α2a-adrenergic receptors may play a potential stress-protective role whereas stress susceptibility might be mediated by α2c-adrenergic receptor. Mice lacking the α2a-adrenergic receptor exhibited more immobility in the FST and lower exploration of the light compartment in the LDT [186]. Target inactivation of the gene encoding the α2c-adrenergic receptor resulted in an antidepressant-like phenotype in the FST; conversely, overexpression of α2c-adrenergic receptor increased immobility in the FST [187]. Finally, the projection from the LC NE neurons to VTA DA neurons might be a critical factor in determining resilience to emotional stress. Chronic optogenetic stimulation of LC NE neurons projecting onto VTA stimulation reversed susceptible phenotype into a resilient one [185].

10.3. The Cholinergic System

The cholinergic system has also been implicated in mood disorder pathology. In medication-free subjects with recurrent MDD, a decrease in availability of the ß2 subunit-containing nicotinic acetylcholine (ACh) receptor (nAChR) throughout much of the brain structures has been observed, probably due to higher endogenous ACh levels rather than a decrease in the total number of receptors [188]. Secondly, blocking the muscarinic receptors with antagonists reduced depression and anxiety rating scale scores in patients suffering from recurrent MDD and BP [189]. Lastly, inhibiting acetylcholinesterase (AChE), an enzyme responsible for the breakdown of ACh, as well as hippocampal AChE knockdown (KD) in rodents had a depressive- and anxiety-like effect, which are reversed by administration of an AChR antagonist [190]. Taken together, these observations suggest that hyperactivity of the cholinergic pathway contributes to the pathophysiology of anxiety and depression. This hypothesis was supported in preclinical studies as KD or KO mice for the ß2 nAChR subunit exhibited anxiolytic- and antidepressant-like phenotypes [191, 192]. Similarly, mice lacking the ß4-containing nAChR displayed decreased anxiety-like behavior in the LDT and reduced fear memory retention in the cue-induced fear-conditioning task [193]. However, the results were variable when in depressive-like tests, as mice lacking the ß4 nAChR subunit showed increased immobility in the FST, but decreased immobility in the TST [193].

In addition to being involved in mood disorder states, the cholinergic system might also confer resilience to chronic stress. Unlike control animals, a 1-day SD stress induced an increase in social avoidance in hippocampal KD of AChE mice [190]. Moreover, downregulation of the ß2 subunit in the amygdala decreased social avoidance in mice subjected to a 3-day SD stress, suggesting that blockade of ß2 signaling in the amygdala increases resilience to social stress [192]. These data support the importance for maintaining ACh at homeostatic levels for promoting behavioral resilience to stress and preventing mood disorders.

As data on stress resiliency thus far demonstrate that there are a number of potential risk factors that increase susceptibility for developing mood disorders, particularly anxiety disorders, an emerging field of research is also focused on resilience in the context of aging.

11. RESILIENCE THROUGHOUT AGING

As an individual grows older, the risk for developing mood disorders, particularly anxiety disorders, increases with each passing year [5-7]. There is often high comorbidity of neuropsychiatric and neurodegenerative disorders, as well as of depression and anxiety disorders in elderly individuals [194-196]. Neuropsychiatric disorders in particular have been associated with accelerated cellular aging and neuro-

progression, as well as secondary medical illnesses such as cardiovascular disease, stroke, osteoporosis, dementia, diabetes, and metabolic syndrome [197-203]. The effects of stress throughout aging may contribute to heightened incidence of disease onset [204, 205]. The aging process may change biological processes (*i.e*. HPA axis function) that are essential to maintain resilience [206-209]; the breakdown of these systems could make a once-resilient individual susceptible, though the causality between symptoms and biological breakdown is still under speculation. Additionally, there may be risk factors during old age that contribute to this increased susceptibility to stress, such as neurodegenerative disorders and genetic factors such as telomere shortening associated with stress-related oxidative damage [196, 202, 205, 210, 211].

In order to combat this susceptible phenotype, it has been shown that increasing resiliency throughout the lifespan can slow the aging process, improve overall health, and protect against stressful situations in multiple species [212-214]. Importantly, several studies have discovered that adults aged 85 or older have a similar capacity for resilience as younger individuals [215-218]. However, it is equally likely that resilience is maintained in individuals throughout the lifespan, and that those with more susceptibility to disease are not included in this study due to earlier mortality. Despite this caveat, these studies have spurred an increased focus on developing behavioral interventions to attempt to improve resilience in older adults. Most research, however, is centered on developing measurement scales and identifying characteristics of resilience, and not many resilience interventions have been developed or thoroughly studied, especially for older adults [215]. Historically, resilience research has been largely centered on early childhood and adolescence, and has not been as widely studied in the adult or elderly population [219]. Only recently have researchers begun to study resilience in aging, and how the changes that occur in the body with age relate to the potential neurobiological underpinnings of stress resilience (reviewed in [220]). For instance, several groups have attempted pharmacologic approaches to increase the lifespan and improve resilience in pre-clinical models [211].

12. EFFECTS OF STRESS THROUGHOUT AGING

Previous work has shown that in a large sample of Canadians aged 18 and older, the perceived impact of stress exposure is strongest in older adults [221], suggesting that the level of observed stress correlates with the onset of stress-induced disorders [222]. It is generally accepted that the way that an individual ages is highly influenced by major life events and stressors (reviewed in [223]). Here, we will discuss the increased incidence of psychiatric disorders in older adults, and how mood disorders subsequently have a negative cyclical effect by accelerating aging.

12.1. Increased Incidence of Psychiatric Disorders in Older Adults

A literature review focused on World Health Organization (WHO) World Mental Health (WMH) surveys found that there was a proportional increase in projected lifetime risk versus prevalence with mood disorders. Additionally, estimates of projected lifetime risk of any DSM-IV mental disorder is increased throughout the lifespan [6]. It has been estimated that 25% of the population over 65, or 8.6 million people, contracts a mental disorder [224]. In particular, the overall rates of GAD are high (5-10% lifetime prevalence), but due to increased vulnerability in elderly people, late-life onset of GAD is as high as 25% [204, 225, 226]. Anxiety symptoms are common in older subjects, especially when they are medically ill, and depression and alcoholism are also often comorbid diagnoses [195]. Specifically, the prevalence of anxiety in community samples of older adults ranges from 15-52.3%, if sub-threshold anxiety symptoms are included as well [227]. Depressive symptoms are also prevalent in older adults, though some of the earlier literature reported values that varied from 1-23% depending on the population sampled [228]; however, a more recent review concluded that the prevalence of major depression is up to 16-42%, depending on whether the elderly were living in private households or in institutions [229]. Comorbid anxiety disorders and depression are common; one group found that as many as 35% of depressed patients aged 60 and older had at least one lifetime anxiety disorder diagnosis, and 23% had current diagnosis at the time of the study [230]. In younger individuals, the estimates range from 10 to 15% [231]. These studies, though varied, indicate that there is a general increased prevalence of psychiatric disorders with old age, and with it, an increased incidence of other mental disorders as well as secondary illnesses.

One specific group that experiences increased risk for a psychiatric disease throughout life is the veteran population. Several studies have recently shown that elderly individuals experience greater levels of stress after war, and respond differently to social support aimed to improve mental health [232, 233]. For instance, one study, which assessed individuals along the Lebanese border after the Second Lebanon War, found that the elderly reported significantly higher levels of stress symptoms, and lower levels of posttraumatic recovery as compared with younger age groups [232]. Additionally, older veterans experience PTSD at higher rates than younger veterans; in other words, the longer the time from the experience of war, the more likely an individual is to begin experiencing symptoms of PTSD, possibly due to the phenomenon of delayed-onset PTSD. One study found that approximately 1 in 10 US veterans experiences a clinically significant exacerbation of PTSD symptoms in late life, at an average of nearly 3 decades after their worst trauma [234]. Though the mechanisms of this late-life exacerbation were not discussed, it is possible that the aging process contributed to this intensification of trauma-related stress reactivity leading to PTSD.

In terms of factors that may contribute to the exacerbation of PTSD in older US veterans, a recent study was published that assessed loneliness [235]. The authors found that loneliness is prevalent among older veterans in the US, as 44% reported feeling lonely at least some of the time, with 10.4% reporting that they often felt lonely. The authors correlated increased age, trauma, perceived stress, and several other factors with the severity of loneliness and concluded that interventions might aid in mitigating loneliness, through social support and the eventual reduction of depressive

symptoms. However, no specific interventions were suggested or outlined in the study. Another study echoed these effects and found that a significant portion of older male veterans in the US contemplates suicide, with a higher rate of suicidal ideation among combat veterans as compared with non-combat veterans [236]. Both studies conclude by suggesting interventions that improve social connectedness to decrease loneliness, though no specific interventions were proposed.

These data are in stark contrast to a study that assessed older veterans and found that 69.5% of US veterans aged 60 and older were considered resilient, which they characterized as a high number of lifetime traumas and low current psychological distress [237]. These individuals were highly likely to have been college or higher level educated, and had high levels of emotional stability, social connectedness, and positive perceptions of the military's effect on one's life. Whether these characteristics existed before the experience of these traumas, or were built as a result of them, is unknown, but it is interesting to consider the possibility that these veterans had with high levels of resilience to begin with, and despite their experiences with multiple lifetime traumas, came away without disease. It is also possible that the generation of the cohort may have an impact on the outcome; specifically, the older generation in this cohort may be more resilient in general than the younger generation, though to our knowledge, no studies have informed on generational differences in regards to stress resilience. According to the APA's Stress in America survey from 2011, 23% of Baby Boomers, or those born between 1946 and 1964, reported decreased stress levels, and this may be because they were more likely to have grown up in two-parent households, with safe schools, job-security, and post-war prosperity; they also report decreased stress levels [238]. Thus, it is possible that there may exist a generational difference for stress resilience, and that this is manifested in the US veteran study, though no studies have directly tested this hypothesis.

12.2. The Role of Mood Disorders and Stress on Accelerated Aging

Experiencing chronic stress is a large risk factor for developing mood disorders, and both stress and mental illness may contribute to accelerated aging. It was shown that chronic psychological stress in rats affect genes that are critical for longevity [239]. Stress has been found to impact the developmental process, especially during critical developmental stages [240]. In general, however, there are complex interactions between stress and aging, as one can promote the other [241]. It has been shown that the peroxisome proliferator-activated receptor γ (PPARγ) may be a critical mechanistic link between aging and stress [241]. For example, PTSD has been associated with elevated risk for age-related diseases; it has been hypothesized that chronic PTSD is a form of persistent life stress that elevates oxidative stress and leads to accelerated cellular aging [202]. Elevated rates of aging-related biological and functional decline, specifically through accelerated cerebral white matter aging, was also found in patients with schizophrenia and MDD [203]. Stress experiences, therefore, appear to be interlinked with aging processes and psychiatric disorders, and the combination of the two may have large consequences on the rate of aging.

13. BENEFITS OF STRESS RESILIENCE IN AGED ADULTS

Though the risk of contracting mood disorders and other diseases increases with age, there are individuals who are able to avoid these risks, and succeed in living healthily throughout the lifespan. Thus, strategies that enhance resilience may slow aging [242]. Here, we will discuss how resiliency not only improves general well-being, but also how it may function to slow the process of aging.

13.1. Stress Resilience and Improved Health in Aged Adults

Having components of stress resiliency has been correlated with high functioning and successful aging in older adults. One group demonstrated that several markers of resiliency in persons older than 85 years include intact cognitive function, high mobility, and good nutritional status, and that these traits improved the likelihood of recovery from disease, and in performing activities of daily living (ADLs) [243]. Another group attempted to estimate the likelihood of and the factors associated with recovery from exhaustion in older adults, which is a common ailment for this population. They found that among individuals aged 69 or older, resiliency was associated with physical and psychological well-being in the face of persistent exhaustion [244].

13.2. Stress Resilience and Slowed Aging

In fact, as an individual grows older, stress resilience becomes increasingly important to continue to age successfully. Several studies have demonstrated that the older individuals are, the more resilience becomes a critical factor in maintaining health and longevity, and the more that adults self-rate as successfully aging [214]. For instance, one group studied centenarians, nonagenarians, and octogenarians, and found that nonagenarians aged 94-98 with increased resilience had a 43.1% higher likelihood of living to be 100, or becoming a centenarian, than those with lower resilience [245]. This suggests that the impact resilience becomes more pronounced at older ages, and greatly contributes to healthy lifespan.

In one review, the resilience framework was applied in two case studies of resilience among patients with Alzheimer disease (AD), and found that individuals with dementia may still lead meaningful lives, and that the resilience process may contribute to a more positive dementia experience [246]. The key point of this review is that the field of gerontology should be striving not for successful aging, but for resilience, which has a fundamental role in aging. Importantly, improving resilience and improving longevity is possible for all adults regardless of social and cultural background, or physical and cognitive impairments [246].

14. CHANGES THROUGHOUT AGING THAT SHIFT A RESILIENT PHENOTYPE INTO A SUSCEPTIBLE ONE

Though it is evident that increased resilience is beneficial throughout life, it is possible for an individual to gradually

lose a resilient phenotype as a result of the aging process. There are several mechanisms that are critical for maintaining resilience that are vulnerable to wearing down and making a once-resilient individual susceptible to stressors and the development of mood disorders. These include HPA axis dysfunction, brain atrophy in regions that are most actively protective against stress, genetic causes, loss of coping abilities, and the onset of a neurodegenerative disorders. Additionally, early-life or critical-period stressors are factors that may accelerate the resilient mechanism breakdown.

14.1. HPA AXIS Dysfunction in Aging

As discussed previously in this review, the HPA axis modulates stress responses by facilitating responses to threat, and susceptible individuals exhibit persistently altered stress responses characterized by enhanced activity of the HPA axis and secretion of glucocorticoids [152, 153]. Importantly, the HPA axis may be perturbed by exposure to prolonged stress that leads to deleterious effects, and HPA axis dysfunction has been correlated with age-related diseases such as depression and cognitive disorders [208] and this predisposes individuals to deleterious effects such as unstable emotional regulation [209]. For example, there could be either decreased aldosterone, or hyperaldosteronism resulting from increased ACTH stimulation that occurs with age [206, 208]. Cortisol may also be increased with aging, though the evidence supporting this claim is not conclusive [209]. To date, there are few studies that assess specific changes in the HPA axis that occur throughout aging that may contribute to mood disorder onset, and much work needs to be done to elucidate the what contributes to HPA axis breakdown, and how this may be prevented.

14.2. Telomere Shortening and Genetic Factors Associated with Mood Disorder Onset

In addition to changes brain morphology and stress axis functioning, there are also genetic markers that may either predispose individuals to developing mood disorders, or epigenetic changes that induce a susceptible phenotype. A large body of research has been dedicated to investigating the relationship between telomere length and health [247, 248]. Reduced telomere length has been associated with a number of chronic somatic diseases normally associated with aging but also implicated in psychiatric diseases such as depression [249-251]. Despite the established role of telomere length in health and aging, there are only a few therapies have been developed to combat the telomere shortening process. For instance, there have been several small stress reduction and wellness studies that have examined the potential to elongate telomeres *in vivo* over short periods of time [252]. The recent interest in gene therapy has led to the development of telomere-enhancing drugs not only as a cancer therapy [253], but also as a method to potentially slow the aging process, as a recent biotechnical company BioViva, based in Texas, has proposed.

In regards to genetic markers and polymorphisms that may indicate resilience, if 5-HTTLPR short (s)-allele carriers have reduced resilience to stress in young adults, in older adults, it appeared that though the s allele had less of a direct effect on resilience, it did correlate with poorer self-rated successful aging, as well as cognitive performance, suggesting that carrying this gene throughout life has an impact on quality of life in old age [254]. A separate study found that SNPs in the FK506 binding protein 5 (FKBP51) gene is an indicator of increased risk to develop PTSD and MDD when exposed to traumatic events [255]. The trauma can induce changes in FKBP51 protein expression and impair glucocorticoid signaling [255].

Epigenetic changes throughout the lifespan may also greatly contribute to disease susceptibility, and are more commonly studied than single genes, as both aging and stress are associated with changes to the epigenome [256-258]. Indeed, DNA methylation changes are associated with an aging clock, which has been implicated as a biomarker of aging [259]. In general, aging has been known to affect specific regulatory gene elements such as enhancers, promoters, and CpG islands [260]. It was found that in mice, age-associated hypomethylation was enriched at super-enhancers at highly expressed genes that are critical for liver function, and hypermethylation was enriched at CpG islands. These changes were suppressed in calorie-restricted mice and in mice treated with rapamycin (two possible therapies discussed later in this review) [260]. Epigenetic changes as a result of stress may also occur at the level of microRNAs (miRNAs). For instance, the Nestler laboratory found that β-catenin mediates pro-resilient and anxiolytic effects in the NAc of mice, which affects miRNA regulation through Dicer1, which is important in maintaining stress resilience [261]. These studies suggest that lifestyle changes may confer epigenetic modifications that contribute to longevity. Overall, it seems that several genetic changes, either inherited or changed over time by telomere shortening, genetic polymorphisms, or epigenetic modifications, may contribute to age-related disease onset.

14.3. Correlation Between Age-Related Cognitive Decline and Mood Disorders

With the onset of a neurodegenerative disorders or age-related cognitive decline, the risk for developing a mood disorder increases, and *vice versa* [262-265]. Shimada and colleagues found that older adults with depressive symptoms have increased risk of cognitive impairment and dementia, particularly AD and vascular dementia [263, 266]. Additionally, anxiety is a common symptom among patients with a cognitive impairment [5]. In cases such as these, the mood disorders correlate with poorer outcomes in patients, and the two disorders often worsen in tandem [5]. It is possible that these cognitive impairments linked to these mood disorders are induced by cellular loss that occurs with age. In the aging brain, it is common to observe atrophy of various regions due to cell loss and tract-specific white matter degeneration [267, 268]. Although brain atrophy in aging has mostly been studied in AD and other cognitive disorders, there are several studies that indicate that depressive symptoms and other mood disorders are associated with changes in both gray and white matter, including atrophy [269]. White matter lesions are frequently found in patients with late-life depression, which is a characteristic that overlaps with dementia [269].

The hippocampus undergoes several structural changes both grossly and at the cellular level with aging, and these have been correlated with cognitive decline in both animals and humans [270]. Although similar hippocampal alterations occur both with normal and pathological aging, in the case of neuropathologies these changes are exacerbated (increase in inflammation and decrease in trophic factors, decreased histone acetylation) [270]. Smaller hippocampal volume has been also associated with depressive symptoms, as well as stress and anxiety [271-273]. The PFC and the amygdala also undergo a plethora of changes during aging [274]. The modulation of stress responses during aging could be affected by changes in PFC-basolateral nucleus of the amygdala. Thus, insensitivity of the PFC-basolateral amygdala pathway to stress could constitute a mark of health, while the alteration of this specific pathway could be involved in mood disorders [274].

Overall, changes in brain region integrity may have effects on brain network function, and specifically the default mood network, cognitive control network, affective/ frontolimbic network, and corticostriatal circuits, which may be directly relevant for mood disorder onset (reviewed in [275]).

14.4. Critical Period Stressors Contribute to Resilience Mechanism Breakdown

The breakdown of brain functions necessary to maintain resilience could likely be induced not just by age, but by an ELS that has long-term deleterious effects. Exposure to stress during critical periods, such as during childhood, adolescence, and early adulthood, may cause an individual to become even more susceptible to stress in the future, and can lead to disease and a number of neuropsychiatric diseases [242, 276, 277]. Specifically, adverse childhood experiences (ACEs), including physical, sexual, and emotional abuse, have been correlated with depression in older adults [277]. The number and types of childhood maltreatment also affect the risk of depression, as cumulative stress has a negative effect on likelihood for mood disorders [242]. It has been shown that several significant important predictors of lifetime history of MDD included non-verbal emotional abuse in males, and peer emotional abuse in females at 14 years of age [242]. For PTSD, the critical periods of vulnerability to ACEs have been found to be the pre-school (age 4-5) and pre-adolescent (age 8-9) periods, and that the type and timing of ACEs affect severity of symptoms [278].

Though little is known about the underlying biology of this effect of early childhood trauma on late-life disorders, it has been noted that early childhood adversity such as abuse, neglect, or exposure to violence increases pro-inflammatory responses [279], affects patterns of gene expression regulated by inflammatory signaling [280], and quickens the process of telomere shortening [249] (as described earlier in regards to stress vulnerability and accelerated aging). One study found that children exposed to maltreatment had smaller volumes of the PFC and the hippocampus, greater activation of the HPA axis, and changes in inflammation levels as adults [279]. Another study found that stressors induce persistent changes in the HPA axis and affect its ability to respond effectively to stress in adulthood [281]. It has also been shown that telomere length may be associated with severity of ELS [249, 282]. 5-HT has been suggested to play a critical role in the maturation of brain systems that modulate emotional functioning in adults [283]. Specifically, inactivation of 5-HT receptors during development produce behavioral abnormalities related to neuropsychiatric diseases such as anxiety and depression [283, 284]. 5-HT has a suggested role in resilience, as previously discussed in this review, and may represent an essential target system that is most sensitive during developmental periods and may induce later-life psychopathology. Overall, the effects of stress during early, vulnerable periods in life may confer long-lasting biological changes to processes necessary to maintain resilience such as nervous, endocrine, immune, and genetic systems; these changes affect an individual's response to future stressors, and lead to faster aging and disease.

15. SEX DIFFERENCES IN AGING AND STRESS RESILIENCE

When considering factors that may contribute to stress susceptibility in old age, it is important to note the role that gender plays in regards to aging and in responding to stressful experiences.

15.1. Sex Differences in Aging

Several studies have attempted to assess sex differences in the aging process, and have discovered a number of characteristics that distinguish between male and female longevity. Women appear to live longer than men, as the average life expectancy for women is 83.5 years, and for men, 79.5 years [285]. This increased lifespan of women may be due to the rate at which telomeres shorten in males and females, though there has yet to be a study that directly links sex, telomeres, and lifespan observed across multiple species [286]. Another hypothesis links responsivity of the immune system to longevity and susceptibility, though the studies assessing this hypothesis are small and not conclusive [285]. A recent study used resting-state networks to study sex differences in normal age trajectory, and found that males and females both showed decreases in connectivity with age, but at different rates, which may explain the rates of aging [287]. Yet, paradoxically, despite living longer lives, women generally experience worse health throughout life than men [285, 288]. This decreased quality of health throughout life is likely due to an increased vulnerability to stress in women, as women seem to be more susceptible to stress than men throughout the lifespan [289].

15.2. Differential Sex Effects of Stress Throughout the Lifespan

Sex differences in stress responses are found at all ages, and are related to gonadal hormone changes that occur throughout development and maturation, and sex chromosome genes (reviewed in [290]). In general, females are twice as likely to develop anxiety disorders such as PTSD than males [233], even though some studies suggest that the probability of trauma exposure in females is lower [291]. Older depressed females were observed to have higher GR immunoreactivity in postmortem hippocampal tissue than

elderly depressed males [292]. Women also seem to lose hippocampal volume more rapidly than men in older age, according to one study, which used cerebral magnetic resonance imaging (MRI) [271]. There also seems to be indication that epigenetic mechanisms may promote sexual dimorphism in the brain in regions such as the hypothalamus due to sex hormone exposure during development [293]. This differentiation may create susceptibilities between males and females for psychiatric disorders. Yet, despite some hints about how females seem more likely to develop mood disorders, the exact neurobiological underpinnings of this increased susceptibility are not well known, though several studies have provided insight into potential mechanisms. It has been hypothesized that prepubertal stress induces long-lasting changes in brain regions such as the hippocampus and that these effects are sex-specific [276]. Specifically, one study found there prepubertal stress impaired hippocampus-dependent behavior in males (CFC), yet enhanced hippocampus-dependent behavior in females (spatial navigation and memory retention), suggesting differential sex effects of brief, variable stress during the prepubertal phase.

15.3. Peri- and Post-menopausal Periods as Windows of Vulnerability for Women

Recent research has attempted to describe female's heightened response to stressors by exploring the effects of stress during peri- and post-menopausal periods, as these represent windows of vulnerability for women to develop mood disorders [294-298]. Specifically, women are 2 to 3 times more likely to experience a first episode of depression during the peri-menopausal period [299, 300].

A reason for this increased susceptibility to stress could be due to the loss of gonadal hormones in females and their metabolites that are critical for stress regulation [290]. Ovarian estradiol secretion ceases at menopause and is followed by low levels of circulating estradiol [301]. Interestingly, one study found that age after menopause impacted the effect of estradiol hormone replacement therapy on mood after a psychosocial stress situation. This is important in light of previous studies, which demonstrated that estradiol improves mood in women in the menopause transition, but not older post-menopausal women. Thus, estradiol administration may be modulating emotional reactivity to stress by sensitizing older women to its adverse effects [302]. Though a specific mechanism is not addressed in this study, it suggests that estrogen receptor function shifts during the post-menopausal phase in women, and that this shift may be critical in mediating women's responses to stress. Several other groups have demonstrated the effects of estrogen receptor function shifts by examining mood in pre- and post-menopausal women, in which estradiol treatment has differential effects in both populations [302-304]. Indeed, in line with these studies, it has been suggested that the rapid decline of gonadal hormones, as well as ovarian senescence, in women and the cellular aging process promotes stress dysregulation in women [290, 305]. Thus, females are at greater risk for mood disorders induced by stress throughout life, and this should be considered when developing preclinical models or stress resilience enhancers that would benefit both males and females. It is possible that the male and female populations may require separate therapeutic strategies based on the differences in their stress reactivity, as well as the significant influence of hormonal states.

16. BEHAVIORAL STRATEGIES OF PREVENTING MOOD DISORDERS EXACERBATED WITH AGE

As there currently exists no pharmaceutical therapies for prevention of mood disorders in old age, one option is to implement behavioral strategies to prevent mood disorders in aged adults. Though very few intervention programs exist for elderly adults, there are several intervention programs that have been developed to increase resilience for the general population.

16.1. Intervention Programs

One example of an intervention program aimed to increase resilience is the American Psychological Association (APA)'s Road to Resilience program, which sought to promote resilience in in middle and high school students affected by the 9/11 terrorist attacks through focus groups in several major cities [306]. There are plans to provide psychologist-led workshops, forums, and lectures, but this program is not validated in older adults [306]. Meditation and Physical (MAP) training was also implemented in a small cohort of young mothers who were recently homeless and suffered from physical and sexual abuse, addiction, and depression. After 8 weeks, measures of aerobic fitness increased, and symptoms of depression and anxiety decreased [307]. However, though these positive preliminary results are promising for developing more refined and effective interventions, it is important to note that these examples have been published as pilot studies, and that none of them have extensive or long-term evaluation of their impact on resilience, or very large sample sizes in their original studies (for review, see [215]).

For current active duty military members, there exists the US Army Ready and Resilient Campaign (R2C) is one that attempts to build resilience in soldiers, army civilians, and their families, and the Army spends about $50 million a year on this program alone. In 2013, there existed over 94 different prevention or resilience programs within the Department of Defense (DoD). As opposed to the aforementioned studies, the impact on resilience from these programs has been evaluated, but no consistent, significant impact has been uncovered yet [308]. Thus, overall, resilience behavioral training is in its infancy and there exists a dearth of evidence validating that these behavioral programs are actually effective [309].

The only intervention programs in existence for older adults are implemented primarily after the onset of symptoms. For instance, though the exact causes of increased depression in aging is unknown, some research suggests that deficits in biological rhythmicity can contribute to onset of depressive symptoms. One option for these patients is using bright light therapy (BLT), in which bright blue light is shone daily in elderly patients' homes. In essence, the patients are to sit in front of a light box for 60 minutes each day for the duration of the study, during the middle of the day [310]. One group found that 3 weeks of BLT treatment

caused a reduction in MDD symptoms, including mood, sleep and cortisol hyperexcretion [311]. There also exist elderly suicide prevention programs, which consist of community workshops, interpersonal psychotherapy, and individual counseling. One review summarized 19 studies that assessed suicide prevention programs for adults aged 60 or older, and found that most studies observed a reduction in the level of suicide ideation or suicide rate of their respective communities [312]. The authors point out, however, that none of the studies aimed to improve protective factors.

Despite these small studies, building resilience through behavioral interventions in older adults is a field that requires much more investigation. Most research concludes with suggestions rather than definitive evaluations; for instance, savoring positive experiences was examined in older adults, and the authors reached the conclusion that positive psychological interventions to enhance resilience would be beneficial [313]. In general, positive emotions correlates strongly with resilience and well-being, and these could be the foundation for building effective resilience programs, or happiness interventions, for both the general population and the elderly [222, 313-315]. However, to our knowledge, no specific interventions have been established. Thus, the field of resilience enhancement in the elderly can potentially gain insight from resilience studies on other populations such as children and adolescents, but would likely find more value in studies that have examined resilience among specific groups of older adults, such as veterans or groups that come from specific backgrounds or experienced similar adversities. Because resilience is such a dynamic process, one suggestion has been to develop individualized resilience enhancement programs for older adults [215, 316, 317].

16.2. Exercise Therapies and Caloric Restriction (CR)

A popular intervention is regular exercise or high mobility, as a number of studies have correlated regular exercise and physical strength with higher emotional resilience in adults [18, 318, 319], and contributes to successful aging [320-323]. In addition to its effectiveness in preventing or alleviating heart disease [324], exercise has also been shown to improve mental health in older populations [325]. Increasing interest has been focused on using exercise to promote healthy aging and as a treatment for older people with and without psychiatric illnesses [326]. In regards to resilience, in a study of participants 72 years or older, it was demonstrated that high mobility was a positive predictor and a marker of resiliency in this population [243]. In general, the molecular processes of exercise are ones that attenuate typical signs of aging, such as inflammatory processes and telomere length [327, 328]. Additionally, since maximal oxygen capacity decreases with age, due to decreases in aging skeletal muscles, exercise can have a restoring effect on health; it also has effects in neurodegenerative diseases and oxidative stress regulation, even in frail elderly [327]. These studies collectively suggest that exercise has a multitude of benefits, but importantly, they may increase health and resilience in elderly populations.

In line with exercise therapies, weight management over time has also been correlated with resilience, particularly in the older population [329]. Thus, caloric restriction (CR) has been used as a therapy to postpone the detrimental aspects of aging, and is defined as a decrease of 30% to 60% *ad libitum* feeding without malnutrition (reviewed in [211, 329]). It has been shown to be effective in improving resilience, but that the effects of exercise have proven more consistently beneficial [248]. Numerous studies since 1935 have shown that lifelong CR increases mean and maximum lifespan and delays age-associated disease in several species, including mice, rats, and rhesus monkeys [330-332]. For instance, some studies have found that some dietary regimes and over a dozen single-gene mutations can extend the mean and maximal lifespan in mice [333, 334]. It has been suggested that CR may suppress inflammatory cytokines, a common risk factor for a number of chronic diseases [335]. Though CR is not used primarily as a method to alleviate mood disorders, it has been shown to improve mood states such as depression, but to our knowledge, the relationship between CR and mood has only been examined in aged men [336, 337]. Altogether, these studies provide evidence that therapeutic interventions in older adults would benefit from incorporating exercise and CR in their programs, though some groups are working to achieve the effects of these therapies, as not all individuals can withstand the rigor of these approaches.

17. POTENTIAL METHODS TO TARGET NEUROBIOLOGICAL SYSTEMS OF RESILIENCE IN AGING AND ELDERLY ADULT POPULATIONS

Although the aforementioned behavioral interventions are currently the standard of care for elderly patients susceptible to mood disorders, or who already suffer from one or more, it may be possible in the near future to target biological mechanisms of resilience to protect against stress.

17.1. Stress and Aging in Invertebrates and Mammals

As early as the 1990s, it was known that mutations in the genes of the nematode *Caenorhabditis elegans* (*C. elegans*) led to extensions in their lifespan; it was discovered that these nematodes were resistant to oxidative and thermal stress, as well as other environmental stressors [220]. This ability to face multiple stressors and protect against multiple forms of injury was deemed "multiplex stress resistance" [213]. More thorough molecular observations revealed that mutations that lead to stress resistance involved the slowing of molecular chaperones and cellular protein accumulation, which represents failed homeostasis, and that enhancing chaperone activity *via* enhancement of the heat shock factor 1 (HSF-1) increased stress resilience and life span in *C. elegans* [338]. Though studies in mammals are less numerous, some cell culture work has revealed that fibroblasts from Snell dwarf mice and cells from long-lived species, are resistant to multiple forms of stress in culture [339, 340].

Pharmacologic strategies have also been proposed to improve indices of health and aging, though the effects on resilience have not been consistent [211]. As discussed, the benefits of CR and exercise are large, but committing to a rigorous dietary program is unfeasible for some individuals. Thus, novel research has focused on developing CR mimetics such

as pharmacological approaches in order to confer the benefits of CR and exercise without the rigorous requirements. For instance, the mTOR inhibitor rapamycin has been shown to extend lifespan and have effects on immune processes when administered to mice [341-344], as well as other compounds such as resveratrol and metformin [329]. However, a recent study demonstrated that neither rapamycin nor CR has effects in older mice, and that there may even be deleterious effects to the aging immune system [250]. Resveratrol, a polyphenolic flavonoid found in grapes and red wine, and has been shown to enhance health and increase lifespan, and it may currently be taken as a therapeutic supplement in humans (reviewed in [345]). Other options such as drugs that inhibit the growth hormone/IGF-I axis, or ones that activate specific sirtuins are being discussed as potentially promising candidates to increase lifespan [346].

17.2. Translating Potential Biological Mechanisms to Humans

Given the aforementioned studies in invertebrates and mammals, as well as all that has been discussed in this review concerning the increased understanding of the neurobiology of stress resilience, there seems to be potential in targeting several different pathways to increase resilience in vulnerable populations. In addition to the potential exercise and CR mimetic drugs discussed in the previous section, there is potential to induce changes in biological pathways that have been implicated in resilience. For instance, this review provides evidence for a multitude of systems that are viable pharmacologic targets for increasing stress resistance: targeting the serotonergic system in more acute ways than common SSRIs; the glutamatergic system, and in particular the NMDA receptors as through ketamine administration; AMPA receptors; mGluR receptors; the GABA system; other neurotransmitter systems; and the HPA axis. These biological pathways are complex and integrated, but research has been aimed at uncovering the most effective pathway implicated in stress resilience, which may soon aid in improving health, longevity, and mental capacity, especially in susceptible populations.

CONCLUSION

Frequent exposure to adverse life events is an important risk factor for developing psychopathology. But, why do some individuals succumb to debilitating psychiatric disease whereas others age normally? The notion that gene-by-environment interactions affect susceptibility to stress-related disorders, especially genes enhancing vulnerability is well known. Identifying these genes that confer resilience to stressful events in adulthood has become even more important. In this review, we have provided a brief overview of the biological mechanisms underlying stress resilience, and have explored how resilience changes throughout age. We have also offered suggestions for manipulating these mechanisms to improve resilience throughout life and prevent against stress-induced mood disorders. The topic of resilience as it pertains to the aged population is particularly relevant today, as the US Census Bureau population data projects that by 2030, adults aged 65 and older will constitute nearly 20% of the population [215]. Specifically, Baby Boomers, or those born between 1946 and 1964, are the fastest growing age group in the US [215]. Thus, current research is focusing on how to aid these Baby Boomers as they reach old age to remain healthy and resilient.

While we have focused this review on neurobiological factors of resilience, it is important to emphasize once more that other individualistic factors such as strength, the ability to cope with adversity, optimism, savoring positive experiences, and flexibility also largely contribute to resilient aging [215, 313, 347, 348], as these psychosocial processes are highly integrated with resilience. For example, coping strategies and other psychosocial influences that were briefly discussed in this review are critical components to maintaining resilience. Though a more in-depth discussion of these factors was beyond the scope of this review, they are not trivial and should be considered when evaluating potential psychological interventions in conjunction with biologically-based therapeutics to increase resilience in susceptible populations. In a similar vein, as effective interventions are developed to increase resilience, there must also be a parallel improvement in resilience scales in order to properly capture what elements of health and wellness are being impacted by these interventions. Currently, there are no "gold-standard" resilience scales, as Windle and colleagues found that each of the 15 measures of resilience they reviewed were missing information regarding psychometric properties [349]. Much work needs to be done to most effectively capture resiliency in individuals.

Resiliency research is still in its infancy. It is unlikely that neurobiological mechanisms involved in stress resiliency can be summarized to one single brain structure or target; it is more likely that circuits and systems dynamically drive stress resiliency. Identifying a common circuit involved in drug-induced stress resiliency, such as that induced by a prophylactic ketamine treatment, would be beneficial for the success of future drug development.

We have also discussed here the emerging series of studies that have been conducted to probe the relationship between resilience and aging. Importantly, we prefaced this discussion with a summary of what is currently known about biological mechanisms of stress resilience, and provide suggestions for how to move forward by combining what is currently known about resilience, and how it changes throughout the aging process, to inform more effective preventative resilience-enhancement therapies that is effective throughout life. Ultimately, prophylactic approaches may reduce the worldwide burden of disability, saving billions of dollars a year for countries, and years of emotional and physiological distress for both patients and their loved ones.

CONSENT FOR PUBLICATION

Not applicable.

CONFLICT OF INTEREST

Dr. Christine A. Denny and Josephine C. McGowan are named on non-provisional patent applications for the prophylactic use of ketamine against stress-related psychiatric disorders.

ACKNOWLEDGEMENTS

Declared none.

REFERENCES

[1] Reddy, M.S. Depression: the disorder and the burden. *Indian J. Psychol. Med.,* **2010**, *32*(1), 1-2. [http://dx.doi.org/10.4103/0253-7176.70510] [PMID: 21799550]

[2] Andlin-Sobocki, P.; Jönsson, B.; Wittchen, H.U.; Olesen, J. Cost of disorders of the brain in Europe. *Eur. J. Neurol.,* **2005**, *12*(Suppl. 1), 1-27. [http://dx.doi.org/10.1111/j.1468-1331.2005.01202.x] [PMID: 15877774]

[3] Greenberg, P.E.; Kessler, R.C.; Birnbaum, H.G.; Leong, S.A.; Lowe, S.W.; Berglund, P.A.; Corey-Lisle, P.K. The economic burden of depression in the United States: how did it change between 1990 and 2000? *J. Clin. Psychiatry,* **2003**, *64*(12), 1465-1475. [http://dx.doi.org/10.4088/JCP.v64n1211] [PMID: 14728109]

[4] Greenberg, P.E.; Sisitsky, T.; Kessler, R.C.; Finkelstein, S.N.; Berndt, E.R.; Davidson, J.R.; Ballenger, J.C.; Fyer, A.J. The economic burden of anxiety disorders in the 1990s. *J. Clin. Psychiatry,* **1999**, *60*(7), 427-435. [http://dx.doi.org/10.4088/JCP.v60n0702] [PMID: 10453795]

[5] Gomoll, B.P.; Kumar, A. Managing anxiety associated with neurodegenerative disor-ders. *F1000Prime Rep.,* **2015**, *7*, 05. [http://dx.doi.org/10.12703/P7-05]

[6] Kessler, R.C.; Amminger, G.P.; Aguilar-Gaxiola, S.; Alonso, J.; Lee, S.; Ustün, T.B. Age of onset of mental disorders: a review of recent literature. *Curr. Opin. Psychiatry,* **2007**, *20*(4), 359-364. [http://dx.doi.org/10.1097/YCO.0b013e32816ebc8c] [PMID: 17551351]

[7] Forlani, C.; Morri, M.; Ferrari, B.; Dalmonte, E.; Menchetti, M.; De Ronchi, D.; Atti, A.R. Prevalence and gender differences in late-life depression: a population-based study. *Am. J. Geriatr. Psychiatry,* **2014**, *22*(4), 370-380. [http://dx.doi.org/10.1016/j.jagp.2012.08.015] [PMID: 23567427]

[8] Johnson, S.A.; Fournier, N.M.; Kalynchuk, L.E. Effect of different doses of corticosterone on depression-like behavior and HPA axis responses to a novel stressor. *Behav. Brain Res.,* **2006**, *168*(2), 280-288. [http://dx.doi.org/10.1016/j.bbr.2005.11.019] [PMID: 16386319]

[9] Kudielka, B.M.; Buske-Kirschbaum, A.; Hellhammer, D.H.; Kirschbaum, C. HPA axis responses to laboratory psychosocial stress in healthy elderly adults, younger adults, and children: impact of age and gender. *Psychoneuroendocrinology,* **2004**, *29*(1), 83-98. [http://dx.doi.org/10.1016/S0306-4530(02)00146-4] [PMID: 14575731]

[10] Southwick, S.M.; Vythilingam, M.; Charney, D.S. The psychobiology of depression and resilience to stress: implications for prevention and treatment. *Annu. Rev. Clin. Psychol.,* **2005**, *1*, 255-291. [http://dx.doi.org/10.1146/annurev.clinpsy.1.102803.143948] [PMID: 17716089]

[11] Gloria, C.T.; Steinhardt, M.A. Relationships among positive emotions, coping, resilience and mental health. *Stress Health,* **2016**, *32*(2), 145-156. [http://dx.doi.org/10.1002/smi.2589] [PMID: 24962138]

[12] Galatzer-Levy, I.R.; Brown, A.D.; Henn-Haase, C.; Metzler, T.J.; Neylan, T.C.; Marmar, C.R. Positive and negative emotion prospectively predict trajectories of resilience and distress among high-exposure police officers. *Emotion,* **2013**, *13*(3), 545-553. [http://dx.doi.org/10.1037/a0031314] [PMID: 23339621]

[13] Breton, J.J.; Labelle, R.; Berthiaume, C.; Royer, C.; St-Georges, M.; Ricard, D.; Abadie, P.; Gérardin, P.; Cohen, D.; Guilé, J.M. Protective factors against depression and suicidal behaviour in adolescence. *Can. J. Psychiatry,* **2015**, *60*(2)(Suppl. 1), S5-S15. [PMID: 25886672]

[14] Davidovich, S.; Collishaw, S.; Thapar, A.K.; Harold, G.; Thapar, A.; Rice, F. Do better executive functions buffer the effect of current parental depression on adolescent depressive symptoms? *J. Affect. Disord.,* **2016**, *199*, 54-64. [http://dx.doi.org/10.1016/j.jad.2016.03.049] [PMID: 27085164]

[15] Burton, N.W.; Pakenham, K.I.; Brown, W.J. Feasibility and effectiveness of psychosocial resilience training: a pilot study of the READY program. *Psychol. Health Med.,* **2010**, *15*(3), 266-277. [http://dx.doi.org/10.1080/13548501003758710] [PMID: 20480432]

[16] Waite, P.J.; Richardson, G.E. Determining the efficacy of resiliency training in the work site. *J. Allied Health,* **2004**, *33*(3), 178-183. [PMID: 15503750]

[17] Steensma, H.; Den Heijer, M.; Stallen, V. Research note: effects of resilience training on the reduction of stress and depression among Dutch workers. *Int. Q. Commun. Health Educ.,* **2006-2007**, *27*(2), 145-159. [http://dx.doi.org/10.2190/IQ.27.2.e] [PMID: 18364303]

[18] Childs, E.; de Wit, H. Regular exercise is associated with emotional resilience to acute stress in healthy adults. *Front. Physiol.,* **2014**, *5*, 161. [http://dx.doi.org/10.3389/fphys.2014.00161] [PMID: 24822048]

[19] Dell'Osso, L.; Carmassi, C.; Mucci, F.; Marazziti, D. Depression, serotonin and tryptophan. *Curr. Pharm. Des.,* **2016**, *22*(8), 949-954. [http://dx.doi.org/10.2174/1381612822666151214104826] [PMID: 26654774]

[20] Richell, R.A.; Deakin, J.F.; Anderson, I.M. Effect of acute tryptophan depletion on the response to controllable and uncontrollable noise stress. *Biol. Psychiatry,* **2005**, *57*(3), 295-300. [http://dx.doi.org/10.1016/j.biopsych.2004.10.010] [PMID: 15691531]

[21] Gutknecht, L.; Popp, S.; Waider, J.; Sommerlandt, F.M.; Göppner, C.; Post, A.; Reif, A.; van den Hove, D.; Strekalova, T.; Schmitt, A.; Colaço, M.B.; Sommer, C.; Palme, R.; Lesch, K.P. Interaction of brain 5-HT synthesis deficiency, chronic stress and sex differentially impact emotional behavior in Tph2 knockout mice. *Psychopharmacology (Berl.),* **2015**, *232*(14), 2429-2441. [http://dx.doi.org/10.1007/s00213-015-3879-0] [PMID: 25716307]

[22] Gardner, K.L.; Hale, M.W.; Oldfield, S.; Lightman, S.L.; Plotsky, P.M.; Lowry, C.A. Adverse experience during early life and adulthood interact to elevate tph2 mRNA expression in serotonergic neurons within the dorsal raphe nucleus. *Neuroscience,* **2009**, *163*(4), 991-1001. [http://dx.doi.org/10.1016/j.neuroscience.2009.07.055] [PMID: 19647049]

[23] Stein, M.B.; Campbell-Sills, L.; Gelernter, J. Genetic variation in 5HTTLPR is associated with emotional resilience. *Am. J. Med. Genet. B. Neuropsychiatr. Genet.,* **2009**, *150B*(7), 900-906. [http://dx.doi.org/10.1002/ajmg.b.30916] [PMID: 19152387]

[24] Gunthert, K.C.; Conner, T.S.; Armeli, S.; Tennen, H.; Covault, J.; Kranzler, H.R. Serotonin transporter gene polymorphism (5-HTTLPR) and anxiety reactivity in daily life: a daily process approach to gene-environment interaction. *Psychosom. Med.,* **2007**, *69*(8), 762-768. [http://dx.doi.org/10.1097/PSY.0b013e318157ad42] [PMID: 17942837]

[25] Markus, C.R.; De Raedt, R. Differential effects of 5-HTTLPR genotypes on inhibition of negative emotional information following acute stress exposure and tryptophan challenge. *Neuropsychopharmacology,* **2011**, *36*(4), 819-826. [http://dx.doi.org/10.1038/npp.2010.221] [PMID: 21150915]

[26] Caspi, A.; Sugden, K.; Moffitt, T.E.; Taylor, A.; Craig, I.W.; Harrington, H.; McClay, J.; Mill, J.; Martin, J.; Braithwaite, A.; Poulton, R. Influence of life stress on depression: moderation by a polymorphism in the 5-HTT gene. *Science,* **2003**, *301*(5631), 386-389. [http://dx.doi.org/10.1126/science.1083968] [PMID: 12869766]

[27] Kaufman, J.; Yang, B.Z.; Douglas-Palumberi, H.; Grasso, D.; Lipschitz, D.; Houshyar, S.; Krystal, J.H.; Gelernter, J. Brain-derived neurotrophic factor-5-HTTLPR gene interactions and environmental modifiers of depression in children. *Biol. Psychiatry,* **2006**, *59*(8), 673-680. [http://dx.doi.org/10.1016/j.biopsych.2005.10.026] [PMID: 16458264]

[28] Lesch, K.P.; Bengel, D.; Heils, A.; Sabol, S.Z.; Greenberg, B.D.; Petri, S.; Benjamin, J.; Müller, C.R.; Hamer, D.H.; Murphy, D.L. Association of anxiety-related traits with a polymorphism in the serotonin transporter gene regulatory region. *Science,* **1996**, *274*(5292), 1527-1531. [http://dx.doi.org/10.1126/science.274.5292.1527] [PMID: 8929413]

[29] Telch, M.J.; Beevers, C.G.; Rosenfield, D.; Lee, H.J.; Reijntjes, A.; Ferrell, R.E.; Hariri, A.R. 5-HTTLPR genotype potentiates the effects of war zone stressors on the emergence of PTSD, depressive and anxiety symptoms in soldiers deployed to Iraq. *World Psychiatry,* **2015**, *14*(2), 198-206. [http://dx.doi.org/10.1002/wps.20215] [PMID: 26043338]

[30] van den Hove, D.L.; Jakob, S.B.; Schraut, K.G.; Kenis, G.; Schmitt, A.G.; Kneitz, S.; Scholz, C.J.; Wiescholleck, V.; Ortega, G.; Prickaerts, J.; Steinbusch, H.; Lesch, K.P. Differential effects of prenatal stress in 5-Htt deficient mice: towards molecular mechanisms of gene × environment interactions. *PLoS One,* **2011**, *6*(8),

e22715. [http://dx.doi.org/10.1371/journal.pone.0022715] [PMID: 21857948]

[31] Couch, Y.; Anthony, D.C.; Dolgov, O.; Revischin, A.; Festoff, B.; Santos, A.I.; Steinbusch, H.W.; Strekalova, T. Microglial activation, increased TNF and SERT expression in the prefrontal cortex define stress-altered behaviour in mice susceptible to anhedonia. *Brain Behav. Immun.,* **2013**, *29*, 136-146. [http://dx.doi.org/10.1016/j.bbi.2012.12.017] [PMID: 23305936]

[32] Zurawek, D. Reciprocal microRNA expression in mesocortical circuit and its interplay with serotonin transporter define resilient rats in the chronic mild stress. *Mol. Neurobiol.,* **2017**, *54*, 5741. [PMID: 27660265]

[33] Bethea, C.L.; Phu, K.; Reddy, A.P.; Cameron, J.L. The effect of short-term stress on serotonin gene expression in high and low resilient macaques. *Prog. Neuropsychopharmacol. Biol. Psychiatry,* **2013**, *44*, 143-153. [http://dx.doi.org/10.1016/j.pnpbp.2013.01.013] [PMID: 23357537]

[34] Bethea, C.L.; Streicher, J.M.; Mirkes, S.J.; Sanchez, R.L.; Reddy, A.P.; Cameron, J.L. Serotonin-related gene expression in female monkeys with individual sensitivity to stress. *Neuroscience,* **2005**, *132*(1), 151-166. [http://dx.doi.org/10.1016/j.neuroscience.2004.11.022] [PMID: 15780474]

[35] David, D.J.; Gardier, A.M. The pharmacological basis of the serotonin system: Application to antidepressant response. *Encephale,* **2016**, *42*(3), 255-263. [http://dx.doi.org/10.1016/j.encep.2016.03.012] [PMID: 27112704]

[36] Samuels, B.A.; Mendez-David, I.; Faye, C.; David, S.A.; Pierz, K.A.; Gardier, A.M.; Hen, R.; David, D.J. Serotonin 1A and serotonin 4 receptors: Essential mediators of the neurogenic and behavioral actions of antidepressants. *Neuroscientist,* **2016**, *22*(1), 26-45. [http://dx.doi.org/10.1177/1073858414561303] [PMID: 25488850]

[37] Lemonde, S.; Turecki, G.; Bakish, D.; Du, L.; Hrdina, P.D.; Bown, C.D.; Sequeira, A.; Kushwaha, N.; Morris, S.J.; Basak, A.; Ou, X.M.; Albert, P.R. Impaired repression at a 5-hydroxytryptamine 1A receptor gene polymorphism associated with major depression and suicide. *J. Neurosci.,* **2003**, *23*(25), 8788-8799. [PMID: 14507979]

[38] Richardson-Jones, J.W.; Craige, C.P.; Guiard, B.P.; Stephen, A.; Metzger, K.L.; Kung, H.F.; Gardier, A.M.; Dranovsky, A.; David, D.J.; Beck, S.G.; Hen, R.; Leonardo, E.D. 5-HT1A autoreceptor levels determine vulnerability to stress and response to antidepressants. *Neuron,* **2010**, *65*(1), 40-52. [http://dx.doi.org/10.1016/j.neuron.2009.12.003] [PMID: 20152112]

[39] Attar-Lévy, D.; Martinot, J.L.; Blin, J.; Dao-Castellana, M.H.; Crouzel, C.; Mazoyer, B.; Poirier, M.F.; Bourdel, M.C.; Aymard, N.; Syrota, A.; Féline, A. The cortical serotonin2 receptors studied with positron-emission tomography and [18F]-setoperone during depressive illness and antidepressant treatment with clomipramine. *Biol. Psychiatry,* **1999**, *45*(2), 180-186. [http://dx.doi.org/10.1016/S0006-3223(98)00007-9] [PMID: 9951565]

[40] Biver, F.; Wikler, D.; Lotstra, F.; Damhaut, P.; Goldman, S.; Mendlewicz, J. Serotonin 5-HT2 receptor imaging in major depression: focal changes in orbito-insular cortex. *Br. J. Psychiatry,* **1997**, *171*, 444-448. [http://dx.doi.org/10.1192/bjp.171.5.444] [PMID: 9463603]

[41] Larisch, R.; Klimke, A.; Mayoral, F.; Hamacher, K.; Herzog, H.R.; Vosberg, H.; Tosch, M.; Gaebel, W.; Rivas, F.; Coenen, H.H.; Müller-Gärtner, H.W. Disturbance of serotonin 5HT2 receptors in remitted patients suffering from hereditary depressive disorder. *Nucl. Med. (Stuttg.),* **2001**, *40*(4), 129-134. [PMID: 11556203]

[42] Mintun, M.A.; Sheline, Y.I.; Moerlein, S.M.; Vlassenko, A.G.; Huang, Y.; Snyder, A.Z. Decreased hippocampal 5-HT2A receptor binding in major depressive disorder: *In vivo* measurement with [18F]altanserin positron emission tomography. *Biol. Psychiatry,* **2004**, *55*(3), 217-224. [http://dx.doi.org/10.1016/j.biopsych.2003.08.015] [PMID: 14744461]

[43] Sheline, Y.I.; Mintun, M.A.; Barch, D.M.; Wilkins, C.; Snyder, A.Z.; Moerlein, S.M. Decreased hippocampal 5-HT(2A) receptor binding in older depressed patients using [18F]altanserin positron emission tomography. *Neuropsychopharmacology,* **2004**, *29*(12), 2235-2241. [http://dx.doi.org/10.1038/sj.npp.1300555] [PMID: 15367923]

[44] Adams, K.H.; Hansen, E.S.; Pinborg, L.H.; Hasselbalch, S.G.; Svarer, C.; Holm, S.; Bolwig, T.G.; Knudsen, G.M. Patients with obsessive-compulsive disorder have increased 5-HT2A receptor binding in the caudate nuclei. *Int. J. Neuropsychopharmacol.,* **2005**, *8*(3), 391-401. [http://dx.doi.org/10.1017/S1461145705005055] [PMID: 15801987]

[45] Berton, O.; Aguerre, S.; Sarrieau, A.; Mormede, P.; Chaouloff, F. Differential effects of social stress on central serotonergic activity and emotional reactivity in Lewis and spontaneously hypertensive rats. *Neuroscience,* **1998**, *82*(1), 147-159. [http://dx.doi.org/10.1016/S0306-4522(97)00282-0] [PMID: 9483511]

[46] Farhang, S.; Barar, J.; Fakhari, A.; Mesgariabbasi, M.; Khani, S.; Omidi, Y.; Farnam, A. Asymmetrical expression of BDNF and NTRK3 genes in frontoparietal cortex of stress-resilient rats in an animal model of depression. *Synapse,* **2014**, *68*(9), 387-393. [http://dx.doi.org/10.1002/syn.21746] [PMID: 24753016]

[47] Blier, P.; Keller, M.B.; Pollack, M.H.; Thase, M.E.; Zajecka, J.M.; Dunner, D.L. Preventing recurrent depression: long-term treatment for major depressive disorder. *J. Clin. Psychiatry,* **2007**, *68*(3), e06. [http://dx.doi.org/10.4088/JCP.0307e06] [PMID: 17388700]

[48] Hirschfeld, R.M. Guidelines for the long-term treatment of depression. *J. Clin. Psychiatry,* **1994**, *55*(Suppl.), 61-69. [PMID: 7814359]

[49] Gilaberte, I.; Montejo, A.L.; de la Gandara, J.; Perez-Sola, V.; Bernardo, M.; Massana, J.; Martin-Santos, R.; Santiso, A.; Noguera, R.; Casais, L.; Perez-Camo, V.; Arias, M.; Judge, R. Fluoxetine in the prevention of depressive recurrences: a double-blind study. *J. Clin. Psychopharmacol.,* **2001**, *21*(4), 417-424. [http://dx.doi.org/10.1097/00004714-200108000-00009] [PMID: 11476126]

[50] Montgomery, S.A.; Dufour, H.; Brion, S.; Gailledreau, J.; Laqueille, X.; Ferrey, G.; Moron, P.; Parant-Lucena, N.; Singer, L.; Danion, J.M. The prophylactic efficacy of fluoxetine in unipolar depression. *Br. J. Psychiatry Suppl.,* **1988**, (3), 69-76. [PMID: 3150694]

[51] Montgomery, S.A.; Dunbar, G. Paroxetine is better than placebo in relapse prevention and the prophylaxis of recurrent depression. *Int. Clin. Psychopharmacol.,* **1993**, *8*(3), 189-195. [http://dx.doi.org/10.1097/00004850-199300830-00009] [PMID: 8263317]

[52] Montgomery, S.A.; Rasmussen, J.G.; Tanghøj, P. A 24-week study of 20 mg citalopram, 40 mg citalopram, and placebo in the prevention of relapse of major depression. *Int. Clin. Psychopharmacol.,* **1993**, *8*(3), 181-188. [http://dx.doi.org/10.1097/00004850-199300830-00008] [PMID: 8263316]

[53] Doogan, D.P.; Caillard, V. Sertraline in the prevention of depression. *Br. J. Psychiatry,* **1992**, *160*, 217-222. [http://dx.doi.org/10.1192/bjp.160.2.217] [PMID: 1540762]

[54] Peselow, E.D.; Tobia, G.; Karamians, R.; Pizano, D.; IsHak, W.W. Prophylactic efficacy of fluoxetine, escitalopram, sertraline, paroxetine, and concomitant psychotherapy in major depressive disorder: outcome after long-term follow-up. *Psychiatry Res.,* **2015**, *225*(3), 680-686. [http://dx.doi.org/10.1016/j.psychres.2014.11.022] [PMID: 25496869]

[55] Berton, O.; Durand, M.; Aguerre, S.; Mormède, P.; Chaouloff, F. Behavioral, neuroendocrine and serotonergic consequences of single social defeat and repeated fluoxetine pretreatment in the Lewis rat strain. *Neuroscience,* **1999**, *92*(1), 327-341. [http://dx.doi.org/10.1016/S0306-4522(98)00742-8] [PMID: 10392854]

[56] Baek, I.S.; Park, J.Y.; Han, P.L. Chronic antidepressant treatment in normal mice induces anxiety and impairs stress-coping ability. *Exp. Neurobiol.,* **2015**, *24*(2), 156-168. [http://dx.doi.org/10.5607/en.2015.24.2.156] [PMID: 26113795]

[57] Brachman, R.A.; McGowan, J.C.; Perusini, J.N.; Lim, S.C.; Pham, T.H.; Faye, C.; Gardier, A.M.; Mendez-David, I.; David, D.J.; Hen, R.; Denny, C.A. Ketamine as a prophylactic against stress-induced depressive-like behavior. *Biol. Psychiatry,* **2016**, *79*(9), 776-786. [http://dx.doi.org/10.1016/j.biopsych.2015.04.022] [PMID: 26037911]

[58] Binder, E.; Malki, K.; Paya-Cano, J.L.; Fernandes, C.; Aitchison, K.J.; Mathé, A.A.; Sluyter, F.; Schalkwyk, L.C. Antidepressants and the resilience to early-life stress in inbred mouse strains. *Pharmacogenet. Genomics,* **2011**, *21*(12), 779-789. [http://dx.doi.org/10.1097/FPC.0b013e32834b3f35] [PMID: 22016050]

[59] Trullas, R.; Skolnick, P. Functional antagonists at the NMDA receptor complex exhibit antidepressant actions. *Eur. J. Pharmacol.,* **1990**, *185*(1), 1-10. [http://dx.doi.org/10.1016/0014-2999(90)90204-J] [PMID: 2171955]

[60] Hashimoto, K.; Sawa, A.; Iyo, M. Increased levels of glutamate in brains from patients with mood disorders. *Biol. Psychiatry,* **2007**, *62*(11), 1310-1316. [http://dx.doi.org/10.1016/j.biopsych.2007.03.017] [PMID: 17574216]

[61] Sanacora, G.; Gueorguieva, R.; Epperson, C.N.; Wu, Y.T.; Appel, M.; Rothman, D.L.; Krystal, J.H.; Mason, G.F. Subtype-specific alterations of gamma-aminobutyric acid and glutamate in patients with major depression. *Arch. Gen. Psychiatry,* **2004**, *61*(7), 705-713. [http://dx.doi.org/10.1001/archpsyc.61.7.705] [PMID: 15237082]

[62] Hasler, G.; van der Veen, J.W.; Tumonis, T.; Meyers, N.; Shen, J.; Drevets, W.C. Reduced prefrontal glutamate/glutamine and gamma-aminobutyric acid levels in major depression determined using proton magnetic resonance spectroscopy. *Arch. Gen. Psychiatry,* **2007**, *64*(2), 193-200. [http://dx.doi.org/10.1001/archpsyc.64.2.193] [PMID: 17283286]

[63] Yildiz-Yesiloglu, A.; Ankerst, D.P. Review of 1H magnetic resonance spectroscopy findings in major depressive disorder: a meta-analysis. *Psychiatry Res.,* **2006**, *147*(1), 1-25. [http://dx.doi.org/10.1016/j.pscychresns.2005.12.004] [PMID: 16806850]

[64] Luykx, J.J.; Laban, K.G.; van den Heuvel, M.P.; Boks, M.P.; Mandl, R.C.; Kahn, R.S.; Bakker, S.C. Region and state specific glutamate downregulation in major depressive disorder: a meta-analysis of (1)H-MRS findings. *Neurosci. Biobehav. Rev.,* **2012**, *36*(1), 198-205. [http://dx.doi.org/10.1016/j.neubiorev.2011.05.014] [PMID: 21672551]

[65] Rosenberg, D.R.; Macmaster, F.P.; Mirza, Y.; Smith, J.M.; Easter, P.C.; Banerjee, S.P.; Bhandari, R.; Boyd, C.; Lynch, M.; Rose, M.; Ivey, J.; Villafuerte, R.A.; Moore, G.J.; Renshaw, P. Reduced anterior cingulate glutamate in pediatric major depression: a magnetic resonance spectroscopy study. *Biol. Psychiatry,* **2005**, *58*(9), 700-704. [http://dx.doi.org/10.1016/j.biopsych.2005.05.007] [PMID: 16084860]

[66] Hermens, D.F.; Chitty, K.M.; Lee, R.S.; Tickell, A.; Haber, P.S.; Naismith, S.L.; Hickie, I.B.; Lagopoulos, J. Hippocampal glutamate is increased and associated with risky drinking in young adults with major depression. *J. Affect. Disord.,* **2015**, *186*, 95-98. [http://dx.doi.org/10.1016/j.jad.2015.07.009] [PMID: 26233319]

[67] de Diego-Adeliño, J.; Portella, M.J.; Gómez-Ansón, B.; López-Moruelo, O.; Serra-Blasco, M.; Vives, Y.; Puigdemont, D.; Pérez-Egea, R.; Álvarez, E.; Pérez, V. Hippocampal abnormalities of glutamate/glutamine, N-acetylaspartate and choline in patients with depression are related to past illness burden. *J. Psychiatry Neurosci.,* **2013**, *38*(2), 107-116. [http://dx.doi.org/10.1503/jpn.110185] [PMID: 23425950]

[68] Block, W.; Träber, F.; von Widdern, O.; Metten, M.; Schild, H.; Maier, W.; Zobel, A.; Jessen, F. Proton MR spectroscopy of the hippocampus at 3 T in patients with unipolar major depressive disorder: correlates and predictors of treatment response. *Int. J. Neuropsychopharmacol.,* **2009**, *12*(3), 415-422. [http://dx.doi.org/10.1017/S1461145708009516] [PMID: 18845018]

[69] Moghaddam, B. Stress preferentially increases extraneuronal levels of excitatory amino acids in the prefrontal cortex: comparison to hippocampus and basal ganglia. *J. Neurochem.,* **1993**, *60*(5), 1650-1657. [http://dx.doi.org/10.1111/j.1471-4159.1993.tb13387.x] [PMID: 8097232]

[70] Ghasemi, M.; Phillips, C.; Trillo, L.; De Miguel, Z.; Das, D.; Salehi, A. The role of NMDA receptors in the pathophysiology and treatment of mood disorders. *Neurosci. Biobehav. Rev.,* **2014**, *47*, 336-358. [http://dx.doi.org/10.1016/j.neubiorev.2014.08.017] [PMID: 25218759]

[71] Boyce-Rustay, J.M.; Holmes, A. Genetic inactivation of the NMDA receptor NR2A subunit has anxiolytic- and antidepressant-like effects in mice. *Neuropsychopharmacology,* **2006**, *31*(11), 2405-2414. [http://dx.doi.org/10.1038/sj.npp.1301039] [PMID: 16482087]

[72] Miller, O.H.; Yang, L.; Wang, C.C.; Hargroder, E.A.; Zhang, Y.; Delpire, E.; Hall, B.J. GluN2B-containing NMDA receptors regulate depression-like behavior and are critical for the rapid antidepressant actions of ketamine. *eLife,* **2014**, *3*, e03581. [http://dx.doi.org/10.7554/eLife.03581] [PMID: 25340958]

[73] Miyamoto, Y.; Yamada, K.; Noda, Y.; Mori, H.; Mishina, M.; Nabeshima, T. Lower sensitivity to stress and altered monoaminergic neuronal function in mice lacking the NMDA receptor epsilon 4 subunit. *J. Neurosci.,* **2002**, *22*(6), 2335-2342. [PMID: 11896172]

[74] Yamamoto, H. Loss of GluN2D subunit results in social recognition deficit, social stress, 5-HT2C receptor dysfunction, and anhedonia in mice. *Neuropharmacology,* **2017**, *112*(Pt A), 188-197.

[75] Zarate, C.A., Jr; Singh, J.B.; Carlson, P.J.; Brutsche, N.E.; Ameli, R.; Luckenbaugh, D.A.; Charney, D.S.; Manji, H.K. A randomized trial of an N-methyl-D-aspartate antagonist in treatment-resistant major depression. *Arch. Gen. Psychiatry,* **2006**, *63*(8), 856-864. [http://dx.doi.org/10.1001/archpsyc.63.8.856] [PMID: 16894061]

[76] Covvey, J.R.; Crawford, A.N.; Lowe, D.K. Intravenous ketamine for treatment-resistant major depressive disorder. *Ann. Pharmacother.,* **2012**, *46*(1), 117-123. [http://dx.doi.org/10.1345/aph.1Q371] [PMID: 22190250]

[77] Murrough, J.W.; Iosifescu, D.V.; Chang, L.C.; Al Jurdi, R.K.; Green, C.E.; Perez, A.M.; Iqbal, S.; Pillemer, S.; Foulkes, A.; Shah, A.; Charney, D.S.; Mathew, S.J. Antidepressant efficacy of ketamine in treatment-resistant major depression: a two-site randomized controlled trial. *Am. J. Psychiatry,* **2013**, *170*(10), 1134-1142. [http://dx.doi.org/10.1176/appi.ajp.2013.13030392] [PMID: 23982301]

[78] Lapidus, K.A.; Levitch, C.F.; Perez, A.M.; Brallier, J.W.; Parides, M.K.; Soleimani, L.; Feder, A.; Iosifescu, D.V.; Charney, D.S.; Murrough, J.W. A randomized controlled trial of intranasal ketamine in major depressive disorder. *Biol. Psychiatry,* **2014**, *76*(12), 970-976. [http://dx.doi.org/10.1016/j.biopsych.2014.03.026] [PMID: 24821196]

[79] Berman, R.M.; Cappiello, A.; Anand, A.; Oren, D.A.; Heninger, G.R.; Charney, D.S.; Krystal, J.H. Antidepressant effects of ketamine in depressed patients. *Biol. Psychiatry,* **2000**, *47*(4), 351-354. [http://dx.doi.org/10.1016/S0006-3223(99)00230-9] [PMID: 10686270]

[80] Irwin, S.A.; Iglewicz, A. Oral ketamine for the rapid treatment of depression and anxiety in patients receiving hospice care. *J. Palliat. Med.,* **2010**, *13*(7), 903-908. [http://dx.doi.org/10.1089/jpm.2010.9808] [PMID: 20636166]

[81] Ray, S.M.; Kious, B.M. Sustained resolution of panic disorder, agoraphobia, and generalized anxiety disorder with a single ketamine infusion: A case report. *Prim. Care Companion CNS Disord.,* **2016**, *18*(4), [PMID: 27828703]

[82] Feder, A.; Parides, M.K.; Murrough, J.W.; Perez, A.M.; Morgan, J.E.; Saxena, S.; Kirkwood, K.; Aan Het Rot, M.; Lapidus, K.A.; Wan, L.B.; Iosifescu, D.; Charney, D.S. Efficacy of intravenous ketamine for treatment of chronic posttraumatic stress disorder: a randomized clinical trial. *JAMA Psychiatry,* **2014**, *71*(6), 681-688. [http://dx.doi.org/10.1001/jamapsychiatry.2014.62] [PMID: 24740528]

[83] Rodriguez, C.I.; Kegeles, L.S.; Levinson, A.; Feng, T.; Marcus, S.M.; Vermes, D.; Flood, P.; Simpson, H.B. Randomized controlled crossover trial of ketamine in obsessive-compulsive disorder: proof-of-concept. *Neuropsychopharmacology,* **2013**, *38*(12), 2475-2483. [http://dx.doi.org/10.1038/npp.2013.150] [PMID: 23783065]

[84] Juven-Wetzler, A.; Cohen, H.; Kaplan, Z.; Kohen, A.; Porat, O.; Zohar, J. Immediate ketamine treatment does not prevent posttraumatic stress responses in an animal model for PTSD. *Eur. Neuropsychopharmacol.,* **2014**, *24*(3), 469-479. [http://dx.doi.org/10.1016/j.euroneuro.2013.08.007] [PMID: 24239430]

[85] Amat, J.; Dolzani, S.D.; Tilden, S.; Christianson, J.P.; Kubala, K.H.; Bartholomay, K.; Sperr, K.; Ciancio, N.; Watkins, L.R.; Maier, S.F. Previous ketamine produces an enduring blockade of neurochemical and behavioral effects of uncontrollable stress. *J. Neurosci.,* **2016**, *36*(1), 153-161. [http://dx.doi.org/10.1523/JNEUROSCI.3114-15.2016] [PMID: 26740657]

[86] McGowan, J.C.; LaGamma, C.T.; Lim, S.C.; Tsitsiklis, M.; Neria, Y.; Brachman, R.A.; Denny, C.A. Prophylactic ketamine attenuates learned feaR. *Neuropsychopharmacology,* **2017**, *42*(8), 1577-1589. [http://dx.doi.org/10.1038/npp.2017.19] [PMID: 28128336]

[87] Maeng, S.; Zarate, C.A., Jr; Du, J.; Schloesser, R.J.; McCammon, J.; Chen, G.; Manji, H.K. Cellular mechanisms underlying the antidepressant effects of ketamine: role of alpha-amino-3-hydroxy-5-methylisoxazole-4-propionic acid receptors. *Biol. Psychiatry,* **2008**, *63*(4), 349-352. [http://dx.doi.org/10.1016/j.biopsych.2007.05.028] [PMID: 17643398]

[88] Gibbons, A.S.; Brooks, L.; Scarr, E.; Dean, B. AMPA receptor expression is increased post-mortem samples of the anterior cingulate from subjects with major depressive disorder. *J. Affect. Dis-*

ord., **2012**, *136*(3), 1232-1237. [http://dx.doi.org/10.1016/j.jad.2011.10.001] [PMID: 22036795]

[89] Beneyto, M.; Kristiansen, L.V.; Oni-Orisan, A.; McCullumsmith, R.E.; Meador-Woodruff, J.H. Abnormal glutamate receptor expression in the medial temporal lobe in schizophrenia and mood disorders. *Neuropsychopharmacology,* **2007**, *32*(9), 1888-1902. [http://dx.doi.org/10.1038/sj.npp.1301312] [PMID: 17299517]

[90] Freudenberg, F.; Celikel, T.; Reif, A. The role of α-amino-3-hydroxy-5-methyl-4-isoxazolepropionic acid (AMPA) receptors in depression: central mediators of pathophysiology and antidepressant activity? *Neurosci. Biobehav. Rev.,* **2015**, *52*, 193-206. [http://dx.doi.org/10.1016/j.neubiorev.2015.03.005] [PMID: 25783220]

[91] Fitzgerald, P.J.; Barkus, C.; Feyder, M.; Wiedholz, L.M.; Chen, Y.C.; Karlsson, R.M.; Machado-Vieira, R.; Graybeal, C.; Sharp, T.; Zarate, C.; Harvey-White, J.; Du, J.; Sprengel, R.; Gass, P.; Bannerman, D.; Holmes, A. Does gene deletion of AMPA GluA1 phenocopy features of schizoaffective disorder? *Neurobiol. Dis.,* **2010**, *40*(3), 608-621. [http://dx.doi.org/10.1016/j.nbd.2010.08.005] [PMID: 20699120]

[92] Maksimovic, M.; Vekovischeva, O.Y.; Aitta-aho, T.; Korpi, E.R. Chronic treatment with mood-stabilizers attenuates abnormal hyperlocomotion of GluA1-subunit deficient mice. *PLoS One,* **2014**, *9*(6), e100188. [http://dx.doi.org/10.1371/journal.pone.0100188] [PMID: 24932798]

[93] Chourbaji, S.; Vogt, M.A.; Fumagalli, F.; Sohr, R.; Frasca, A.; Brandwein, C.; Hörtnagl, H.; Riva, M.A.; Sprengel, R.; Gass, P. AMPA receptor subunit 1 (GluR-A) knockout mice model the glutamate hypothesis of depression. *FASEB J.,* **2008**, *22*(9), 3129-3134. [http://dx.doi.org/10.1096/fj.08-106450] [PMID: 18492725]

[94] Vogt, M.A.; Elkin, H.; Pfeiffer, N.; Sprengel, R.; Gass, P.; Inta, D. Impact of adolescent GluA1 AMPA receptor ablation in forebrain excitatory neurons on behavioural correlates of mood disorders. *Eur. Arch. Psychiatry Clin. Neurosci.,* **2014**, *264*(7), 625-629. [http://dx.doi.org/10.1007/s00406-014-0509-5] [PMID: 24895223]

[95] Weber, T.; Vogt, M.A.; Gartside, S.E.; Berger, S.M.; Lujan, R.; Lau, T.; Herrmann, E.; Sprengel, R.; Bartsch, D.; Gass, P. Adult AMPA GLUA1 receptor subunit loss in 5-HT neurons results in a specific anxiety-phenotype with evidence for dysregulation of 5-HT neuronal activity. *Neuropsychopharmacology,* **2015**, *40*(6), 1471-1484. [http://dx.doi.org/10.1038/npp.2014.332] [PMID: 25547714]

[96] Vialou, V.; Robison, A.J.; Laplant, Q.C.; Covington, H.E., III; Dietz, D.M.; Ohnishi, Y.N.; Mouzon, E.; Rush, A.J., III; Watts, E.L.; Wallace, D.L.; Iñiguez, S.D.; Ohnishi, Y.H.; Steiner, M.A.; Warren, B.L.; Krishnan, V.; Bolaños, C.A.; Neve, R.L.; Ghose, S.; Berton, O.; Tamminga, C.A.; Nestler, E.J. DeltaFosB in brain reward circuits mediates resilience to stress and antidepressant responses. *Nat. Neurosci.,* **2010**, *13*(6), 745-752. [http://dx.doi.org/10.1038/nn.2551] [PMID: 20473292]

[97] Mead, A.N.; Morris, H.V.; Dixon, C.I.; Rulten, S.L.; Mayne, L.V.; Zamanillo, D.; Stephens, D.N. AMPA receptor GluR2, but not GluR1, subunit deletion impairs emotional response conditioning in mice. *Behav. Neurosci.,* **2006**, *120*(2), 241-248. [http://dx.doi.org/10.1037/0735-7044.120.2.241] [PMID: 16719688]

[98] Li, X.; Tizzano, J.P.; Griffey, K.; Clay, M.; Lindstrom, T.; Skolnick, P. Antidepressant-like actions of an AMPA receptor potentiator (LY392098). *Neuropharmacology,* **2001**, *40*(8), 1028-1033. [http://dx.doi.org/10.1016/S0028-3908(00)00194-5] [PMID: 11406194]

[99] Schmidt, M.V.; Trümbach, D.; Weber, P.; Wagner, K.; Scharf, S.H.; Liebl, C.; Datson, N.; Namendorf, C.; Gerlach, T.; Kühne, C.; Uhr, M.; Deussing, J.M.; Wurst, W.; Binder, E.B.; Holsboer, F.; Müller, M.B. Individual stress vulnerability is predicted by short-term memory and AMPA receptor subunit ratio in the hippocampus. *J. Neurosci.,* **2010**, *30*(50), 16949-16958. [http://dx.doi.org/10.1523/JNEUROSCI.4668-10.2010] [PMID: 21159965]

[100] Knable, M.B.; Torrey, E.F.; Webster, M.J.; Bartko, J.J. Multivariate analysis of prefrontal cortical data from the Stanley Foundation Neuropathology Consortium. *Brain Res. Bull.,* **2001**, *55*(5), 651-659. [http://dx.doi.org/10.1016/S0361-9230(01)00521-4] [PMID: 11576762]

[101] Laje, G.; Paddock, S.; Manji, H.; Rush, A.J.; Wilson, A.F.; Charney, D.; McMahon, F.J. Genetic markers of suicidal ideation emerging during citalopram treatment of major depression. *Am. J. Psychiatry,* **2007**, *164*(10), 1530-1538. [http://dx.doi.org/10.1176/appi.ajp.2007.06122018] [PMID: 17898344]

[102] Myung, W.; Song, J.; Lim, S.W.; Won, H.H.; Kim, S.; Lee, Y.; Kang, H.S.; Lee, H.; Kim, J.W.; Carroll, B.J.; Kim, D.K. Genetic association study of individual symptoms in depression. *Psychiatry Res.,* **2012**, *198*(3), 400-406. [http://dx.doi.org/10.1016/j.psychres.2011.12.037] [PMID: 22429480]

[103] Schiffer, H.H.; Heinemann, S.F. Association of the human kainate receptor GluR7 gene (GRIK3) with recurrent major depressive disorder. *Am. J. Med. Genet. B. Neuropsychiatr. Genet.,* **2007**, *144B*(1), 20-26. [http://dx.doi.org/10.1002/ajmg.b.30374] [PMID: 16958029]

[104] Pickard, B.S.; Malloy, M.P.; Christoforou, A.; Thomson, P.A.; Evans, K.L.; Morris, S.W.; Hampson, M.; Porteous, D.J.; Blackwood, D.H.; Muir, W.J. Cytogenetic and genetic evidence supports a role for the kainate-type glutamate receptor gene, GRIK4, in schizophrenia and bipolar disorder. *Mol. Psychiatry,* **2006**, *11*(9), 847-857. [http://dx.doi.org/10.1038/sj.mp.4001867] [PMID: 16819533]

[105] Shaltiel, G.; Maeng, S.; Malkesman, O.; Pearson, B.; Schloesser, R.J.; Tragon, T.; Rogawski, M.; Gasior, M.; Luckenbaugh, D.; Chen, G.; Manji, H.K. Evidence for the involvement of the kainate receptor subunit GluR6 (GRIK2) in mediating behavioral displays related to behavioral symptoms of mania. *Mol. Psychiatry,* **2008**, *13*(9), 858-872. [http://dx.doi.org/10.1038/mp.2008.20] [PMID: 18332879]

[106] Catches, J.S.; Xu, J.; Contractor, A. Genetic ablation of the GluK4 kainate receptor subunit causes anxiolytic and antidepressant-like behavior in mice. *Behav. Brain Res.,* **2012**, *228*(2), 406-414. [http://dx.doi.org/10.1016/j.bbr.2011.12.026] [PMID: 22203159]

[107] Terbeck, S.; Akkus, F.; Chesterman, L.P.; Hasler, G. The role of metabotropic glutamate receptor 5 in the pathogenesis of mood disorders and addiction: combining preclinical evidence with human Positron Emission Tomography (PET) studies. *Front. Neurosci.,* **2015**, *9*, 86. [http://dx.doi.org/10.3389/fnins.2015.00086] [PMID: 25852460]

[108] Kovačević, T.; Skelin, I.; Minuzzi, L.; Rosa-Neto, P.; Diksic, M. Reduced metabotropic glutamate receptor 5 in the flinders sensitive line of rats, an animal model of depression: an autoradiographic study. *Brain Res. Bull.,* **2012**, *87*(4-5), 406-412. [http://dx.doi.org/10.1016/j.brainresbull.2012.01.010] [PMID: 22310150]

[109] Iyo, A.H.; Feyissa, A.M.; Chandran, A.; Austin, M.C.; Regunathan, S.; Karolewicz, B. Chronic corticosterone administration down-regulates metabotropic glutamate receptor 5 protein expression in the rat hippocampus. *Neuroscience,* **2010**, *169*(4), 1567-1574. [http://dx.doi.org/10.1016/j.neuroscience.2010.06.023] [PMID: 20600666]

[110] Van den Hove, D.L.; Kenis, G.; Brass, A.; Opstelten, R.; Rutten, B.P.; Bruschettini, M.; Blanco, C.E.; Lesch, K.P.; Steinbusch, H.W.; Prickaerts, J. Vulnerability versus resilience to prenatal stress in male and female rats; implications from gene expression profiles in the hippocampus and frontal cortex. *Eur. Neuropsychopharmacol.,* **2013**, *23*(10), 1226-1246. [http://dx.doi.org/10.1016/j.euroneuro.2012.09.011] [PMID: 23199416]

[111] Shin, S.; Kwon, O.; Kang, J.I.; Kwon, S.; Oh, S.; Choi, J.; Kim, C.H.; Kim, D.G. mGluR5 in the nucleus accumbens is critical for promoting resilience to chronic stress. *Nat. Neurosci.,* **2015**, *18*(7), 1017-1024. [http://dx.doi.org/10.1038/nn.4028] [PMID: 26005851]

[112] Li, X.; Need, A.B.; Baez, M.; Witkin, J.M. Metabotropic glutamate 5 receptor antagonism is associated with antidepressant-like effects in mice. *J. Pharmacol. Exp. Ther.,* **2006**, *319*(1), 254-259. [http://dx.doi.org/10.1124/jpet.106.103143] [PMID: 16803860]

[113] Feyissa, A.M.; Woolverton, W.L.; Miguel-Hidalgo, J.J.; Wang, Z.; Kyle, P.B.; Hasler, G.; Stockmeier, C.A.; Iyo, A.H.; Karolewicz, B. Elevated level of metabotropic glutamate receptor 2/3 in the prefrontal cortex in major depression. *Prog. Neuropsychopharmacol. Biol. Psychiatry,* **2010**, *34*(2), 279-283. [http://dx.doi.org/10.1016/j.pnpbp.2009.11.018] [PMID: 19945495]

[114] Muguruza, C.; Miranda-Azpiazu, P.; Díez-Alarcia, R.; Morentin, B.; González-Maeso, J.; Callado, L.F.; Meana, J.J. Evaluation of 5-HT2A and mGlu2/3 receptors in postmortem prefrontal cortex of subjects with major depressive disorder: effect of antidepressant treatment. *Neuropharmacology,* **2014**, *86*, 311-318. [http://dx.doi.org/10.1016/j.neuropharm.2014.08.009] [PMID: 25150943]

[115] Du Jardin, K.G.; Müller, H.K.; Sanchez, C.; Wegener, G.; Elfving, B. Gene expression related to serotonergic and glutamatergic neurotransmission is altered in the flinders sensitive line rat model of depression: Effect of ketamine. *Synapse,* **2017**, *71*(1), 37-45. [http://dx.doi.org/10.1002/syn.21940] [PMID: 27589698]

[116] Matrisciano, F.; Caruso, A.; Orlando, R.; Marchiafava, M.; Bruno, V.; Battaglia, G.; Gruber, S.H.; Melchiorri, D.; Tatarelli, R.; Girardi, P.; Mathè, A.A.; Nicoletti, F. Defective group-II metaboropic glutamate receptors in the hippocampus of spontaneously depressed rats. *Neuropharmacology,* **2008**, *55*(4), 525-531. [http://dx.doi.org/10.1016/j.neuropharm.2008.05.014] [PMID: 18590921]

[117] Nasca, C.; Bigio, B.; Zelli, D.; Nicoletti, F.; McEwen, B.S. Mind the gap: glucocorticoids modulate hippocampal glutamate tone underlying individual differences in stress susceptibility. *Mol. Psychiatry,* **2015**, *20*(6), 755-763. [http://dx.doi.org/10.1038/mp.2014.96] [PMID: 25178162]

[118] De Filippis, B.; Lyon, L.; Taylor, A.; Lane, T.; Burnet, P.W.; Harrison, P.J.; Bannerman, D.M. The role of group II metabotropic glutamate receptors in cognition and anxiety: comparative studies in GRM2(-/-), GRM3(-/-) and GRM2/3(-/-) knockout mice. *Neuropharmacology,* **2015**, *89*, 19-32. [http://dx.doi.org/10.1016/j.neuropharm.2014.08.010] [PMID: 25158312]

[119] Cryan, J.F.; Kelly, P.H.; Neijt, H.C.; Sansig, G.; Flor, P.J.; van Der Putten, H. Antidepressant and anxiolytic-like effects in mice lacking the group III metabotropic glutamate receptor mGluR7. *Eur. J. Neurosci.,* **2003**, *17*(11), 2409-2417. [http://dx.doi.org/10.1046/j.1460-9568.2003.02667.x] [PMID: 12814372]

[120] Linden, A.M.; Johnson, B.G.; Peters, S.C.; Shannon, H.E.; Tian, M.; Wang, Y.; Yu, J.L.; Köster, A.; Baez, M.; Schoepp, D.D. Increased anxiety-related behavior in mice deficient for metabotropic glutamate 8 (mGlu8) receptor. *Neuropharmacology,* **2002**, *43*(2), 251-259. [http://dx.doi.org/10.1016/S0028-3908(02)00079-5] [PMID: 12213279]

[121] Nutt, D.J.; Malizia, A.L. New insights into the role of the GABA(A)-benzodiazepine receptor in psychiatric disorder. *Br. J. Psychiatry,* **2001**, *179*, 390-396. [http://dx.doi.org/10.1192/bjp.179.5.390] [PMID: 11689393]

[122] Schür, R.R.; Draisma, L.W.; Wijnen, J.P.; Boks, M.P.; Koevoets, M.G.; Joëls, M.; Klomp, D.W.; Kahn, R.S.; Vinkers, C.H. Brain GABA levels across psychiatric disorders: A systematic literature review and meta-analysis of (1) H-MRS studies. *Hum. Brain Mapp.,* **2016**, *37*(9), 3337-3352. [http://dx.doi.org/10.1002/hbm.23244] [PMID: 27145016]

[123] Vaiva, G.; Boss, V.; Ducrocq, F.; Fontaine, M.; Devos, P.; Brunet, A.; Laffargue, P.; Goudemand, M.; Thomas, P. Relationship between posttrauma GABA plasma levels and PTSD at 1-year follow-up. *Am. J. Psychiatry,* **2006**, *163*(8), 1446-1448. [http://dx.doi.org/10.1176/ajp.2006.163.8.1446] [PMID: 16877663]

[124] Varga, Z.; Csabai, D.; Miseta, A.; Wiborg, O.; Czéh, B. Chronic stress affects the number of GABAergic neurons in the orbitofrontal cortex of rats. *Behav. Brain Res.,* **2017**, *316*, 104-114. [http://dx.doi.org/10.1016/j.bbr.2016.08.030] [PMID: 27555539]

[125] Birkenhäger, T.K.; Moleman, P.; Nolen, W.A. Benzodiazepines for depression? A review of the literature. *Int. Clin. Psychopharmacol.,* **1995**, *10*(3), 181-195. [http://dx.doi.org/10.1097/00004850-199510030-00008] [PMID: 8675972]

[126] Pham, X.; Sun, C.; Chen, X.; van den Oord, E.J.; Neale, M.C.; Kendler, K.S.; Hettema, J.M. Association study between GABA receptor genes and anxiety spectrum disorders. *Depress. Anxiety,* **2009**, *26*(11), 998-1003. [http://dx.doi.org/10.1002/da.20628] [PMID: 19842164]

[127] Feusner, J.; Ritchie, T.; Lawford, B.; Young, R.M.; Kann, B.; Noble, E.P. GABA(A) receptor beta 3 subunit gene and psychiatric morbidity in a post-traumatic stress disorder population. *Psychiatry Res.,* **2001**, *104*(2), 109-117. [http://dx.doi.org/10.1016/S0165-1781(01)00296-7] [PMID: 11711165]

[128] Gafford, G.M.; Guo, J.D.; Flandreau, E.I.; Hazra, R.; Rainnie, D.G.; Ressler, K.J. Cell-type specific deletion of GABA(A)α1 in corticotropin-releasing factor-containing neurons enhances anxiety and disrupts fear extinction. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA,* **2012**, *109*(40), 16330-16335. [http://dx.doi.org/10.1073/pnas.1119261109] [PMID: 22992651]

[129] Vollenweider, I.; Smith, K.S.; Keist, R.; Rudolph, U. Antidepressant-like properties of α2-containing GABA(A) receptors. *Behav. Brain Res.,* **2011**, *217*(1), 77-80. [http://dx.doi.org/10.1016/j.bbr.2010.10.009] [PMID: 20965216]

[130] Fiorelli, R.; Rudolph, U.; Straub, C.J.; Feldon, J.; Yee, B.K. Affective and cognitive effects of global deletion of alpha3-containing gamma-aminobutyric acid-A receptors. *Behav. Pharmacol.,* **2008**, *19*(5-6), 582-596. [http://dx.doi.org/10.1097/FBP.0b013e32830dc0c7] [PMID: 18690113]

[131] Engin, E.; Smith, K.S.; Gao, Y.; Nagy, D.; Foster, R.A.; Tsvetkov, E.; Keist, R.; Crestani, F.; Fritschy, J.M.; Bolshakov, V.Y.; Hajos, M.; Heldt, S.A.; Rudolph, U. Modulation of anxiety and fear via distinct intrahippocampal circuits. *eLife,* **2016**, *5*, e14120. [http://dx.doi.org/10.7554/eLife.14120] [PMID: 26971710]

[132] Yee, B.K.; Keist, R.; von Boehmer, L.; Studer, R.; Benke, D.; Hagenbuch, N.; Dong, Y.; Malenka, R.C.; Fritschy, J.M.; Bluethmann, H.; Feldon, J.; Möhler, H.; Rudolph, U. A schizophrenia-related sensorimotor deficit links alpha 3-containing GABAA receptors to a dopamine hyperfunction. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA,* **2005**, *102*(47), 17154-17159. [http://dx.doi.org/10.1073/pnas.0508752102] [PMID: 16284244]

[133] Chandra, D.; Korpi, E.R.; Miralles, C.P.; De Blas, A.L.; Homanics, G.E. GABAA receptor gamma 2 subunit knockdown mice have enhanced anxiety-like behavior but unaltered hypnotic response to benzodiazepines. *BMC Neurosci.,* **2005**, *6*, 30. [http://dx.doi.org/10.1186/1471-2202-6-30] [PMID: 15850489]

[134] Crestani, F.; Lorez, M.; Baer, K.; Essrich, C.; Benke, D.; Laurent, J.P.; Belzung, C.; Fritschy, J.M.; Lüscher, B.; Mohler, H. Decreased GABAA-receptor clustering results in enhanced anxiety and a bias for threat cues. *Nat. Neurosci.,* **1999**, *2*(9), 833-839. [http://dx.doi.org/10.1038/12207] [PMID: 10461223]

[135] Levinson, A.J.; Fitzgerald, P.B.; Favalli, G.; Blumberger, D.M.; Daigle, M.; Daskalakis, Z.J. Evidence of cortical inhibitory deficits in major depressive disorder. *Biol. Psychiatry,* **2010**, *67*(5), 458-464. [http://dx.doi.org/10.1016/j.biopsych.2009.09.025] [PMID: 19922906]

[136] O'Leary, O.F.; Felice, D.; Galimberti, S.; Savignac, H.M.; Bravo, J.A.; Crowley, T.; El Yacoubi, M.; Vaugeois, J.M.; Gassmann, M.; Bettler, B.; Dinan, T.G.; Cryan, J.F. GABAB(1) receptor subunit isoforms differentially regulate stress resilience. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA,* **2014**, *111*(42), 15232-15237. [http://dx.doi.org/10.1073/pnas.1404090111] [PMID: 25288769]

[137] Thoeringer, C.K.; Ripke, S.; Unschuld, P.G.; Lucae, S.; Ising, M.; Bettecken, T.; Uhr, M.; Keck, M.E.; Mueller-Myhsok, B.; Holsboer, F.; Binder, E.B.; Erhardt, A. The GABA transporter 1 (SLC6A1): a novel candidate gene for anxiety disorders. *J. Neural Transm. (Vienna),* **2009**, *116*(6), 649-657. [http://dx.doi.org/10.1007/s00702-008-0075-y] [PMID: 18607529]

[138] Schwartz, T.L.; Nihalani, N. Tiagabine in anxiety disorders. *Expert Opin. Pharmacother.,* **2006**, *7*(14), 1977-1987. [http://dx.doi.org/10.1517/14656566.7.14.1977] [PMID: 17020423]

[139] Liu, G.X.; Cai, G.Q.; Cai, Y.Q.; Sheng, Z.J.; Jiang, J.; Mei, Z.; Wang, Z.G.; Guo, L.; Fei, J. Reduced anxiety and depression-like behaviors in mice lacking GABA transporter subtype 1. *Neuropsychopharmacology,* **2007**, *32*(7), 1531-1539. [http://dx.doi.org/10.1038/sj.npp.1301281] [PMID: 17164814]

[140] Gong, X.; Shao, Y.; Li, B.; Chen, L.; Wang, C.; Chen, Y. γ-aminobutyric acid transporter-1 is involved in anxiety-like behaviors and cognitive function in knockout mice. *Exp. Ther. Med.,* **2015**, *10*(2), 653-658. [http://dx.doi.org/10.3892/etm.2015.2577] [PMID: 26622370]

[141] Karolewicz, B.; Maciag, D.; O'Dwyer, G.; Stockmeier, C.A.; Feyissa, A.M.; Rajkowska, G. Reduced level of glutamic acid decarboxylase-67 kDa in the prefrontal cortex in major depression. *Int. J. Neuropsychopharmacol.,* **2010**, *13*(4), 411-420. [http://dx.doi.org/10.1017/S1461145709990587] [PMID: 20236554]

[142] Gao, S.F.; Klomp, A.; Wu, J.L.; Swaab, D.F.; Bao, A.M. Reduced GAD(65/67) immunoreactivity in the hypothalamic paraventricular nucleus in depression: a postmortem study. *J. Affect. Disord.,* **2013**, *149*(1-3), 422-425. [http://dx.doi.org/10.1016/j.jad.2012.12.003] [PMID: 23312397]

[143] Gilabert-Juan, J.; Castillo-Gomez, E.; Guirado, R.; Moltó, M.D.; Nacher, J. Chronic stress alters inhibitory networks in the medial prefrontal cortex of adult mice. *Brain Struct. Funct.,* **2013**, *218*(6), 1591-1605. [http://dx.doi.org/10.1007/s00429-012-0479-1] [PMID: 23179864]

[144] Pochwat, B.; Nowak, G.; Szewczyk, B. Brain glutamic acid decarboxylase-67kDa alterations induced by magnesium treatment in olfactory bulbectomy and chronic mild stress models in rats. *Pharmacol. Rep.,* **2016**, *68*(5), 881-885. [http://dx.doi.org/10.1016/j.pharep.2016.04.011] [PMID: 27351943]

[145] Stork, O.; Ji, F.Y.; Kaneko, K.; Stork, S.; Yoshinobu, Y.; Moriya, T.; Shibata, S.; Obata, K. Postnatal development of a GABA deficit and disturbance of neural functions in mice lacking GAD65. *Brain Res.,* **2000**, *865*(1), 45-58. [http://dx.doi.org/10.1016/S0006-8993(00)02206-X] [PMID: 10814732]

[146] Kash, S.F.; Tecott, L.H.; Hodge, C.; Baekkeskov, S. Increased anxiety and altered responses to anxiolytics in mice deficient in the 65-kDa isoform of glutamic acid decarboxylase. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA,* **1999**, *96*(4), 1698-1703. [http://dx.doi.org/10.1073/pnas.96.4.1698] [PMID: 9990087]

[147] Sangha, S.; Narayanan, R.T.; Bergado-Acosta, J.R.; Stork, O.; Seidenbecher, T.; Pape, H.C. Deficiency of the 65 kDa isoform of glutamic acid decarboxylase impairs extinction of cued but not contextual fear memory. *J. Neurosci.,* **2009**, *29*(50), 15713-15720. [http://dx.doi.org/10.1523/JNEUROSCI.2620-09.2009] [PMID: 20016086]

[148] Müller, I.; Obata, K.; Richter-Levin, G.; Stork, O. GAD65 haplodeficiency conveys resilience in animal models of stress-induced psychopathology. *Front. Behav. Neurosci.,* **2014**, *8*, 265. [PMID: 25147515]

[149] Shaheen, A.A.; Hamdy, M.A.; Kheir-Eldin, A.A.; Lindström, P.; el-Fattah, A.A. Effect of pretreatment with vitamin E or diazepam on brain metabolism of stressed rats. *Biochem. Pharmacol.,* **1993**, *46*(1), 194-197. [http://dx.doi.org/10.1016/0006-2952(93)90367-6] [PMID: 8394075]

[150] Maldonado, N.M.; Martijena, I.D.; Molina, V.A. Facilitating influence of stress on the consolidation of fear memory induced by a weak training: reversal by midazolam pretreatment. *Behav. Brain Res.,* **2011**, *225*(1), 77-84. [http://dx.doi.org/10.1016/j.bbr.2011.06.035] [PMID: 21763355]

[151] Skórzewska, A.; Lehner, M.; Wisłowska-Stanek, A.; Turzyńska, D.; Sobolewska, A.; Krząścik, P.; Płaźnik, A. Midazolam treatment before re-exposure to contextual fear reduces freezing behavior and amygdala activity differentially in high- and low-anxiety rats. *Pharmacol. Biochem. Behav.,* **2015**, *129*, 34-44. [http://dx.doi.org/10.1016/j.pbb.2014.11.020] [PMID: 25482326]

[152] Holsboer, F. The corticosteroid receptor hypothesis of depression. *Neuropsychopharmacology,* **2000**, *23*(5), 477-501. [http://dx.doi.org/10.1016/S0893-133X(00)00159-7] [PMID: 11027914]

[153] Pariante, C.M.; Lightman, S.L. The HPA axis in major depression: classical theories and new developments. *Trends Neurosci.,* **2008**, *31*(9), 464-468. [http://dx.doi.org/10.1016/j.tins.2008.06.006] [PMID: 18675469]

[154] David, D.J.; Samuels, B.A.; Rainer, Q.; Wang, J.W.; Marsteller, D.; Mendez, I.; Drew, M.; Craig, D.A.; Guiard, B.P.; Guilloux, J.P.; Artymyshyn, R.P.; Gardier, A.M.; Gerald, C.; Antonijevic, I.A.; Leonardo, E.D.; Hen, R. Neurogenesis-dependent and -independent effects of fluoxetine in an animal model of anxiety/depression. *Neuron,* **2009**, *62*(4), 479-493. [http://dx.doi.org/10.1016/j.neuron.2009.04.017] [PMID: 19477151]

[155] Stetler, C.; Miller, G.E. Depression and hypothalamic-pituitary-adrenal activation: a quantitative summary of four decades of research. *Psychosom. Med.,* **2011**, *73*(2), 114-126. [http://dx.doi.org/10.1097/PSY.0b013e31820ad12b] [PMID: 21257974]

[156] Elliott, E.; Ezra-Nevo, G.; Regev, L.; Neufeld-Cohen, A.; Chen, A. Resilience to social stress coincides with functional DNA methylation of the Crf gene in adult mice. *Nat. Neurosci.,* **2010**, *13*(11), 1351-1353. [http://dx.doi.org/10.1038/nn.2642] [PMID: 20890295]

[157] Smith, G.W.; Aubry, J.M.; Dellu, F.; Contarino, A.; Bilezikjian, L.M.; Gold, L.H.; Chen, R.; Marchuk, Y.; Hauser, C.; Bentley, C.A.; Sawchenko, P.E.; Koob, G.F.; Vale, W.; Lee, K.F. Corticotropin releasing factor receptor 1-deficient mice display decreased anxiety, impaired stress response, and aberrant neuroendocrine development. *Neuron,* **1998**, *20*(6), 1093-1102. [http://dx.doi.org/10.1016/S0896-6273(00)80491-2] [PMID: 9655498]

[158] Müller, M.B.; Zimmermann, S.; Sillaber, I.; Hagemeyer, T.P.; Deussing, J.M.; Timpl, P.; Kormann, M.S.; Droste, S.K.; Kühn, R.; Reul, J.M.; Holsboer, F.; Wurst, W. Limbic corticotropin-releasing hormone receptor 1 mediates anxiety-related behavior and hormonal adaptation to stress. *Nat. Neurosci.,* **2003**, *6*(10), 1100-1107. [http://dx.doi.org/10.1038/nn1123] [PMID: 12973355]

[159] Taneja, M.; Salim, S.; Saha, K.; Happe, H.K.; Qutna, N.; Petty, F.; Bylund, D.B.; Eikenburg, D.C. Differential effects of inescapable stress on locus coeruleus GRK3, alpha2-adrenoceptor and CRF1 receptor levels in learned helpless and non-helpless rats: a potential link to stress resilience. *Behav. Brain Res.,* **2011**, *221*(1), 25-33. [http://dx.doi.org/10.1016/j.bbr.2011.02.018] [PMID: 21333691]

[160] Bradley, R.G.; Binder, E.B.; Epstein, M.P.; Tang, Y.; Nair, H.P.; Liu, W.; Gillespie, C.F.; Berg, T.; Evces, M.; Newport, D.J.; Stowe, Z.N.; Heim, C.M.; Nemeroff, C.B.; Schwartz, A.; Cubells, J.F.; Ressler, K.J. Influence of child abuse on adult depression: moderation by the corticotropin-releasing hormone receptor gene. *Arch. Gen. Psychiatry,* **2008**, *65*(2), 190-200. [http://dx.doi.org/10.1001/archgenpsychiatry.2007.26] [PMID: 18250257]

[161] Jochems, J.; Teegarden, S.L.; Chen, Y.; Boulden, J.; Challis, C.; Ben-Dor, G.A.; Kim, S.F.; Berton, O. Enhancement of stress resilience through histone deacetylase 6-mediated regulation of glucocorticoid receptor chaperone dynamics. *Biol. Psychiatry,* **2015**, *77*(4), 345-355. [http://dx.doi.org/10.1016/j.biopsych.2014.07.036] [PMID: 25442004]

[162] Meewisse, M.L.; Reitsma, J.B.; de Vries, G.J.; Gersons, B.P.; Olff, M. Cortisol and post-traumatic stress disorder in adults: systematic review and meta-analysis. *Br. J. Psychiatry,* **2007**, *191*, 387-392. [http://dx.doi.org/10.1192/bjp.bp.106.024877] [PMID: 17978317]

[163] Klengel, T.; Binder, E.B. Gene-environment interactions in major depressive disorder. *Can. J. Psychiatry,* **2013**, *58*(2), 76-83. [http://dx.doi.org/10.1177/070674371305800203] [PMID: 23442893]

[164] Juruena, M.F.; Cleare, A.J.; Papadopoulos, A.S.; Poon, L.; Lightman, S.; Pariante, C.M. Different responses to dexamethasone and prednisolone in the same depressed patients. *Psychopharmacology (Berl.),* **2006**, *189*(2), 225-235. [http://dx.doi.org/10.1007/s00213-006-0555-4] [PMID: 17016711]

[165] Guidotti, G.; Calabrese, F.; Anacker, C.; Racagni, G.; Pariante, C.M.; Riva, M.A. Glucocorticoid receptor and FKBP5 expression is altered following exposure to chronic stress: modulation by antidepressant treatment. *Neuropsychopharmacology,* **2013**, *38*(4), 616-627. [http://dx.doi.org/10.1038/npp.2012.225] [PMID: 23169346]

[166] George, S.A.; Rodriguez-Santiago, M.; Riley, J.; Rodriguez, E.; Liberzon, I. The effect of chronic phenytoin administration on single prolonged stress induced extinction retention deficits and glucocorticoid upregulation in the rat medial prefrontal cortex. *Psychopharmacology (Berl.),* **2015**, *232*(1), 47-56. [http://dx.doi.org/10.1007/s00213-014-3635-x] [PMID: 24879497]

[167] Boyle, M.P.; Brewer, J.A.; Funatsu, M.; Wozniak, D.F.; Tsien, J.Z.; Izumi, Y.; Muglia, L.J. Acquired deficit of forebrain glucocorticoid receptor produces depression-like changes in adrenal axis regulation and behavior. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA,* **2005**, *102*(2), 473-478. [http://dx.doi.org/10.1073/pnas.0406458102] [PMID: 15623560]

[168] Ridder, S.; Chourbaji, S.; Hellweg, R.; Urani, A.; Zacher, C.; Schmid, W.; Zink, M.; Hörtnagl, H.; Flor, H.; Henn, F.A.; Schütz, G.; Gass, P. Mice with genetically altered glucocorticoid receptor expression show altered sensitivity for stress-induced depressive reactions. *J. Neurosci.,* **2005**, *25*(26), 6243-6250. [http://dx.doi.org/10.1523/JNEUROSCI.0736-05.2005] [PMID: 15987954]

[169] Hartmann, J.; Wagner, K.V.; Liebl, C.; Scharf, S.H.; Wang, X.D.; Wolf, M.; Hausch, F.; Rein, T.; Schmidt, U.; Touma, C.; Cheung-Flynn, J.; Cox, M.B.; Smith, D.F.; Holsboer, F.; Müller, M.B.; Schmidt, M.V. The involvement of FK506-binding protein 51 (FKBP5) in the behavioral and neuroendocrine effects of chronic social defeat stress. *Neuropharmacology,* **2012**, *62*(1), 332-339. [http://dx.doi.org/10.1016/j.neuropharm.2011.07.041] [PMID: 21839098]

[170] O'Leary, J.C., III; Dharia, S.; Blair, L.J.; Brady, S.; Johnson, A.G.; Peters, M.; Cheung-Flynn, J.; Cox, M.B.; de Erausquin, G.; Weeber, E.J.; Jinwal, U.K.; Dickey, C.A. A new anti-depressive strategy for the elderly: ablation of FKBP5/FKBP51. *PLoS One,* **2011**, *6*(9), e24840. [http://dx.doi.org/10.1371/journal.pone.0024840] [PMID: 21935478]

[171] Murphy, P.J.; Morishima, Y.; Kovacs, J.J.; Yao, T.P.; Pratt, W.B. Regulation of the dynamics of hsp90 action on the glucocorticoid receptor by acetylation/deacetylation of the chaperone. *J. Biol. Chem.,* **2005**, *280*(40), 33792-33799. [http://dx.doi.org/10.1074/jbc.M506997200] [PMID: 16087666]

[172] Fukada, M.; Hanai, A.; Nakayama, A.; Suzuki, T.; Miyata, N.; Rodriguiz, R.M.; Wetsel, W.C.; Yao, T.P.; Kawaguchi, Y. Loss of deacetylation activity of Hdac6 affects emotional behavior in mice. *PLoS One,* **2012**, *7*(2), e30924. [http://dx.doi.org/10.1371/journal.pone.0030924] [PMID: 22328923]

[173] Espallergues, J.; Teegarden, S.L.; Veerakumar, A.; Boulden, J.; Challis, C.; Jochems, J.; Chan, M.; Petersen, T.; Deneris, E.; Matthias, P.; Hahn, C.G.; Lucki, I.; Beck, S.G.; Berton, O. HDAC6 regulates glucocorticoid receptor signaling in serotonin pathways with critical impact on stress resilience. *J. Neurosci.,* **2012**, *32*(13), 4400-4416. [http://dx.doi.org/10.1523/JNEUROSCI.5634-11.2012] [PMID: 22457490]

[174] ter Heegde, F.; De Rijk, R.H.; Vinkers, C.H. The brain mineralocorticoid receptor and stress resilience. *Psychoneuroendocrinology,* **2015**, *52*, 92-110. [http://dx.doi.org/10.1016/j.psyneuen.2014.10.022] [PMID: 25459896]

[175] Klok, M.D.; Giltay, E.J.; Van der Does, A.J.; Geleijnse, J.M.; Antypa, N.; Penninx, B.W.; de Geus, E.J.; Willemsen, G.; Boomsma, D.I.; van Leeuwen, N.; Zitman, F.G.; de Kloet, E.R.; DeRijk, R.H. A common and functional mineralocorticoid receptor haplotype enhances optimism and protects against depression in females. *Transl. Psychiatry,* **2011**, *1*, e62. [http://dx.doi.org/10.1038/tp.2011.59] [PMID: 22832354]

[176] Lai, M.; Horsburgh, K.; Bae, S.E.; Carter, R.N.; Stenvers, D.J.; Fowler, J.H.; Yau, J.L.; Gomez-Sanchez, C.E.; Holmes, M.C.; Kenyon, C.J.; Seckl, J.R.; Macleod, M.R. Forebrain mineralocorticoid receptor overexpression enhances memory, reduces anxiety and attenuates neuronal loss in cerebral ischaemia. *Eur. J. Neurosci.,* **2007**, *25*(6), 1832-1842. [http://dx.doi.org/10.1111/j.1460-9568.2007.05427.x] [PMID: 17432969]

[177] Mitra, R.; Ferguson, D.; Sapolsky, R.M. Mineralocorticoid receptor overexpression in basolateral amygdala reduces corticosterone secretion and anxiety. *Biol. Psychiatry,* **2009**, *66*(7), 686-690. [http://dx.doi.org/10.1016/j.biopsych.2009.04.016] [PMID: 19500777]

[178] de Kloet, E.R.; Otte, C.; Kumsta, R.; Kok, L.; Hillegers, M.H.; Hasselmann, H.; Kliegel, D.; Joëls, M. Stress and depression: a crucial role of the mineralocorticoid receptor. *J. Neuroendocrinol.,* **2016**, *28*(8)[http://dx.doi.org/10.1111/jne.12379] [PMID: 26970338]

[179] Dunlop, B.W.; Nemeroff, C.B. The role of dopamine in the pathophysiology of depression. *Arch. Gen. Psychiatry,* **2007**, *64*(3), 327-337. [http://dx.doi.org/10.1001/archpsyc.64.3.327] [PMID: 17339521]

[180] Krishnan, V.; Han, M.H.; Graham, D.L.; Berton, O.; Renthal, W.; Russo, S.J.; Laplant, Q.; Graham, A.; Lutter, M.; Lagace, D.C.; Ghose, S.; Reister, R.; Tannous, P.; Green, T.A.; Neve, R.L.; Chakravarty, S.; Kumar, A.; Eisch, A.J.; Self, D.W.; Lee, F.S.; Tamminga, C.A.; Cooper, D.C.; Gershenfeld, H.K.; Nestler, E.J. Molecular adaptations underlying susceptibility and resistance to social defeat in brain reward regions. *Cell,* **2007**, *131*(2), 391-404. [http://dx.doi.org/10.1016/j.cell.2007.09.018] [PMID: 17956738]

[181] Cao, J.L.; Covington, H.E., III; Friedman, A.K.; Wilkinson, M.B.; Walsh, J.J.; Cooper, D.C.; Nestler, E.J.; Han, M.H. Mesolimbic dopamine neurons in the brain reward circuit mediate susceptibility to social defeat and antidepressant action. *J. Neurosci.,* **2010**, *30*(49), 16453-16458. [http://dx.doi.org/10.1523/JNEUROSCI.3177-10.2010] [PMID: 21147984]

[182] Chaudhury, D.; Walsh, J.J.; Friedman, A.K.; Juarez, B.; Ku, S.M.; Koo, J.W.; Ferguson, D.; Tsai, H.C.; Pomeranz, L.; Christoffel, D.J.; Nectow, A.R.; Ekstrand, M.; Domingos, A.; Mazei-Robison, M.S.; Mouzon, E.; Lobo, M.K.; Neve, R.L.; Friedman, J.M.; Russo, S.J.; Deisseroth, K.; Nestler, E.J.; Han, M.H. Rapid regulation of depression-related behaviours by control of midbrain dopamine neurons. *Nature,* **2013**, *493*(7433), 532-536. [http://dx.doi.org/10.1038/nature11713] [PMID: 23235832]

[183] Tye, K.M.; Mirzabekov, J.J.; Warden, M.R.; Ferenczi, E.A.; Tsai, H.C.; Finkelstein, J.; Kim, S.Y.; Adhikari, A.; Thompson, K.R.; Andalman, A.S.; Gunaydin, L.A.; Witten, I.B.; Deisseroth, K. Dopamine neurons modulate neural encoding and expression of depression-related behaviour. *Nature,* **2013**, *493*(7433), 537-541. [http://dx.doi.org/10.1038/nature11740] [PMID: 23235822]

[184] Goddard, A.W.; Ball, S.G.; Martinez, J.; Robinson, M.J.; Yang, C.R.; Russell, J.M.; Shekhar, A. Current perspectives of the roles of the central norepinephrine system in anxiety and depression. *Depress. Anxiety,* **2010**, *27*(4), 339-350. [http://dx.doi.org/10.1002/da.20642] [PMID: 19960531]

[185] Isingrini, E.; Perret, L.; Rainer, Q.; Amilhon, B.; Guma, E.; Tanti, A.; Martin, G.; Robinson, J.; Moquin, L.; Marti, F.; Mechawar, N.; Williams, S.; Gratton, A.; Giros, B. Resilience to chronic stress is mediated by noradrenergic regulation of dopamine neurons. *Nat. Neurosci.,* **2016**, *19*(4), 560-563. [http://dx.doi.org/10.1038/nn.4245] [PMID: 26878672]

[186] Schramm, N.L.; McDonald, M.P.; Limbird, L.E. The alpha(2a)-adrenergic receptor plays a protective role in mouse behavioral models of depression and anxiety. *J. Neurosci.,* **2001**, *21*(13), 4875-4882. [PMID: 11425914]

[187] Sallinen, J.; Haapalinna, A.; MacDonald, E.; Viitamaa, T.; Lähdesmäki, J.; Rybnikova, E.; Pelto-Huikko, M.; Kobilka, B.K.; Scheinin, M. Genetic alteration of the alpha2-adrenoceptor subtype c in mice affects the development of behavioral despair and stress-induced increases in plasma corticosterone levels. *Mol. Psychiatry,* **1999**, *4*(5), 443-452. [http://dx.doi.org/10.1038/sj.mp.4000543] [PMID: 10523817]

[188] Saricicek, A.; Esterlis, I.; Maloney, K.H.; Mineur, Y.S.; Ruf, B.M.; Muralidharan, A.; Chen, J.I.; Cosgrove, K.P.; Kerestes, R.; Ghose, S.; Tamminga, C.A.; Pittman, B.; Bois, F.; Tamagnan, G.; Seibyl, J.; Picciotto, M.R.; Staley, J.K.; Bhagwagar, Z. Persistent β2*-nicotinic acetylcholinergic receptor dysfunction in major depressive disorder. *Am. J. Psychiatry,* **2012**, *169*(8), 851-859. [http://dx.doi.org/10.1176/appi.ajp.2012.11101546] [PMID: 22772158]

[189] Furey, M.L.; Drevets, W.C. Antidepressant efficacy of the antimuscarinic drug scopolamine: a randomized, placebo-controlled clinical trial. *Arch. Gen. Psychiatry,* **2006**, *63*(10), 1121-1129. [http://dx.doi.org/10.1001/archpsyc.63.10.1121] [PMID: 17015814]

[190] Mineur, Y.S.; Obayemi, A.; Wigestrand, M.B.; Fote, G.M.; Calarco, C.A.; Li, A.M.; Picciotto, M.R. Cholinergic signaling in the hippocampus regulates social stress resilience and anxiety- and depression-like behavior. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA,* **2013**, *110*(9), 3573-3578. [http://dx.doi.org/10.1073/pnas.1219731110] [PMID: 23401542]

[191] Caldarone, B.J.; Harrist, A.; Cleary, M.A.; Beech, R.D.; King, S.L.; Picciotto, M.R. High-affinity nicotinic acetylcholine receptors are required for antidepressant effects of amitriptyline on behavior and hippocampal cell proliferation. *Biol. Psychiatry,* **2004**, *56*(9), 657-664. [http://dx.doi.org/10.1016/j.biopsych.2004.08.010] [PMID: 15522249]

[192] Mineur, Y.S.; Fote, G.M.; Blakeman, S.; Cahuzac, E.L.; Newbold, S.A.; Picciotto, M.R. Multiple nicotinic acetylcholine receptor subtypes in the mouse amygdala regulate affective behaviors and response to social stress. *Neuropsychopharmacology,* **2016**, *41*(6), 1579-1587. [http://dx.doi.org/10.1038/npp.2015.316] [PMID: 26471256]

[193] Semenova, S.; Contet, C.; Roberts, A.J.; Markou, A. Mice lacking the β4 subunit of the nicotinic acetylcholine receptor show memory deficits, altered anxiety- and depression-like behavior, and diminished nicotine-induced analgesia. *Nicotine Tob. Res.,* **2012**, *14*(11), 1346-1355. [http://dx.doi.org/10.1093/ntr/nts107] [PMID: 22573727]

[194] Lenze, E.J.; Mulsant, B.H.; Shear, M.K.; Alexopoulos, G.S.; Frank, E.; Reynolds, C.F. III Comorbidity of depression and anxiety disorders in later life. *Depress. Anxiety,* **2001**, *14*(2), 86-93. [http://dx.doi.org/10.1002/da.1050] [PMID: 11668661]

[195] Forlani, M.; Morri, M.; Belvederi, M.M.; Bernabei, V.; Moretti, F.; Attili, T.; Biondini, A.; De Ronchi, D.; Atti, A.R. Anxiety symptoms in 74+ community-dwelling elderly: associations with physical morbidity, depression and alcohol consumption. *PLoS One,* **2014**, *9*(2), e89859. [http://dx.doi.org/10.1371/journal.pone.0089859] [PMID: 24587079]

[196] Sibille, E. Molecular aging of the brain, neuroplasticity, and vulnerability to depression and other brain-related disorders. *Dialogues Clin. Neurosci.,* **2013**, *15*(1), 53-65. [PMID: 23576889]

[197] Perna, G.; Iannone, G.; Alciati, A.; Caldirola, D. Are anxiety disorders associated with accelerated aging? A focus on neuroprogression. *Neural Plast.,* **2016**, *2016*, 8457612. [http://dx.doi.org/10.1155/2016/8457612] [PMID: 26881136]

[198] Wolkowitz, O.M.; Reus, V.I.; Mellon, S.H. Of sound mind and body: depression, disease, and accelerated aging. *Dialogues Clin. Neurosci.,* **2011**, *13*(1), 25-39. [PMID: 21485744]

[199] Evans, D.L.; Charney, D.S.; Lewis, L.; Golden, R.N.; Gorman, J.M.; Krishnan, K.R.; Nemeroff, C.B.; Bremner, J.D.; Carney, R.M.; Coyne, J.C.; Delong, M.R.; Frasure-Smith, N.; Glassman, A.H.; Gold, P.W.; Grant, I.; Gwyther, L.; Ironson, G.; Johnson,

R.L.; Kanner, A.M.; Katon, W.J.; Kaufmann, P.G.; Keefe, F.J.; Ketter, T.; Laughren, T.P.; Leserman, J.; Lyketsos, C.G.; McDonald, W.M.; McEwen, B.S.; Miller, A.H.; Musselman, D.; O'Connor, C.; Petitto, J.M.; Pollock, B.G.; Robinson, R.G.; Roose, S.P.; Rowland, J.; Sheline, Y.; Sheps, D.S.; Simon, G.; Spiegel, D.; Stunkard, A.; Sunderland, T.; Tibbits, P., Jr; Valvo, W.J. Mood disorders in the medically ill: scientific review and recommendations. *Biol. Psychiatry,* **2005**, *58*(3), 175-189. [http://dx.doi.org/10.1016/j.biopsych.2005.05.001] [PMID: 16084838]

[200] Wolkowitz, O.M.; Epel, E.S.; Reus, V.I.; Mellon, S.H. Depression gets old fast: do stress and depression accelerate cell aging? *Depress. Anxiety,* **2010**, *27*(4), 327-338. [http://dx.doi.org/10.1002/da.20686] [PMID: 20376837]

[201] Verhoeven, J.E.; Révész, D.; Epel, E.S.; Lin, J.; Wolkowitz, O.M.; Penninx, B.W. Major depressive disorder and accelerated cellular aging: results from a large psychiatric cohort study. *Mol. Psychiatry,* **2014**, *19*(8), 895-901. [http://dx.doi.org/10.1038/mp.2013.151] [PMID: 24217256]

[202] Miller, M.W.; Sadeh, N. Traumatic stress, oxidative stress and post-traumatic stress disorder: neurodegeneration and the accelerated-aging hypothesis. *Mol. Psychiatry,* **2014**, *19*(11), 1156-1162. [http://dx.doi.org/10.1038/mp.2014.111] [PMID: 25245500]

[203] Kochunov, P.; Glahn, D.C.; Rowland, L.M.; Olvera, R.L.; Winkler, A.; Yang, Y.H.; Sampath, H.; Carpenter, W.T.; Duggirala, R.; Curran, J.; Blangero, J.; Hong, L.E. Testing the hypothesis of accelerated cerebral white matter aging in schizophrenia and major depression. *Biol. Psychiatry,* **2013**, *73*(5), 482-491. [http://dx.doi.org/10.1016/j.biopsych.2012.10.002] [PMID: 23200529]

[204] Zhang, X.; Norton, J.; Carrière, I.; Ritchie, K.; Chaudieu, I.; Ancelin, M.L. Risk factors for late-onset generalized anxiety disorder: results from a 12-year prospective cohort (the ESPRIT study). *Transl. Psychiatry,* **2015**, *5*, e536. [http://dx.doi.org/10.1038/tp.2015.31] [PMID: 25826111]

[205] Maurya, P.K.; Noto, C.; Rizzo, L.B.; Rios, A.C.; Nunes, S.O.; Barbosa, D.S.; Sethi, S.; Zeni, M.; Mansur, R.B.; Maes, M.; Brietzke, E. The role of oxidative and nitrosative stress in accelerated aging and major depressive disorder. *Prog. Neuropsychopharmacol. Biol. Psychiatry,* **2016**, *65*, 134-144. [http://dx.doi.org/10.1016/j.pnpbp.2015.08.016] [PMID: 26348786]

[206] Belvederi Murri, M.; Pariante, C.; Mondelli, V.; Masotti, M.; Atti, A.R.; Mellacqua, Z.; Antonioli, M.; Ghio, L.; Menchetti, M.; Zanetidou, S.; Innamorati, M.; Amore, M. HPA axis and aging in depression: systematic review and meta-analysis. *Psychoneuroendocrinology,* **2014**, *41*, 46-62. [http://dx.doi.org/10.1016/j.psyneuen.2013.12.004] [PMID: 24495607]

[207] Yokoyama, K.; Yamada, T.; Mitani, H.; Yamada, S.; Pu, S.; Yamanashi, T.; Matsumura, H.; Nakagome, K.; Kaneko, K. Relationship between hypothalamic-pituitary-adrenal axis dysregulation and insulin resistance in elderly patients with depression. *Psychiatry Res.,* **2015**, *226*(2-3), 494-498. [http://dx.doi.org/10.1016/j.psychres.2015.01.026] [PMID: 25757913]

[208] Gupta, D.; Morley, J.E. Hypothalamic-pituitary-adrenal (HPA) axis and aging. *Compr. Physiol.,* **2014**, *4*(4), 1495-1510. [http://dx.doi.org/10.1002/cphy.c130049] [PMID: 25428852]

[209] Gaffey, A.E.; Bergeman, C.S.; Clark, L.A.; Wirth, M.M. Aging and the HPA axis: Stress and resilience in older adults. *Neurosci. Biobehav. Rev.,* **2016**, *68*, 928-945. [http://dx.doi.org/10.1016/j.neubiorev.2016.05.036] [PMID: 27377692]

[210] Simon, N.M.; Smoller, J.W.; McNamara, K.L.; Maser, R.S.; Zalta, A.K.; Pollack, M.H.; Nierenberg, A.A.; Fava, M.; Wong, K.K. Telomere shortening and mood disorders: preliminary support for a chronic stress model of accelerated aging. *Biol. Psychiatry,* **2006**, *60*(5), 432-435. [http://dx.doi.org/10.1016/j.biopsych.2006.02.004] [PMID: 16581033]

[211] Huffman, D.M.; Schafer, M.J.; LeBrasseur, N.K. Energetic interventions for healthspan and resiliency with aging. *Exp. Gerontol.,* **2016**, *86*, 73-83. [http://dx.doi.org/10.1016/j.exger.2016.05.012] [PMID: 27260561]

[212] Hamilton, K.L.; Miller, B.F. What is the evidence for stress resistance and slowed aging? *Exp. Gerontol.,* **2016**, *82*, 67-72. [http://dx.doi.org/10.1016/j.exger.2016.06.001] [PMID: 27268049]

[213] Miller, R.A. Cell stress and aging: new emphasis on multiplex resistance mechanisms. *J. Gerontol. A Biol. Sci. Med. Sci.,* **2009**, *64*(2), 179-182. [http://dx.doi.org/10.1093/gerona/gln072] [PMID: 19225033]

[214] Jeste, D.V.; Savla, G.N.; Thompson, W.K.; Vahia, I.V.; Glorioso, D.K.; Martin, A.S.; Palmer, B.W.; Rock, D.; Golshan, S.; Kraemer, H.C.; Depp, C.A. Association between older age and more successful aging: critical role of resilience and depression. *Am. J. Psychiatry,* **2013**, *170*(2), 188-196. [http://dx.doi.org/10.1176/appi.ajp.2012.12030386] [PMID: 23223917]

[215] MacLeod, S.; Musich, S.; Hawkins, K.; Alsgaard, K.; Wicker, E.R. The impact of resilience among older adults. *Geriatr. Nurs.,* **2016**, *37*(4), 266-272. [http://dx.doi.org/10.1016/j.gerinurse.2016.02.014] [PMID: 27055911]

[216] Hamarat, E.; Thompson, D.; Aysan, F.; Steele, D.; Matheny, K.; Simons, C. Age differences in coping resources and satisfaction with life among middle-aged, young-old, and oldest-old adults. *J. Genet. Psychol.,* **2002**, *163*(3), 360-367. [http://dx.doi.org/10.1080/00221320209598689] [PMID: 12230155]

[217] Nygren, B.; Aléx, L.; Jonsén, E.; Gustafson, Y.; Norberg, A.; Lundman, B. Resilience, sense of coherence, purpose in life and self-transcendence in relation to perceived physical and mental health among the oldest old. *Aging Ment. Health,* **2005**, *9*(4), 354-362. [http://dx.doi.org/10.1080/13607500114415] [PMID: 16019292]

[218] Gooding, P.A.; Hurst, A.; Johnson, J.; Tarrier, N. Psychological resilience in young and older adults. *Int. J. Geriatr. Psychiatry,* **2012**, *27*(3), 262-270. [http://dx.doi.org/10.1002/gps.2712] [PMID: 21472780]

[219] Ong, A.D.; Bergeman, C.S.; Boker, S.M. Resilience comes of age: defining features in later adulthood. *J. Pers.,* **2009**, *77*(6), 1777-1804. [http://dx.doi.org/10.1111/j.1467-6494.2009.00600.x] [PMID: 19807864]

[220] Epel, E.S.; Lithgow, G.J. Stress biology and aging mechanisms: toward understanding the deep connection between adaptation to stress and longevity. *J. Gerontol. A Biol. Sci. Med. Sci.,* **2014**, *69*(Suppl. 1), S10-S16. [http://dx.doi.org/10.1093/gerona/glu055] [PMID: 24833580]

[221] Cairney, J.; Krause, N. Negative life events and age-related decline in mastery: are older adults more vulnerable to the control-eroding effect of stress? *J. Gerontol. B Psychol. Sci. Soc. Sci.,* **2008**, *63*(3), S162-S170. [http://dx.doi.org/10.1093/geronb/63.3.S162] [PMID: 18559691]

[222] Osmanovic-Thunström, A.; Mossello, E.; Åkerstedt, T.; Fratiglioni, L.; Wang, H.X. Do levels of perceived stress increase with increasing age after age 65? A population-based study. *Age Ageing,* **2015**, *44*(5), 828-834. [http://dx.doi.org/10.1093/ageing/afv078] [PMID: 26187986]

[223] Novais, A.; Monteiro, S.; Roque, S.; Correia-Neves, M.; Sousa, N. How age, sex and genotype shape the stress response. *Neurobiol. Stress,* **2016**, *6*, 44-56. [http://dx.doi.org/10.1016/j.ynstr.2016.11.004] [PMID: 28229108]

[224] Flood, M.; Buckwalter, K.C. Recommendations for mental health care of older adults: Part 1--an overview of depression and anxiety. *J. Gerontol. Nurs.,* **2009**, *35*(2), 26-34. [http://dx.doi.org/10.3928/00989134-20090201-03] [PMID: 19263919]

[225] Parmentier, H.; García-Campayo, J.; Prieto, R. Comprehensive review of generalized anxiety disorder in primary care in Europe. *Curr. Med. Res. Opin.,* **2013**, *29*(4), 355-367. [http://dx.doi.org/10.1185/03007995.2013.770731] [PMID: 23356728]

[226] Zhang, X.; Norton, J.; Carrière, I.; Ritchie, K.; Chaudieu, I.; Ancelin, M.L. Generalized anxiety in community-dwelling elderly: Prevalence and clinical characteristics. *J. Affect. Disord.,* **2015**, *172*, 24-29. [http://dx.doi.org/10.1016/j.jad.2014.09.036] [PMID: 25451391]

[227] Bryant, C.; Jackson, H.; Ames, D. The prevalence of anxiety in older adults: methodological issues and a review of the literature. *J. Affect. Disord.,* **2008**, *109*(3), 233-250. [http://dx.doi.org/10.1016/j.jad.2007.11.008] [PMID: 18155775]

[228] Beekman, A.T.; Copeland, J.R.; Prince, M.J. Review of community prevalence of depression in later life. *Br. J. Psychiatry,* **1999**, *174*, 307-311. [http://dx.doi.org/10.1192/bjp.174.4.307] [PMID: 10533549]

[229] Djernes, J.K. Prevalence and predictors of depression in populations of elderly: a review. *Acta Psychiatr. Scand.,* **2006**, *113*(5), 372-387. [http://dx.doi.org/10.1111/j.1600-0447.2006.00770.x] [PMID: 16603029]

[230] Lenze, E.J.; Mulsant, B.H.; Shear, M.K.; Schulberg, H.C.; Dew, M.A.; Begley, A.E.; Pollock, B.G.; Reynolds, C.F., III Comorbid anxiety disorders in depressed elderly patients. *Am. J. Psychiatry,*

2000, *157*(5), 722-728. [http://dx.doi.org/10.1176/appi.ajp.157.5.722] [PMID: 10784464]

[231] Cummings, C.M.; Caporino, N.E.; Kendall, P.C. Comorbidity of anxiety and depression in children and adolescents: 20 years after. *Psychol. Bull.,* **2014**, *140*(3), 816-845. [http://dx.doi.org/10.1037/a0034733] [PMID: 24219155]

[232] Kimhi, S.; Hantman, S.; Goroshit, M.; Eshel, Y.; Zysberg, L. Elderly people coping with the aftermath of war: resilience versus vulnerability. *Am. J. Geriatr. Psychiatry,* **2012**, *20*(5), 391-401. [http://dx.doi.org/10.1097/JGP.0b013e31821106b3] [PMID: 21358387]

[233] Kessler, R.C.; Berglund, P.; Demler, O.; Jin, R.; Merikangas, K.R.; Walters, E.E. Lifetime prevalence and age-of-onset distributions of DSM-IV disorders in the National Comorbidity Survey Replication. *Arch. Gen. Psychiatry,* **2005**, *62*(6), 593-602. [http://dx.doi.org/10.1001/archpsyc.62.6.593] [PMID: 15939837]

[234] Mota, N.; Tsai, J.; Kirwin, P.D.; Harpaz-Rotem, I.; Krystal, J.H.; Southwick, S.M.; Pietrzak, R.H. Late-life exacerbation of PTSD symptoms in US veterans: results from the National Health and Resilience in Veterans Study. *J. Clin. Psychiatry,* **2016**, *77*(3), 348-354. [http://dx.doi.org/10.4088/JCP.15m10101] [PMID: 27046308]

[235] Kuwert, P.; Knaevelsrud, C.; Pietrzak, R.H. Loneliness among older veterans in the United States: results from the National Health and Resilience in Veterans Study. *Am. J. Geriatr. Psychiatry,* **2014**, *22*(6), 564-569. [http://dx.doi.org/10.1016/j.jagp.2013.02.013] [PMID: 23806682]

[236] Fanning, J.R.; Pietrzak, R.H. Suicidality among older male veterans in the United States: results from the National Health and Resilience in Veterans Study. *J. Psychiatr. Res.,* **2013**, *47*(11), 1766-1775. [http://dx.doi.org/10.1016/j.jpsychires.2013.07.015] [PMID: 23992768]

[237] Pietrzak, R.H.; Cook, J.M. Psychological resilience in older U.S. veterans: results from the national health and resilience in veterans study. *Depress. Anxiety,* **2013**, *30*(5), 432-443. [http://dx.doi.org/10.1002/da.22083] [PMID: 23468170]

[238] Association, A.P. *Stress in America.,* **2011**.http://www.apa.org/news/press/releases/stress/2011/generations.aspx

[239] Sánchez-Hidalgo, A.C.; Muñoz, M.F.; Herrera, A.J.; Espinosa-Oliva, A.M.; Stowell, R.; Ayala, A.; Machado, A.; Venero, J.L.; de Pablos, R.M. Chronic stress alters the expression levels of longevity-related genes in the rat hippocampus. *Neurochem. Int.,* **2016**, *97*, 181-192. [http://dx.doi.org/10.1016/j.neuint.2016.04.009] [PMID: 27120255]

[240] Koenig, J.I.; Walker, C.D.; Romeo, R.D.; Lupien, S.J. Effects of stress across the lifespan. *Stress,* **2011**, *14*(5), 475-480. [http://dx.doi.org/10.3109/10253890.2011.604879] [PMID: 21848435]

[241] Ulrich-Lai, Y.M.; Ryan, K.K. PPARγ and stress: implications for aging. *Exp. Gerontol.,* **2013**, *48*(7), 671-676. [http://dx.doi.org/10.1016/j.exger.2012.08.011] [PMID: 22960592]

[242] Khan, A.; McCormack, H.C.; Bolger, E.A.; McGreenery, C.E.; Vitaliano, G.; Polcari, A.; Teicher, M.H. Childhood maltreatment, depression, and suicidal ideation: critical importance of parental and peer emotional abuse during developmental sensitive periods in males and females. *Front. Psychiatry,* **2015**, *6*, 42. [http://dx.doi.org/10.3389/fpsyt.2015.00042] [PMID: 25870565]

[243] Gill, T.M.; Robison, J.T.; Tinetti, M.E. Predictors of recovery in activities of daily living among disabled older persons living in the community. *J. Gen. Intern. Med.,* **1997**, *12*(12), 757-762. [http://dx.doi.org/10.1046/j.1525-1497.1997.07161.x] [PMID: 9436895]

[244] Whitson, H.E.; Thielke, S.; Diehr, P.; O'Hare, A.M.; Chaves, P.H.; Zakai, N.A.; Arnold, A.; Chaudhry, S.; Ives, D.; Newman, A.B. Patterns and predictors of recovery from exhaustion in older adults: the cardiovascular health study. *J. Am. Geriatr. Soc.,* **2011**, *59*(2), 207-213. [http://dx.doi.org/10.1111/j.1532-5415.2010.03238.x] [PMID: 21288229]

[245] Zeng, Y.; Shen, K. Resilience significantly contributes to exceptional longevity. *Curr. Gerontol. Geriatr. Res.,* **2010**, *2010*, 525693. [http://dx.doi.org/10.1155/2010/525693] [PMID: 21197075]

[246] Harris, P.B. Another wrinkle in the debate about successful aging: the undervalued concept of resilience and the lived experience of dementia. *Int. J. Aging Hum. Dev.,* **2008**, *67*(1), 43-61. [http://dx.doi.org/10.2190/AG.67.1.c] [PMID: 18630190]

[247] Shalev, I.; Entringer, S.; Wadhwa, P.D.; Wolkowitz, O.M.; Puterman, E.; Lin, J.; Epel, E.S. Stress and telomere biology: a lifespan perspective. *Psychoneuroendocrinology,* **2013**, *38*(9), 1835-1842. [http://dx.doi.org/10.1016/j.psyneuen.2013.03.010] [PMID: 23639252]

[248] Starkweather, A.R.; Alhaeeri, A.A.; Montpetit, A.; Brumelle, J.; Filler, K.; Montpetit, M.; Mohanraj, L.; Lyon, D.E.; Jackson-Cook, C.K. An integrative review of factors associated with telomere length and implications for biobehavioral research. *Nurs. Res.,* **2014**, *63*(1), 36-50. [http://dx.doi.org/10.1097/NNR.0000000000000009] [PMID: 24335912]

[249] Price, L.H.; Kao, H.T.; Burgers, D.E.; Carpenter, L.L.; Tyrka, A.R. Telomeres and early-life stress: an overview. *Biol. Psychiatry,* **2013**, *73*(1), 15-23. [http://dx.doi.org/10.1016/j.biopsych.2012.06.025] [PMID: 22831981]

[250] Goldberg, E.L.; Romero-Aleshire, M.J.; Renkema, K.R.; Ventevogel, M.S.; Chew, W.M.; Uhrlaub, J.L.; Smithey, M.J.; Limesand, K.H.; Sempowski, G.D.; Brooks, H.L.; Nikolich-Žugich, J. Lifespan-extending caloric restriction or mTOR inhibition impair adaptive immunity of old mice by distinct mechanisms. *Aging Cell,* **2015**, *14*(1), 130-138. [http://dx.doi.org/10.1111/acel.12280] [PMID: 25424641]

[251] Zhang, L.; Hu, X.Z.; Li, X.; Li, H.; Smerin, S.; Russell, D.; Ursano, R.J. Telomere length - a cellular aging marker for depression and Post-traumatic Stress Disorder. *Med. Hypotheses,* **2014**, *83*(2), 182-185. [http://dx.doi.org/10.1016/j.mehy.2014.04.033] [PMID: 24875221]

[252] Epel, E. How "reversible" is telomeric aging? *Cancer Prev. Res. (Phila.),* **2012**, *5*(10), 1163-1168. [http://dx.doi.org/10.1158/1940-6207.CAPR-12-0370] [PMID: 23041472]

[253] Saretzki, G.; von Zglinicki, T. Telomerase as a promising target for human cancer gene therapy. *Drugs Today (Barc),* **2003**, *39*(4), 265-276. [http://dx.doi.org/10.1358/dot.2003.39.4.799403] [PMID: 12743642]

[254] O'Hara, R.; Marcus, P.; Thompson, W.K.; Flournoy, J.; Vahia, I.; Lin, X.; Hallmayer, J.; Depp, C.; Jeste, D.V. 5-HTTLPR short allele, resilience, and successful aging in older adults. *Am. J. Geriatr. Psychiatry,* **2012**, *20*(5), 452-456. [http://dx.doi.org/10.1097/JGP.0b013e31823e2d03] [PMID: 22233775]

[255] Sabbagh, J.J.; O'Leary, J.C., III; Blair, L.J.; Klengel, T.; Nordhues, B.A.; Fontaine, S.N.; Binder, E.B.; Dickey, C.A. Age-associated epigenetic upregulation of the FKBP5 gene selectively impairs stress resiliency. *PLoS One,* **2014**, *9*(9), e107241. [http://dx.doi.org/10.1371/journal.pone.0107241] [PMID: 25191701]

[256] Berdasco, M.; Esteller, M. Hot topics in epigenetic mechanisms of aging: 2011. *Aging Cell,* **2012**, *11*(2), 181-186. [http://dx.doi.org/10.1111/j.1474-9726.2012.00806.x] [PMID: 22321768]

[257] Adams, P.D.; Jasper, H.; Rudolph, K.L. Aging-induced stem cell mutations as drivers for disease and cancer. *Cell Stem Cell,* **2015**, *16*(6), 601-612. [http://dx.doi.org/10.1016/j.stem.2015.05.002] [PMID: 26046760]

[258] Babenko, O.; Kovalchuk, I.; Metz, G.A. Stress-induced perinatal and transgenerational epigenetic programming of brain development and mental health. *Neurosci. Biobehav. Rev.,* **2015**, *48*, 70-91. [http://dx.doi.org/10.1016/j.neubiorev.2014.11.013] [PMID: 25464029]

[259] López-Otín, C.; Galluzzi, L.; Freije, J.M.; Madeo, F.; Kroemer, G. Metabolic control of longevity. *Cell,* **2016**, *166*(4), 802-821. [http://dx.doi.org/10.1016/j.cell.2016.07.031] [PMID: 27518560]

[260] Cole, J.J.; Robertson, N.A.; Rather, M.I.; Thomson, J.P.; McBryan, T.; Sproul, D.; Wang, T.; Brock, C.; Clark, W.; Ideker, T.; Meehan, R.R.; Miller, R.A.; Brown-Borg, H.M.; Adams, P.D. Diverse interventions that extend mouse lifespan suppress shared age-associated epigenetic changes at critical gene regulatory regions. *Genome Biol.,* **2017**, *18*(1), 58. [http://dx.doi.org/10.1186/s13059-017-1185-3] [PMID: 28351383]

[261] Dias, C.; Feng, J.; Sun, H.; Shao, N.Y.; Mazei-Robison, M.S.; Damez-Werno, D.; Scobie, K.; Bagot, R.; LaBonté, B.; Ribeiro, E.; Liu, X.; Kennedy, P.; Vialou, V.; Ferguson, D.; Peña, C.; Calipari, E.S.; Koo, J.W.; Mouzon, E.; Ghose, S.; Tamminga, C.; Neve, R.; Shen, L.; Nestler, E.J. β-catenin mediates stress resilience through Dicer1/microRNA regulation. *Nature,* **2014**, *516*(7529), 51-55. [PMID: 25383518]

[262] Rao, J.A.; Kassel, M.T.; Weldon, A.L.; Avery, E.T.; Briceno, E.M.; Mann, M.; Cornett, B.; Kales, H.C.; Zubieta, J.K.; Welsh, R.C.; Langenecker, S.A.; Weisenbach, S.L. The double burden of age and major depressive disorder on the cognitive control network. *Psychol. Aging,* **2015**, *30*(2), 475-485. [http://dx.doi.org/10.1037/pag0000027] [PMID: 26030776]

[263] Shimada, H.; Park, H.; Makizako, H.; Doi, T.; Lee, S.; Suzuki, T. Depressive symptoms and cognitive performance in older adults. *J. Psychiatr. Res.,* **2014**, *57*, 149-156. [http://dx.doi.org/10.1016/j.jpsychires.2014.06.004] [PMID: 25023083]

[264] Diniz, B.S.; Sibille, E.; Ding, Y.; Tseng, G.; Aizenstein, H.J.; Lotrich, F.; Becker, J.T.; Lopez, O.L.; Lotze, M.T.; Klunk, W.E.; Reynolds, C.F.; Butters, M.A. Plasma biosignature and brain pathology related to persistent cognitive impairment in late-life depression. *Mol. Psychiatry,* **2015**, *20*(5), 594-601. [http://dx.doi.org/10.1038/mp.2014.76] [PMID: 25092249]

[265] Wilkins, C.H.; Mathews, J.; Sheline, Y.I. Late life depression with cognitive impairment: evaluation and treatment. *Clin. Interv. Aging,* **2009**, *4*, 51-57. [PMID: 19503765]

[266] Nozaki, S.; Yoshimura, K.; Mimura, M. Depression and dementia: perspectives from clinical studies. *Brain Nerve,* **2012**, *64*(12), 1387-1397. [PMID: 23209065]

[267] Oh, H.; Madison, C.; Villeneuve, S.; Markley, C.; Jagust, W.J. Association of gray matter atrophy with age, β-amyloid, and cognition in aging. *Cereb. Cortex,* **2014**, *24*(6), 1609-1618. [http://dx.doi.org/10.1093/cercor/bht017] [PMID: 23389995]

[268] de Groot, M.; Ikram, M.A.; Akoudad, S.; Krestin, G.P.; Hofman, A.; van der Lugt, A.; Niessen, W.J.; Vernooij, M.W. Tract-specific white matter degeneration in aging: the Rotterdam Study. *Alzheimers Dement.,* **2015**, *11*(3), 321-330. [http://dx.doi.org/10.1016/j.jalz.2014.06.011] [PMID: 25217294]

[269] Vu, N.Q.; Aizenstein, H.J. Depression in the elderly: brain correlates, neuropsychological findings, and role of vascular lesion load. *Curr. Opin. Neurol.,* **2013**, *26*(6), 656-661. [http://dx.doi.org/10.1097/WCO.0000000000000028] [PMID: 24184971]

[270] Bettio, L.E.; Rajendran, L.; Gil-Mohapel, J. The effects of aging in the hippocampus and cognitive decline. *Neurosci. Biobehav. Rev.,* **2017**, *79*, 66-86. [http://dx.doi.org/10.1016/j.neubiorev.2017.04.030] [PMID: 28476525]

[271] Elbejjani, M.; Fuhrer, R.; Abrahamowicz, M.; Mazoyer, B.; Crivello, F.; Tzourio, C.; Dufouil, C. Depression, depressive symptoms, and rate of hippocampal atrophy in a longitudinal cohort of older men and women. *Psychol. Med.,* **2015**, *45*(9), 1931-1944. [http://dx.doi.org/10.1017/S0033291714003055] [PMID: 25896060]

[272] Boldrini, M.; Hen, R.; Underwood, M.D.; Rosoklija, G.B.; Dwork, A.J.; Mann, J.J.; Arango, V. Hippocampal angiogenesis and progenitor cell proliferation are increased with antidepressant use in major depression. *Biol. Psychiatry,* **2012**, *72*(7), 562-571. [http://dx.doi.org/10.1016/j.biopsych.2012.04.024] [PMID: 22652019]

[273] Boldrini, M.; Santiago, A.N.; Hen, R.; Dwork, A.J.; Rosoklija, G.B.; Tamir, H.; Arango, V.; John, M.J. Hippocampal granule neuron number and dentate gyrus volume in antidepressant-treated and untreated major depression. *Neuropsychopharmacology,* **2013**, *38*(6), 1068-1077. [http://dx.doi.org/10.1038/npp.2013.5] [PMID: 23303074]

[274] Nashiro, K.; Sakaki, M.; Mather, M. Age differences in brain activity during emotion processing: reflections of age-related decline or increased emotion regulation? *Gerontology,* **2012**, *58*(2), 156-163. [http://dx.doi.org/10.1159/000328465] [PMID: 21691052]

[275] Tadayonnejad, R.; Ajilore, O. Brain network dysfunction in late-life depression: a literature review. *J. Geriatr. Psychiatry Neurol.,* **2014**, *27*(1), 5-12. [http://dx.doi.org/10.1177/0891988713516539] [PMID: 24381233]

[276] Brydges, N.M.; Wood, E.R.; Holmes, M.C.; Hall, J. Prepubertal stress and hippocampal function: sex-specific effects. *Hippocampus,* **2014**, *24*(6), 684-692. [http://dx.doi.org/10.1002/hipo.22259] [PMID: 24677338]

[277] Ege, M.A.; Messias, E.; Thapa, P.B.; Krain, L.P. Adverse childhood experiences and geriatric depression: results from the 2010 BRFSS. *Am. J. Geriatr. Psychiatry,* **2015**, *23*(1), 110-114. [http://dx.doi.org/10.1016/j.jagp.2014.08.014] [PMID: 25306195]

[278] Schalinski, I.; Teicher, M.H.; Nischk, D.; Hinderer, E.; Müller, O.; Rockstroh, B. Type and timing of adverse childhood experiences differentially affect severity of PTSD, dissociative and depressive symptoms in adult inpatients. *BMC Psychiatry,* **2016**, *16*, 295. [http://dx.doi.org/10.1186/s12888-016-1004-5] [PMID: 27543114]

[279] Danese, A.; McEwen, B.S. Adverse childhood experiences, allostasis, allostatic load, and age-related disease. *Physiol. Behav.,* **2012**, *106*(1), 29-39. [http://dx.doi.org/10.1016/j.physbeh.2011.08.019] [PMID: 21888923]

[280] Cole, S.W. Social regulation of human gene expression: mechanisms and implications for public health. *Am. J. Public Health,* **2013**, *103*(Suppl. 1), S84-S92. [http://dx.doi.org/10.2105/AJPH.2012.301183] [PMID: 23927506]

[281] Juruena, M.F. Early-life stress and HPA axis trigger recurrent adulthood depression. *Epilepsy Behav.,* **2014**, *38*, 148-159. [http://dx.doi.org/10.1016/j.yebeh.2013.10.020] [PMID: 24269030]

[282] Tyrka, A.R.; Price, L.H.; Kao, H.T.; Porton, B.; Marsella, S.A.; Carpenter, L.L. Childhood maltreatment and telomere shortening: preliminary support for an effect of early stress on cellular aging. *Biol. Psychiatry,* **2010**, *67*(6), 531-534. [http://dx.doi.org/10.1016/j.biopsych.2009.08.014] [PMID: 19828140]

[283] Gingrich, J.A.; Ansorge, M.S.; Merker, R.; Weisstaub, N.; Zhou, M. New lessons from knockout mice: The role of serotonin during development and its possible contribution to the origins of neuropsychiatric disorders. *CNS Spectr.,* **2003**, *8*(8), 572-577. [http://dx.doi.org/10.1017/S1092852900018848] [PMID: 12907920]

[284] Ansorge, M.S.; Zhou, M.; Lira, A.; Hen, R.; Gingrich, J.A. Early-life blockade of the 5-HT transporter alters emotional behavior in adult mice. *Science,* **2004**, *306*(5697), 879-881. [http://dx.doi.org/10.1126/science.1101678] [PMID: 15514160]

[285] Austad, S.N.; Bartke, A. Sex Differences in Longevity and in Responses to Anti-Aging Interventions: A Mini-Review. *Gerontology,* **2015**, *62*(1), 40-46. [http://dx.doi.org/10.1159/000381472] [PMID: 25968226]

[286] Barrett, E.L.; Richardson, D.S. Sex differences in telomeres and lifespan. *Aging Cell,* **2011**, *10*(6), 913-921. [http://dx.doi.org/10.1111/j.1474-9726.2011.00741.x] [PMID: 21902801]

[287] Scheinost, D.; Finn, E.S.; Tokoglu, F.; Shen, X.; Papademetris, X.; Hampson, M.; Constable, R.T. Sex differences in normal age trajectories of functional brain networks. *Hum. Brain Mapp.,* **2015**, *36*(4), 1524-1535. [http://dx.doi.org/10.1002/hbm.22720] [PMID: 25523617]

[288] Murtagh, K.N.; Hubert, H.B. Gender differences in physical disability among an elderly cohort. *Am. J. Public Health,* **2004**, *94*(8), 1406-1411. [http://dx.doi.org/10.2105/AJPH.94.8.1406] [PMID: 15284051]

[289] Dalla, C.; Antoniou, K.; Drossopoulou, G.; Xagoraris, M.; Kokras, N.; Sfikakis, A.; Papadopoulou-Daifoti, Z. Chronic mild stress impact: are females more vulnerable? *Neuroscience,* **2005**, *135*(3), 703-714. [http://dx.doi.org/10.1016/j.neuroscience.2005.06.068] [PMID: 16125862]

[290] Bale, T.L.; Epperson, C.N. Sex differences and stress across the lifespan. *Nat. Neurosci.,* **2015**, *18*(10), 1413-1420. [http://dx.doi.org/10.1038/nn.4112] [PMID: 26404716]

[291] Breslau, N.; Wilcox, H.C.; Storr, C.L.; Lucia, V.C.; Anthony, J.C. Trauma exposure and posttraumatic stress disorder: a study of youths in urban America. *J. Urban Health,* **2004**, *81*(4), 530-544. [http://dx.doi.org/10.1093/jurban/jth138] [PMID: 15466836]

[292] Wang, Q.; Joels, M.; Swaab, D.F.; Lucassen, P.J. Hippocampal GR expression is increased in elderly depressed females. *Neuropharmacology,* **2012**, *62*(1), 527-533. [http://dx.doi.org/10.1016/j.neuropharm.2011.09.014] [PMID: 21945289]

[293] Qureshi, I.A.; Mehler, M.F. Genetic and epigenetic underpinnings of sex differences in the brain and in neurological and psychiatric disease susceptibility. *Prog. Brain Res.,* **2010**, *186*, 77-95. [http://dx.doi.org/10.1016/B978-0-444-53630-3.00006-3] [PMID: 21094887]

[294] Siegel, A.M.; Mathews, S.B. Diagnosis and Treatment of Anxiety in the Aging Woman. *Curr. Psychiatry Rep.,* **2015**, *17*(12), 93. [http://dx.doi.org/10.1007/s11920-015-0636-3] [PMID: 26458819]

[295] Bromberger, J.T.; Assmann, S.F.; Avis, N.E.; Schocken, M.; Kravitz, H.M.; Cordal, A. Persistent mood symptoms in a multiethnic community cohort of pre- and perimenopausal women. *Am. J. Epidemiol.,* **2003**, *158*(4), 347-356. [http://dx.doi.org/10.1093/aje/kwg155] [PMID: 12915500]

[296] Sagsöz, N.; Oguztürk, O.; Bayram, M.; Kamaci, M. Anxiety and depression before and after the menopause. *Arch. Gynecol. Obstet.,* **2001**, *264*(4), 199-202. [http://dx.doi.org/10.1007/s004040000108] [PMID: 11205708]

[297] Woods, N.F.; Mariella, A.; Mitchell, E.S. Depressed mood symptoms during the menopausal transition: observations from the Seattle Midlife Women's Health Study. *Climacteric,* **2006**, *9*(3), 195-203. [http://dx.doi.org/10.1080/13697130600730663] [PMID: 16766433]

[298] Freeman, E.W.; Sammel, M.D.; Liu, L.; Gracia, C.R.; Nelson, D.B.; Hollander, L. Hormones and menopausal status as predictors

of depression in women in transition to menopause. *Arch. Gen. Psychiatry,* **2004**, *61*(1), 62-70. [http://dx.doi.org/10.1001/archpsyc.61.1.62] [PMID: 14706945]

[299] Nemeroff, C.B. Stress, menopause and vulnerability for psychiatric illness. *Expert Rev. Neurother.,* **2007**, *7*(11)(Suppl.), S11-S13. [http://dx.doi.org/10.1586/14737175.7.11s.S11] [PMID: 18039060]

[300] Freeman, E.W.; Sammel, M.D.; Boorman, D.W.; Zhang, R. Longitudinal pattern of depressive symptoms around natural menopause. *JAMA Psychiatry,* **2014**, *71*(1), 36-43. [http://dx.doi.org/10.1001/jamapsychiatry.2013.2819] [PMID: 24227182]

[301] Mebes, I.; Graf, M.; Kellner, M.; Keck, C.; Segerer, S.E. High estradiol levels during postmenopause - pitfalls in laboratory analysis. *Geburtshilfe Frauenheilkd.,* **2015**, *75*(9), 941-944. [http://dx.doi.org/10.1055/s-0035-1557815] [PMID: 26500371]

[302] Dumas, J.A.; Albert, K.M.; Naylor, M.R.; Sites, C.K.; Benkelfat, C.; Newhouse, P.A. The effects of age and estrogen on stress responsivity in older women. *Am. J. Geriatr. Psychiatry,* **2012**, *20*(9), 734-743. [http://dx.doi.org/10.1097/JGP.0b013e31825c0a14] [PMID: 22832417]

[303] Newhouse, P.A.; Dumas, J.; Wilkins, H.; Coderre, E.; Sites, C.K.; Naylor, M.; Benkelfat, C.; Young, S.N. Estrogen treatment impairs cognitive performance after psychosocial stress and monoamine depletion in postmenopausal women. *Menopause,* **2010**, *17*(4), 860-873. [http://dx.doi.org/10.1097/gme.0b013e3181e15df4] [PMID: 20616673]

[304] Albert, K.; Pruessner, J.; Newhouse, P. Estradiol levels modulate brain activity and negative responses to psychosocial stress across the menstrual cycle. *Psychoneuroendocrinology,* **2015**, *59*, 14-24. [http://dx.doi.org/10.1016/j.psyneuen.2015.04.022] [PMID: 26123902]

[305] Kelly, S.D.; Harrell, C.S.; Neigh, G.N. Chronic stress modulates regional cerebral glucose transporter expression in an age-specific and sexually-dimorphic manner. *Physiol. Behav.,* **2014**, *126*, 39-49. [http://dx.doi.org/10.1016/j.physbeh.2013.12.002] [PMID: 24382486]

[306] Newman, R. APA's Resilience Initiative. *Prof. Psychol. Res. Pr.,* **2005**, *36*(3), 227-229. [http://dx.doi.org/10.1037/0735-7028.36.3.227]

[307] Shors, T.J.; Olson, R.L.; Bates, M.E.; Selby, E.A.; Alderman, B.L. Mental and physical (MAP) Training: a neurogenesis-inspired intervention that enhances health in humans. *Neurobiol. Learn. Mem.,* **2014**, *115*, 3-9. [http://dx.doi.org/10.1016/j.nlm.2014.08.012] [PMID: 25219804]

[308] Laura Aiuppa Denning, Marc Meisnere, and Kenneth E. Warner. Committee on the Assessment of Resiliency and Prevention Programs for Mental and Behavioral Health in Service Members and Their Families; Board on the Health of Select Populations; Institute of Medicin. *Preventing Psychological Disorders in Service Members and Their Families: An Assessment of Programs.,* **2014**.

[309] Leppin, A.L.; Bora, P.R.; Tilburt, J.C.; Gionfriddo, M.R.; Zeballos-Palacios, C.; Dulohery, M.M.; Sood, A.; Erwin, P.J.; Brito, J.P.; Boehmer, K.R.; Montori, V.M. The efficacy of resiliency training programs: a systematic review and meta-analysis of randomized trials. *PLoS One,* **2014**, *9*(10), e111420. [http://dx.doi.org/10.1371/journal.pone.0111420] [PMID: 25347713]

[310] Loving, R.T.; Kripke, D.F.; Elliott, J.A.; Knickerbocker, N.C.; Grandner, M.A. Bright light treatment of depression for older adults [ISRCTN55452501]. *BMC Psychiatry,* **2005**, *5*, 41. [ISRCTN55452501]. [http://dx.doi.org/10.1186/1471-244X-5-41] [PMID: 16283925]

[311] Lieverse, R.; Van Someren, E.J.; Nielen, M.M.; Uitdehaag, B.M.; Smit, J.H.; Hoogendijk, W.J. Bright light treatment in elderly patients with nonseasonal major depressive disorder: a randomized placebo-controlled trial. *Arch. Gen. Psychiatry,* **2011**, *68*(1), 61-70. [http://dx.doi.org/10.1001/archgenpsychiatry.2010.183] [PMID: 21199966]

[312] Lapierre, S.; Erlangsen, A.; Waern, M.; De Leo, D.; Oyama, H.; Scocco, P.; Gallo, J.; Szanto, K.; Conwell, Y.; Draper, B.; Quinnett, P. A systematic review of elderly suicide prevention programs. *Crisis,* **2011**, *32*(2), 88-98. [http://dx.doi.org/10.1027/0227-5910/a000076] [PMID: 21602163]

[313] Smith, J.L.; Hollinger-Smith, L. Savoring, resilience, and psychological well-being in older adults. *Aging Ment. Health,* **2015**, *19*(3), 192-200. [http://dx.doi.org/10.1080/13607863.2014.986647] [PMID: 25471325]

[314] Lyubomirsky, S.; Sousa, L.; Dickerhoof, R. The costs and benefits of writing, talking, and thinking about life's triumphs and defeats. *J. Pers. Soc. Psychol.,* **2006**, *90*(4), 692-708. [http://dx.doi.org/10.1037/0022-3514.90.4.692] [PMID: 16649864]

[315] Bretherton, S.J.; McLean, L.A. Interrelations of stress, optimism and control in older people's psychological adjustment. *Australas. J. Ageing,* **2015**, *34*(2), 103-108. [http://dx.doi.org/10.1111/ajag.12138] [PMID: 24629026]

[316] Mancini, A.D.; Bonanno, G.A. Resilience in the face of potential trauma: clinical practices and illustrations. *J. Clin. Psychol.,* **2006**, *62*(8), 971-985. [http://dx.doi.org/10.1002/jclp.20283] [PMID: 16700017]

[317] Mancini, A.D.; Bonanno, G.A. Predictors and parameters of resilience to loss: toward an individual differences model. *J. Pers.,* **2009**, *77*(6), 1805-1832. [http://dx.doi.org/10.1111/j.1467-6494.2009.00601.x] [PMID: 19807863]

[318] Yoshikawa, E.; Nishi, D.; Matsuoka, Y.J. Association between regular physical exercise and depressive symptoms mediated through social support and resilience in Japanese company workers: a cross-sectional study. *BMC Public Health,* **2016**, *16*, 553. [http://dx.doi.org/10.1186/s12889-016-3251-2] [PMID: 27405459]

[319] Deuster, P.A.; Silverman, M.N. Physical fitness: a pathway to health and resilience. *U.S. Army Med. Dep. J.,* **2013**, 24-35. [PMID: 24146240]

[320] Cho, M.S. Verification of the mediation effect of recovery resilience according to the relation between elderly users' participation in exercise rehabilitation program and their successful aging. *J. Exerc. Rehabil.,* **2014**, *10*(5), 319-325. [http://dx.doi.org/10.12965/jer.140164] [PMID: 25426471]

[321] Fleg, J.L. Aerobic exercise in the elderly: a key to successful aging. *Discov. Med.,* **2012**, *13*(70), 223-228. [PMID: 22463798]

[322] Resnick, B.A.; Inguito, P.L. The Resilience Scale: psychometric properties and clinical applicability in older adults. *Arch. Psychiatr. Nurs.,* **2011**, *25*(1), 11-20. [http://dx.doi.org/10.1016/j.apnu.2010.05.001] [PMID: 21251597]

[323] Rantanen, T.; Masaki, K.; He, Q.; Ross, G.W.; Willcox, B.J.; White, L. Midlife muscle strength and human longevity up to age 100 years: a 44-year prospective study among a decedent cohort. *Age (Dordr.),* **2012**, *34*(3), 563-570. [http://dx.doi.org/10.1007/s11357-011-9256-y] [PMID: 21541735]

[324] Roh, J.; Rhee, J.; Chaudhari, V.; Rosenzweig, A. The role of exercise in cardiac aging: from physiology to molecular mechanisms. *Circ. Res.,* **2016**, *118*(2), 279-295. [http://dx.doi.org/10.1161/CIRCRESAHA.115.305250] [PMID: 26838314]

[325] Saxena, S.; Jané-Llopis, E.; Hosman, C. Prevention of mental and behavioural disorders: implications for policy and practice. *World Psychiatry,* **2006**, *5*(1), 5-14. [PMID: 16757984]

[326] Harmell, A.L.; Jeste, D.; Depp, C. Strategies for successful aging: a research update. *Curr. Psychiatry Rep.,* **2014**, *16*(10), 476. [http://dx.doi.org/10.1007/s11920-014-0476-6] [PMID: 25135776]

[327] Garatachea, N.; Pareja-Galeano, H.; Sanchis-Gomar, F.; Santos-Lozano, A.; Fiuza-Luces, C.; Morán, M.; Emanuele, E.; Joyner, M.J.; Lucia, A. Exercise attenuates the major hallmarks of aging. *Rejuvenation Res.,* **2015**, *18*(1), 57-89. [http://dx.doi.org/10.1089/rej.2014.1623] [PMID: 25431878]

[328] Sallam, N.; Laher, I. Exercise modulates oxidative stress and inflammation in aging and cardiovascular diseases. *Oxid. Med. Cell. Longev.,* **2016**, *2016*, 7239639. [http://dx.doi.org/10.1155/2016/7239639] [PMID: 26823952]

[329] Mercken, E.M.; Carboneau, B.A.; Krzysik-Walker, S.M.; de Cabo, R. Of mice and men: the benefits of caloric restriction, exercise, and mimetics. *Ageing Res. Rev.,* **2012**, *11*(3), 390-398. [http://dx.doi.org/10.1016/j.arr.2011.11.005] [PMID: 22210414]

[330] Weindruch, R. The retardation of aging by caloric restriction: studies in rodents and primates. *Toxicol. Pathol.,* **1996**, *24*(6), 742-745. [http://dx.doi.org/10.1177/019262339602400618] [PMID: 8994305]

[331] Masoro, E.J. Dietary restriction and aging. *J. Am. Geriatr. Soc.,* **1993**, *41*(9), 994-999. [http://dx.doi.org/10.1111/j.1532-5415.1993.tb06767.x] [PMID: 8409187]

[332] Barger, J.L.; Walford, R.L.; Weindruch, R. The retardation of aging by caloric restriction: its significance in the transgenic era. *Exp. Gerontol.,* **2003**, *38*(11-12), 1343-1351. [http://dx.doi.org/10.1016/j.exger.2003.10.017] [PMID: 14698815]

[333] Hauck, S.J.; Aaron, J.M.; Wright, C.; Kopchick, J.J.; Bartke, A. Antioxidant enzymes, free-radical damage, and response to paraquat in liver and kidney of long-living growth hormone receptor/binding protein gene-disrupted mice. *Horm. Metab. Res.,* **2002**,

34(9), 481-486. [http://dx.doi.org/10.1055/s-2002-34787] [PMID: 12384824]

[334] Harper, J.M.; Salmon, A.B.; Chang, Y.; Bonkowski, M.; Bartke, A.; Miller, R.A. Stress resistance and aging: influence of genes and nutrition. *Mech. Ageing Dev.,* **2006**, *127*(8), 687-694. [http://dx.doi.org/10.1016/j.mad.2006.04.002] [PMID: 16713617]

[335] Yu, B.P. Why calorie restriction would work for human longevity. *Biogerontology,* **2006**, *7*(3), 179-182. [http://dx.doi.org/10.1007/s10522-006-9009-y] [PMID: 16676136]

[336] Hussin, N.M.; Shahar, S.; Teng, N.I.; Ngah, W.Z.; Das, S.K. Efficacy of fasting and calorie restriction (FCR) on mood and depression among ageing men. *J. Nutr. Health Aging,* **2013**, *17*(8), 674-680. [http://dx.doi.org/10.1007/s12603-013-0344-9] [PMID: 24097021]

[337] Teng, N.I.; Shahar, S.; Manaf, Z.A.; Das, S.K.; Taha, C.S.; Ngah, W.Z. Efficacy of fasting calorie restriction on quality of life among aging men. *Physiol. Behav.,* **2011**, *104*(5), 1059-1064. [http://dx.doi.org/10.1016/j.physbeh.2011.07.007] [PMID: 21781980]

[338] Rea, S.L.; Wu, D.; Cypser, J.R.; Vaupel, J.W.; Johnson, T.E. A stress-sensitive reporter predicts longevity in isogenic populations of *Caenorhabditis elegans*. *Nat. Genet.,* **2005**, *37*(8), 894-898. [http://dx.doi.org/10.1038/ng1608] [PMID: 16041374]

[339] Harper, J.M.; Salmon, A.B.; Leiser, S.F.; Galecki, A.T.; Miller, R.A. Skin-derived fibroblasts from long-lived species are resistant to some, but not all, lethal stresses and to the mitochondrial inhibitor rotenone. *Aging Cell,* **2007**, *6*(1), 1-13. [http://dx.doi.org/10.1111/j.1474-9726.2006.00255.x] [PMID: 17156084]

[340] Kapahi, P.; Boulton, M.E.; Kirkwood, T.B. Positive correlation between mammalian life span and cellular resistance to stress. *Free Radic. Biol. Med.,* **1999**, *26*(5-6), 495-500. [http://dx.doi.org/10.1016/S0891-5849(98)00323-2] [PMID: 10218637]

[341] Anisimov, V.N.; Zabezhinski, M.A.; Popovich, I.G.; Piskunova, T.S.; Semenchenko, A.V.; Tyndyk, M.L.; Yurova, M.N.; Rosenfeld, S.V.; Blagosklonny, M.V. Rapamycin increases lifespan and inhibits spontaneous tumorigenesis in inbred female mice. *Cell Cycle,* **2011**, *10*(24), 4230-4236. [http://dx.doi.org/10.4161/cc.10.24.18486] [PMID: 22107964]

[342] Spong, A.; Bartke, A. Rapamycin slows aging in mice. *Cell Cycle,* **2012**, *11*(5), 845. [http://dx.doi.org/10.4161/cc.11.5.19607] [PMID: 22356747]

[343] Hurez, V.; Dao, V.; Liu, A.; Pandeswara, S.; Gelfond, J.; Sun, L.; Bergman, M.; Orihuela, C.J.; Galvan, V.; Padrón, Á.; Drerup, J.; Liu, Y.; Hasty, P.; Sharp, Z.D.; Curiel, T.J. Chronic mTOR inhibition in mice with rapamycin alters T, B, myeloid, and innate lymphoid cells and gut flora and prolongs life of immune-deficient mice. *Aging Cell,* **2015**, *14*(6), 945-956. [http://dx.doi.org/10.1111/acel.12380] [PMID: 26315673]

[344] Kitada, M.; Koya, D. The use of calorie restriction mimetics to study aging. *Methods Mol. Biol.,* **2013**, *1048*, 95-107. [http://dx.doi.org/10.1007/978-1-62703-556-9_8] [PMID: 23929100]

[345] Markus, M.A.; Morris, B.J. Resveratrol in prevention and treatment of common clinical conditions of aging. *Clin. Interv. Aging,* **2008**, *3*(2), 331-339. [PMID: 18686754]

[346] Longo, V.D.; Antebi, A.; Bartke, A.; Barzilai, N.; Brown-Borg, H.M.; Caruso, C.; Curiel, T.J.; de Cabo, R.; Franceschi, C.; Gems, D.; Ingram, D.K.; Johnson, T.E.; Kennedy, B.K.; Kenyon, C.; Klein, S.; Kopchick, J.J.; Lepperdinger, G.; Madeo, F.; Mirisola, M.G.; Mitchell, J.R.; Passarino, G.; Rudolph, K.L.; Sedivy, J.M.; Shadel, G.S.; Sinclair, D.A.; Spindler, S.R.; Suh, Y.; Vijg, J.; Vinciguerra, M.; Fontana, L. Interventions to slow aging in humans: are we ready? *Aging Cell,* **2015**, *14*(4), 497-510. [http://dx.doi.org/10.1111/acel.12338] [PMID: 25902704]

[347] Hildon, Z.; Montgomery, S.M.; Blane, D.; Wiggins, R.D.; Netuveli, G. Examining resilience of quality of life in the face of health-related and psychosocial adversity at older ages: what is "right" about the way we age? *Gerontologist,* **2010**, *50*(1), 36-47. [http://dx.doi.org/10.1093/geront/gnp067] [PMID: 19549715]

[348] Tugade, M.M.; Fredrickson, B.L. Resilient individuals use positive emotions to bounce back from negative emotional experiences. *J. Pers. Soc. Psychol.,* **2004**, *86*(2), 320-333. [http://dx.doi.org/10.1037/0022-3514.86.2.320] [PMID: 14769087]

[349] Windle, G.; Bennett, K.M.; Noyes, J. A methodological review of resilience measurement scales. *Health Qual. Life Outcomes,* **2011**, *9*, 8. [http://dx.doi.org/10.1186/1477-7525-9-8] [PMID: 21294858]

OBJECTIFS

En 2010, les troubles anxieux étaient la sixième cause d'invalidité en termes d'années de vie vécues avec un handicap, faisant d'eux l'un des désordres psychiatriques les plus répandus sur le globe. Depuis des années, les BZD ont prouvé leur efficacité pour soulager rapidement les symptômes des troubles anxieux. Malheureusement, les trop nombreux effets indésirables qu'elles provoquent ont conduit à revoir la stratégie thérapeutique. Désormais, les antidépresseurs sont indiqués en première intention dans les troubles anxieux, mais une fois encore, la plupart de ces traitements sont aujourd'hui limités par plusieurs facteurs, dont un nombre important de patients non-répondeurs, un long délai d'action avant l'apparition des premiers effets thérapeutiques ou encore une exacerbation temporaire des symptômes anxieux à l'initiation du traitement. De ce fait, le développement de nouvelles molécules efficaces avec des propriétés anxiolytiques rapides devient indispensable, d'autant plus que le taux de suicides pendant la période de latence des antidépresseurs est élevé. Toutefois, la mise au point de nouvelles perspectives thérapeutiques ne peut avoir lieu sans une compréhension minutieuse des mécanismes et des circuits à la base de la réponse de type anxiolytique rapide. **Le premier objectif de ce travail a été de confirmer que le récepteur 5-HT$_4$ est une cible à privilégier pour traiter rapidement avec une efficacité comparable aux BZD, le phénotype anxieux basal des souris BALB/cJRj** (**Article 2**). Des travaux ayant précédemment mis en évidence l'activité de type anxio-dépressive après un traitement chronique dans un modèle murin de dépression (Mendez-David *et al.*, 2014).

De nombreuses études cliniques et précliniques rapportent à plusieurs reprises des anomalies du cortex préfrontal chez des individus anxieux, et de manière intéressante, le récepteur 5-HT$_4$ est largement exprimé dans cette région. Les projections glutamatergiques des neurones pyramidaux du cortex préfrontal se projettent, entre autres, sur les neurones du noyau du raphé dorsal, dont la principale activité est de synthétiser la sérotonine, un neurotransmetteur sans aucun doute impliqué dans les troubles de l'humeur. **Le second objectif de ce travail a été de mettre en évidence l'un des circuits neuronaux impliqués dans l'effet anxiolytique induit par l'activation du récepteur 5-HT$_4$, en examinant le rôle du circuit**

cortex-raphé dans la réponse de type anxiolytique rapide, à l'aide d'outils pharmacologiques et optogénétiques (**Article 2**).

Les troubles anxieux constituent un facteur de risque de développer des pathologies dépressives. De plus, la comorbidité anxieuse renforce la sévérité, la persistance et la récurrence des symptômes dépressifs en favorisant la résistance au traitement antidépresseur. **Le troisième objectif de ce travail a été de développer un modèle murin de résilience, dans lequel les symptômes anxio-dépressifs induits par une élévation des taux de glucocorticoïdes pourraient être prévenus par l'activation prophylactique du récepteur 5-HT$_4$** (**Article 3** et **Brevet provisionnel en partenariat avec Columbia University, NYC, USA**).

MATÉRIELS ET MÉTHODES

1. Animaux

Figure 17. *Souris BALB/cJRj*

Des souris BALB/cJRj mâles (**Figure 17**), âgées de 8 semaines et pesant entre 20 et 25 g (*Janvier Labs – Le Genest Saint Isle, Fran*ce) ont été utilisées dans toutes les expériences de l'**Article 2**. Cette souche de souris sensible au stress est connue pour son phénotype anxieux à l'état basal comparativement aux autres souches standard de laboratoire et pour répondre à un traitement antidépresseur chronique, de manière fiable et répétable (Dulawa *et al.*, 2004). Cette souche de souris présente également des concentrations cérébrales de sérotonine plus faibles que les autres souches. Cette altération s'explique par une diminution de 50% à 70% de l'activité catalytique de la tryptophane hydroxylase neuronale de type 2 (TpH2), causée par un polymorphisme nucléotidique (SNP, C1473G) dans le gène codant pour cette enzyme (Zhang *et al.*, 2004). Les souris BALB/cJRJ, comparativement aux souris C57BL/6J, affichent également un défaut d'expression en transcrits de TpH2 dans le NRD, dans les régions proches de l'axe antéropostérieur, avec plus précisément une diminution de 30% dans la partie caudale située entre 0,8 et 1,2 mm de la ligne interaurale (Bach *et al.*, 2011).

Figure 18. *Souris C57BL/6JRj*

Des souris C57BL/6JRj mâles (**Figure 18**), âgées de 8 semaines et pesant entre 20 et 25 g (*Janvier Labs – Le Genest Saint Isle, France*) ont été utilisées dans une partie des expériences de l'**Article 3**. Cette souche de souris est utilisée car à l'état basal, elle ne répond pas à l'administration chronique d'antidépresseurs, comme la fluoxétine, l'imipramine ou l'agomélatine (David *et al.*, 2009; Rainer *et al.*, 2012) Cependant, après induction d'un

phénotype anxio-dépressif par une augmentation des concentrations en glucocorticoïdes, l'administration chronique de ces mêmes traitements antidépresseurs suffit à corriger les conséquences comportementales induites. Ce modèle murin est ainsi appelé modèle CORT, pour corticostérone, l'équivalent du cortisol chez l'humain.

Les souris ont aléatoirement été réparties par groupe de 4 à 5 souris par cage et maintenues dans des conditions d'éclairage et de température standards en laboratoire (cycle jour/nuit de 12h et température de 25°C). La nourriture et l'eau ont été fournies *ad libitum*. Les tests comportementaux se sont déroulés en aveugle et pendant la période lumineuse du cycle. Ils ont été conduits en accord avec la directive du 19 octobre n°87-848 du Ministère de l'Agriculture et de la Forêt, sous le protocole n°2012_100 approuvé par le comité d'éthique CEEA26 et sous le contrôle du Pr. Denis David, titulaire de l'autorisation d'expérimenter n°92256B.

2. Molécules et traitements

La fluoxétine (Prozac®, N-Methyl-gamma-(4-(trifluoromethyl)phenoxy)benzene-propanamine) et le diazépam (Valium®, 7-Chloro-1,3-dihydro-1-methyl-5-phenyl-2H-1,4-benzodiazepin-2-one) ont été respectivement utilisés comme comparateurs négatifs et positifs puisqu'ils sont indiqués dans les troubles anxieux. La fluoxétine est un ISRS qui n'a pratiquement aucune affinité pour les autres récepteurs sérotoninergiques, adrénergiques α_1 et α_2, ß-adrénergiques, dopaminergiques, histaminergiques H_1, muscariniques et GABAergiques (**Tableau 15**). La solution de fluoxétine (18 mg/kg) a été préparée à partir de fluoxetine hydrochloride (*Anawa Trading, Zurich, Suisse*) dissout dans une solution saline à 0,9 % (David *et al.*, 2009; Mendez-David *et al.*, 2014). Le diazépam (1,5 mg/kg ou 3 µg) est un anxiolytique appartenant à la sous-classe des BZD dont les effets sont liés à une action agoniste spécifique sur le site allostérique positif du récepteur central $GABA_A$, modulant l'ouverture du canal chlore. Quel que soit le mode d'administration, la solution de diazépam a été préparée en dissolvant du diazépam (*Sigma-Aldrich, Saint-Quentin Fallavier, France*)

dans un mélange d'eau distillée et de Tween® 20 à 0,5 % selon un protocole établi (Petit-Demouliere *et al.*, 2009; Guilloux *et al.*, 2013)

L'intérêt du RS 67333 (1-(4-Amino-5-chloro-2-methoxyphenyl)-3-(1-butyl-4-piperidinyl)-1-propanone) réside dans sa forte affinité pour le 5-HT_4R (pKi = 8,7 ; (Bockaert *et al.*, 2004)) (**Tableau 15**). En effet, excepté pour les récepteurs σ pour lesquels il possède une affinité de liaison de l'ordre du micro-molaire (pKi σ1 = 8,9 et pKi σ2 = 8,0 ; (Eglen *et al.*, 1995b)), le RS 67333 présente une affinité négligeable pour les autres récepteurs sérotoninergiques, dopaminergiques et muscariniques. Les solutions de RS 67333 (1,5 mg/kg, 0,2 µg ou 1 µg) ont été préparées à partir de RS 67333 hydrochloride (*Tocris Bioscience, Bristol, Royaume-Uni*) dissout dans une solution de β-cyclodextrine (Kleptose®, *Roquette, France*) à 20% pour les administrations aiguës ou à 10% pour les administrations chroniques par mini-pompes osmotiques (ALZET®, CA, USA) ou dans un mélange de liquide céphalo-rachidien artificiel (LCR, 147mM NaCl, 3,5 mM KCl, 1,2 mM $MgCl_2$, 1,26 mM $CaCl_2$, 25 mM $NaHCO_3$, 1 mM NaH_2PO_4) et de ß-CD 5 % (McMahon & Cunningham, 1999; Orsetti *et al.*, 2003; Mendez-David *et al.*, 2014).

Le GR 125487 (5-fluoro-2-methoxy-[1-[2-[(methylsulfonyl)amino]ethyl]-4-piperidinyl]-1H-indole-3-methylcarboxylate sulfamate) est le plus sélectif des antagonistes du 5-HT_4R (pKi = 10,6 ; (Schiavi *et al.*, 1994)) (**Tableau 15**), avec une affinité 1 000 fois supérieure à celle pour les autres récepteurs sérotoninergiques. La solution de GR 125487 (1,0 mg/kg ; *Tocris Bioscience, Bristol, Royaume*-Uni) a été préparée en le dissolvant dans une solution de ß-CD 20 % ou dans un mélange de LCR artificiel et de ß-CD 5 % (Mendez-David *et al.*, 2014). Pour s'assurer de la sélectivité des effets de type anxiolytique induits par le RS 67333, le GR 125487 a été injecté par voie intrapéritonéale 15 minutes avant l'administration de RS 67333 ou de diazépam.

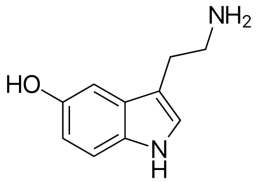
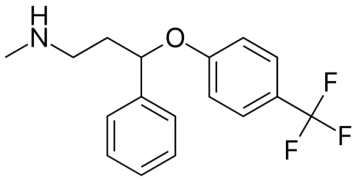
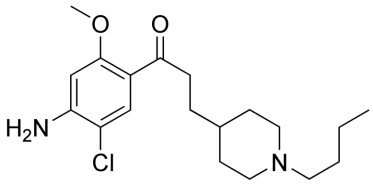
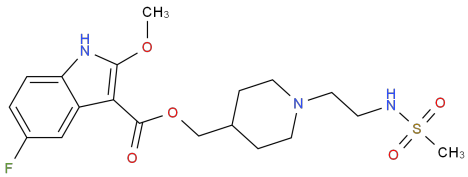
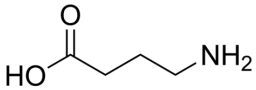
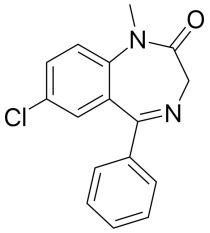
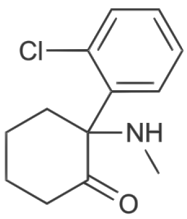
Le *para*-chlorophenylalanine (*p*-CPA) est un puissant inhibiteur de l'activité enzymatique de la TpH et un agent dépléteur sélectif des stocks de sérotonine cérébrale, qui n'affecte que très légèrement les concentrations des autres catécholamines (Koe & Weissman, 1966). La solution de *p*-CPA (150 mg/kg) a été préparée à partir d'une solution de

4-Chloro-DL-phenylalanine methyl ester hydrochloride (*Sigma-Aldrich, Saint-Quentin Fallavier, France*) dissout dans une solution de polysorbate 80 à 1 % (Pham *et al.*, 2017). Le *p*-CPA a été injecté par voie intrapéritonéale, deux fois par jour pendant trois jours consécutifs, avant les tests comportementaux.

La kétamine (2-(2-Chlorophenyl)-2-(methylamino)cyclohexanone) est un antagoniste non compétitif du récepteur N-méthyl-d-aspartate (NMDA-R) qui, après fixation sur le site de la phencyclidine (PCP) intra-canalaire, induit le blocage du canal et donc de l'influx calcique consécutif à l'ouverture du canal. La kétamine possède une forte affinité pour les NMDA-R (pKi = 6,18 ; (Roth *et al.*, 2013)) (**Tableau 15**), mais aussi pour les récepteurs dopaminergiques D_2, sérotoninergiques 5-HT_2 et pour les récepteurs opioïdes μ, κ et δ ((Kapur & Seeman, 2002)). La kétamine (10, 30, 90 mg/kg ; IMALGENE 1000®, *Merial, Lyon, France*) a été injectée par voie intrapéritonéale, à dose unique, avant le début du traitement à la corticostérone.

La corticostérone (11β,21-Dihydroxy-4-pregnene-3,20-dione) a été utilisée pour induire un phénotype anxio-dépressif chez la souris C57BL/6JRj. La corticostérone (*Sigma-Aldrich, Saint-Quentin Fallavier, France*) a été dissoute dans une solution de β-cyclodextrine (Kleptose®, *Roquette, France*) à 0,45% et administrée pendant 4 semaines dans l'eau de boisson à la dose de 5 mg/kg/jour ((David *et al.*, 2009; Mendez-David *et al.*, 2014; Brachman *et al.*, 2016)). La corticostérone se dégradant rapidement, des biberons opaques ont été utilisés et les solutions ont été changées deux fois par semaine.

Tableau 15. *Affinités des différents ligands pour les récepteurs 5-HT$_4$ et GABA$_A$*

Ligand	Structure chimique	Récepteur	pKi	Références
Sérotonine (5-HT)		5-HT$_4$	7,1	(Bockaert *et al.*, 2004)
Fluoxétine (Flx)		5-HT$_4$	négligeable	(Lucchelli *et al.*, 1995)
		GABA$_A$	négligeable	(Vidal, 2015)
RS67333 (RS)		5-HT$_4$	8,7	(Bockaert *et al.*, 2004)(Bockaert *et al.*, 2004)(Bockaert *et al.*, 2004)(Bockaert *et al.*, 2004)
GR125487 (GR)		5-HT$_4$	10,6	(Schiavi *et al.*, 1994)
Acide γ-amino-butyrique (GABA)		GABA$_A$	7,6	(Ebert *et al.*, 1997)
Diazépam (DZP)		GABA$_A$	7,8	(Pritchett *et al.*, 1989)
Kétamine		5-HT$_4$	?	
		NMDA-R	6,18	(Roth *et al.*, 2013)

3. Manipulations in vivo

3.1. Études des performances liées à l'émotion chez la Souris

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

Test du champ ouvert (*OF, de l'anglais Open Field*) : conçu à l'origine par Hall et collaborateurs (Hall, 1932) pour comptabiliser les défécations comme mesure de l'émotivité des animaux, ce test est désormais plus couramment utilisé pour évaluer le comportement anxieux et l'activité locomotrice des animaux suite à une intervention pharmacologique. Dans ce test, l'animal est placé dans une enceinte étrangère en plexiglas à 2 dimensions (43x43 cm), où chaque cadre compte 16 x 16 cellules photoélectriques infrarouges permettant l'enregistrement automatique du nombre de faisceaux interrompus (*Activity monitor, Sandown Scientific, UK*) (**Figure 19**). Pour évaluer le comportement anxieux des animaux, le nombre d'entrées et le temps passé dans le centre de l'enceinte, mais aussi en périphérie, ainsi que le ratio de la distance ambulatoire dans le centre sur la distance ambulatoire totale sont les paramètres évalués pendant 10 minutes. Pour évaluer l'activité locomotrice spontanée des animaux, les mêmes paramètres sont évalués pendant 30 minutes.

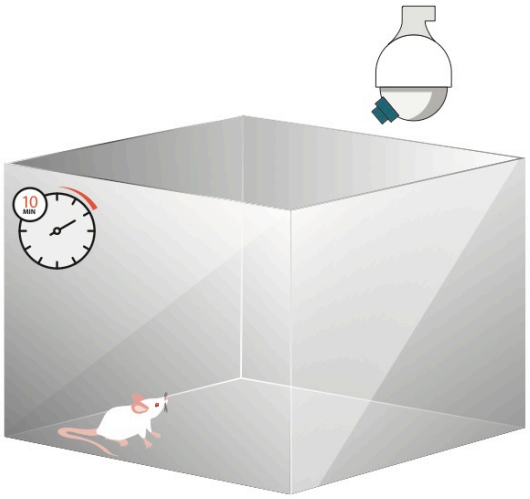


Figure 19. *Open Field*

Ce test est caractéristique d'un phénotype de type anxieux en évaluant pendant 10 minutes le temps passé et le nombre d'entrées dans le centre de l'enceinte. L'administration unique d'un anxiolytique augmente ces deux paramètres sans affecter l'activité locomotrice.

Test du labyrinthe en croix surélevé (*EPM, de l'anglais Elevated Plus Maze*) : le labyrinthe en croix surélevé a initialement été développé par Handley et Mithani (Handley & Mithani, 1984) puis validé chez le rat (Pellow *et al.*, 1985) et la souris (Lister, 1987) dans le but d'identifier les effets anxiolytiques ou anxiogéniques de molécules. Le labyrinthe, situé à 50 cm au-dessus du sol et éclairé par une lampe, est constitué de 2 bras fermés et de 2 bras ouverts de 45 cm de long et 10 cm de large, reliés par une plateforme centrale (**Figure 20**). La situation conflictuelle induite par la curiosité innée des souris à explorer un nouvel environnement et leur aversion pour les espaces ouverts et en hauteur permet de caractériser l'anxiété de ces animaux. Lors du test, l'animal est placé au centre du labyrinthe, sur la plateforme d'indécision, face à un bras ouvert. Les paramètres mesurés pendant 5 minutes, à l'aide d'une caméra et d'un logiciel de vidéo-tracking (*BioEPM3C, Bioseb, France*) sont le nombre d'entrées et le temps passé dans les bras ouverts et les bras fermés ainsi que le ratio de la distance ambulatoire dans les bras ouverts sur la distance ambulatoire totale.

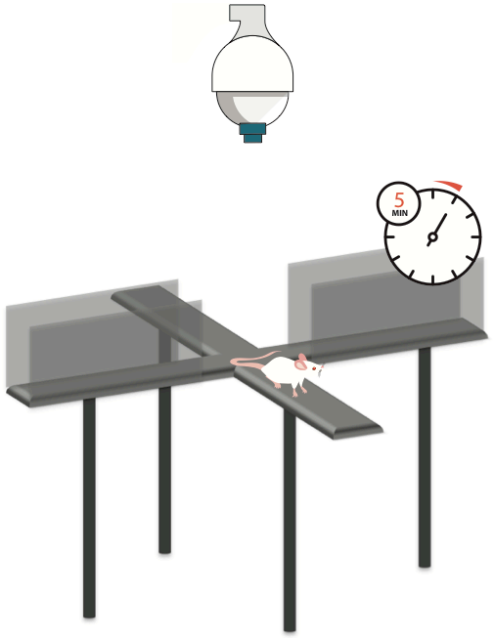


Figure 20. *Elevated Plus Maze*

Ce test est caractéristique d'un phénotype de type anxieux en évaluant pendant 5 minutes le temps passé et le nombre d'entrées dans les bras ouverts du labyrinthe. L'administration unique d'un anxiolytique augmente ces deux paramètres sans affecter l'activité locomotrice.

3.1.2. *Tests prédictifs d'un phénotype ou d'une activité de type antidépressive*

Test de toilettage forcé (*ST, de l'anglais Splash Test*) : ce test, décrit par Surget et collaborateurs (Surget *et al.*, 2008) évalue en environnement familier, le comportement de toilettage défini comme un nettoyage de la fourrure par léchage d'au moins 2 secondes, après vaporisation d'une solution de sucrose à 10% sur le dos de l'animal. La viscosité de la solution incitant l'animal à se toiletter, la latence entre la pulvérisation et le début du toilettage, le temps de toilettage et le nombre d'épisodes de toilettage sont les paramètres évalués pendant 5 minutes (**Figure 21**).

Figure 21. *Splash Test*

Ce test est caractéristique d'un phénotype de type dépressif en évaluant pendant 5 minutes la durée de toilettage. L'administration chronique d'un antidépresseur augmente ce paramètre.

3.1.3. *Tests prédictifs d'un phénotype ou d'une activité mixte*

Test d'alimentation supprimée par la nouveauté (*NSF, de l'anglais Novelty Suppressed Feeding*) : à l'origine modélisé chez le rat par Bodnoff et collaborateurs (Bodnoff *et al.*, 1988) et adapté chez la souris par Santarelli et collaborateurs (Santarelli *et al.*, 2003), ce test induit chez l'animal une situation de motivation conflictuelle entre l'envie d'aller se nourrir et la peur de s'aventurer au centre de l'enceinte. La veille du test, la nourriture est retirée de la cage des animaux. Le jour du test, la nourriture est disposée sur un cercle blanc éclairé, au centre d'une enceinte rectangulaire de 50 x 40 x 20 cm, recouverte d'une couche de sciure d'environ 2 cm et l'animal y est placé dans un coin. La latence pour aller se nourrir est enregistrée pendant 10 minutes et immédiatement après le test, l'animal est transféré dans son environnement familier où la quantité de nourriture consommée en 5 minutes sera mesurée (**Figure 22**).

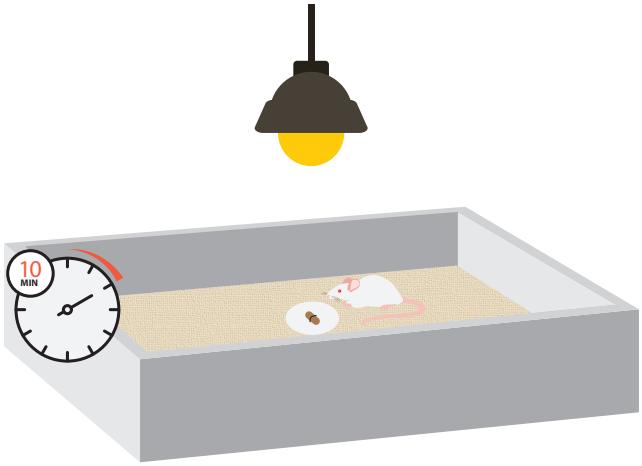


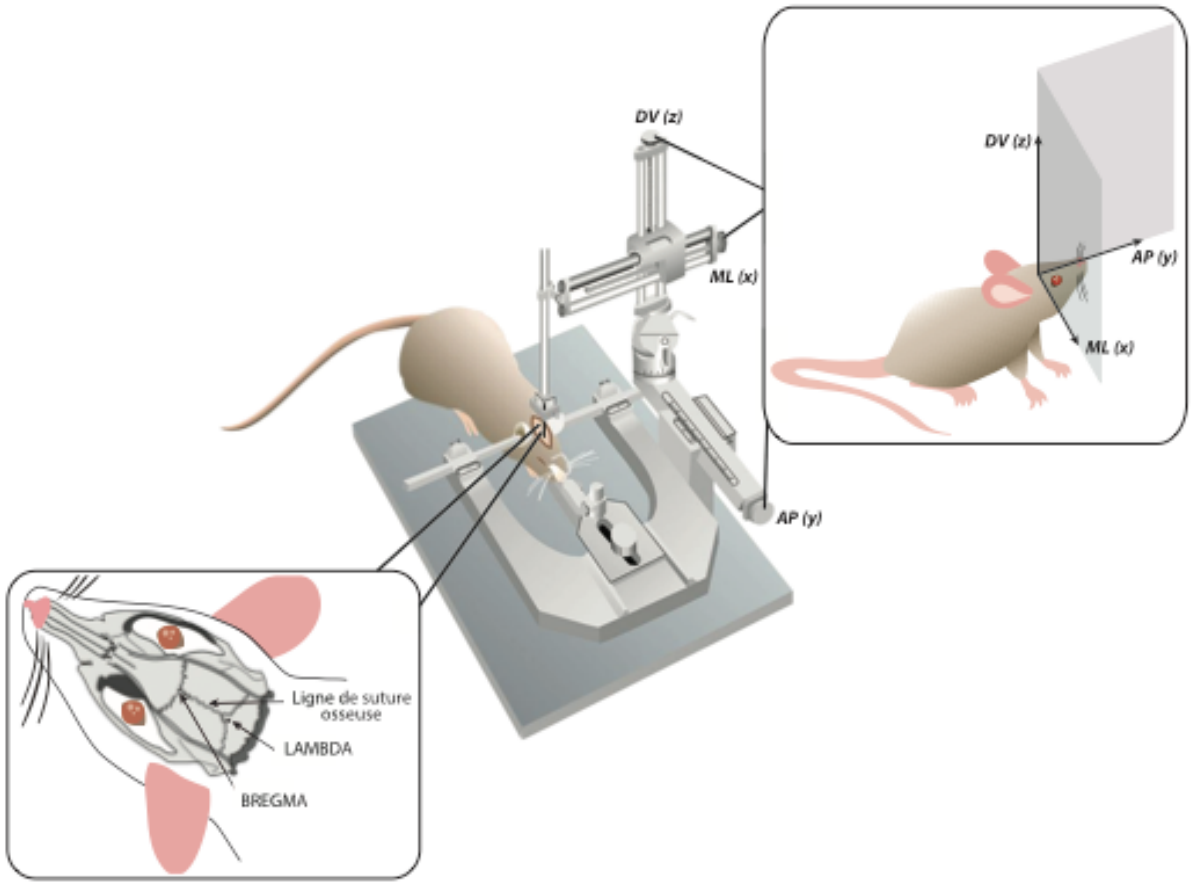
Figure 22. *Novelty Suppressed Feeding*

Ce test est caractéristique d'un phénotype mixte de type anxieux et dépressif en évaluant pendant 10 minutes maximum la latence pour se nourrir. L'administration unique d'un anxiolytique ou chronique d'un antidépresseur réduit ce paramètre sans affecter la consommation de nourriture dans la *home cage*.

3.2. Technique de stéréotaxie chez la Souris

Après anesthésie à l'hydrate de chloral (400 mg/kg, i.p.), les souris sont placées sur un cadre stéréotaxique pour permettre l'implantation de canules d'injection, de micropipettes en verre, de sondes de microdialyse ou encore d'optrodes après détermination préalable des coordonnées théoriques de l'implantation grâce à l'Atlas du cerveau de souris (Paxinos, 2007). Le calcul des coordonnées stéréotaxiques de la structure cible s'effectue par rapport aux coordonnées du Bregma et du Lambda situés sur le crâne de la souris à l'intersection de différentes lignes de sutures osseuses. Les coordonnées de la structure cible sont déterminées selon trois axes d'orientation : antéro-postérieur (AP), médio-latéral (ML) et dorso-ventral (DV) (**Figure 23**).

Figure 23. *Placement de l'animal dans un cadre stéréotaxique et repères stéréotaxiques en vue d'une injection ou d'une implantation intracérébrale.*



Adapté de (Ferry, 2012)

La tête de la souris est maintenue immobile, en position horizontale, grâce à deux barres d'oreilles insérées délicatement dans les deux conduits auditifs et une barre à dents glissée derrière les incisives supérieures. Après asepsie de la zone opératoire à l'alcool 70%, l'épiderme est incisé de manière longitudinale avec un bistouri et les différentes lignes de suture des quatre plaques osseuses sont révélées avec de l'eau oxygénée (10 volumes). Une fois que le Bregma, aussi appelé « point référence zéro » est identifié, il convient de vérifier l'horizontalité du crâne. Pour cela, l'écart DV entre le Bregma et le Lambda ne doit pas excéder ± 20 µm. Lorsque les coordonnées AP et ML sont identifiées, l'os crânien est percé à l'aide d'une fraise permettant ainsi l'accès à la dure-mère qui constitue le point zéro de l'axe DV. Les

coordonnées de chaque structure en fonction du protocole réalisé après chirurgie sont résumées dans le **Tableau 16**.

Tableau 16. *Coordonnées des différentes régions cibles selon l'Atlas du cerveau de souris en fonction de la technique utilisée a posteriori.*

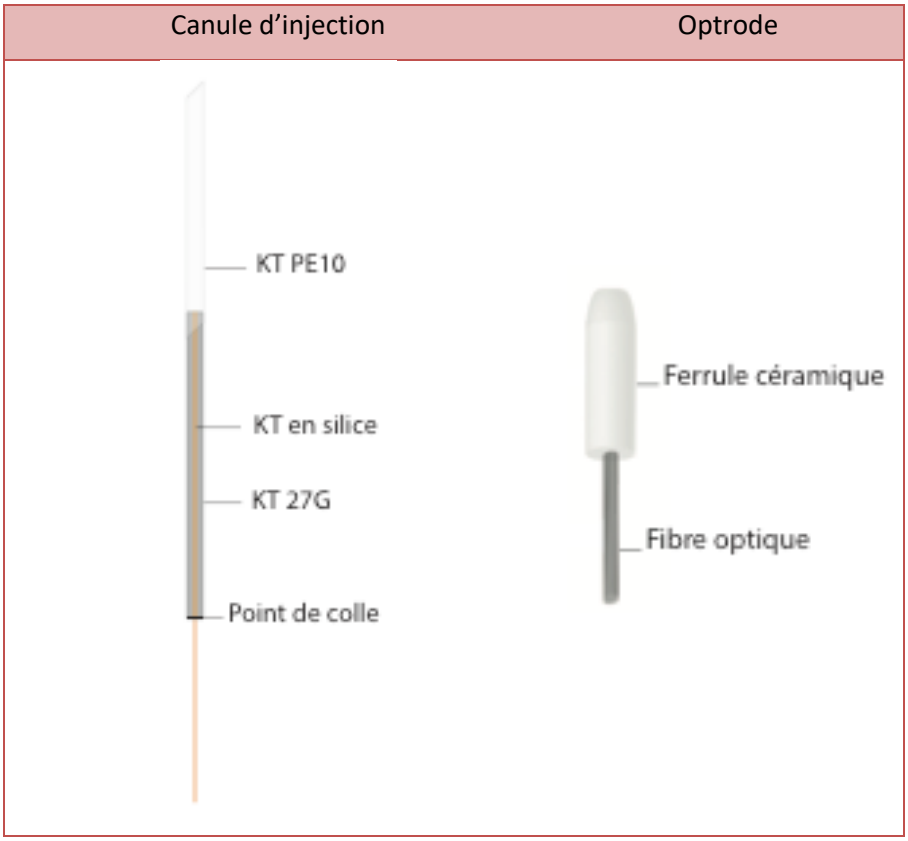
Structures	Techniques	Matériels	Coordonnées (en mm)			
			AP	DV	ML	α
CPF_m	Injection locale	Canules	+ 2,20	**- 2,60**	± 0,50	
HPC_v	Injection locale	Canules	- 2,80	- 2,00	± 2,50	
NRD	Électrophysiologie	Micropipette en verre		2,5 – 3,5		
NRD	Optogénétique	Optrodes	- 4,50	**- 4,00**	+ 1,20	15°

Abréviations *: AP : antéro-postérieur ; CPF_m : cortex préfrontal médian ; DV : dorso-ventral ; HPC_v : hippocampe ventral ; ML : médio-latéral ; NRD : noyau du raphé dorsal.*

D'après (Paxinos, 2007)

Selon le protocole expérimental réalisé *a posteriori* de la chirurgie, les canules, micropipettes, sondes ou optrodes (**Figure 24**) sont insérées très lentement dans le cerveau, à raison d'un millimètre par minute, pour limiter les conséquences de la lésion tissulaire. Les différentes sondes sont ensuite maintenues de manière solidaire au crâne de l'animal grâce à une résine dentaire autopolymérisable poudre et liquide (*DENTALON® plus, Kulzer*). Après durcissement complet de la résine, l'animal est retiré du cadre et replacé dans sa cage avec ses congénères où il sera autorisé à récupérer pendant 1 semaine, sous surveillance post-opératoire quotidienne.

Figure 24. *Schéma des différents implants utilisés pour la stéréotaxie.*



3.3. Étude d'électrophysiologie intracérébrale chez la Souris anesthésiée

3.3.1. ***Principe***

Dans les neurones, comme dans toutes les autres cellules de l'organisme, il existe une différence de charge ionique entre les côtés intracellulaire et extracellulaire générant ainsi un potentiel membranaire, mesuré en Volt. Le potentiel membranaire du neurone au repos est d'environ -70 mV. Le mouvement des ions entre la le milieu intra- et extracellulaire, à travers les différents types de canaux ioniques présents au niveau de la membrane cellulaire, crée un courant qui engendre un changement au niveau du potentiel membranaire. Lorsque ce potentiel atteint le seuil d'environ -30 mV, un potentiel d'action est déclenché par le corps cellulaire et se propage dans l'axone jusqu'aux terminaisons axonales. Ce potentiel d'action, souvent appelé *spike* de par son déclenchement rapide (moins d'une seconde), représente le

moyen de communication entre les neurones et est mesurable par différentes techniques d'électrophysiologie. Il existe 3 principales catégories d'enregistrement en électrophysiologie, en fonction de l'endroit où l'électrode est placée au niveau du neurone : l'enregistrement extracellulaire où l'électrode est placée à l'extérieur et à proximité du neurone d'intérêt, l'enregistrement intracellulaire où l'électrode est introduite dans le neurone d'intérêt et enfin le patch clamp où l'électrode est apposée sur la membrane pour former un joint étanche entre la membrane et l'électrode. Dans cette étude, c'est la première méthode qui a été utilisée.

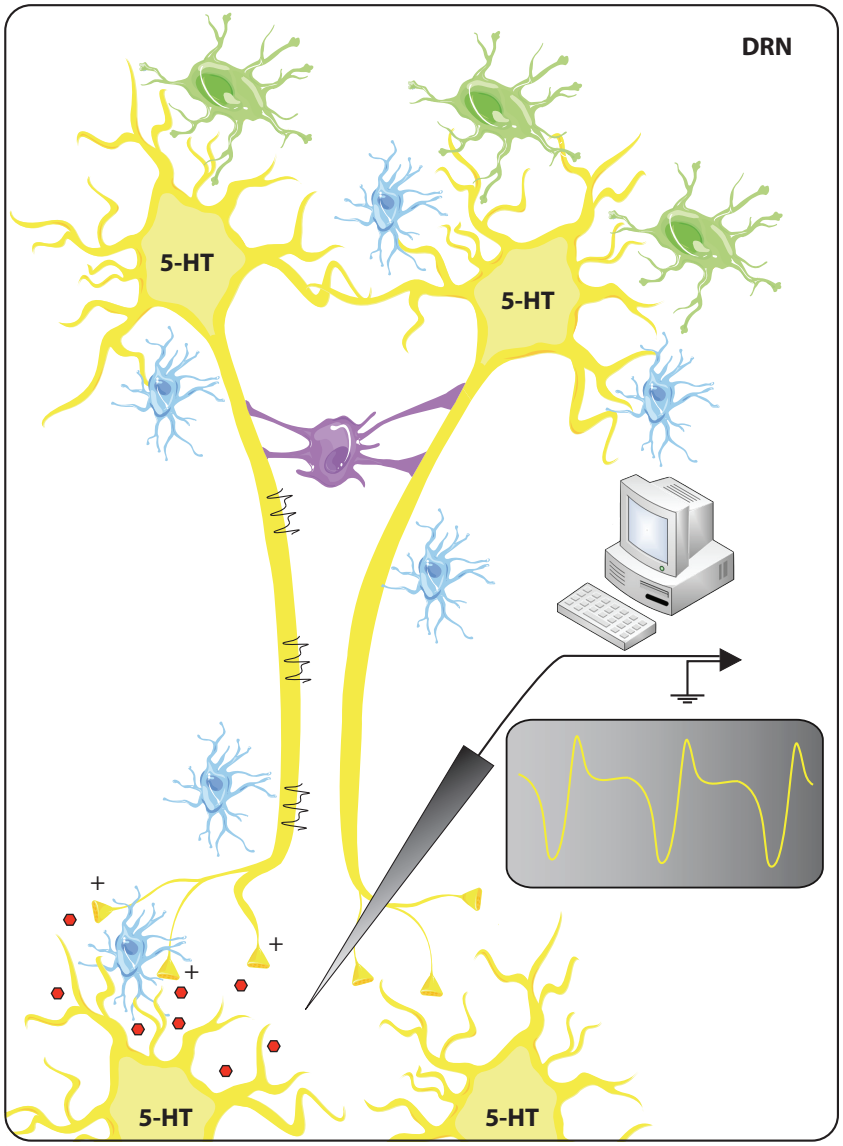
Une plateforme d'électrophysiologie se compose de certains éléments fondamentaux. Le signal est détecté par une microélectrode, ici une micropipette de verre insérée dans le cerveau de l'animal au niveau du neurone d'intérêt. La microélectrode transmet alors le signal à un amplificateur, à un oscilloscope puis à un ordinateur permettant la visualisation du potentiel de membrane dans le temps.

3.3.2. *Enregistrements extracellulaires de l'activité électrique des neurones sérotoninergiques du noyau du raphé dorsal*

Cette expérience a été réalisée par le Dr. Bruno Guiard au Centre de Recherches sur la Cognition Animal à Toulouse. Les animaux ont été anesthésiés à l'hydrate de chloral (400 mg/kg, i.p.) et placés dans un cadre stéréotaxique. Les enregistrements extracellulaires unitaires ont été réalisés d'après le protocole de Guiard et collaborateurs (Guiard *et al.*, 2011), à l'aide de micropipettes en verre à un seul baril (*R&D Scientific Glass, USA*), pré-chargées avec des filaments de fibres de verre pour en faciliter le remplissage capillaire, avec une solution de NaCl 2M. La pointe des micropipettes a été brisée à 2-4 µm puis étirée grâce à un étireur de pipette (*Narishige, Japon*) de sorte à obtenir une résistance comprise entre 2,5 et 5 MΩ. Après chirurgie, la micropipette a été introduite dans le cerveau de l'animal, à 0,2-0,5 mm en arrière de la ligne interaurale et sur une distance d'environ 2,5-3,5 mm en dessous de la surface du cerveau, jusqu'à rencontrer des neurones sérotoninergiques (**Figure 25**). Ces neurones se caractérisent par une cadence de décharge lente (0,5 – 2,5 Hz), régulière et de longue durée (0,8 – 1,2 ms).

Pour déterminer si l'administration aiguë de RS67333 (1,5 mg/kg) modifie l'activité des neurones sérotoninergiques du NRD, la cadence de décharge de ces neurones a été mesurée avant et après injection par voie systémique du composé.

Figure 25. *Placement de l'électrode mesurant l'activité électrique extracellulaire d'un neurone.*



Adapté de (Guiard *et al.*, 2011)

3.4. Étude d'optogénétique couplée au comportement la souris vigile

3.4.1. ***Principe***

Au cours des dernières années, l'optogénétique est devenue l'une des technologies clés dans la compréhension et la cartographie des circuits neuronaux, ouvrant des perspectives considérables dans le traitement de nombreuses pathologies cérébrales. En effet, l'optogénétique permet de contrôler transitoirement et avec précision, l'activité d'une population neuronale spécifique sans affecter les cellules alentours et sans utiliser de produits chimiques, chez l'animal éveillé et libre de ses mouvements. Cette technologie, inventée en 2006 par K. Deisseroth, l'un des pionniers dans le domaine, combine des techniques d'optiques et de photoniques «opto-» avec des techniques de génie génétique «-génétique», un ensemble d'approches apparues indépendamment depuis la fin des années 1990 (Deisseroth *et al.*, 2006). En 2010, cette méthodologie unique et véritable révolution technologique a été élue technique de l'année par le journal *Nature Methods*.

Le contrôle de l'activité neuronale par la lumière est rendu possible par l'introduction génétique de protéines sensibles à la lumière, appelées opsines. L'une des fonctions principales de ces opsines est de fournir l'environnement nécessaire à l'absorption de la lumière à une longueur d'onde donnée, en captant l'énergie lumineuse. Ces protéines à 7 domaines transmembranaires sont couplées à une protéine G dont l'activation dépend des modifications de la structure moléculaire des opsines induites par l'absorption de la lumière. L'activation de la protéine G initie alors une cascade de signalisation enzymatique générant une réponse électrique dans la cellule photoréceptrice (Duebel *et al.*, 2015).

En fonction du type d'opsine, cette réponse se traduit par l'ouverture de divers canaux permettant un flux passif d'ions à travers la membrane, responsable d'une dépolarisation ou d'une hyperpolarisation neuronale. Les neurones n'étant pas des cellules sensibles à la lumière, il convient donc d'introduire des opsines, dîtes microbiennes, dans ces cellules. Ceci est rendu possible par l'utilisation d'adénovirus, dont le tropisme permet d'infecter une

grande diversité de cellules et dont une partie du génome peut être remplacée par un gène d'intérêt, ici le gène codant pour un type d'opsine.

Actuellement, il existe une grande variété d'opsines microbiennes offrant la possibilité d'activer ou d'inhiber très rapidement l'activité d'une population neuronale. Les opsines microbiennes les plus communément utilisées en optogénétique comprennent les archaerhodopsines, premières à avoir été identifiées et initialement appelées bacteriorhodopsines, les channelrhodopsines et les halorhodopsines (**Tableau 17**).

Tableau 17. *Propriétés pharmacologiques, cinétiques et spectrales des opsines utilisées en optogénétique*

Abréviation	Espèces	Propriétés pharmacologiques	Activité	Constante de désactivation	Longueur d'onde
VChR1	*Volvox carteri*	Canal cationique	+	133 ms	545 nm
ChR2	*Chlamydomonas reinhardtii*	Canal cationique	+	~10 ms	470 nm
ChETA		Canal cationique	+	4-8 ms	470-500 nm
ChRGR		Canal cationique	+	4-5 ms	474 nm
eNpHR3.0	*Natronomonas pharaonis*	Canal chlore	-	4,2 ms	590 nm
Arch3.0/ArchT	*Halorubrum sodomense*	Pompe à proton	-	9 ms	530-560 nm
eBR	*Halobacterium salinarum*	Pompe à proton	-	18,9 ms	560 nm
Opto-XR		Couplage aux protéines G	+/-	0,5-20 ms	440-500 nm

Abréviations *: + : dépolarisation ; - : hyperpolarisation.*

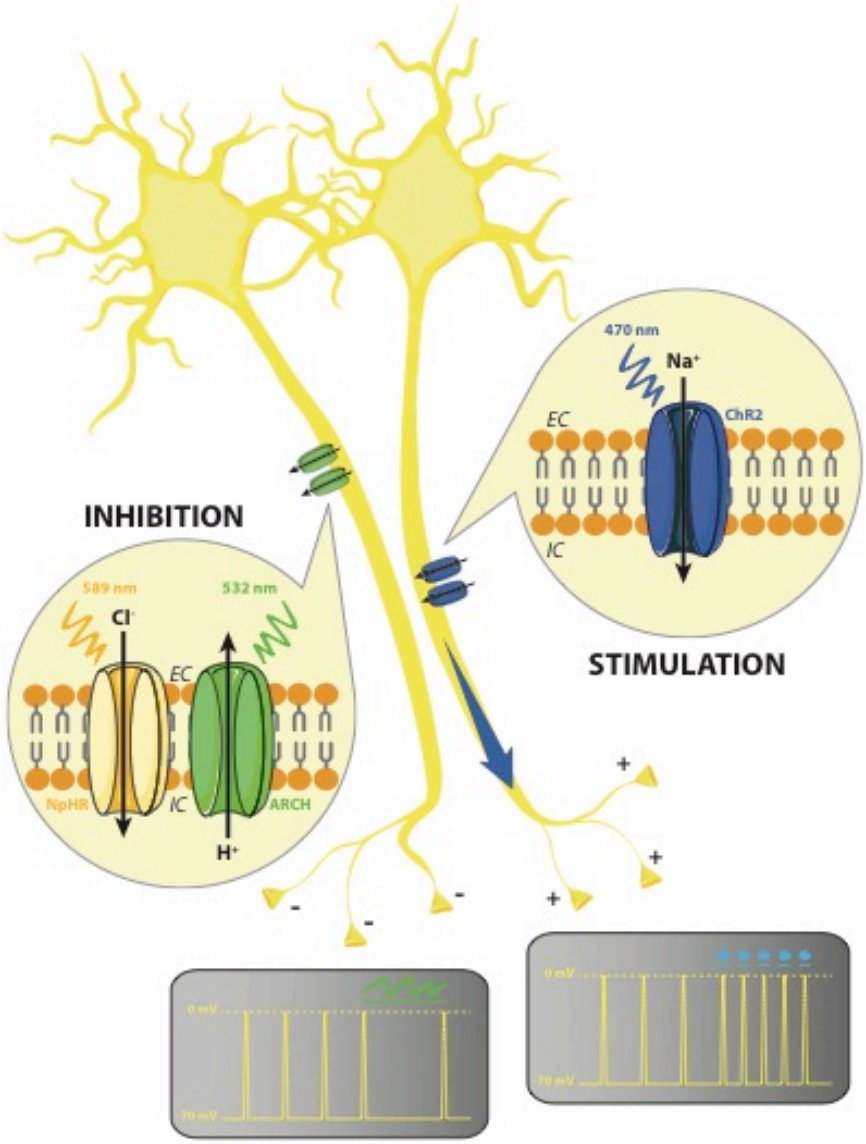
Adapté de (Yizhar *et al.*, 2011)

Les archaerhodopsines (Arch) extraites d'*Halorubrum sodomense* sont des pompes à proton, décrites pour la première fois par Oesterhelt et Stoeckenius (Oesterhelt & Stoeckenius, 1971). La stimulation de ces opsines par la lumière jaune ou verte (530-590 nm) induit un changement de conformation de la protéine permettant la libération de protons (H^+) hors de la cellule. Identifiées par Nagel et Hegemann (Nagel *et al.*, 2002), les channelrhodopsines (ChR) issues de *Chlamydomonas reinhardtii*, sont des canaux cationiques non spécifiques, activés par la lumière bleue (470 nm). En réponse à des impulsions lumineuses, ces opsines génèrent des courants ioniques de sodium (Na^+), de potassium (K^+) et de calcium (Ca^{2+}) suffisant pour déclencher des potentiels d'action, avec une latence proche de la milliseconde (**Figure 26**). ChR2 a été utilisée pour la première fois par Boyden et son équipe en 2005, dans le but de contrôler l'activité électrique de neurones hippocampiques en culture (Boyden *et al.*, 2005). Désormais, des variants de ChR2 sont disponibles, comme par exemple les ChETA ou les ChRGR aussi connues sous le nom d'opsines ultra-rapides, pour garantir une cinétique de désactivation rapide pour les régimes de décharge à haute fréquence. Isolées chez *Natromonas pharaonis* et découvertes par Matsuno-Yagi et Mukohata (Matsuno-Yagi & Mukohata, 1977), les halorhodopsines (HR) sont des canaux chlore, qui après stimulation par la lumière jaune (580 nm) génèrent un flux entrant d'ions chlorure (Cl^-) (**Figure 26**). Les Arch et HR et les ChR présentent une cinétique rapide et permettent respectivement une hyperpolarisation et une dépolarisation sélective de la membrane des cellules génétiquement ciblées lors de l'illumination. Mais contrairement à Arch et ChR, les HR entrent dans des états inactifs de longue durée avec un temps de récupération de plusieurs minutes, alors que Arch et ChR recouvrent spontanément leurs fonctions en quelques secondes. C'est pour cette raison que dans notre étude, nous avons préféré utiliser des outils tels que Arch et ChR2, plus adaptés à des protocoles comportementaux mettant en jeu des séquences de stimulation et d'inhibition répétées.

Il existe une alternative aux opsines microbiennes. Les opsines animales ou opto-XR sont utilisées pour photoactiver des voies de signalisation intracellulaires spécifiques, liées à un récepteur métabotropique spécifique. Ces opsines de signalisation biochimiques, conceptualisées par l'équipe de Deisseroth (Airan *et al.*, 2009), sont des protéines chimères

dans lesquelles les boucles intracellulaires de la rhodopsine sont remplacées par celles d'un récepteur à 7 domaines transmembranaires, couplé à une protéine G (GPCR), afin de permettre à ces opsines de cibler spécifiquement les seconds messagers intracellulaires normalement recrutés par ces récepteurs. Parmi ces chimères, on retrouve les opto-$ß_2$AR (voie Gs/AMPc) et opto- α_1AR (voie Gq/IP3/DAG) pour les récepteurs adrénergiques et le Rh-$CT_{5\text{-}HT1A}$ (voie $G_{i/o}$/AMPc) pour les récepteurs sérotoninergiques.

Figure 26. *Contrôle par optogénétique des influx électriques neuronaux par l'utilisation de pompes ou canaux photosensibles.*



Adapté de (Yizhar *et al.*, 2011)

3.4.2. *Expression neuronale des opsines chez la souris*

L'un des avantages de l'optogénétique est d'offrir une spécificité pour un type cellulaire ou pour un circuit neuronal particulier grâce à la transgénèse. On en distingue deux types : la transgénèse de la lignée germinale par croisement génétique, longue mais permettant une expression à la fois forte et spécifique ainsi que la conservation des modifications génétiques dans le temps, et la transgénèse somatique par injection intracrânienne de vecteurs viraux, rapide et permettant un niveau d'expression élevé.

La transgénèse de la lignée germinale (**Figure 27A**) consiste à croiser une souris exprimant la recombinase Cre (pour *cause recombination*) dans une population cellulaire spécifique, ici les cellules pyramidales exprimant la protéine kinase Ca^{2+}/calmoduline-dépendante de type 2 (CaMKII), avec une souris rapportrice dont l'expression du transgène codant une protéine d'intérêt, ici ChR2 ou Arch, est sous le contrôle d'un promoteur à forte activité transcriptionnelle. La recombinase Cre est capable de reconnaître spécifiquement un site LoxP, qui chez la lignée rapportrice se situe de part et d'autre d'un codon STOP empêchant la transcription du transgène. Une fois l'ADN clivé, le codon STOP est excisé et le transgène peut alors être transcrit uniquement dans les cellules qui expriment la recombinase Cre, à savoir les cellules pyramidales. C'est en utilisant cette stratégie d'expression qu'une équipe du *Allen Institute for Brain Science* à Seattle a créé 4 nouvelles lignées de souris « Cre-dépendantes », exprimant ChR2, Arch ou NpHR3.0 (Madisen *et al.*, 2012). Cette équipe a ainsi montré que ces lignées permettaient une activation ou une inhibition robuste des neurones pyramidaux corticaux et hippocampiques *in vitro* et *in vivo* lors d'une illumination. Diverses lignées, recensées dans la revue de (Yizhar *et al.*, 2011), sont disponibles pour l'activation ou l'inhibition de populations neuronales autres que les neurones pyramidaux, comme par exemple la lignée PV-Cre ciblant les interneurones inhibiteurs corticaux, la lignée DAT-Cre ciblant les neurones dopaminergiques ou encore la lignée ePET-Cre ciblant les neurones sérotoninergiques du NRD.

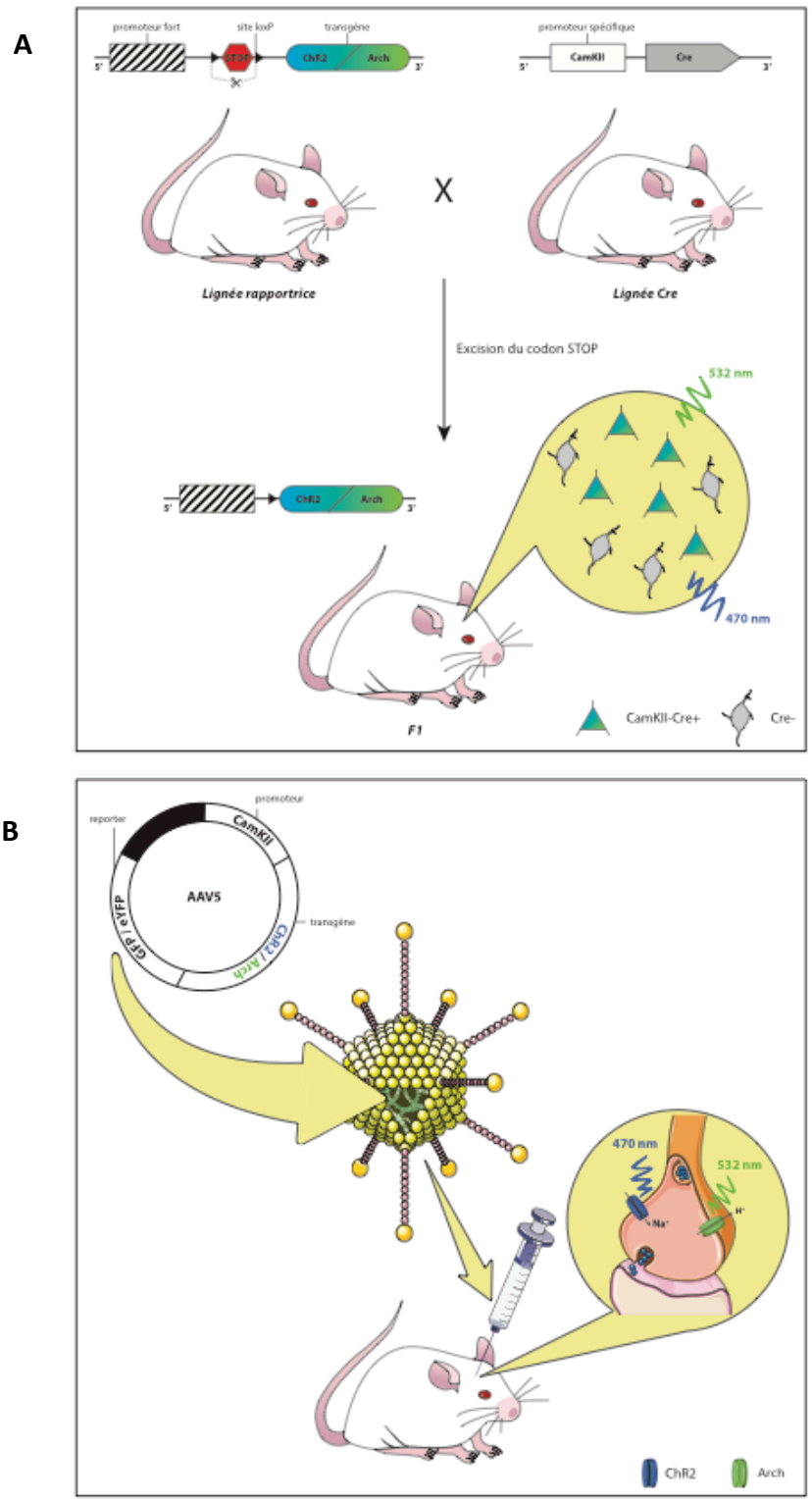
La transgénèse somatique (**Figure 27B**) vise à modifier le génome de cellules non reproductrices, ici les cellules pyramidales glutamatergiques du CPF_m, à l'aide de vecteurs viraux qui permettent l'incorporation des outils optogénétiques dans ces cellules. L'organisation du génome des adénovirus utilisés dans notre étude se compose d'une cassette d'expression du transgène (ChR2 ou ArchT), d'un promoteur qui dérive de la CaMKII et qui garantit que seules les cellules excitatrices du CPF_m sont capables d'exprimer le transgène et d'un gène reporter (GFP ou eYFP) utilisé pour visualiser *post-mortem* les profils d'expression génique et la localisation du transgène.

Dans notre étude, trois types de virus ont été utilisés (**Tableau 18**). Ces virus ont été injectés bilatéralement dans le CPF_m des animaux après anesthésie à l'hydrate de chloral (400 mg/kg, i.p.), avec un débit de perfusion de 0,2 µL/min pour un volume total par côté de 0,5 µL. Cette chirurgie a été effectuée 8 semaines avant la réalisation des tests comportementaux afin de permettre au transgène d'être transporté et exprimés au niveau des terminaisons synaptiques des neurones pyramidaux du CPF_m, situées dans le NRD.

Tableau 18. *Virus utilisés dans les expériences d'optogénétique.*

Intitulé	Titre	Source
AAV5-CaMKII-eYFP	$5,3x10^{12}$ molécules de virus/mL	*K. Deisseroth, UNC Vector Core, USA*
AAV5-CaMKII-hChR2(H134R)-eYFP	$6,2x10^{12}$ molécules de virus/mL	*K. Deisseroth, UNC Vector Core, USA*
AAV5-CaMKII-ArchT-GFP	$7,5x10^{12}$ molécules de virus/mL	*E. Boyden, UNC Vector Core, USA*

Figure 27. *Stratégies d'expression des opsines utilisées en optogénétique chez la souris.*



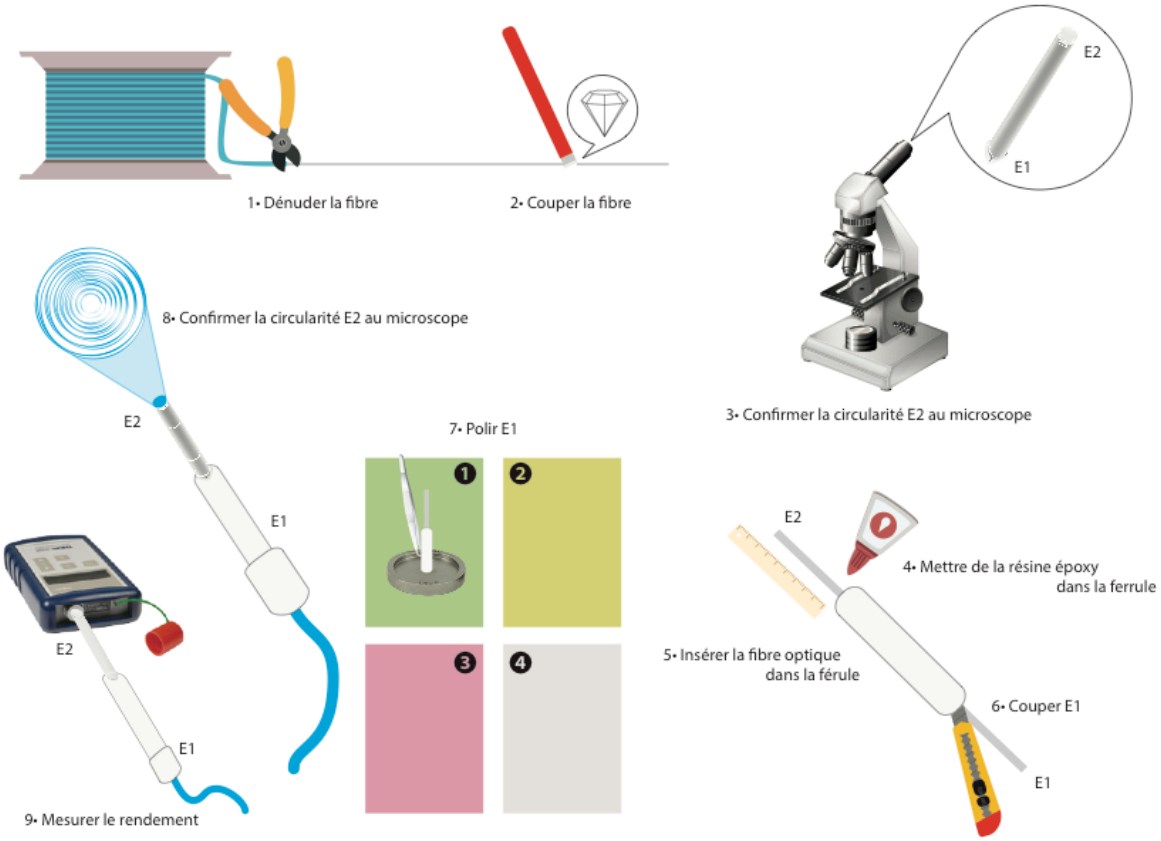
(A) La transgénèse de la lignée germinale faisant appel au croisement d'une lignée de souris floxée avec un transgène d'intérêt avec une lignée de souris Cre-dépendante sous le contrôle d'un promoteur spécifique. (B) La transgénèse somatique utilisant des virus adéno-associés.

Adapté de (Buchen, 2010)

3.4.3. ***Construction des fibres optiques***

La fabrication des optrodes a été réalisée selon le protocole décrit par Sparta (Sparta *et al.*, 2011) (**Figure 28**). La fibre optique (*0,39 NA, Ø200 µm core multimode, Thorlabs, France*) a d'abord été dénudée puis coupée avec une pointe en diamant. La parfaite circularité des extrémités de la fibre optique a été vérifiée au microscope optique avant d'insérer la fibre optique dans une férule en céramique (*LC Ø230 µm, Thorlabs, France*). La fibre optique et la férule sont fermement maintenues ensemble grâce à une résine époxy. L'extrémité de la fibre optique qui sera reliée au laser a ensuite été polie sur différentes feuilles de papier abrasif avec une taille de grain décroissant (*5 µm silicon carbide, 3 – 1 µm aluminium oxyde et 0,3 µm calcined alumina, Thorlabs, France*). Lorsque la surface de la fibre optique est parfaitement lisse, le rendement est mesuré à l'aide d'un compteur de puissance lumineuse (PM20, Thorlabs, France). Seules les optrodes avec un rendement supérieur à 80% ont été conservées en vue de l'implantation chez les animaux.

Figure 28. *Protocole de fabrication des optrodes.*



Adapté de (Sparta *et al.*, 2011)

3.4.4. *Stimulation lumineuse*

Sept semaines après l'injection intracorticale de virus, les animaux ont subi une deuxième chirurgie permettant l'implantation des optrodes dans le NRD. Selon le protocole, les animaux ont également pu être implantés, dans une même chirurgie, avec des canules d'injection dans le CPF_m (**Figure 29**). La stimulation des terminaisons glutamatergiques du CPF_m dans le NRD, simultanément au comportement, a été réalisée à l'aide d'un laser délivrant des pulses de lumière bleue (*OEM laser systems*) à une longueur d'onde de 473 nm et d'une puissance de 10-12 mW. Les pulses de 10 ms délivrés à une fréquence de 10 Hz ont pu être contrôlés par un stimulateur (*Master-8, A.M.P Instruments, Israël*) (Kheirbek *et al.*, 2013). Ces paramètres ont été choisis de manière à mimer la fréquence de décharge électrique des neurones sérotoninergiques du NRD en conditions physiologiques. Dans l'EPM, afin d'étudier les effets d'une activation de la voie cortex-raphé sur le phénotype anxieux, une séquence ON de 3 minutes suivie d'une séquence OFF de 3 minutes a été appliquée. L'inhibition des terminaisons a, quant à elle, été réalisée avec un laser délivrant une lumière verte continue (*OEM laser systems*) à une longueur d'onde de 532 nm et d'une puissance de 15-16 mW. Ces paramètres d'illumination ont été adaptés du protocole de Kheirbek pour eNpHR3.0 (Kheirbek *et al.*, 2013). Afin de visualiser les effets du traitement pharmacologique sur le phénotype anxieux dans l'EPM, une séquence OFF a d'abord été appliquée pendant 3 minutes suivie d'une séquence ON de 3 minutes. Cet ordre de séquence ainsi défini a permis d'observer les conséquences d'une inhibition de la voie cortex-raphé sur les effets de type anxiolytique induits de manière pharmacologique.

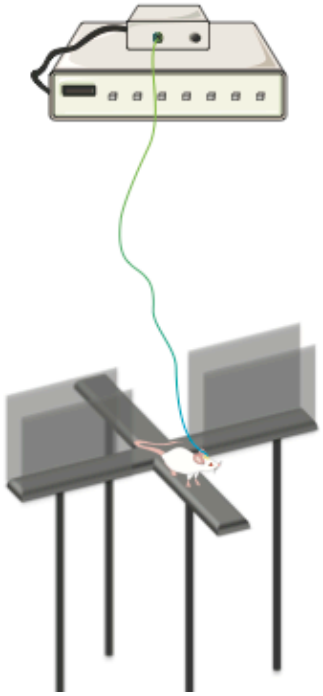


Figure 29. *Schéma du couplage de l'optogénétique avec l'EPM chez la souris*

3.4.5. *Vérification de l'expression des opsines*

Pour s'assurer que les opsines sont bien exprimées au niveau des terminaisons des neurones pyramidaux du CPF_m situées dans le NRD, un gène reporter a été inséré dans le génome de chacun des virus. Ce gène reporter émet un signal fluorescent visualisable par microscopie confocale après immunomarquage.

Après anesthésie (100 mg/ml kétamine ; 20 mg/ml xylazine, i.p.), les animaux ont été perfusés par voie intracardiaque avec une solution froide de sérum physiologique (0,9% NaCl) pendant 2 minutes puis par une solution froide de paraformaldéhyde (4% PFA). Les cerveaux ont été prélevés et disposés dans une solution cryoprotectrice de sucrose (30% sucrose ; 0,1% sodium azide) à 4°C pendant 3 jours consécutifs, en changeant la solution tous les jours. Les cerveaux ont ensuite été découpés au cryostat dans leur totalité en tranches coronales de 35 µm d'épaisseur et stockés dans un mélange de solution saline dans un tampon phosphate (1X PBS ; 0,1% sodium azide). Les coupes flottantes ont été incubées dans un tampon de blocage (0,5% triton X-100 ; 5% normal donkey serum (NDS) ; 1X PBS) pendant 2 heures à température ambiante. Les protéines eYFP et GFP ont été détectées en utilisant un anticorps polyclonal anti-GFP de lapin (1:500, *#A-11122, Thermo Fischer Scientific, France*) dilué dans du tampon de blocage et laissé à incuber avec les coupes flottantes à 4°C pendant toute la nuit. Après plusieurs lavages de 1X PBS, un anticorps secondaire Cy3-AffiniPure anti-lapin d'âne (1:250, *#711-165-15, Jackson Immunoresearch, UK*) a été ajouté dans une solution tampon (1X PBS ; 10% NDS) et incubé avec les coupes flottantes pendant 2 heures à température ambiante. De nouveaux rinçages avec du 1X PBS ont été effectués avant de monter sur lame puis de laisser sécher à l'air les coupes flottantes. Pour finir, les coupes ont été recouvertes de fluoromont et visualisées au microscope confocal (Leica TCS SP8) en utilisant les filtres appropriés.

4. Manipulations ex vivo

4.1. Mesure de la concentration en sérotonine par ELISA

Pour vérifier la bonne déplétion en 5-HT du cortex préfrontal, la concentration en 5-HT dans cette région a été dosée par méthode immuno-enzymatique ELISA. Cette méthode quantitative ultra-sensible permet de déterminer des concentrations sériques d'une substance, ici la 5-HT, grâce à sa détection par son ligand conjugué à une enzyme qui produit une réaction colorée en agissant sur un substrat chromogénique.

A la fin des tests comportementaux, les animaux ont été sacrifiés et les cerveaux prélevés puis disséqués afin d'isoler le cortex frontal. Sur la glace, les tissus ont été broyés mécaniquement dans une solution de tampon de lyse (70% acide perchlorique commercial ; 1,76 mg acide ascorbique ; 24,4 mg EDTA ; dH_2O). Le surnageant a été récolté et transféré dans un nouveau tube en vue de l'acylation des protéines. Cette étape est nécessaire et préalable au test ELISA car elle permet aux antigènes spécifiques de la 5-HT contenus dans les échantillons de se fixer de manière électrostatique à la phase solide de la plaque de micro-titration. Pour ce faire, les échantillons ont été déposés dans les puits de la plaque d'acylation et incubés pendant 5 minutes à température ambiante sous agitation avec le tampon d'acylation. Les standards (solutions contenant des concentrations connues d'anticorps), les contrôles et les échantillons acylés ont ensuite été transférés de la plaque d'acylation à la plaque de micro-titration (*Labor Diagnostika Nord, Allemagne*). L'anticorps anti-5-HT de lapin a été ajouté à chaque échantillon afin de permettre aux antigènes de rentrer en compétition avec un nombre fixe de sites de liaison de l'anticorps. Après incubation pendant 15 à 20 heures à 4°C, les antigènes libres et les complexes antigène-anticorps libres ont été éliminés par 3 lavages successifs. Les complexes antigène-anticorps liés à la phase solide ont été détectés par un anticorps anti-lapin de chèvre, conjugué à une peroxydase, qui a été laissé à incuber avec les échantillons pendant 30 minutes à température ambiante sous agitation. Pour finir, le tétraméthylbenzidine (TMB), un substrat chromogène utilisé comme révélateur de la peroxydase, a été incubé avec les échantillons pendant 30 minutes à température ambiante sous agitation. L'addition de ce substrat a ainsi permis l'apparition d'une coloration bleue dont

l'intensité, mesurable par spectrophotométrie à la longueur d'onde de 450 nm, est proportionnelle à la quantité d'enzyme présente et donc à la concentration d'anticorps recherchés. La quantification des concentrations en 5-HT contenue dans les extraits de cortex frontal a été obtenue en comparant leur absorbance à celle de la courbe de référence obtenue grâce aux concentrations connues des standards.

4.2. Cartographie de l'expression d'ARNm par hybridation *in situ*

L'hybridation *in situ* est un moyen de localiser à l'échelle ultra-structurale l'expression d'un acide nucléique donné sur une coupe histologie de tissus fixés. Cette technique est réalisée à partir d'une sonde ARN antisens marquée, c'est-à-dire une séquence complémentaire d'une portion d'un ARNm, qui forme avec l'ARNm cible, un hybride moléculaire visualisable chimiquement uniquement dans les cellules qui expriment le gène donné.

Dans notre étude, cette technique a été utilisée afin de vérifier l'expression et la localisation des transcrits du 5-HT_4R dans le cerveau des animaux. Les animaux ont été sacrifiés par dislocation cervicale et les cerveaux ont été prélevés. Des sections coronales et longitudinales de tissu cérébral de 20 µm d'épaisseur ont été découpées, fixées par du PFA 4% dans du 1X PBS pendant 15 minutes à 4°C puis déshydratées dans des bains successifs de 5 minutes d'éthanol (EtOH) 50%, d'EtOH 70% et d'EtOH 100% à température ambiante. Les sections ont été prétraitées par une solution de Pretreat1 pendant 10 minutes à température ambiante, rincées dans de l'eau puis du 1X PBS, pour finalement être hybridées par la sonde appropriée, un oligodeoxyribonucléotide complémentaire des bases de l'ARNm du 5-HT_4R chez la souris. Après avoir été incubées avec la sonde pendant 2 heures à 40°C puis lavées dans un tampon de lavage 1X (50X washing buffer) pendant 2 minutes à température ambiante sur agitateur, les sections ont été hybridées avec différents réactifs stabilisants à 40°C pendant 15 ou 30 minutes selon le réactif. Pour amplifier le signal, les sections hybridées ont été incubées avec des substrats du diaminobenzidine (DAB, 120 µL d'un mélange équivalent de BROWN-A et BROWN-B) pendant 10 minutes à température ambiante. Après 2

lavages à l'eau, les sections ont été colorées à l'hématoxyline 50% (Gill's Hematoxylin I) pendant 2 minutes à température ambiante puis à l'eau Ammonia 0,02% (1N ammonium hydroxyde). Pour finir, les sections ont été de nouveau déshydratées dans un bain d'EtOH 70% et 2 bains d'EtOH 100% de 2 minutes à température ambiante puis un bain de xylène pendant 5 minutes. L'ARNm du 5-HT_4R a été visualisé grâce à un microscope à champ clair et les sections ont été scannées à l'aide d'un scanner de lames (ZEISS Axio Scan.Z1). Les données ont été analysées par les logiciels Guide ZEN 2012 SP2 – Slidescan et FIJI.

5. Analyses statistiques

Les résultats des études comportementales et biochimiques sont présentés sous forme de moyenne ± l'écart standard à la moyenne (SEM). Toutes les données ont été analysées à l'aide du logiciel Prism 6.0 (*Graphpad Prism, USA*). Différents tests statistiques ont été utilisés dans cette étude. Pour toutes les expériences, un test de t de Student non apparié ou une ANOVA à un ou deux facteurs ont été appliqués aux données. Lorsque l'ANOVA a révélé un effet significatif et/ou une interaction, deux types de test de comparaisons multiples *a posteriori* ont été conduits : le test de Dunnett, comparant la différence de moyenne entre un groupe donné et le groupe contrôle et le test de la plus petite différence significative (LSD) de Fisher, comparant les moyennes entre un groupe donné et un autre groupe différent ou non du groupe contrôle. Dans le NSF, une analyse de survie de Kaplan-Meier a été réalisée, du fait que la distribution des données ne suivait pas une loi Normale puis le test du logrank de Mantel-Cox a été utilisé pour comparer les courbes de survie. Le seuil de significativité statistique a été fixé à $p < 0,05$.

RÉSULTATS EXPÉRIMENTAUX

Article 2

Rapid anxiolytic effects of 5-HT$_4$ receptor agonist involves prefrontal cortex-brainstem neural circuit recruitment

Faye et al., soumis

Article 3

Ketamine as a prophylactic against stress-induced depressive-like behavior

Brachman et al., 2016. Ketamine as a Prophylactic Against Stress-Induced Depressive-like Behavior. Biol Psychiatry 79, 776-786.

ARTICLE 2

ARTICLE 2 : Rapid anxiolytic effects of 5-HT$_4$ receptor agonist involves prefrontal cortex-brainstem neural circuit recruitment

Auteurs: Charlene Faye, Rene Hen, Bruno P. Guiard, Christine A. Denny, Alain M. Gardier, Indira Mendez-David*, Denis J. David*

Soumis dans Biological Psychiatry

Questions posées :

1. L'administration à dose unique d'un agoniste du récepteur 5-HT$_4$, le RS 67333, induit-elle des effets anxiolytiques rapide chez la souris avec un phénotype anxieux ?
2. Quelles sont le ou les régions et circuits recrutés dans l'activité anxiolytique rapide liée à l'activation du récepteur 5-HT$_4$?

Résumé de l'étude :

Les troubles anxieux comptent parmi les troubles mentaux les plus répandus. Pendant de nombreuses années, les BZD ont été le traitement de référence des troubles anxieux et la norme de traitement, mais les craintes suscitées par leurs effets secondaires et le risque potentiel de dépendance ont conduit à la prescription d'ISRS et d'autres agents sérotoninergiques. Cependant, les ISRS ont un délai d'action de plusieurs semaines. Par conséquent, le développement de nouveaux anxiolytiques à action rapide revêt une importance considérable. De récentes études, utilisant un modèle murin d'anxiété/dépression, ont montré que le ciblage du récepteur sérotoninergique de type 4 (5-HT$_4$R) pouvait constituer un nouveau moyen de traiter l'anxiété (Mendez-David *et al.*, 2014). Par ailleurs, il a également été démontré que les projections du cortex préfrontal médian sur le noyau du raphé dorsal modulent les comportements liés à l'anxiété et à la dépression (Warden *et al.*, 2012).

Dans ce travail, nous avons donc cherché à savoir si l'activation du récepteur 5-HT_4, en ciblant les terminaisons axonales glutamatergiques du cortex préfrontal médian qui se projettent sur le noyau du raphé dorsal, pouvait constituer une nouvelle manière d'induire des effets anxiolytiques rapides.

Les effets anxiolytiques d'une administration unique, soit par injection intrapéritonéale, soit par une infusion directement dans le cortex préfrontal médian, d'un agoniste du récepteur 5-HT_4 (RS 67333) ont été examinés chez la souris BALB/cJRJ mâle adulte, qui présente un phénotype anxieux basal. Ces effets ont été comparés à deux témoins, l'un positif, le diazépam et l'autre négatif, la fluoxétine. Pour fournir des preuves du recrutement du circuit CPF_m-NRD dans les effets anxiolytiques du RS 67333, des enregistrements *in vivo* de l'activité électrique des neurones sérotoninergiques du NRD, une déplétion en sérotonine cérébrale et une activation ou une inhibition par optogénétique des terminaisons des neurones pyramidaux du cortex préfrontal médian dans le NRD ont été employées.

De manière similaire au diazépam, les administrations par voie systémique et intracorticale de RS 67333 ont produit une réponse anxiolytique rapide chez la souris BALB/cJRJ. D'autre part, l'administration par voie systémique de RS 67333 a augmenté l'émission des potentiels d'action des neurones sérotoninergiques du NRD. La déplétion en sérotonine cérébrale a prévenu les effets anxiolytiques induits par une injection intracorticale de RS 67333 et de diazépam. La stimulation optogénétique des projections glutamatergiques du cortex préfrontal médian dans le NRD a confirmé le rôle de ce circuit dans l'activité anxiolytique. Enfin, l'inhibition de ces projections, après une infusion intracorticale ou une injection par voie systémique de RS 67333 ou de diazépam a bloqué les effets anxiolytiques rapides de ces deux molécules, confirmant ainsi l'implication de ce circuit dans l'activité anxiolytique rapide liée à l'activation du récepteur 5-HT_4.

En conclusion, ce travail a fourni une meilleure compréhension des mécanismes sous-jacents à l'activité anxiolytique rapide et suggère que le récepteur 5-HT_4 pourrait représenter une approche thérapeutique pour traiter rapidement et efficacement les troubles anxieux.

Contribution personnelle :

Au cours de ce travail, j'ai :

- Réalisé le suivi des animaux, y compris post-chirurgical.
- Réalisé les chirurgies d'implantation de canules et d'optrode.
- Mis au point la technique d'optogénétique couplée au comportement, incluant la fabrication intégrale des optrodes.
- Analysé les résultats, conçu les figures et rédigé l'intégralité de l'article, exceptée la partie d'électrophysiologie, sous la supervision du Pr. Denis David.

Biological Psychiatry

Rapid anxiolytic effects of serotonin type 4 receptor agonist involve prefrontal cortex-brainstem neural circuit recruitment

--Manuscript Draft--

Manuscript Number:	BPS-D-19-00180
Full Title:	Rapid anxiolytic effects of serotonin type 4 receptor agonist involve prefrontal cortex-brainstem neural circuit recruitment
Article Type:	Archival Report
Corresponding Author:	Denis Joseph DAVID, PhD Universite Paris-Sud Chatenay-Malabry, FRANCE
Order of Authors:	Charlène Faye, PharmD, MSc
	René Hen, PhD
	Bruno P Guiard, PhD
	Christine Denny, PhD
	Alain M Gardier, PharmD, PhD
	Indira Mendez-David, PhD
	Denis Joseph David, PhD
Abstract:	Background: Activation of serotonin 4 receptors (5-HT4R) may represent a new target for treating anxiety. Although a number of studies have assessed its anxiolytic activity after subchronic/chronic treatment, few of them have evaluated their anxiolytic- profile acutely. Then, the brain circuits involved in this behavioral activity is largely unknown. Methods: Here, we evaluated whether acute 5-HT4R activation in glutamatergic axon terminals arising from the medial prefrontal cortex (mPFC) to the dorsal raphe nucleus (DRN), a circuit involved in emotional processes, induced fast anxiolytic effects. Anxiolytic effects of an acute systemic administration or intra-mPFC infusion with the 5-HT4R agonist, RS67333, were examined in mice. To provide evidences that anxiolytic effects of RS67333 are mediated by mPFC-brainstem neural circuit recruitment, in vivo recordings of firing rate of DRN serotonin (5-HT) neurons, cerebral 5-HT depletion, and optogenetic activation/silencing were performed. Results: Acute systemic administration and intra-mPFC infusion of RS67333 produced fast anxiolytic effects and increased DRN 5-HT cell firing. Serotonin depletion prevented anxiolytic effects induced by intra-mPFC infusion of RS67333 or diazepam. Optogenetically activating mPFC terminals targeting the DRN reduced anxiety whereas silencing this circuit blocked RS67333 and diazepam mPFC infusion -induced anxiolytic effects. Finally, anxiolytic effects induced by an acute systemic RS67333 or diazepam administration were partially blocked after optogenetically inhibiting cortical glutamatergic terminals in the DRN. Conclusions: Our findings suggest that activating 5-HT4R acutely may constitute an encouraging strategy to obtain a fast-anxiolytic response. Finally, targeting mPFC terminals in the DRN is necessary but not sufficient for a rapid anxiolytic activity.
Additional Information:	
Question	**Response**
Number of words in the abstract	250
Number of words in the main text	3753
Number of tables	0
Number of figures	5
Number of supplemental files	1

Powered by Editorial Manager® and ProduXion Manager® from Aries Systems Corporation

Suggested Reviewers:	Guillaume Lucas, PhD Neurocentre Magendie Guillaume.lucas@inserm.fr Dr Lucas has published numerous paper on the role of the 5HT4 receptor on 5HT firing, including one in Neuron
	Pierre Blier, MD, PhD University of Ottawa Pierre.Blier@theroyal.ca Pr Blier is an expert in the field of anxiety disorder and animal model
	Keri Martinowich Lieber Institute for Brain Development Keri.Martinowich@libd.org Dr Martinowich is an expert in the field of animal model of mood disorders
	John Cryan University College Cork National University of Ireland J.Cryan@ucc.ie Dr Cryan has published numerous paper on filed of anxiety.
	Francesc Artigas, PhD Institut d'Investigacions Biomediques de Barcelona fapnqi@iibb.csic.es Dr Artigas has published numerous papers on the field of Neuropsychopharmacoiogy including the role of some serotoninergic receptor such 5HT1A in anxiety
	Stephanie Dulawa, PhD University of California San Diego sdulawa@ucsd.edu Dr Dulawa is currently studying the mechanisms underlying fast-onset of action of serotoninergic drugs on emotional behavior.
Opposed Reviewers:	

Powered by Editorial Manager® and ProduXion Manager® from Aries Systems Corporation

Manuscript Click here to view linked References

Rapid anxiolytic effects of serotonin type 4 receptor agonist involve prefrontal cortex-brainstem neural circuit recruitment

Charlene Faye[1], Rene Hen[2,3,4], Bruno P. Guiard[5], Christine A. Denny[2,3], Alain M. Gardier[1], Indira Mendez-David[1,*], Denis J. David[1,*,§]

[1]CESP/UMRS 1178, Univ Paris-Sud, Fac Pharmacie, INSERM, Université Paris-Saclay, Châtenay-Malabry, France

[2]Department of Psychiatry, Columbia University, New York, NY 10032, USA

[3]Division of Integrative Neuroscience, Research Foundation for Mental Hygiene, Inc (RFMH) / New York State Psychiatric Institute (NYSPI), New York, NY 10032, USA

[4]Department of Neuroscience, Columbia University, New York, NY 10032, USA

[5]UMR5169 CNRS “Centre de Recherches sur la Cognition Animale”, Toulouse, 31062, France

*shared co-last author

§ To whom correspondence should be sent:

Pr Denis David

CESP/UMR-S 1178,

Univ. Paris-Sud, Fac Pharmacie,

Inserm, Université Paris-Saclay

5, rue Jean-Baptiste Clément

92290 Chatenay-Malabry

Tel: +33146835968

Fax: +33146835355

Email: denis.david@u-psud.fr

Running title: 5-HT$_4$ receptor contribution to fast anxiolytic response

Keywords: anxiety, 5-HT$_4$ receptor agonist, benzodiazepine, optogenetic, prefrontal cortex, dorsal raphe nucleus

Number of:

Word in abstract: 250

Words in main text: 3,753

Words in figure legends: 925

Figures in Main Text: 5

Tables in Main Text: 0

Words in Supplementary Text: 1,154

Supplemental figures: 1

Supplementary tables: 4

ABSTRACT

Background: Activation of serotonin 4 receptors (5-HT$_4$R) may represent a new target for treating anxiety. Although a number of studies have assessed its anxiolytic activity after subchronic/chronic treatment, few of them have evaluated their anxiolytic-profile acutely. Then, the brain circuits involved in this behavioral activity is largely unknown.

Methods: Here, we evaluated whether acute 5-HT$_4$R activation in glutamatergic axon terminals arising from the medial prefrontal cortex (mPFC) to the dorsal raphe nucleus (DRN), a circuit involved in emotional processes, induced fast anxiolytic effects. Anxiolytic effects of an acute systemic administration or intra-mPFC infusion with the 5-HT$_4$R agonist, RS67333, were examined in mice. To provide evidences that anxiolytic effects of RS67333 are mediated by mPFC-brainstem neural circuit recruitment, *in vivo* recordings of firing rate of DRN serotonin (5-HT) neurons, cerebral 5-HT depletion, and optogenetic activation/silencing were performed.

Results: Acute systemic administration and intra-mPFC infusion of RS67333 produced fast anxiolytic effects and increased DRN 5-HT cell firing. Serotonin depletion prevented anxiolytic effects induced by intra-mPFC infusion of RS67333 or diazepam. Optogenetically activating mPFC terminals targeting the DRN reduced anxiety whereas silencing this circuit blocked RS67333 and diazepam mPFC infusion -induced anxiolytic effects. Finally, anxiolytic effects induced by an acute systemic RS67333 or diazepam administration were partially blocked after optogenetically inhibiting cortical glutamatergic terminals in the DRN.

Conclusions: Our findings suggest that activating 5-HT$_4$R acutely may constitute an encouraging strategy to obtain a fast-anxiolytic response. Finally, targeting mPFC terminals in the DRN is necessary but not sufficient for a rapid anxiolytic activity.

INTRODUCTION

Anxiety disorders are among the most common psychiatric disorders, with a lifetime prevalence over 25% (1). The annual financial burden imposed by these illnesses is more than $40 billion (2). Benzodiazepines (BZDs) are effective to treat most anxiety disorders and the standard treatment for years, as it has an over 80% response in reducing acute anxiety in patients (3). However, their long-term daily use has been associated with a risk for dependency and amnesia. Consequently, they are often replaced by a chronic treatment with Selective Serotonin Reuptake Inhibitors (SSRIs) and other serotonergic agents, which suggests a key role of serotonin (5-HT) in anxiety, which is poorly documented. However, the delayed onset of action of several weeks combined with the fact that 40% of anxious patients are non-responders (4) emphasizes the need to develop novel fast-acting anxiolytics.

Recent findings have indicated that the serotonin 4 receptor (5-HT$_4$R) may represent a new target for treating both depression and anxiety (5, 6). Indeed, mice lacking the 5-HT$_4$R displayed anhedonia and a context-dependent anxiety-like behavior (7) and conversely behavioral experiments in rodents found that various 5-HT$_4$R agonists can directly exert an antidepressant and anxiolytic-like activity (6). Unlike SSRIs, treatment with RS67333, a 5-HT$_4$R agonist presenting high affinity for the 5-HT$_4$R [pKi = 8.7] (8), induced fast anxiolytic/antidepressant-like effects through a neurogenesis-independent mechanism in a mouse model of anxiety/depression (5). Although a number of studies have assessed the anxiolytic/antidepressant-like activity of 5-HT$_4$R modulation after subchronic or chronic treatment, few have evaluated their anxiolytic-like profile acutely. For instance, whether 5-HT$_4$R antagonists cause anxiolytic-like effects in rodents remains unclear (9, 10), acute 5-HT$_4$R activation has been shown to be an encouraging pharmacological strategy to obtain

a fast anxiolytic-like response. Recently, acute administration of RS67333, induced anxiolytic-like effects in mice (11) and reversed the anxiogenic effects of chronic exposure to cannabinoids during adolescence (12).

Interestingly, approximately 60% of pyramidal neurons recorded in the medial prefrontal cortex (mPFC) contain the 5-HT$_4$R transcript, and 5-HT$_4$R of the infralimbic and prelimbic sub-regions of the mPFC appear also to facilitate dorsal raphe nucleus (DRN) 5-HT neuronal activity (13). While these data suggest the existence of 5-HT$_4$-dependent activation of glutamatergic axon terminals in the DRN that may involve the mPFC, interestingly, they may also suggest that 5-HT$_4$R activation in the mPFC can induce fast anxiolytic-like effects. A large body of evidence also suggests that mPFC projections to the DRN modulate anxiety and depression-related behaviors (14-16). Indeed, chronic optical stimulation of layer V pyramidal cells in the PFC induced a long-lasting anxiolytic-like effect in a mouse model of anxiety/depression (17), and inhibition of mPFC terminals targeting to the DRN induces a long-lasting suppression of anxiety-like behavior in socially stressed mice (18). Lastly a recent study revealed a key role for DRN circuits in rapid environment specific behavioral regulation including stress (19).

Here, using behavioral paradigms predictive of anxiolytic-like activity, we first evaluated the consequences of an acute systemic or intra-mPFC administration with RS67333 or diazepam in male BALB/cJRj anxious mice (20). We showed that acute systemic or intra-mPFC RS67333 or diazepam administration –induced fast anxiolytic-like effects required intact 5-HT system. Then, using optogenetic techniques, we assessed the contribution of glutamatergic axon terminals arising from the mPFC to the DRN on fast anxiolytic-like effects. We demonstrated that mPFC terminals in the DRN are necessary but not sufficient for diazepam and 5-HT$_4$R to mediate fast anxiolytic activity.

MATERIALS AND METHODS

Subjects

At the beginning of the experiments, all male BALB/cJRj mice (Janvier Labs, Le Genest-St-Isle, France) were 7-8 weeks old, weighing 25-30 g, and were maintained on a 12h light:12h dark schedule (lights on at 06:00 hours). Food and water were provided *ad libitum* except during behavioral observations. The protocols involving animals and their care were conducted in conformity with the institutional guidelines that are in compliance with national and international laws and policies (Council directive #87-848, October 19, 1987, Ministère de l'Agriculture et de la Forêt, Service Vétérinaire de la Santé et de la Protection Animale, permissions # 92-256B to DJD, Institutional Animal Care and Use Committee 26 authorization #4074).

Drugs

1-(4-amino-5-chloro-2-methoxyphenyl)-3-(1-butyl-4piperidinyl)-1-propanone hydrochloride (RS67333 dissolved in 0.9% NaCl, Tocris Bioscience, Bristol, UK) was administered intraperitoneally (i.p) at 1.5 mg/kg (5), or locally in the mPFC (21, 22) at 0.1 µg/side or 0.5 µg/side. Diazepam hydrochloride (dissolved in 0.5% Tween®20 solution, Sigma-Aldrich, Saint-Quentin Fallavier, France) was administered i.p at 1.5 mg/kg (23) or locally in the mPFC at 1.5 µg/side (24). Fluoxetine hydrochloride (dissolved in 0.9% NaCl, Anawa Trading, Zurich, Switzerland) was administered at 18 mg/kg (23). Para-chlorophenylalanine methyl ester (PCPA, Sigma-Aldrich, Saint-Quentin Fallavier, France) was administered i.p. twice a day during 3 days at 150 mg/kg (25).

Behavioral assays

Behavioral characterization of putative fast anxiolytic 5-HT$_4$R activation and the role of cortical glutamatergic terminals in the DRN on its effects were performed in the Elevated Plus Maze (EPM) and the Novelty Suppressed Feeding (NSF) paradigm as described previously (5, 26) (Supplementary Material).

in vivo electrophysiological recordings

The DRN 5-HT neurons were then identified according to the following criteria: a slow (0.5–2.5 Hz) and regular firing rate and a long duration, positive action potential as previously reported (27).

Optogenetic manipulations

For targeting opsin expression selectively to cortical glutamatergic terminals in the DRN, AAV5-CaMKIIα-ChR2-enhanced yellow fluorescent protein (eYFP), AAV5-CaMKII-ArchT-green fluorescent protein (GFP) or AAV5-CaMKII-eYFP, obtained from Karl Deisseroth and Ed Boyden (UNC Vector Core, NC, USA) were bilaterally injected into the mPFC. Mice injected with AAV5-CamKII-eYFP were used as control. The stimulation or the inhibition of terminal regions of pyramidal neurons in the DRN occurred simultaneously to the behavioral paradigms.

Statistical analysis

Results from data analyses, expressed as mean ± SEM were analyzed using Prism 6.0h software (Graphpad, San Diego, CA, USA). For all experiments, unpaired *t*-test, one-way or two-way ANOVAs were applied to the data as appropriate. Significant main effects and/or interactions were followed by Dunnett's or Fisher's PLSD post-hoc analysis. In the

NSF, we used the Kaplan-Meier survival analysis due to the lack of normal distribution of the data and Mantel-Cox log rank test to evaluate differences between experimental groups. Statistical significance was set at $p<0.05$. All statistical tests and p values are listed in Supplemental Tables (Supplemental Table S1-S4).

RESULTS

Acute systemic 5-HT$_4$R stimulation induced fast anxiolytic-like effect in anxious adult male BALB/cJRj mice.

To assess putative fast anxiolytic 5-HT$_4$R activation, in two independent cohorts of BALB/cJRj animals, vehicle, fluoxetine (18 mg/kg), diazepam (1.5 mg/kg), or RS67333 (1.5 mg/kg) were administered i.p., 45 minutes before behavioral testing in the EPM or NSF (Figure 1A). In the EPM, acute systemic injection of RS67333 and diazepam induced a fast anxiolytic-like effect when compared with vehicle and fluoxetine administration in BALB/cJRj mice. RS67333 and diazepam increased time spent in the open arms (one-way ANOVA, $^{**}p<0.01$) (Figure 1C). It is unlikely that this effect was the consequence of a change in locomotor activity, as the ratio of ambulatory distance in the open arms divided by total distance was significantly increased for both RS67333 and diazepam (one-way ANOVA, $^{**}p<0.01$) (Figure 1D).

In another anxiety-related test, the NSF, unlike fluoxetine that induced an anxiogenic-like effect, we found that RS67333 and diazepam, decreased the latency to feed (Kaplan–Meier survival analysis, $^{**}p<0.01$) when compared with saline administration without affecting the home-cage food consumption (Figures 1E-1F).

To assess the selectivity of RS67333-induced anxiolytic-like effects, we also tested whether the 5-HT$_4$R antagonist GR125487 (1 mg/kg, i.p) influenced the response of

RS67333 (1.5 mg/kg) on anxiety-like behavior. Here, GR125487 was administered 15 minutes before RS administration (Figure S1A). In the EPM, GR125487 administration prevented RS67333-induced increase in time spent in the open arms, and the ratio of ambulatory distance in the open arms divided by total distance (one-way ANOVA, **p<0.01, Figures S1B-S1C). Similarly, in the NSF, GR125487 occluded the effect of RS67333 on the latency to feed without affecting food consumption (one-way ANOVA, **p<0.01, Figures S1D-S1E). Altogether, these data indicate that RS67333-induced fast anxiolytic-like effects through 5-HT$_4$R activation.

Acute cortical 5-HT$_4$R activation induces fast anxiolytic-like effects.

Since 5-HT$_4$Rs are expressed in the mPFC (28), a brain region involved in the physiopathology of mood disorders related to central 5-HT dysfunction (13, 29, 30), we examined the contribution of 5-HT$_4$R activation in the mPFC to fast anxiolytic-like activity (Figure 1B). In the EPM, unlike 0.2 µg of RS67333 (RS$_1$, unpaired t-test) but as observed with a systemic administration of diazepam (1.5 mg/kg), a local infusion of 1 µg RS67333 (RS$_2$) significantly increased time spent in the open arms and the ratio of ambulatory distance in the open arms divided by total distance (unpaired t-test, Figures 1G-1H). In the NSF, unlike 0.2 µg of RS67333 (unpaired t-test), 1 µg of RS67333 and systemic administration of diazepam decreased latency to feed without affecting the home-cage food consumption (one-way ANOVA, **p<0.01, Figures 1I-1J) confirming the anxiolytic-like effects of 5-HT$_4$R activation in the mPFC.

Serotonin from the dorsal raphe nucleus is involved in fast anxiolytic-like effects of acute RS67333 and diazepam administration.

Here, we set out to test whether an acute administration of RS67333 can induce persistent changes in serotonergic activity (Figure 2A). We found that acute systemic administration of RS67333 (1,5 mg/kg) increased the discharge frequency of DRN 5-HT neurons by 63% (unpaired t-test, Figures 2B-2C).

To further confirm that anxiolytic-like effects of mPFC 5-HT$_4$R stimulation depend on an intact 5-HT system, mice were pre-treated with PCPA for 3 days before RS67333 (0.5 µg/side) or diazepam (1.5 µg/side) intra-mPFC infusion (Figure 2D). PCPA induced an average decrease of 86.08% in the 5-HT content in the PFC of vehicle mice (two-way ANOVA, **p<0.01, Figure 2E). Acute intra-mPFC infusion with RS67333 or diazepam increased time spent in open arms and the ratio of ambulatory distance in the open arms divided by total distance in the EPM were abolished in 5-HT-depleted PCPA mice (two-way ANOVA, **p<0.01, Figures 2F-2G). These results point out the critical role of the 5-HT neurotransmission in fast anxiolytic-like effects. In summary, RS67333, as suggested previously (30), and diazepam act on 5-HT function through a modulation of the mPFC.

Fast anxiolytic-like effects of 5-HT$_4$R agonist recruit medial prefrontal cortex-brainstem neural circuit.

If emotional behaviors are mediated by mPFC pyramidal neurons projecting to the DRN (16), no direct evidence suggests that these projections are involved in anxiolytic-like effects. Next, using optogenetic strategies, we began an examination of the specific contribution of the incoming cortical glutamatergic terminals in the DRN to fast anxiolytic-like effects induced by acute diazepam or RS67333 administration.

First, to target opsin expression selectively to cortical glutamatergic projections to the DRN, we employed a AAV5-CaMKIIα-virus, that specifically expresses ChR2 in mPFC pyramidal

cell terminals in the DRN (Figures 3A-3B). AAV5-CaMKIIα-ChR2-eYFP injected mice were compared to AAV5-CaMKII-eYFP -injected control. In the EPM, we found that illumination of mPFC pyramidal neurons projecting to the DRN in CamKII-ChR2-injected BALB/cJRj mice induced a significant increase in the time spent in the open arms in comparison to light OFF and also to control group (two-way ANOVA, *p<0.05, Figures 3C-3D). It is unlikely that this effect was the consequence of a change in locomotor activity, as the total ambulatory distance was not affected in comparison to eYFP control animals (Figure 3E). Moreover, the ratio of ambulatory distance in open arms divided by total distance was increased in CamKII-ChR2-injected mice during light ON in comparison to light OFF (two-way ANOVA, **p<0.01, Figure 3E; two-way ANOVA, *p<0.05, Figure 3F).

Next, we probed the effects of optogenetic inhibition of mPFC projections to the DRN after cortical infusion of RS67333 or diazepam (Figures 4A). AAV5-CaMKII-ArchT injected mice in the mPFC showed robust expression of ArchT-GFP in mPFC but also in cortical glutamatergic terminals in the DRN (Figures 4B). In the EPM, RS67333 (0.5 µg/side) and diazepam (1.5 µg/side) -injected in the mPFC of CamKII-ArchT mice -increased time spent in the open arms during light OFF was reversed during a 3-min green light illumination (70.64 ±7.8 % and 85.38 ±5.5 % of inhibition for RS67333 and diazepam respectively, two-way ANOVA, **p<0.01, Figures 4C-4D). Similarly, acute RS67333 and diazepam -increased the ratio of ambulatory distance in open arms divided by total distance during light OFF in comparison to controls was blocked during light ON, confirming anxiolytic effects of both drugs (two-way ANOVA, **p<0.01, Figures 4F). No changes in ambulatory distance were observed during light OFF or light ON (Figures 4E-4F). These data support the importance of the mPFC-DRN neural circuit in the anxiolytic-like activity of RS67333 and diazepam, despite different pharmacological targets.

We then proceeded to investigate whether mPFC terminals targeting to the DRN circuit could be necessary and sufficient for fast anxiolytic-like effects induced by acute diazepam or RS67333 treatment (Figures 4A-4B). In the EPM paradigm, as previously shown, acute systemic administration of RS67333 (1.5 mg/kg) or diazepam (1.5 mg/kg) in CaMKII-ArchT -mPFC injected mice elicited an anxiolytic-like effect without affecting locomotor activity during the OFF and ON epoch (two-way ANOVA, **p<0.01, Figures 4G-4J). A partial, but significant, decrease in time spent in the open arms was observed during a 3-minute green-light illumination of cortical glutamatergic terminals in the DRN after acute systemic RS67333 treatment. A similar decrease in anxiolytic-like effect after acute diazepam treatment, even though not significant (p=0.09), was observed during the ON epochs (61.45 ±4.7% and 61.10 ±3.1% for RS67333 and diazepam respectively; two-way ANOVA, *p<0.05, Figures 4G-4J).

DISCUSSION

Acute 5-HT$_4$R activation and fast anxiolytic-like effects.

Beyond the role of 5-HT$_4$R agonist in antidepressant-like action, our study provides evidence in a mouse strain with a high anxiety level that its stimulation induced fast anxiolytic-like effects similar to diazepam in two different anxiety paradigms, namely EPM and NSF. Interestingly, unlike RS67333, acute systemic administration of fluoxetine did not affect anxiety-like behavior, confirming previous observations with monoaminergic antidepressant drugs (23). These data also suggest that rapid anxiolytic-like activity requires selective activation of some key postsynaptic receptors such as the 5-HT$_4$R or the 5-HT$_{1A}$R (31) more than a global increase in 5-HT neurotransmission.

Involvement of mPFC-DRN circuit for the 5-HT$_4$R activation-mediated rapid anxiolytic-like activity.

In humans and also in rodents, 5-HT$_4$R are mainly localized in limbic area involved in psychiatric disorders, such as anxiety (28, 32). Then we explored the role of the 5-HT$_4$R expressed in mPFC activation in fast anxiolytic-like effects. Indeed, 5-HT$_4$R is expressed in excitatory pyramidal neurons of the mPFC, a region showing glutamate dysregulation of the functional activity in patients with generalized anxiety disorders (33, 34). Interestingly, fast anxiolytic-like effects observed after acute systemic administration of RS67333 were reproduced by an acute infusion of 5-HT$_4$R agonist (RS67333, 0.5 µg/side) in mPFC in BALB/cJRj. Indeed, after a bilateral infusion with RS67333, similar to diazepam, there was an increase in time spent in open arms in the EPM and a decrease in latency to feed was observed in the NSF. Our results are in line with previous results showing that 5-HT$_4$R overexpression in the mPFC yields a robust anxiolytic-like behavioral phenotype (13, 35).

Anatomical studies revealed that the insular cortex makes up a larger proportion of inputs to DRN 5-HT neurons compared to other neurotransmitters (36). This connectivity has attracted great interest as a potential circuit involved in modulating stress and depressive behaviors (16). For example, stressor exposure (*i.e.,* inescapable shock) in rodents increased the number of cFos protein expression in 5-HT-labeled neurons in the middle and caudal regions of the DRN, suggesting an increased neural activation of this structure in anxiogenic situations (37). There is also accumulating evidence that 5-HT$_4$R activation in the mPFC controls the firing rate of midbrain serotonergic neurons via descending inputs (13, 38). A reduce spontaneous activity of 5-HT neurons and a decrease in 5-HT content in the DRN of 5-HT$_4$R-null mice were observed (39). Conversely, administration of RS67333 in rat, at different time points, drives effects on DRN 5-HT

neuronal activity (13, 30, 40), and increase 5-HT release at projection sites (41). We showed that acute systemic injection of RS67333 enhances the firing rate of DRN 5-HT neurons in mice, suggesting that the fast anxiolytic-like activity of the 5-HT$_4$R agonist is dependent on activation of this neuronal population, despite the fact that DRN does not express 5-HT$_4$R (28). In fact, the fast onset of action of the 5-HT$_4$R agonist could be a consequence of an increase in serotonergic output to projection areas including the mPFC (13, 42). These results are supported by the fact that the depletion of whole brain 5-HT content by pre-treatment with systemic PCPA prevented RS67333-induced anxiolytic-like phenotype, while PCPA alone did not affect behavior as previously reported (43). Interestingly, despite different pharmacological targets, the 5-HT$_4$R agonist and BZD shared a common anxiolytic-like activity with similar efficiency suggesting activation of 5-HT neurotransmission and possibly common neural circuit recruitment by these two drugs. Under our experimental conditions, anxiolytic-like activity of intra-mPFC infusion of diazepam was blocked by a pre-treatment with PCPA, suggesting a participation of 5-HT system in this activity. Nevertheless, conversely to RS67333, diazepam, a positive GABA$_A$ receptor modulator, probably does not directly affect the 5-HT system since it does not seem to alter the spontaneous firing rate of DRN 5-HT neurons (44), although it does require an intact 5-HT system to exert its fast anxiolytic-like activity.

Knowing that 5-HT-producing neurons in the DRN are preferentially modulated by monosynaptic glutamatergic inputs from the mPFC (36), we used a CamKII promoter to target glutamatergic pyramidal neurons and evaluate this neuronal brain circuit involved in fast anxiolytic-like effects. Illumination of ChR2-expressing mPFC neurons in the DRN of anxious BALB/cJRj mouse strain induced an anxiolytic-like effect, measured as an increase in the time spent in the open arms, an effect similarly to intra-mPFC RS67333 and

diazepam. This result emphasizes the role of the mPFC-brainstem DRN neural circuit in fast anxiolytic-like effects. Multiple studies have implicated the mPFC-DRN circuit in the regulation of behavioral response to aversive challenges. For example, deep brain stimulation (DBS) in the ventromedial PFC of chronic social defeat (SD) mice restored social interaction (45). At the same time, 1-hour DBS in naïve mice and chronic DBS in chronic SD mice, increased cFos immunoreactivity in the DRN and reversed SD-induced hypoexcitability of DRN 5-HT neurons, respectively (45). In SD mice, chronic photoactivation of mPFC pyramidal cells increased the time spent in the open arms in the EPM (17), whereas stimulation had no effect on anxiety-related behavior in non-stressed animals (17, 46). Conversely, photosilencing mPFC terminals in the DRN prevented a decrease in social interaction in SD mice, suggesting its contributing role in anxiety-like behavior (18).

To ensure that the behavioral response to local 5-HT$_4$R agonist infusion is in line with the idea that glutamatergic mPFC pyramidal neurons are mediators of 5-HT$_4$R agonist -driven effects on DRN 5-HT neuronal activity, we optogenetically silenced incoming cortical glutamatergic terminals in the DRN. Inhibition of these projections reversed the anxiolytic-like behavior induced by intra-mPFC RS67333 and diazepam administration, confirming that the cortex-raphe circuit recruitment is essential for rapid anxiolytic-like activity (35). Interestingly, in line with our results, a recent study show that rescuing the mPFC-5-HT$_4$R expression in 5-HT$_4$R KO mice partly reduced stress levels (29). Although these results were not surprising for the 5-HT$_4$R agonist, they were unexpected for diazepam. However, cortical GABA$_A$ receptor activation through intra-mPFC muscimol infusion (a direct agonist of GABA$_A$ receptor) has been proposed to attenuate anxiety-related behavior in adult Wistar rats (47). These findings indicate that despite different

pharmacological targets, 5-HT$_4$R agonist and BZD share common mechanisms to induce fast anxiolytic-like effect through prefrontal cortex-DRN brainstem neural circuit recruitment.

In order to evaluate whether mPFC-DRN circuit recruitment is necessary and sufficient in the fast anxiolytic-like activity related to 5-HT$_4$R activation, we investigated the consequences of optogenetic inhibition of the mPFC terminals in the DRN after acute systemic administration of diazepam and RS67333. Thus, only a partial inhibition of acute systemic administration with RS67333 or diazepam –induced anxiolytic-like effects was observed after inhibition of cortical glutamatergic terminals in the DRN, suggesting that other brain structures might be involved in the fast anxiolytic-like activity of BZD and 5-HT$_4$R agonist. These results are not surprising knowing that other subset of essential circuits involved in anxiety-related behaviors such as the ventral hippocampus to prefrontal cortex (48), prefrontal cortex to basolateral amygdala (49), basolateral amygdala to ventral hippocampus (50) or DRN to bed nucleus of the stria terminalis (31) inputs (Figure 5). For instance, RS67333 administration into the basolateral amygdala, hippocampus, or nucleus basalis magnocellularis modulated also emotional memory formation and consolidation (21, 51, 52), suggesting that the anxiolytic-like effect of 5-HT$_4$R agonist might depend on these different limbic areas. Interestingly, we found that silencing this circuit prevented at least in part the anxiolytic-like activity of diazepam. Many other structures express the GABA$_A$ receptor and the 5-HT$_4$R in the whole brain, but it seems that mPFC-DRN circuit is necessary but not sufficient crossroad for diazepam and 5-HT$_4$R-mediated fast anxiolytic-like activity. Future studies should examine how brain structures also involved in anxiety phenotype interact with the mPFC-DRN circuit for fast anxiolytic-like activity and also whether 5-HT$_4$R expression in the mPFC is responsible for fast anxiolytic-like effect of

diazepam since diazepam have been shown to be dose-dependently inhibited by antagonists of the 5-HT$_4$R (53).

Taken together, our study reveals striking pathway-specific control of fast anxiolytic-like behavior. Stimulating 5-HT$_4$R in the mPFC or more generally mPFC-brainstem DRN neural circuit recruitment could represent an innovative and rapid onset therapeutic approach to treat anxiety.

Acknowledgements

We thank K. Deisseroth and E. Boyden for AAV5-CaMKII-hChR2(H134R)-EYFP, AAV5-CaMKII-ArchT-GFP or AAV5-CaMKII-eYFP, M. Kheirbeck and J. McGowan for comments on previous drafts. We also thank L. Tritschler, C. Defaix, T.H. Pham and V. Domergue and the staff of the animal care facility of the SFR-UMS Institut Paris-Saclay Innovation Thérapeutique for their technical support. This work was supported by a National Alliance for Research on Schizophrenia and Depression (NARSAD) 2017 Young Investigator award from Brain & Behavior Research Foundation and Deniker Foundation (I.M.D).

Contribution

C.F, C.A.D, B.P.G, R.H, A.M.G, I.M.D, D.J.D conceived, planned, oversaw the study. C.F, B.P.G, I.M.D, D.J.D performed the experiments. C.F analyzed the data. C.F, I.M.D, D.J.D wrote the paper. CAD, B.P.G, R.H, A.M.G assisted in revising the manuscript. I.M.D and DJD obtained funding and resource used in the experiments.

Disclosures

DJD serves as a consultant for Lundbeck Inc. DJD receives compensation from Lundbeck and Janssen. DJD, IMD, CF, AMG, CAD are named on non-provisional patent applications for the prophylactic use of RS67333 against stress-related psychiatric disorders. RH receives compensation as a consultant for Roche, Lundbeck and Servier in relation to the generation of novel antidepressants. CAD is named on non-provisional

patent applications for the prophylactic use of ketamine against stress-related psychiatric disorders. BPG reports no biomedical financial interests or potential conflicts of interest.

REFERENCES

1. Kheirbek MA, Klemenhagen KC, Sahay A, Hen R (2012): Neurogenesis and generalization: a new approach to stratify and treat anxiety disorders. *Nat Neurosci*. 15:1613-1620.

2. Kessler RC, Chiu WT, Demler O, Merikangas KR, Walters EE (2005): Prevalence, severity, and comorbidity of 12-month DSM-IV disorders in the National Comorbidity Survey Replication. *Arch Gen Psychiatry*. 62:617-627.

3. Klein E (2002): The role of extended-release benzodiazepines in the treatment of anxiety: a risk-benefit evaluation with a focus on extended-release alprazolam. *J Clin Psychiatry*. 63 Suppl 14:27-33.

4. Bystritsky A (2006): Treatment-resistant anxiety disorders. *Mol Psychiatry*. 11:805-814.

5. Mendez-David I, David DJ, Darcet F, Wu MV, Kerdine-Romer S, Gardier AM, et al. (2014): Rapid anxiolytic effects of a 5-HT(4) receptor agonist are mediated by a neurogenesis-independent mechanism. *Neuropsychopharmacology*. 39:1366-1378.

6. Samuels BA, Mendez-David I, Faye C, David SA, Pierz KA, Gardier AM, et al. (2016): Serotonin 1A and Serotonin 4 Receptors: Essential Mediators of the Neurogenic and Behavioral Actions of Antidepressants. *Neuroscientist*. 22:26-45.

7. Amigo J, Diaz A, Pilar-Cuellar F, Vidal R, Martin A, Compan V, et al. (2016): The absence of 5-HT4 receptors modulates depression- and anxiety-like responses and influences the response of fluoxetine in olfactory bulbectomised mice: Adaptive changes in hippocampal neuroplasticity markers and 5-HT1A autoreceptor. *Neuropharmacology*. 111:47-58.

8. Bockaert J, Claeysen S, Compan V, Dumuis A (2004): 5-HT4 receptors. *Curr Drug Targets CNS Neurol Disord*. 3:39-51.

9. Kennett GA, Bright F, Trail B, Blackburn TP, Sanger GJ (1997): Anxiolytic-like actions of the selective 5-HT4 receptor antagonists SB 204070A and SB 207266A in rats. *Neuropharmacology*. 36:707-712.

10. Silvestre JS, Fernandez AG, Palacios JM (1996): Effects of 5-HT4 receptor antagonists on rat behaviour in the elevated plus-maze test. *Eur J Pharmacol*. 309:219-222.

11. Bell R, Duke AA, Gilmore PE, Page D, Begue L (2014): Anxiolytic-like effects observed in rats exposed to the elevated zero-maze following treatment with 5-HT2/5-HT3/5-HT4 ligands. *Sci Rep*. 4:3881.

12. Abboussi O, Said N, Fifel K, Lakehayli S, Tazi A, El Ganouni S (2016): Behavioral effects of D3 receptor inhibition and 5-HT4 receptor activation on animals undergoing chronic cannabinoid exposure during adolescence. *Metab Brain Dis*. 31:321-327.

13. Lucas G, Compan V, Charnay Y, Neve RL, Nestler EJ, Bockaert J, et al. (2005): Frontocortical 5-HT4 receptors exert positive feedback on serotonergic activity: viral transfections, subacute and chronic treatments with 5-HT4 agonists. *Biol Psychiatry*. 57:918-925.

14. Davidson RJ (2002): Anxiety and affective style: role of prefrontal cortex and amygdala. *Biol Psychiatry*. 51:68-80.

15. Riga D, Matos MR, Glas A, Smit AB, Spijker S, Van den Oever MC (2014): Optogenetic dissection of medial prefrontal cortex circuitry. *Front Syst Neurosci*. 8:230.

16. Warden MR, Selimbeyoglu A, Mirzabekov JJ, Lo M, Thompson KR, Kim SY, et al. (2012): A prefrontal cortex-brainstem neuronal projection that controls response to behavioural challenge. *Nature*. 492:428-432.

17. Kumar S, Black SJ, Hultman R, Szabo ST, DeMaio KD, Du J, et al. (2013): Cortical control of affective networks. *J Neurosci*. 33:1116-1129.

18. Challis C, Beck SG, Berton O (2014): Optogenetic modulation of descending prefrontocortical inputs to the dorsal raphe bidirectionally bias socioaffective choices after social defeat. *Front Behav Neurosci*. 8:43.

19. Seo C, Guru A, Jin M, Ito B, Sleezer B, Ho YY, et al. (2019): Intense threat switches dorsal raphe serotonin neurons to a paradoxical operational mode. *Science*. 363:538-542.

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

21. Chegini HR, Nasehi M, Zarrindast MR (2014): Differential role of the basolateral amygdala 5-HT3 and 5-HT4 serotonin receptors upon ACPA-induced anxiolytic-like behaviors and emotional memory deficit in mice. *Behav Brain Res*. 261:114-126.

22. McMahon LR, Cunningham KA (1999): Antagonism of 5-hydroxytryptamine(4) receptors attenuates hyperactivity induced by cocaine: putative role for 5-hydroxytryptamine(4) receptors in the nucleus accumbens shell. *J Pharmacol Exp Ther*. 291:300-307.

23. David DJ, Klemenhagen KC, Holick KA, Saxe MD, Mendez I, Santarelli L, et al. (2007): Efficacy of the MCHR1 antagonist N-[3-(1-{[4-(3,4-difluorophenoxy)phenyl]methyl}(4-piperidyl))-4-methylphenyl]-2-m ethylpropanamide (SNAP 94847) in mouse models of anxiety and depression following acute and chronic

administration is independent of hippocampal neurogenesis. *J Pharmacol Exp Ther*. 321:237-248.

24. Petit-Demouliere B, Masse F, Cogrel N, Hascoet M, Bourin M (2009): Brain structures implicated in the four-plate test in naive and experienced Swiss mice using injection of diazepam and the 5-HT2A agonist DOI. *Behav Brain Res*. 204:200-205.

25. Pham TH, Mendez-David I, Defaix C, Guiard BP, Tritschler L, David DJ, et al. (2017): Ketamine treatment involves medial prefrontal cortex serotonin to induce a rapid antidepressant-like activity in BALB/cJ mice. *Neuropharmacology*. 112:198-209.

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

27. Guiard BP, Chenu F, El Mansari M, Blier P (2011): Characterization of the electrophysiological properties of triple reuptake inhibitors on monoaminergic neurons. *Int J Neuropsychopharmacol*. 14:211-223.

28. Vilaro MT, Cortes R, Mengod G (2005): Serotonin 5-HT4 receptors and their mRNAs in rat and guinea pig brain: distribution and effects of neurotoxic lesions. *J Comp Neurol*. 484:418-439.

29. Jean A, Laurent L, Delaunay S, Doly S, Dusticier N, Linden D, et al. (2017): Adaptive Control of Dorsal Raphe by 5-HT4 in the Prefrontal Cortex Prevents Persistent Hypophagia following Stress. *Cell Rep*. 21:901-909.

30. Moha ou Maati H, Bourcier-Lucas C, Veyssiere J, Kanzari A, Heurteaux C, Borsotto M, et al. (2016): The peptidic antidepressant spadin interacts with prefrontal 5-HT(4) and mGluR(2) receptors in the control of serotonergic function. *Brain Struct Funct*. 221:21-37.

31. Garcia-Garcia AL, Canetta S, Stujenske JM, Burghardt NS, Ansorge MS, Dranovsky A, et al. (2017): Serotonin inputs to the dorsal BNST modulate anxiety in a 5-HT1A receptor-dependent manner. *Mol Psychiatry*.

32. Waeber C, Sebben M, Nieoullon A, Bockaert J, Dumuis A (1994): Regional distribution and ontogeny of 5-HT4 binding sites in rodent brain. *Neuropharmacology*. 33:527-541.

33. Paulesu E, Sambugaro E, Torti T, Danelli L, Ferri F, Scialfa G, et al. (2010): Neural correlates of worry in generalized anxiety disorder and in normal controls: a functional MRI study. *Psychol Med*. 40:117-124.

34. Wang Y, Chai F, Zhang H, Liu X, Xie P, Zheng L, et al. (2016): Cortical functional activity in patients with generalized anxiety disorder. *BMC Psychiatry*. 16:217.

35. Castello J, LeFrancois B, Flajolet M, Greengard P, Friedman E, Rebholz H (2017): CK2 regulates 5-HT4 receptor signaling and modulates depressive-like behavior. *Mol Psychiatry*.

36. Weissbourd B, Ren J, DeLoach KE, Guenthner CJ, Miyamichi K, Luo L (2014): Presynaptic partners of dorsal raphe serotonergic and GABAergic neurons. *Neuron*. 83:645-662.

37. Grahn RE, Will MJ, Hammack SE, Maswood S, McQueen MB, Watkins LR, et al. (1999): Activation of serotonin-immunoreactive cells in the dorsal raphe nucleus in rats exposed to an uncontrollable stressor. *Brain Res*. 826:35-43.

38. Lucas G (2009): Serotonin receptors, type 4: a new hope? *Curr Drug Targets*. 10:1085-1095.

39. Conductier G, Dusticier N, Lucas G, Cote F, Debonnel G, Daszuta A, et al. (2006): Adaptive changes in serotonin neurons of the raphe nuclei in 5-HT(4) receptor knock-out mouse. *Eur J Neurosci*. 24:1053-1062.

40. Etiévant A, Lambas-Senas L, Abrial E, Bétry C, Haddjeri N, Lucas G (2011): Connection re-established: neurotransmission between the medial prefrontal cortex and serotonergic neurons o ers perspectives for fast antidepressant action. *Neuropsychiatry*. 1:165-177.

41. Ge J, Barnes NM (1996): 5-HT4 receptor-mediated modulation of 5-HT release in the rat hippocampus in vivo. *Br J Pharmacol*. 117:1475-1480.

42. Lucas G, Debonnel G (2002): 5-HT4 receptors exert a frequency-related facilitatory control on dorsal raphe nucleus 5-HT neuronal activity. *Eur J Neurosci*. 16:817-822.

43. du Jardin KG, Liebenberg N, Muller HK, Elfving B, Sanchez C, Wegener G (2016): Differential interaction with the serotonin system by S-ketamine, vortioxetine, and fluoxetine in a genetic rat model of depression. *Psychopharmacology (Berl)*. 233:2813-2825.

44. Gallager DW (1978): Benzodiazepines: potentiation of a GABA inhibitory response in the dorsal raphe nucleus. *Eur J Pharmacol*. 49:133-143.

45. Veerakumar A, Challis C, Gupta P, Da J, Upadhyay A, Beck SG, et al. (2014): Antidepressant-like effects of cortical deep brain stimulation coincide with pro-neuroplastic adaptations of serotonin systems. *Biol Psychiatry*. 76:203-212.

46. Covington HE, 3rd, Lobo MK, Maze I, Vialou V, Hyman JM, Zaman S, et al. (2010): Antidepressant effect of optogenetic stimulation of the medial prefrontal cortex. *J Neurosci*. 30:16082-16090.

47. Solati J, Hajikhani R, Golub Y (2013): Activation of GABAA receptors in the medial prefrontal cortex produces an anxiolytic-like response. *Acta Neuropsychiatr*. 25:221-226.

48. Padilla-Coreano N, Bolkan SS, Pierce GM, Blackman DR, Hardin WD, Garcia-Garcia AL, et al. (2016): Direct Ventral Hippocampal-Prefrontal Input Is Required for Anxiety-Related Neural Activity and Behavior. *Neuron*. 89:857-866.

49. Vialou V, Bagot RC, Cahill ME, Ferguson D, Robison AJ, Dietz DM, et al. (2014): Prefrontal cortical circuit for depression- and anxiety-related behaviors mediated by cholecystokinin: role of DeltaFosB. *J Neurosci*. 34:3878-3887.

50. Felix-Ortiz AC, Beyeler A, Seo C, Leppla CA, Wildes CP, Tye KM (2013): BLA to vHPC inputs modulate anxiety-related behaviors. *Neuron*. 79:658-664.

51. Orsetti M, Dellarole A, Ferri S, Ghi P (2003): Acquisition, retention, and recall of memory after injection of RS67333, a 5-HT(4) receptor agonist, into the nucleus basalis magnocellularis of the rat. *Learn Mem*. 10:420-426.

52. Nasehi M, Tabatabaie M, Khakpai F, Zarrindast MR (2015): The effects of CA1 5HT4 receptors in MK801-induced amnesia and hyperlocomotion. *Neurosci Lett*. 587:73-78.

53. Costall B, Naylor RJ (1997): The influence of 5-HT2 and 5-HT4 receptor antagonists to modify drug induced disinhibitory effects in the mouse light/dark test. *Br J Pharmacol*. 122:1105-1118.

Figure Legends

Figure 1. Acute 5-HT$_4$ receptor stimulation induces fast anxiolytic-like effects in an anxious BALB/cJRj mouse strain.

(A, B) Experimental design. In a first cohort of animals, vehicle (V), fluoxetine (F), diazepam (D), or RS67333 (RS) were administered i.p., 45 minutes before behavioral testing (A). In a second cohort of animals, treatments (V or RS) were infused in medial prefrontal cortex (mPFC) and diazepam administered i.p., 45 minutes before the start of behavioral paradigms (B). (C-D and G-H) Anxiolytic-like effect was measured in the elevated plus maze (EPM) as mean time spent in (C, G) or ratio ambulatory distance in open arms/total distance (D, H) (n = 10/group and n = 5-9/group for systemic and local injection study respectively). (E-F and I-J) In the Novelty Suppressed Feeding (NSF) paradigm, anxiolytic-like effect is expressed as cumulative survival of animals that have not eaten over 10 minutes (E, F), the food consumption (inset) or mean of latency to feed (I, J) (n = 10/group, n = 4-8/group). Values plotted are mean ± SEM. *p<0.05, **p<0.01 vs vehicle group.

Figure 2. Acute 5-HT$_4$ receptor stimulation induces fast anxiolytic-like effects on 5-HT function through a modulation of the mPFC in an anxious BALB/cJRj mouse strain.

(A) Before the administration of RS67333 (RS), different tracks were performed to record 5-HT neurons for 30 min. At the end of this period, RS67333 was administered i.p. and 30 min after, two or three subsequent tracks were realized. (B) Discharge frequency of DRN 5-HT neurons is assessed as mean firing rate. The number of neurons tested is indicated in each histogram. Data are mean ± frequency (Hz) of DRN 5-HT neurons determined

before the administration of RS67333. (C) Typical recordings of DRN 5-HT neurons in the different experimental conditions. **p<0.01 vs before RS67333 administration. (D) PCPA was injected i.p. twice a day during 3 days and treatments [vehicle (V), diazepam (D) and RS] were infused 24 hours after the final PCPA administration in the medial prefrontal cortex (mPFC) and 45 minutes before the start of behavioral paradigms. (E) Cortical 5-HT depletion by PCPA pre-treatment is measured as mean 5-HT levels (n = 6-8/group). (F and G) Anxiety is measured in the elevated plus maze (EPM) as mean time spent in (F) or ratio ambulatory distance in open arms/total distance (G) the open arms (n = 8-11/group). Values plotted are mean ± SEM. *p<0.05, **p<0.01 vs vehicle group, #p<0.05, ##p<0.01 vs appropriate group.

Figure 3. Effects of cortical terminals stimulation in the dorsal raphe nucleus of anxious BALB/cJRj mouse strain.

(A) Timeline regarding the behavioral consequences after stimulation of glutamatergic terminals in the DRN. AAV5-CamKIIα-ChR2-eYFP or AAV5-CamKII-eYFP virus were bilaterally injected in the medial prefrontal cortex (mPFC) and an optic fiber was implanted in the dorsal raphe nucleus (DRN), respectively 7 weeks and 1 week before testing in the Elevated Plus Maze (EPM). (B) Expression of virus was confirmed in the mPFC (left) and in the DRN (right). (C-E) After optogenetic stimulation (3-min ON and 3-min OFF), anxiolytic-like effect is measured in the EPM as time spent in the open arms between laser OFF and laser ON (C), as mean time spent in the open arms (D), as total ambulatory distance (E) or as the ratio of ambulatory distance in the open arms divided by total distance (F) (eYFP: n = 12/group; ChR2: n = 19/group). Values plotted are mean ± SEM.

*p<0.05, **p<0.01 between laser ON and laser OFF; @p<0.05, ##p<0.01 between CHR2 and eYFP group.

Figure 4. Modulation of anxiolytic-like activity following optogenetic inhibition of glutamatergic terminals in the DRN of anxious BALB/cJRj mouse strain.

(A) Timeline regarding the behavioral consequences after inhibition of glutamatergic terminals in the dorsal raphe nucleus (DRN) after medial prefrontal cortex (mPFC) infusion or systemic administration of diazepam (D), RS672333 (RS) or vehicle (V). AAV5-CamKII-ArchT-GFP virus was bilaterally injected in the mPFC, 7 weeks before testing. An optic fiber was implanted in the DRN, one week before testing. For the local injection protocol, two injection cannulae were also implanted in the mPFC. Drug treatment (V, D or RS) were infused in mPFC or injected i.p, 45 min before testing. (B) Expression of control CaMKII-ArchT-GFP virus was confirmed in the mPFC (left) and in the DRN (right). (C-J) For the behavioral consequences of a local infusion or systemic administration with vehicle, diazepam or RS67333, anxiolytic-like effect is measured in the elevated plus maze (EPM) as time spent in the open arms across 2 epoch stimulation (3-min OFF and 3-min ON) for each animals (C or G), as mean time spent in the open arms (D or H), as total ambulatory distance (E-I) or as the ratio of ambulatory distance in the open arms divided by total distance (F or J) (n = 7-11/group and n = 7-9/group for local and systemic administration respectively). Values plotted are mean ± SEM. *p<0.05, **p<0.01 vs. vehicle group, #p<0.05, ##p<0.01 vs. appropriate group.

Figure 5. Cartoon summarizing the neuronal circuits involved in fast anxiolytic-like effects induced by acute systemic RS67333 administration.

Acute systemic administration with the 5-HT$_4$R agonist RS67333 induces fast anxiolytic-like effects in BALB/cJRj mice through at least activation of the cortical glutamatergic terminals in the dorsal raphe nucleus (DRN) confirming previous studies (13). Our data also demonstrated that other brain structures might be involved in the fast anxiolytic-like activity of 5-HT$_4$R agonist. Previous studies demonstrated that hippocampus (HPC)/medial prefontal cortex (mPFC) (48) circuit and also the mPFC/amygdala pathway (50) are also recruited to modulate anxiety-like phenotype suggesting that these circuit should be also investigated for 5-HT$_4$R induced fast anxiolytic-like effects.

ARTICLE INFORMATION

Supplementary material cited in this article will be available online.

Figure 1

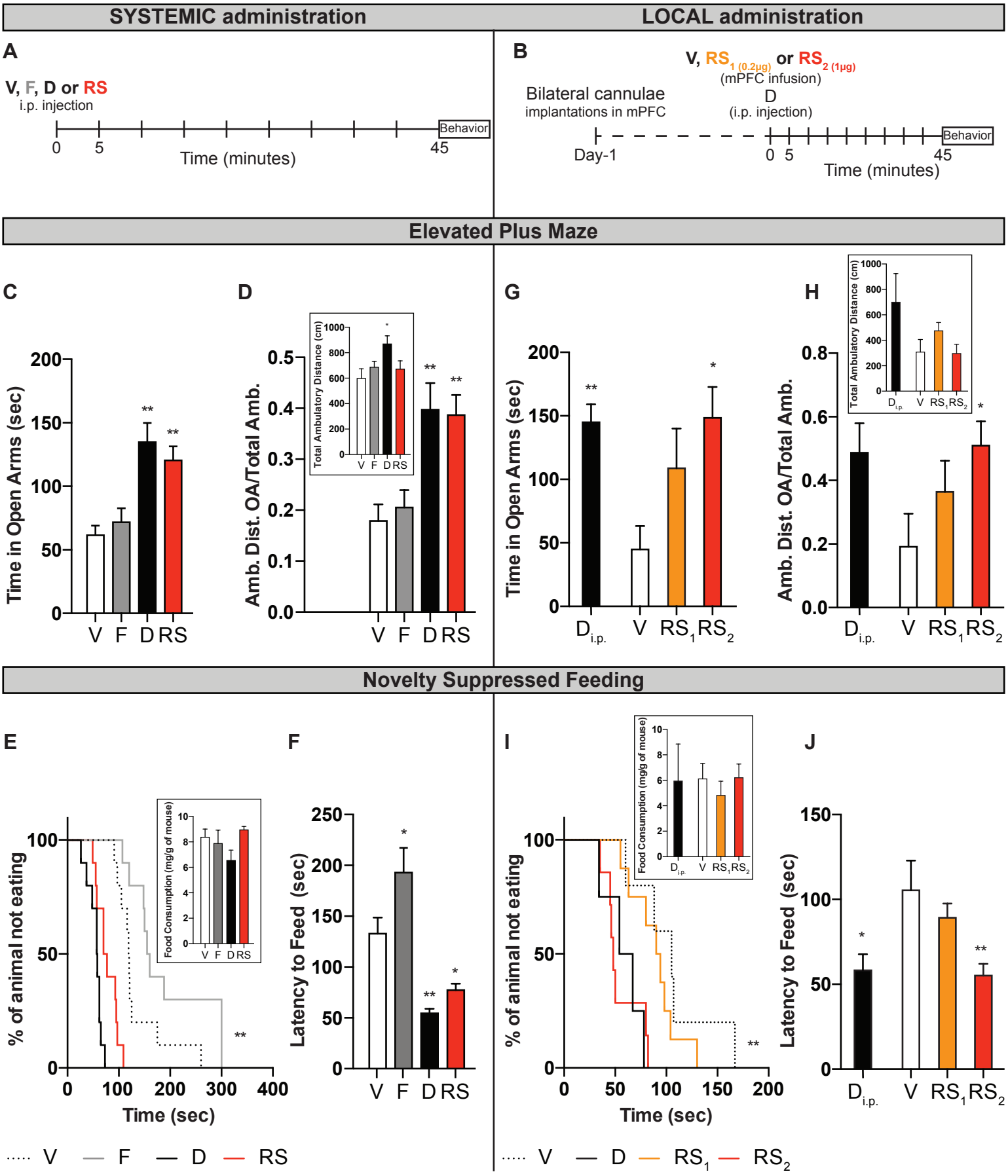

SYSTEMIC administration
LOCAL administration
A
V, F, D or RS
i.p. injection
Behavior
0
5
45
Time (minutes)
B
V, RS1 (0.2µg) or RS2 (1µg)
(mPFC infusion)
Bilateral cannulae
implantations in mPFC
D
(i.p. injection)
Day-1
Behavior
0 5
45
Time (minutes)
Elevated Plus Maze
C
Time in Open Arms (sec)
V F D RS
D
Amb. Dist. OA/Total Amb.
Total Ambulatory Distance (cm)
V F D RS
G
Time in Open Arms (sec)
D i.p. V RS1 RS2
H
Amb. Dist. OA/Total Amb.
Total Ambulatory Distance (cm)
D i.p. V RS1 RS2
Novelty Suppressed Feeding
E
% of animal not eating
Time (sec)
Food Consumption (mg/g of mouse)
V F D RS
F
Latency to Feed (sec)
V F D RS
I
% of animal not eating
Time (sec)
Food Consumption (mg/g of mouse)
D i.p. V RS1 RS2
J
Latency to Feed (sec)
D i.p. V RS1 RS2
V F D RS
V D RS1 RS2

Figure 2

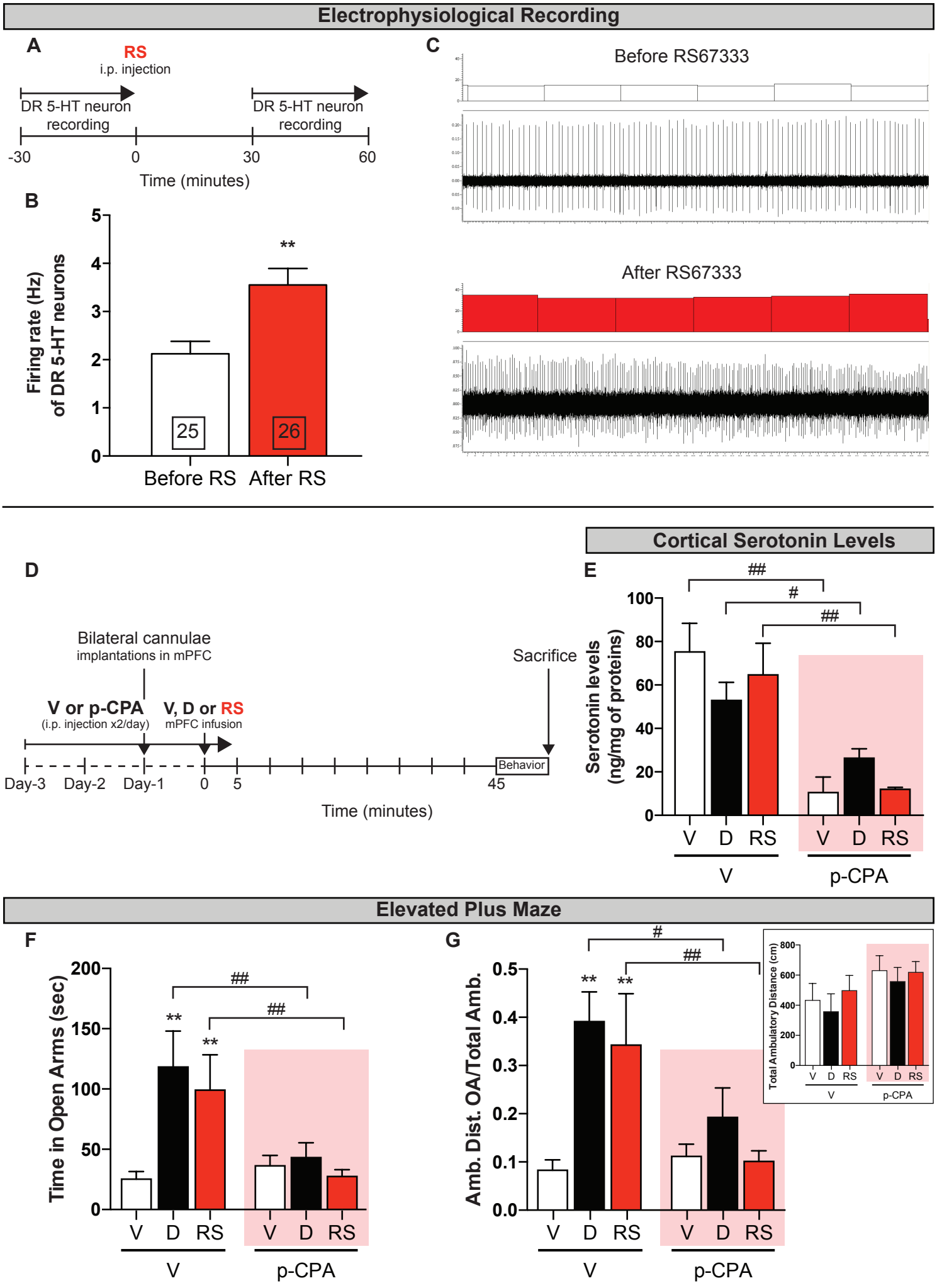

Electrophysiological Recording
A
RS
i.p. injection
DR 5-HT neuron recording
DR 5-HT neuron recording
-30
0
30
60
Time (minutes)
B
Firing rate (Hz) of DR 5-HT neurons
**
25
26
Before RS
After RS
C
Before RS67333
After RS67333
Cortical Serotonin Levels
D
Bilateral cannulae implantations in mPFC
V or p-CPA
(i.p. injection x2/day)
V, D or RS
mPFC infusion
Sacrifice
Behavior
Day-3
Day-2
Day-1
0
5
45
Time (minutes)
E
Serotonin levels (ng/mg of proteins)
##
#
##
V
D
RS
p-CPA
Elevated Plus Maze
F
Time in Open Arms (sec)
##
##
**
**
G
Amb. Dist. OA/Total Amb.
#
##
**
**
Total Ambulatory Distance (cm)

Figure 3

Figure 3

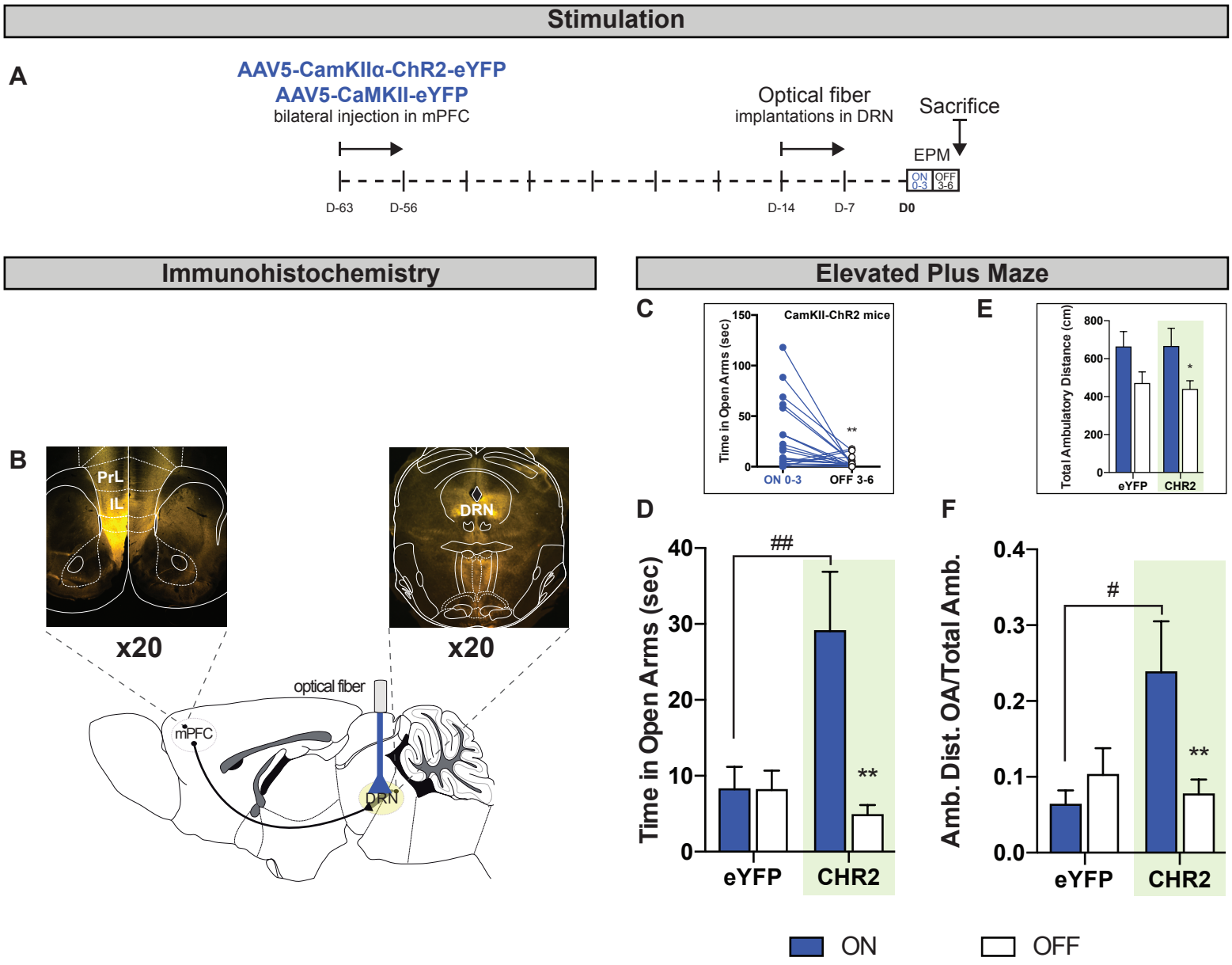
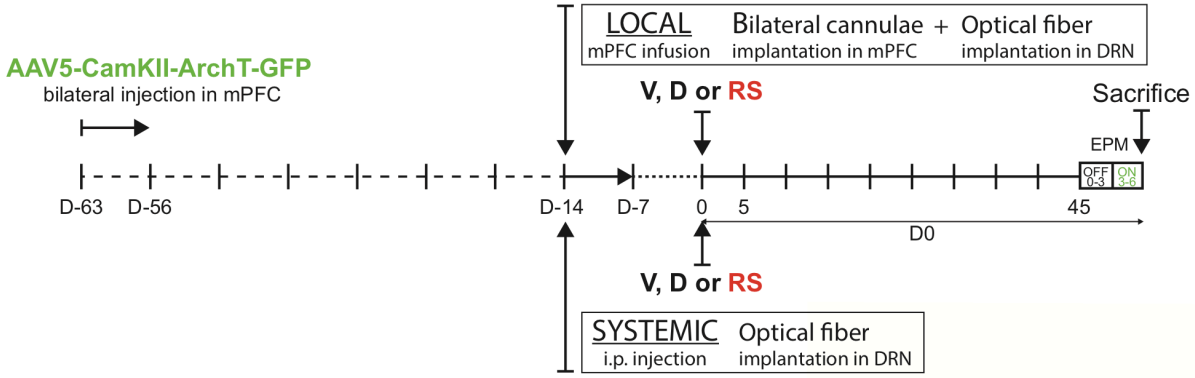


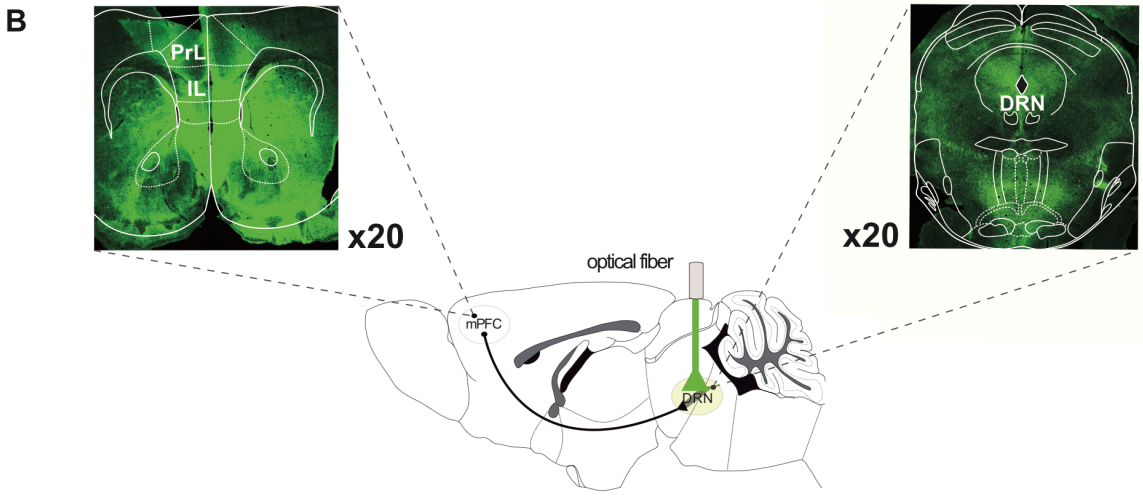
Figure 4

Inhibition

A



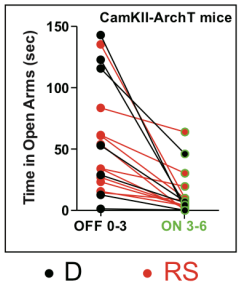
B



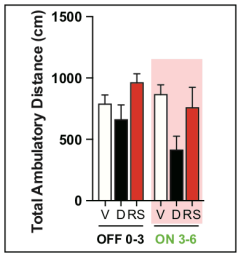
Elevated Plus Maze

LOCAL administration

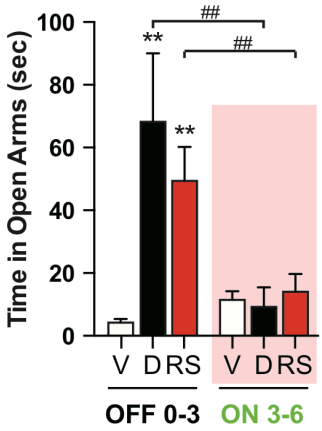
C



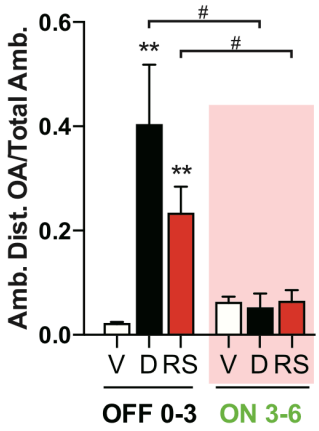
E



D

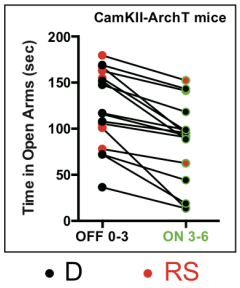


F

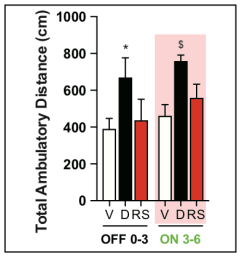


SYSTEMIC administration

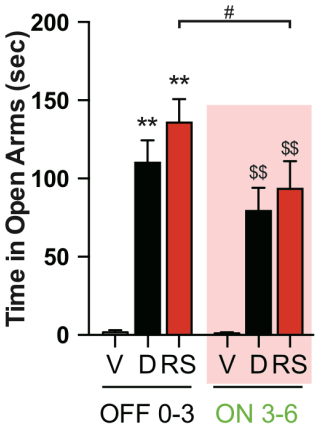
G



I



H



J

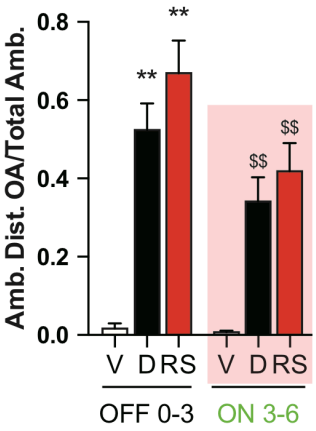
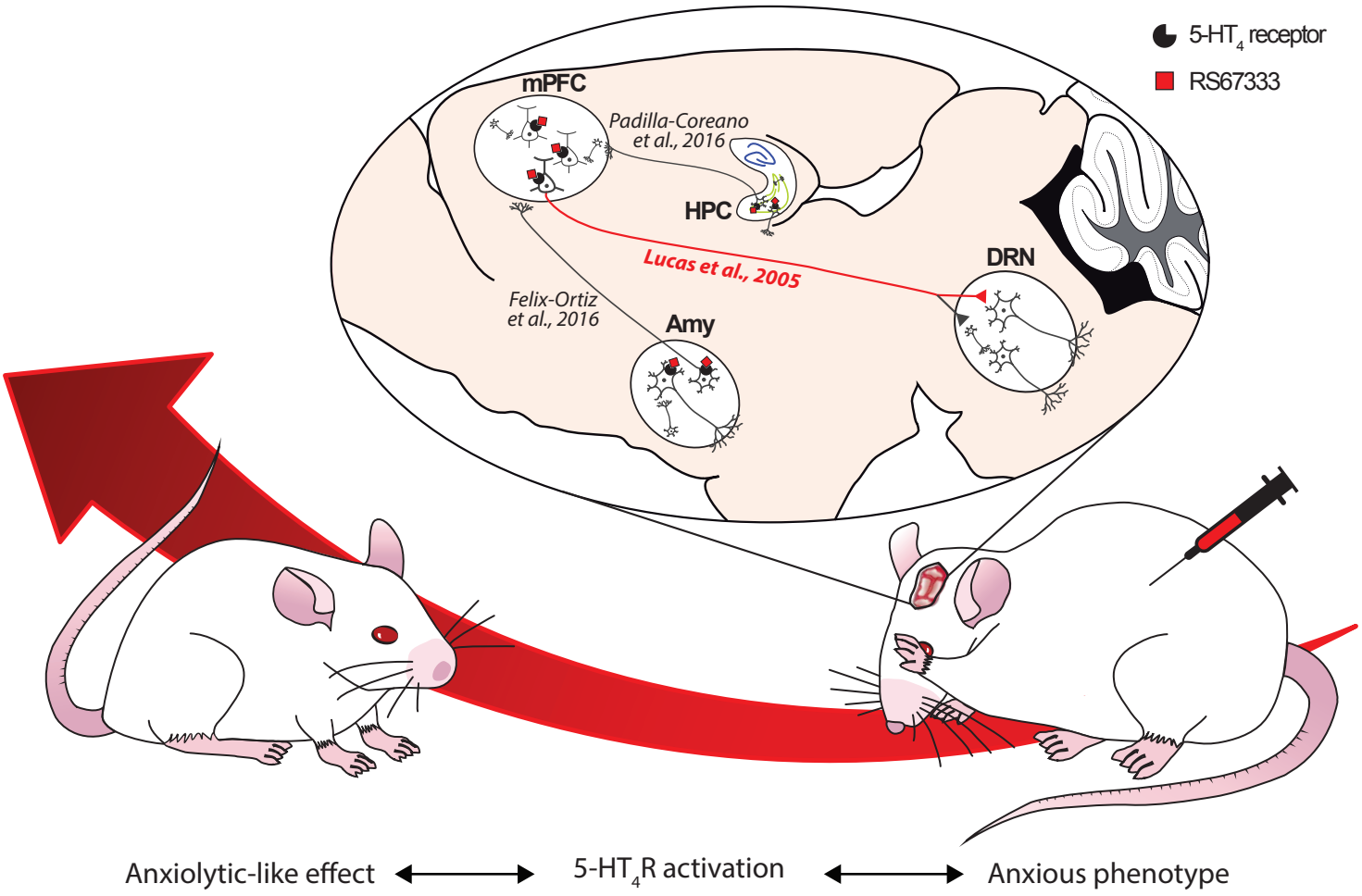


Figure 5

Rapid anxiolytic effects of 5-HT$_4$ receptor agonist involves prefrontal cortex-brainstem neural circuit recruitment



Supplemental Information
Click here to access/download;Supplemental Information;Paper_Supplemental.docx

SUPPLEMENTARY METHODS, RESULTS AND FIGURES FOR:

Rapid anxiolytic effects of serotonin type 4 receptor agonist involve prefrontal cortex-brainstem neural circuit recruitment

Charlene Faye[1], Rene Hen[2,3,4], Bruno P. Guiard[5], Christine A. Denny[2,3], Alain M. Gardier[1], Indira Mendez-David[1,*], Denis J. David[1,*,§]

[1]CESP/UMRS 1178, Univ Paris-Sud, Fac Pharmacie, INSERM, Université Paris-Saclay, Châtenay-Malabry, France

[2]Department of Psychiatry, Columbia University, New York, NY 10032, USA

[3]Division of Integrative Neuroscience, Research Foundation for Mental Hygiene, Inc (RFMH) / New York State Psychiatric Institute (NYSPI), New York, NY 10032, USA

[4]Department of Neuroscience, Columbia University, New York, NY 10032, USA

[5]UMR5169 CNRS “Centre de Recherches sur la Cognition Animale”, Toulouse, 31062, France

*shared co-last author, § To whom correspondence should be sent:

Pr Denis David

CESP/UMR-S 1178,

Univ. Paris-Sud, Fac Pharmacie, Inserm, Université Paris-Saclay

5, rue Jean-Baptiste Clément

92290 Chatenay-Malabry

Tel: +33146835968

Fax: +33146835355

Email: denis.david@u-psud.fr

SUPPLEMENTARY METHODS AND RESULTS

Drugs and Treatment

For mPFC drug infusion, two bilateral cannulae (75 µm-diameter silica capillary tubing inserted in 27G stainless steel catheter) were implanted in the medial prefrontal cortex (stereotaxic coordinates in mm from bregma: A = +2.10, L = ±0.50, V = -2.60, A, anterior; L, lateral; and V, ventral, according to (1)) under anesthesia (chloral hydrate, 400 mg/kg, i.p.). The following day, RS67333 (0.1 µg/side or 0.5 µg/side) was continuously perfused in awake freely moving mice at a flow rate of 0.2 µL/min during 2 minutes (LEGATO^{TM} 180 syringe pump, KD Scientific Inc., Holliston, MA, USA). Diazepam (1.5 mg/kg) was used as a positive control.

p-CPA was administered twice daily (at 0900 and 1700) for 3 consecutive days. RS67333 (0.5 µg/side) and diazepam (1.5 µg/side) were then intra-mPFC administered 24 h after the final p-CPA administration and behavioral test occurred 45 minutes after local infusion.

For the optogenetic experiments, similar doses of RS67333 and diazepam were infused in the mPFC.

To ensure the selectivity of the anxiolytic-like effects of RS67333, the serotonin 4 receptors (5-HT$_4$R) antagonist (1, 5-Fluoro-2- methoxy-[1-[2-[(methylsulfonyl)amino]ethyl]-4-piperidinyl]-1H-indole-3-methylcarboxylate sulfamate [GR125487, 1.0 mg/kg dissolved in 0.9% saline solution, intraperitoneally (i.p.)] was purchased from Tocris Bioscience (Bristol, UK). GR125487 was injected 15 minutes before RS67333 administration (1.5 mg/kg, i.p) and behavioral test occurred 45 minutes after RS67333 administration (2). Behavioral consequences of the co-administration of

GR125487+RS67333 were compared to RS67333 alone, diazepam (1.5 mg/kg, i.p) and fluoxetine (18 mg/kg, i.p) and vehicle groups (0.9% saline solution, i.p).

Behavioral tests

Elevated Plus Maze (EPM)

The elevated plus maze (EPM) is a widely used behavioral assay for rodents and it has been validated to assess the anti-anxiety effects of pharmacological agents (3). This test was performed as described by (2). The maze is a plus-cross-shaped apparatus, with two open arms and two arms closed by walls linked by a central platform 50 cm above the floor. Mice were individually put in the center of the maze facing an open arm and were allowed to explore the maze during 5 min. The time spent in and the number of entries into the open arms were used as an anxiety index. All parameters were measured using a videotracker (EPM3C, Bioseb, Vitrolles, France).

Novelty Suppressed Feeding (NSF).

The NSF is a conflict test that elicits competing motivations: the drive to eat and the fear of venturing into the center of a brightly lit arena. The latency to begin eating is used as an index of anxiety/depression-like behavior, because classical anxiolytic drugs as well as chronic antidepressants decrease this measure. The NSF test was carried out during a 10min period as previously described (4). Briefly, the testing apparatus consisted of a plastic box (50x50x20 cm), the floor of which was covered with approximately 2 cm of wooden bedding. Twenty-four hours prior to behavioral testing, all food was removed from the home cage. At the time of testing, a single pellet of food (regular chow) was placed on a white paper platform positioned in the center of the box. Each animal was

placed in a corner of the box, and a stopwatch was immediately started. The latency to eat (defined as the mouse sitting on its haunches and biting the pellet with the use of forepaws) was timed. Immediately afterwards, the animal was transferred to its home cage, and the amount of food consumed by the mouse in the subsequent 5 min was measured, serving as a control for change in appetite as a possible confounding factor.

Construction of optical fibers

As we previously described, for all experiments, a 200 µm core, 0.37 numerical aperture multimode fiber (ThorLabs, Maison Laffitte, France) was used for optical stimulation through a patch cable connected to a 100 mw 473 nm blue and 532 nm green laser diode (OEM laser systems) (5).

Histochemistry

For local treatment administrations, at the end of the experiments, mice were sacrificed and brains were quickly removed and then frozen on dry ice in order to histologically verify the localization of injection probe. Serial 20 µm-thick coronal sections were cryosectioned through the mPFC before to be fixed for one hour in 4% PFA, stained with 0.3% cresyl violet acetate for 1 min (Sigma-Aldrich, Saint-Quentin Fallavier, France), dehydrated in ethanol and coverslipped with Eukitt (Sigma-Aldrich, Saint-Quentin Fallavier, France). Animals presenting inadequate injection probe location were excluded.

For p-CPA study, immediately after behavioral tests, animals were sacrificed and frontal cortex were dissected and reduced in cortical brain homogenates for serotonin

concentration measurements by ELISA method (Labor Diagnostika Nord, Nordhorn, Germany) to verify the serotonin depletion of tissue content.

Immunohistochemistry

To ensure opsin expression, mice were perfused transcardially (0.9% cold saline for 2 minutes, followed by 4% cold paraformaldehyde) after anesthesia (100 mg/ml ketamine and 20 mg/ml xylazine, i.p.). Brains were removed and cryoprotected with 30% sucrose at 4°C. 35 µm-thick coronal sections were cut through the entire brain and stored in 1X phosphate buffered saline (PBS) with 0.1% sodium azide. Free-floating sections were incubated in a blocking buffer (0.5% triton X-100, 5% normal donkey serum (NDS), 1X PBS) for 2 hours at room temperature. eYFP and GFP were detected using rabbit GFP Tag polyclonal antibody (1:500, Thermo Fischer Scientific, catalog #A-11122) in the same buffer at 4°C overnight. Following washed in 1X PBS, secondary Cy3-AffiniPure donkey anti-rabbit antibody (1:250, Jackson Immunoresearch, 711-165-152) was added in 1X PBS with 10% NDS buffer for 2 hours at room temperature. After several rinses in 1X PBS, sections mounted on slide, air-dried, coverslipped with fluoromont and examined under confocal microspcopy (Olympus BX51) using appropriate filters.

SUPPLEMENTAL FIGURES

Supplemental figure 1

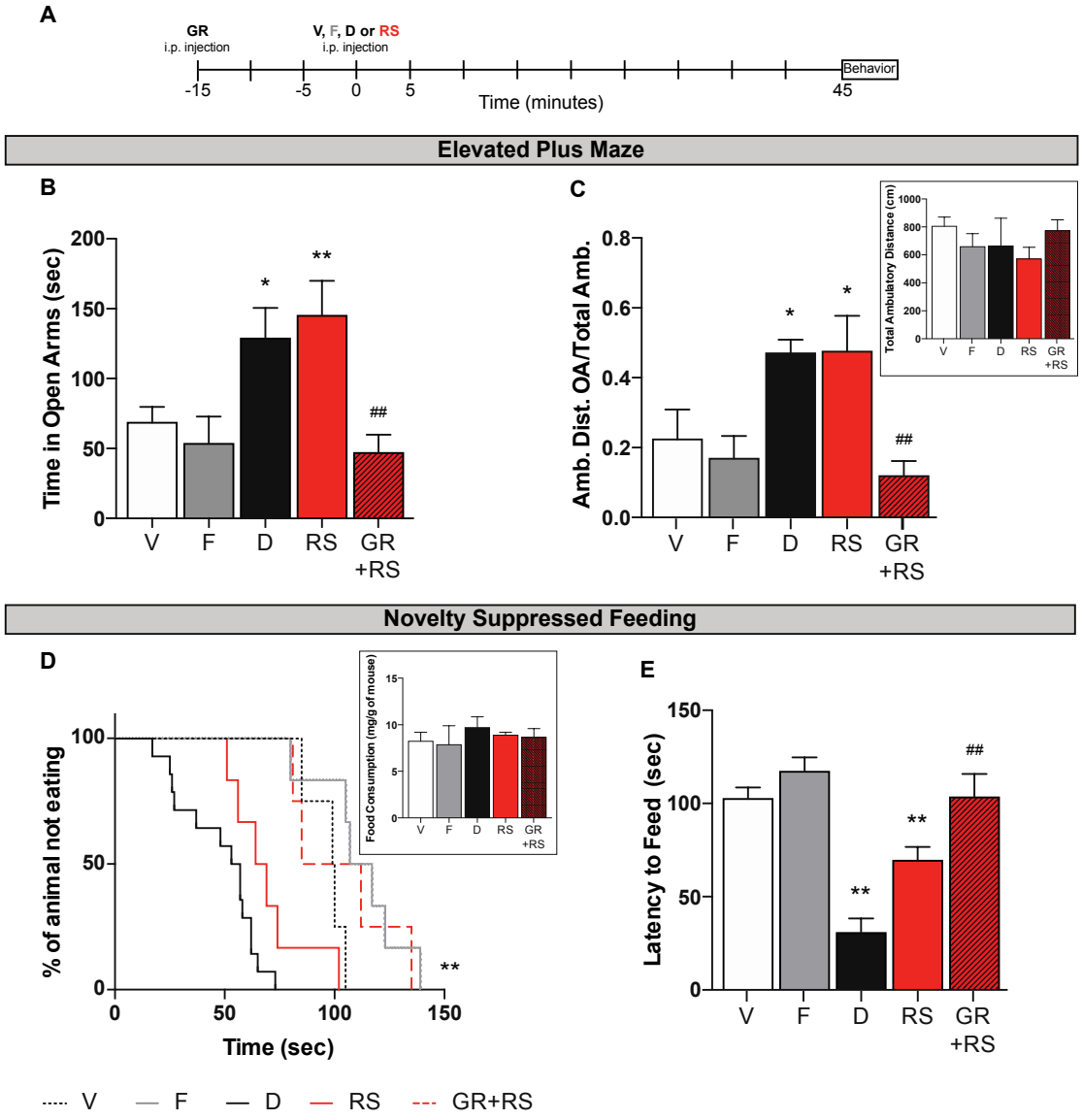


Figure S1. Acute 5-HT$_4$ receptor antagonist administration prevents RS67333-induced fast anxiolytic-like effects in an anxious BALB/cJRj mouse strain.

(A) Treatments (Fluoxetine 18 mg/kg, F; Diazepam 1.5 mg/kg, RS67333 1.5 mg/kg, RS) were administered intraperitoneally 45 minutes before behavioral testing, except for

GR125487 (GR, 1 mg/kg, i.p) administered 15 minutes before RS67333 administration. (B and C) After treatment administration, anxiety is measured in the elevated plus maze (EPM) as mean time spent in the open arms (B) or as the ratio of ambulatory distance in the open arms divided by total distance (C) (n = 5-6/group). (D and E) In the novelty suppressed feeding (NSF), anxiety is expressed as cumulative survival of animals that have not eaten over 10 minutes related to home-cage food consumption (D) or mean of latency to feed (E) (n = 4-6/group). Results from data analyses, expressed as mean ± SEM were analyzed using Prism 6.0h software (Graphpad, San Diego, CA, USA). One-way ANOVA was applied to the data as appropriate. Significant main effects were followed by Fisher's PLSD post-hoc analysis. In the NSF, the Kaplan-Meier survival analysis was used to evaluate differences between experimental groups due to the lack of normal distribution of the data and Mantel-Cox log rank test. Statistical significance was set at $p<0.05$. All statistical tests and p values are mean ± SEM. *$p<0.05$, **$p<0.01$ vs vehicle group (V), ##$p<0.01$ vs RS group.

SUPPLEMENTAL BIBLIOGRAPHY

1. Bi LL, Wang J, Luo ZY, Chen SP, Geng F, Chen YH, et al. (2013): Enhanced excitability in the infralimbic cortex produces anxiety-like behaviors. *Neuropharmacology*. 72:148-156.

2. Mendez-David I, David DJ, Darcet F, Wu MV, Kerdine-Romer S, Gardier AM, et al. (2014): Rapid anxiolytic effects of a 5-HT(4) receptor agonist are mediated by a neurogenesis-independent mechanism. *Neuropsychopharmacology*. 39:1366-1378.

3. Walf AA, Frye CA (2007): The use of the elevated plus maze as an assay of anxiety-related behavior in rodents. *Nat Protoc*. 2:322-328.

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

5. Tritschler L, Kheirbek MA, Dantec YL, Mendez-David I, Guilloux JP, Faye C, et al. (2017): Optogenetic activation of granule cells in the dorsal dentate gyrus enhances dopaminergic neurotransmission in the Nucleus Accumbens. *Neurosci Res*.

Supplementary Table 1: Overall statistical results

			ANALYSES					POST HOC									
	Test	Parameters	One-Way ANOVA F-value	One-Way ANOVA P-value	Log-rank (Mantel-Cox) test P-value	Student's test: diazepam vs vehicle	Student's test: RS67333 0.2µg vs vehicle	Student's test: RS67333 1µg vs vehicle	Dunnett's test: fluoxetine vs vehicle	Dunnett's test: diazepam vs vehicle	Dunnett's test: RS67333 vs vehicle	Dunnett's test: RS67333 1µg vs vehicle	Dunnett's test: RS67333 0.2µg vs vehicle	Fisher's test: fluoxetine vs vehicle	Fisher's test: diazepam vs vehicle	Fisher's test: RS67333 vs vehicle	Fisher's test: GR125487 vs vehicle	Fisher's test: RS67333 vs GR125487+RS6733
Figure 1																		
1C	**Elevated Plus Maze**	Time in Open Arms	F(3,36)=9.627	**<0.0001**					0.8671	**0.0002**	**0.0027**							
1D		Total Amb. Dist.	F(3,36)=3.313	**0.0307**					0.6412	**0.0125**	0.7558							
		Amb. Dist. OA/Total Amb.	F(3,36)=8.269	**0.0003**					0.9376	**0.0014**	**0.0024**							
1E		Fraction of animals not eating			**<0.0001**													
	Novelty Suppressed Feeding	Food consumption	F(3,36)=1.852	0.1552														
1F		Latency to Feed	F(3,36)=16.85	**<0.0001**					**0.0213**	**0.0021**	**0.0343**							
1G		Time in Open Arms	F(3,23)=2.783	0.0637														
						0.0025	0.1636	**0.0135**										
	Elevated Plus Maze	Total Amb. Dist.	F(3,23)=2.555	0.0802														
1H						0.1504	0.1732	0.9237										
		Amb. Dist. OA/Total Amb.	F(3,23)=2.122	0.1251														
						0.0669	0.2745	**0.0289**										
1I		Fraction of animals not eating			**< 0.0001**													
	Novelty Suppressed Feeding	Food consumption	F(3,20)=0.2432	0.8652														
1J		Latency to Feed	F(3,20)=5.051	**0.0091**						**0.033**		**0.0088**	0.5633					
Supplemental Figure 1																		
S2B	**Elevated Plus Maze**	Time in Open Arms	F(4,22)=5.797	**0.0024**										0.5965	**0.0435**	**0.0093**	0.4337	**0.0009**
S2C		Total Amb. Dist.	F(4,22)=0.7574	0.564														
		Amb. Dist. OA/Total Amb.	F(4,22)=5.550	**0.0030**										0.6076	**0.0317**	**0.0233**	0.3156	**0.0015**
S2D		Fraction of animals not eating			**<0.0001**													
	Novelty Suppressed Feeding	Food consumption	F(4,18)=0.3668	0.8291														
S2E		Latency to Feed	F(4,18)=15.85	**<0.0001**										0.2392	**< 0.0001**	**0.0068**	0.9443	**0.0088**

Supplementary Table 2: Overall statistical results

			ANALYSES						POST HOC						
	Test	Parameters	Student's test: after RS67333 vs before RS67333	Two-Way ANOVA F-value (Pretreatment effect)	Two-Way ANOVA P-value (Pretreatment effect)	Two-Way ANOVA F-value (Treatment effect)	Two-Way ANOVA P-value (Treatment effect)	Two-Way ANOVA F-value (Interaction)	Two-Way ANOVA P-value (Interaction)	Fisher's test: vehicle/diazepam vs vehicle/vehicle	Fisher's test: vehicle/RS67333 vs vehicle/vehicle	Fisher's test: pCPA/diazepam vs p-CPA/vehicle	Fisher's test: p-CPA/RS67333 vs p-CPA/vehicle	Fisher's test: p-CPA/vehicle vs vehicle/vehicle	Fisher's test: p-CPA/diazepam vs vehicle/diazepam	Fisher's test: p-CPA/RS67333 vs vehicle/RS67333
Figure 2																
2B	**Electrophysiology**	Firing rate of DRN 5-HT neurons	**0.0016**													
2E	**ELISA**	Serotonin levels		F(1,34)=45.25	**<0.0001**	F(2,34)=0.1347	0.8745	F(2,34)=2.593	0.0895					**<0.0001**	**0.0285**	**0.0002**
2F		Time in Open Arms		F(1,51)=10.53	**0.0021**	F(2,51)=4.568	**0.0150**	F(2,51)=4.300	**0.0188**	**0.0003**	**0.0041**	0.7780	0.6954	0.6200	**0.0036**	**0.0047**
2G	**Elevated Plus Maze**	Total Amb. Dist.		F(1,52)=4.432	**0.0401**	F(2,52)=0.5300	0.5918	F(2,52)=0.09717	0.9076					0.1625	0.1672	0.4054
		Amb. Dist. OA/Total Amb.		F(1,51)=10.16	**0.0024**	F(2,51)=7.107	**0.0019**	F(2,51)=3.920	**0.0261**	**0.0001**	**0.0014**	0.2827	0.8819	0.6927	**0.0118**	**0.0023**

Supplementary Table 3: Overall statistical results

	Test	Parameters	Two-Way ANOVA F-value (Virus effect)	Two-Way ANOVA P-value (Virus effect)	Two-Way ANOVA F-value (Laser effect)	Two-Way ANOVA P-value (Laser effect)	Two-Way ANOVA F-value (Interaction)	Two-Way ANOVA P-value (Interaction)	Fisher's test: GFP - laser ON vs laser OFF	Fisher's test: ChR2 - laser ON vs laser OF	Fisher's test: laser OFF - GFP vs ChR2	Fisher's test: laser ON - GFP vs ChR2
Figure 3												
3D	**Elevated Plus Maze**	Time in Open Arms	F(1,58)=2.779	0.1009	F(1,58)=5.348	**0.0243**	F(1,58)=5.282	**0.0252**	0.9928	**0.0005**	0.6571	**0.0069**
3E		Total Amb. Dist.	F(1,58)=0.03346	0.8555	F(1,58)=7.137	**0.0098**	F(1,58)=0.04611	0.8307	0.1221	**0.0239**		
3F		Amb. Dist. OA/Total Amb.	F(1,58)=2.491	0.1199	F(1,58)=1.663	0.2023	F(1,58)=4.512	**0.0379**	0.5961	**0.0081**	0.7009	**0.0113**

Supplementary Table 4: Overall statistical results

			ANALYSES						POST HOC						
	Test	Parameters	Two-Way ANOVA F-value (Virus or treatment effec	Two-Way ANOVA P-value (Virus or treatment effec	Two-Way ANOVA F-value (Laser effect)	Two-Way ANOVA P-value (Laser effect)	Two-Way ANOVA F-value (Interaction)	Two-Way ANOVA P-value (Interaction)	Laser OFF: diazepam vs sham	Laser OFF: RS67333 vs sham	Laser ON: diazepam vs sham	Laser ON: RS67333 vs sham	sham: laser OFF vs laser ON	diazepam: laser OFF vs laser ON	RS67333: laser OFF vs laser ON
Figure 4															
4D	**Elevated Plus Maze**	Time in Open Arms	F(2,46)=4.923	**0.0116**	F(1,46)=12.56	**0.0009**	F(2,46)=5.123	**0.0098**	**< 0.0001**	**0.0016**	0.8843	0.8463	0.6193	**0.0004**	**0.0064**
4E		Total Amb. Dist.	F(2,46)=4.139	**0.0222**	F(1,46)=1.621	0.2094	F(2,46)=1.046	0.3595	0.479	0.2848	**0.0149**	0.5078			
4F		Amb. Dist. OA/Total Amb.	F(2,46)=6.274	**0.0039**	F(1,46)=15.34	**0.0003**	F(2,46)=6.896	**0.0024**	**< 0.0001**	**0.0029**	0.8924	0.9732	0.5798	**< 0.0001**	**0.0087**
4H		Time in Open Arms	F(2,38)=33.42	**< 0.0001**	F(1,38)=4.601	**0.0384**	F(2,38)=1.052	0.3591	**< 0.0001**	**< 0.0001**	**0.0003**	**< 0.0001**	0.975	0.0901	0.0412
4I		Total Amb. Dist.	F(2,38)=6.499	**0.0037**	F(1,38)=1.762	0.1924	F(2,38)=0.04086	0.9600	**0.0276**	0.7185	**0.0196**	0.4541			
4J		Amb. Dist. OA/Total Amb.	F(2,38)=34.28	**< 0.0001**	F(1,38)=7.893	**0.0078**	F(2,38)=1.688	0.1984	**< 0.0001**	**< 0.0001**	**0.0007**	**0.0001**	0.9288	**0.0298**	**0.0095**

Résultats complémentaires

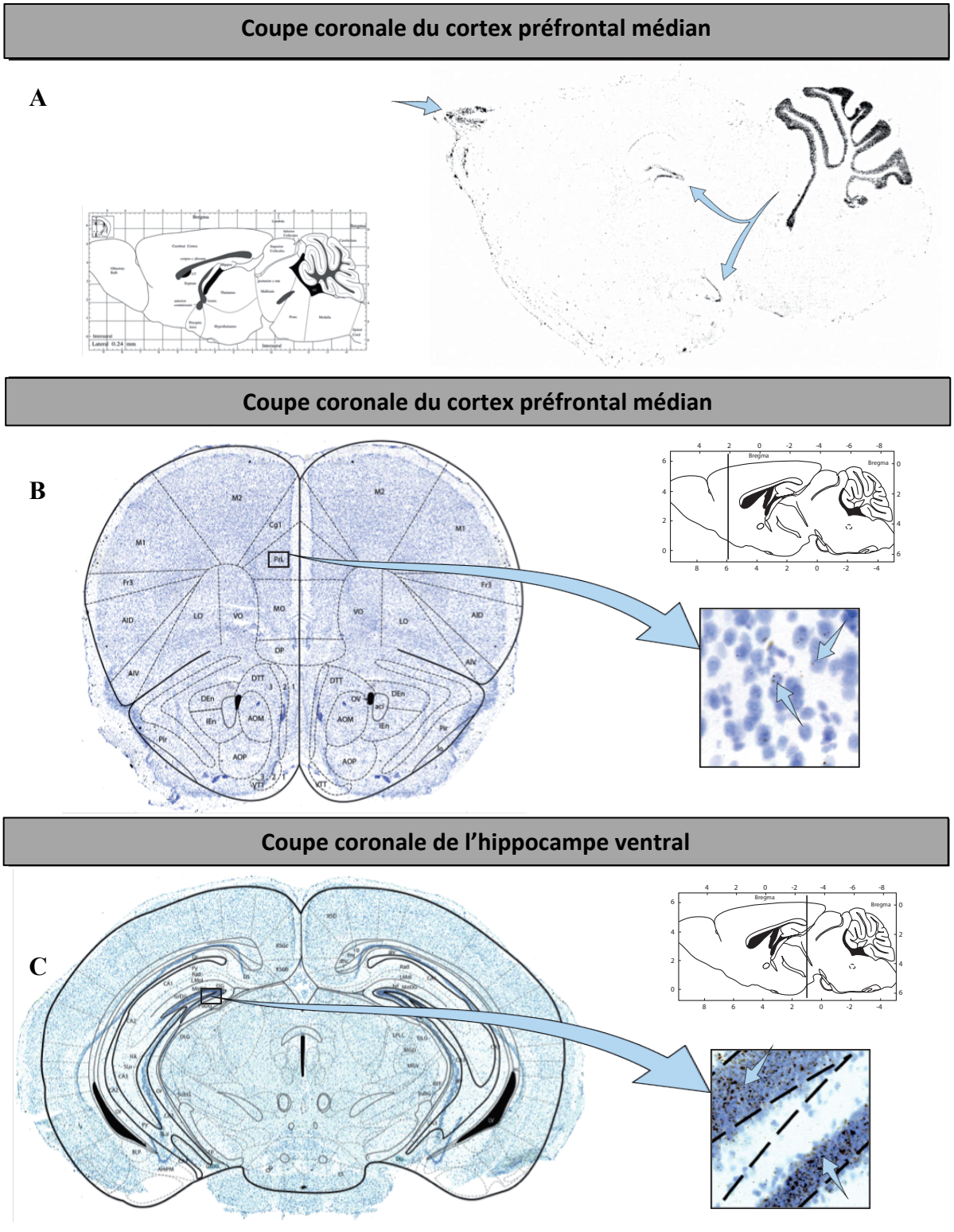
Mise en évidence de l'expression de l'ARNm dans le cerveau de souris BALB/cJRj par hybridation *in situ* :

Dans le but de mettre en évidence le ou les circuits impliqués dans les effets anxiolytiques induits par l'activation du récepteur 5-HT_4, nous avons d'abord procédé à une cartographie de l'expression de l'ARN messager (ARNm) du récepteur 5-HT_4 dans le cerveau de souris BALB/cJRj par hybridation *in situ* (**Figure 30**). L'ARNm du récepteur 5-HT_4 est retrouvé, entre autres, dans le CPF (**Figures 30 A-B**) et dans l'hippocampe (**Figures 30 A-C**), des régions impliquées dans la régulation de l'anxiété.

De manière intéressante, la localisation des transcrits de l'ARNm du récepteur 5-HT_4 est corrélée à son expression protéique, puisqu'une étude d'autoradiographie a montré à l'aide d'un radioligand du récepteur 5-HT_4 dans des sections de cerveau humain post-mortem que l'expression protéique du récepteur 5-HT_4 était co-localisée avec sa transcription (Varnas *et al.*, 2003).

Notre étude confirme donc bien les conclusions des travaux réalisés précédemment (Roychowdhury *et al.*, 1994; Compan *et al.*, 1996; Cai *et al.*, 2002; Vilaro *et al.*, 2005).

Figure 30. *Distribution de l'ARNm du récepteur 5-HT$_4$ dans le cerveau de souris BALB/cJRj.*



Abréviations *: CA1/CA3 : corne d'Ammon ; Cg1 : cortex cingulaire ; DG : gyrus denté ; GrDG : couche granulaire du gyrus dentelé ; MO : cortex orbital médian ; PrL : aire prélimbique ; Py : couche de cellules pyramidales de l'hippocampe. Les flèches indiquent le marquage de l'ARNm du récepteur 5-HT$_4$.*

Évaluation des effets comportementaux suite à la co-administration de GR 125487 et de diazépam :

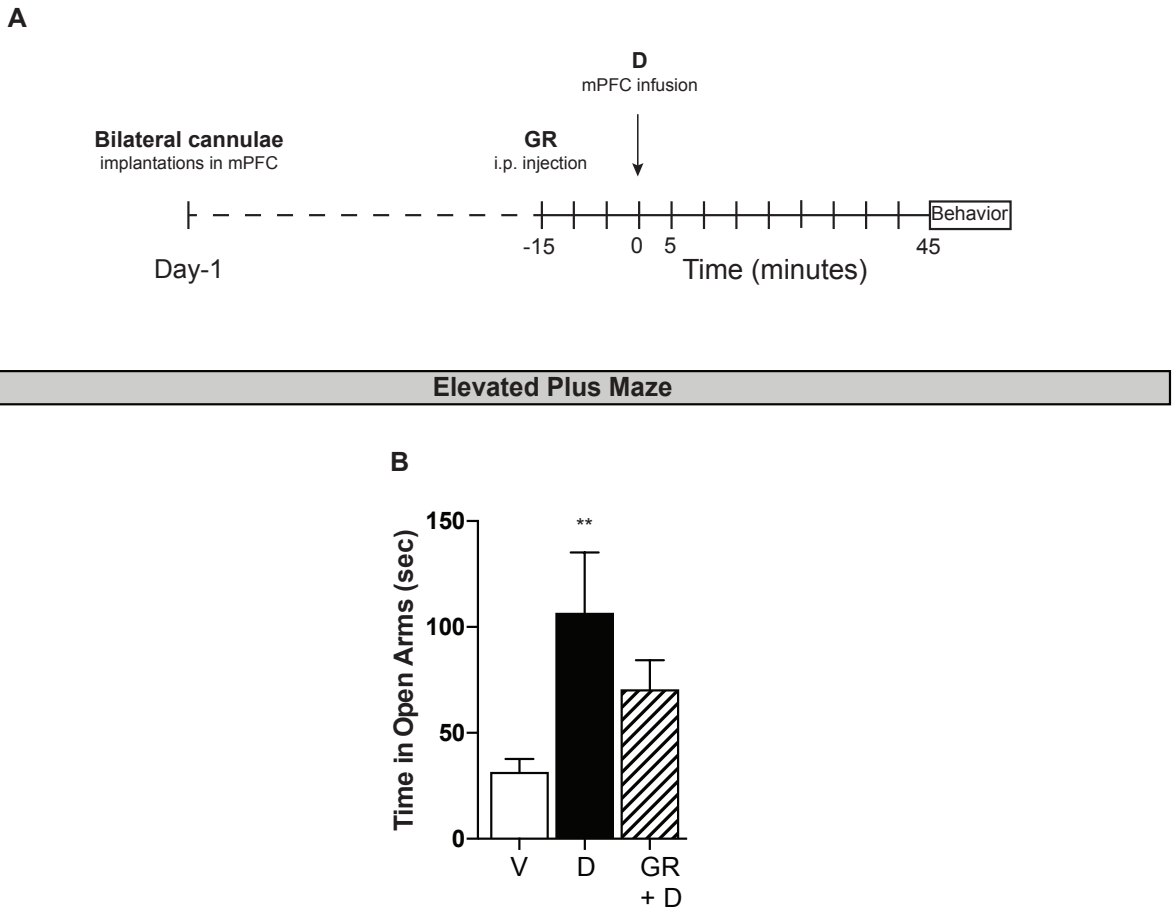
Comme précédemment décrit dans l'introduction de ce manuscrit, le récepteur $GABA_A$ est largement distribué dans les 6 couches du cortex cérébral, dont le cortex préfrontal médian (Akbarian *et al.*, 1995). Le récepteur 5-HT_4 est lui aussi amplement exprimés dans cette région, avec une localisation exclusive sur les neurones pyramidaux (Penas-Cazorla & Vilaro, 2015). D'après une étude menée chez la souris, les différents antagonistes du récepteur 5-HT_4, le SDZ205-557, le GR 113808 et le SB 204070, administrés à dose unique (0,01-10 µg/kg) par voie systémique, échouent à induire un effet de quelque nature que ce soit dans le LDT (Costall & Naylor, 1997). Cependant, ces antagonistes préviennent l'augmentation du temps passé dans le compartiment lumineux du LDT induit par une administration de diazépam (Costall & Naylor, 1997), évoquant un rôle du récepteur 5-HT_4 dans la médiation des effets anxiolytiques du diazépam.

Pour confirmer cette hypothèse, nous avons testé les effets comportementaux d'une administration simultanée de GR 125487, permettant de bloquer le récepteur 5-HT_4, et de diazépam. La veille du test, des canules d'injection ont été implantées dans le CPF_m des souris BALB/cJRj (**Figure 31A**). Le lendemain, 15 minutes avant d'injecter une dose de 3 µg de diazépam localement dans le CPF_m, le GR 125487 a été administré par voie systémique à la dose de 1,0 mg/kg. L'EPM a été réalisé 45 minutes après l'injection de diazépam.

Comme attendu, le diazépam a augmenté le temps passé dans les bras ouverts de l'EPM ($F_{2,18}$ = 5,069 ; $p<0,05$; $p<0,001$ diazépam *vs* véhicule) (**Figure 31B**). De manière plus surprenante, l'activité anxiolytique du diazépam a partiellement été supprimée par un prétraitement au GR 125487 (p=0,1881 GR + diazépam *vs* véhicule ; p=0,2454 diazépam *vs* GR + diazépam).

Nos résultats suggèrent donc que la modulation, et notamment l'activation, du récepteur 5-HT_4 participe à la réponse anxiolytique induite par le diazépam.

Figure 31. *Le blocage du récepteur 5-HT$_4$ prévient partiellement les effets anxiolytiques rapides induits par une administration intracorticale de diazépam chez la souris BALB/cJRj.*



Abréviations *: **p<0,01 versus véhicule ; D : diazépam 3 µg ; GR : GR 125487 1,0 mg/kg ; i.p. : administration intrapéritonéale ; mPFC : cortex préfrontal médian ; V : véhicule.*

Caractérisation des effets comportementaux suite à l'administration unique et intra-hippocampique de RS 67333 chez la souris BALB/cJRj :

Les études chez le rongeur ont montré que les comportements anxieux pouvaient être régulés par l'HPC_v. En particulier, de par ses projections monosynaptiques directes sur le CPF_m, l'HPC_v semble être une composante clef dans l'expression des formes innées d'anxiété (Padilla-Coreano *et al.*, 2016). Mais qu'en est-il de son rôle dans la réponse anxiolytique liée à l'activation du récepteur 5-HT_4, dans la mesure où cette région exprime fortement ce récepteur (Vilaro *et al.*, 2005) ?

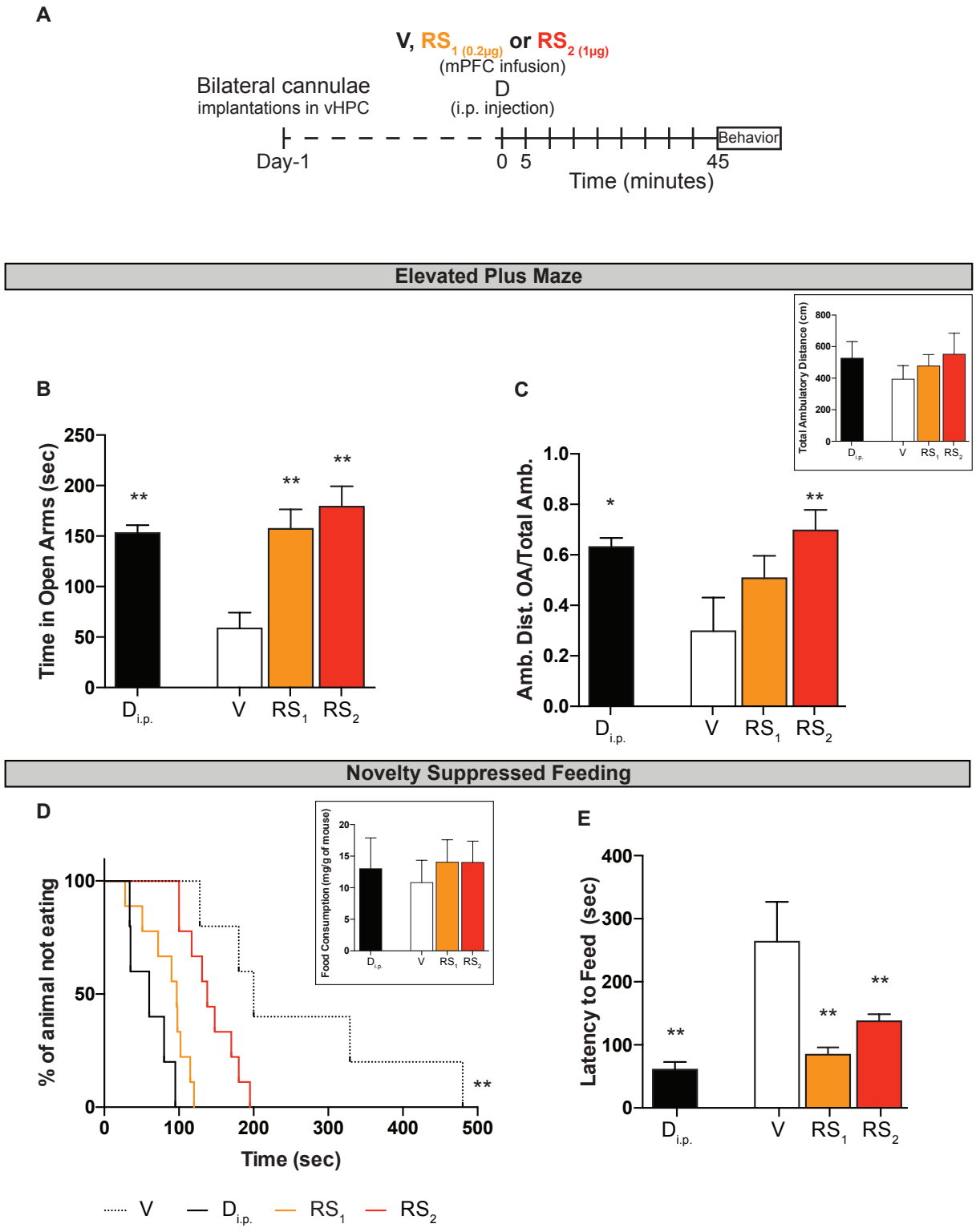
Pour répondre à cette question, nous avons suivi le même protocole que celui des injections intracorticales (**Figure 32A**). Le RS 67333 (0,1 ou 5 µg/côté) a été administré localement et bilatéralement dans l'HPC_v de souris BALB/cJRj mâles, 45 minutes avant la réalisation de deux tests comportementaux prédictifs d'une activité anxiolytique : l'EPM et le NSF. Nous avons ainsi mis en évidence une activité anxiolytique de l'agoniste du récepteur 5-HT_4, le RS 67333 et donc démontré qu'outre le CPF_m, l'HPC_v participe lui aussi à cette régulation.

En effet, dans l'EPM, nous avons montré que tout comme le diazépam administré par voie systémique, le RS 67333, quelle que soit la dose administrée (0,2 ou 1 µg) a augmenté significativement le temps passé dans les bras ouverts ($F_{3,23} = 6,703$, $p<0,01$; $p<0,01$ RS 67333 0,2 µg *vs* véhicule ; $p<0,001$ RS 67333 1 µg *vs* véhicule ; $p<0,01$ diazépam *vs* véhicule) (**Figure 32B**), sans affecter les paramètres de locomotion générale (**Figure 32C**).

Dans le NSF, nous avons trouvé que le RS 67333, quelle que soit la dose administrée, a diminué la latence des souris à se nourrir ($F_{3,23} = 10,22$, $p<0,001$; $p<0,001$ RS 67333 0,2 µg *vs* véhicule ; $p<0,01$ RS 67333 1 µg *vs* véhicule ; $p<0,001$ diazépam *vs* véhicule), similairement au diazépam (**Figure 32D-E**), sans modifier leur consommation de nourriture (**Figure 32D**).

Nos résultats montrent que l'administration locale d'un agoniste du récepteur 5-HT_4 dans l'HPC_v induit une réponse de type anxiolytique rapide.

Figure 32. *Une stimulation aigue du récepteur 5-HT$_4$ dans l'hippocampe ventral induit des effets anxiolytiques rapides chez la souris BALB/cJRj anxieuse.*



Abréviations *: *p<0,05, **p<0,01 versus véhicule ; $D_{i.p.}$: diazépam 1,5 mg/kg administré par voie intrapéritonéale ; HPC : hippocampe ; RS_1 : RS 67333 0,2 µg ; RS_2 : RS 67333 1 µg ; V : véhicule.*

Confirmation des résultats comportementaux obtenus après administration par voie systémique ou intracorticale de RS 67333 et après stimulation des projections des neurones du CPF_m sur le NRD dans l'open field chez la souris BALB/cJRj :

Pour confirmer les effets anxiolytiques rapides obtenus avec le RS 67333 dans différents protocoles et différents tests, tels que l'EPM et le NSF, nous avons réalisé un troisième test comportemental prédictif de l'activité anxiolytique, l'OF, en suivant trois protocoles précédemment utilisés dans notre étude.

Dans le premier protocole, le véhicule, la fluoxétine (18 mg/kg), le diazépam (1,5 mg/kg) et le RS 67333 (1,5 mg/kg) ont été injectés par voie systémique chez la souris BALB/cJRj, 45 minutes avant le test (**Figure 33A**). Nous avons alors observé que contrairement à la fluoxétine, le diazépam provoque une augmentation significative du temps passé dans le centre de l'OF, quand le RS 67333 n'induit qu'une tendance à l'augmentation du temps passé dans le centre de l'OF ($F_{3, 36}$ = 8,000, p<0,001 ; p=0,8390 fluoxétine *vs* véhicule ; p<0,001 diazépam *vs* véhicule ; p=0,0747 RS 67333 *vs* véhicule) (**Figure 33B**). Ces résultats n'étant pas la conséquence d'un changement de l'activité ambulatoire, puisque le ratio de la distance ambulatoire dans le centre divisée par la distance ambulatoire totale est augmenté pour le diazépam ($F_{3, 36}$ = 3,643, p<0,05 ; p<0,01 diazépam *vs* véhicule ; p=0,2011 RS 67333 *vs* véhicule) (**Figure 33C**).

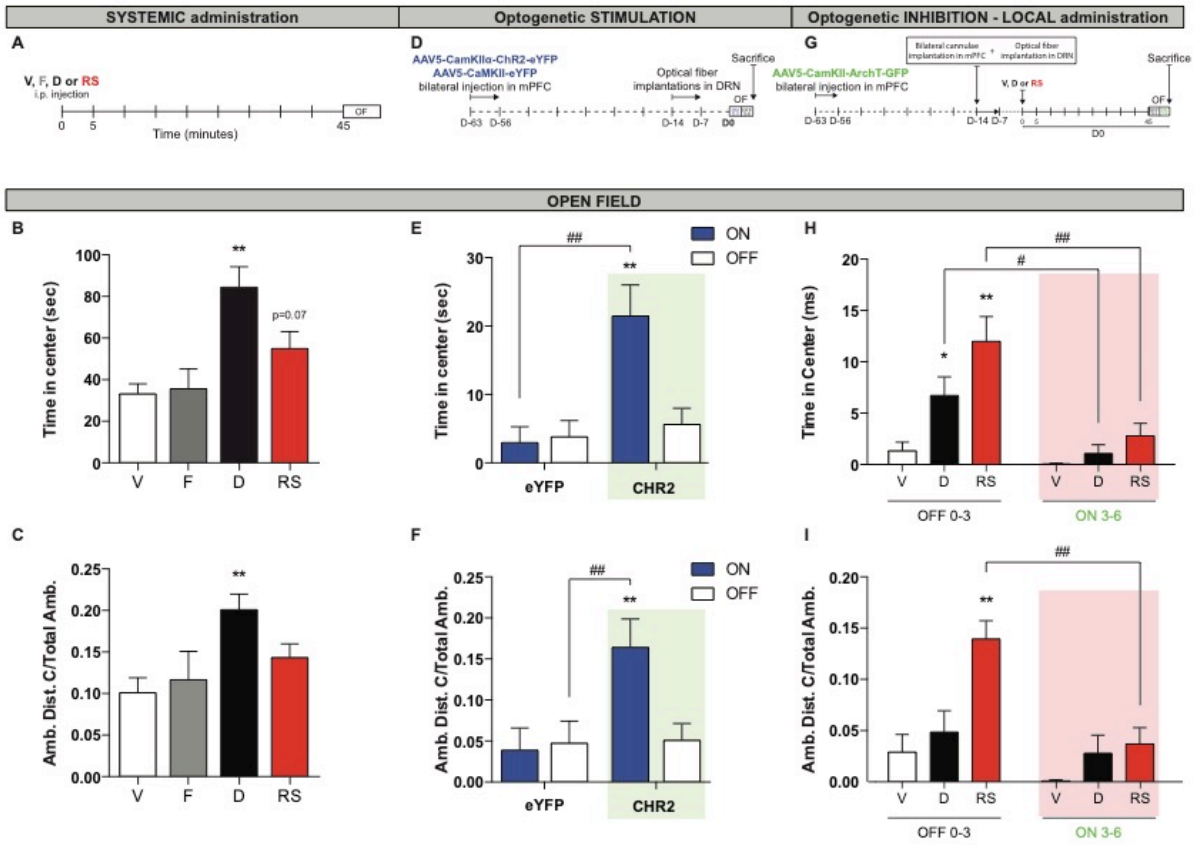
Dans le second protocole, les terminaisons des neurones pyramidaux se projetant vers le NRD, ont été stimulées par optogénétique, simultanément à la réalisation de l'OF, selon une séquence 3 minutes laser ON puis 3 minutes laser OFF. Les souris BALB/cJRj, injectées avec le virus AAV5-CaMKIIα-ChR2-eYFP ont été comparées aux souris contrôles ayant reçu le virus AAV5-CaMKII-eYFP (**Figure 33D**). Nous avons trouvé que la stimulation (laser ON) des projections du CPF_m exprimant CHR2, vers le NRD, augmente significativement le temps passé dans le centre de l'OF, en comparaison au groupe contrôle et lorsque le laser était éteint (laser OFF) (two-way ANOVA, interaction : $F_{(1, 38)}$ = 5,565, p<0,05 ; p<0,001 CHR2:ON *vs* eYFP:ON ; p<0,001 CHR2:ON *vs* CHR2:OFF), sans affecter la distance ambulatoire (two-way ANOVA,

interaction : $F_{(1, 38)}$ = 4,154, p<0,05 ; p<0,01 CHR2:ON *vs* eYFP:ON ; p<0,01 CHR2:ON *vs* CHR2:OFF) (**Figures 33E-F**).

Enfin, dans le troisième protocole, le véhicule, le diazépam (1,5 µg/côté) et le RS 67333 (0,5 µg/côté) ont été injectés directement dans le CPF_m des souris BALB/cJRj. Les terminaisons des neurones pyramidaux se projetant vers le NRD et exprimant Arch, ont ensuite été inhibées par optogénétique, 45 minutes après l'administration des traitements et concomitamment à la réalisation de l'OF, selon une séquence 3 minutes laser OFF puis 3 minutes laser ON (**Figure 33G**). Comme attendu, l'administration intracorticale de diazépam et de RS 67333 (laser OFF) augmente le temps passé dans le centre de l'OF (two-way ANOVA, interaction : $F_{(2, 44)}$ = 3,332, p<0,05 ; p<0,05 diazépam:OFF *vs* véhicule:OFF ; p<0,001 RS 67333:OFF *vs* véhicule:OFF), des effets qui ont été bloqués par la stimulation des projections du CPF_m vers le NRD (laser ON) (two-way ANOVA, interaction : $F_{(2, 44)}$ = 3,332, p<0,05 ; p<0,05 diazépam:OFF *vs* diazépam:ON ; p<0,001 RS 67333:OFF *vs* RS:ON) (**Figure 33H**). Le pourcentage d'inhibition de la réponse anxiolytique pour le diazépam et le RS 67333 était respectivement de 85,02 ± 9,4% et 80,28 ± 8,0%, ces observations n'étant pas dues à un changement de l'activité ambulatoire (two-way ANOVA, interaction : $F_{(2, 44)}$ = 4,093, p<0,05 ; p=0,4397 diazépam:OFF *vs* véhicule:OFF ; p<0,001 RS 67333:OFF *vs* véhicule:OFF ; p=0,4433 diazépam:OFF *vs* diazépam:ON ; p<0,001 RS 67333:OFF *vs* RS:ON) (**Figure 33I**).

Nos résultats montrent que les effets anxiolytiques rapides du RS 67333 sont fiables et robustes puisque reproductibles dans un troisième test comportemental, prédictif d'une activité anxiolytique.

Figure 33. *Une stimulation aigue du récepteur 5-HT$_4$ induit un effet anxiolytique chez la souris BALB/cJRj anxieuse.*



Abréviations *: *p<0,05, **p<0,01 versus véhicule/eYFP ; #p<0,05, ##p<0,01 versus laser ON/OFF ; CHR2 : channelrhodopsine ; D : diazépam ; DRN : noyau du raphé dorsal ; eYFP : enhanced yellow fluorescent protein ; F : fluoxétine ; mPFC : cortex préfrontal médian ; OF : open field ; RS : RS 67333 ; V : véhicule*

ARTICLE 3

ARTICLE 3 : Ketamine as a Prophylactic Against Stress-Induced Depressive-Like Behavior

Auteurs: Rebecca A. Brachman, Josephine C. McGowan, Jennifer N. Perusini, Sean C. Lim, Thu Ha Pham, Charlene Faye, Alain M. Gardier, Indira Mendez-David, Denis J. David, René Hen, and Christine A. Denny

Publié dans Biological Psychiatry (2016)

Question posée :

1. L'administration de kétamine, un antagoniste du récepteur N-méthyl-D-aspartate (NMDA), dans 3 différents modèles murins de résilience au stress prévient-elle l'apparition des symptômes dépressifs, anxieux et cognitifs ?

Résumé de l'étude :

L'exposition au stress est l'un des plus grands facteurs de risque du développement de maladies psychiatriques telles que les EDC ou encore l'ESPT. Toutefois, parmi les personnes exposées au stress, toutes ne développent pas de désordres psychiatriques. La résilience au stress, c'est-à-dire la capacité de faire face au stress sans développer de psychopathologie persistante, varie d'un individu à l'autre (Faye *et al.*, 2018). Améliorer cet état de résilience au sein des populations à risque pourrait potentiellement protéger des maladies psychiatriques induits par le stress. Malgré cela, aucun produit pharmaceutique améliorant la résilience au stress n'a été identifié. Dans ce travail, initié par l'équipe du Dr Denny (Columbia University, NYC, USA) nous avons cherché à savoir si une administration unique de kétamine était capable de prévenir le phénotype anxio-dépressif associé à 3 modèles murins bien caractérisés de dépression.

A l'aide d'un modèle de stress chronique de défaite sociale (*chronic social defeat stress*) et d'un modèle d'impuissance acquise (*learned helplessness*), l'équipe du Dr Denny a testé si une administration unique de kétamine pouvait prévenir le développement d'un phénotype anxio-dépressif dans différents tests comportementaux. Pour ce faire, les animaux ont reçu une dose unique de kétamine (10, 30 ou 90 mg/kg), puis une semaine plus tard, ont été soumis à 2 semaines de stress chronique de défaite sociale ou d'impuissance acquise. Dans notre laboratoire, pour répondre à cette hypothèse, nous avons utilisé un modèle basé sur une élévation des taux de glucocorticoïdes chez la souris (*CORT*). Tout comme à Columbia University, les animaux ont été injectés avec une dose unique de kétamine avant de recevoir 3 semaines d'un traitement par corticostérone. A la fin de la période de stress, les animaux ont finalement été testés dans des tests de comportementaux prédictifs d'un phénotype anxieux et/ou dépressif.

Le stress chronique de défaite sociale induit de manière robuste et fiable un comportement de type dépressif chez les souris naïves. Les souris traitées avec de la kétamine (30 mg/kg) à titre prophylactique ont été protégées contre les effets délétères du stress, dans le test de la nage forcée (*Forced Swimming Test*, FST) et le SIT. Ces observations ont été confirmées dans les deux autres modèles de stress, le modèle d'impuissance acquise et le modèle CORT. Dans le modèle d'impuissance acquise, le temps de latence pour s'échapper a été augmenté après l'entraînement, un effet qui est normalisé après un prétraitement par kétamine. Dans le modèle CORT, une dose unique de kétamine (90 mg/kg) a bloqué les effets néfastes du stress induit par la CORT dans le FST, le NSF et le Splash Test.

Ces données montrent que la kétamine peut induire une résilience au stress persistante chez la souris, suggérant qu'elle pourrait être utile pour prévenir le développement des troubles psychiatriques induits par le stress.

Contribution personnelle :

Au cours de ce travail, j'ai :

- Participé au suivi des animaux, y compris la préparation et l'administration des différents traitements pharmacologiques : corticostérone, fluoxétine et kétamine.
- Participé à l'ensemble des tests comportementaux pour la cohorte des animaux traités par la corticostérone.
- Participé à la relecture de l'article.

Archival Report

Biological Psychiatry

Ketamine as a Prophylactic Against Stress-Induced Depressive-Like Behavior

Rebecca A. Brachman, Josephine C. McGowan, Jennifer N. Perusini, Sean C. Lim, Thu Ha Pham, Charlene Faye, Alain M. Gardier, Indira Mendez-David, Denis J. David, René Hen, and Christine A. Denny

ABSTRACT

BACKGROUND: Stress exposure is one of the greatest risk factors for psychiatric illnesses like major depressive disorder and posttraumatic stress disorder. However, not all individuals exposed to stress develop affective disorders. Stress resilience, the ability to experience stress without developing persistent psychopathology, varies from individual to individual. Enhancing stress resilience in at-risk populations could potentially protect against stress-induced psychiatric disorders. Despite this fact, no resilience-enhancing pharmaceuticals have been identified.

METHODS: Using a chronic social defeat (SD) stress model, learned helplessness (LH), and a chronic corticosterone (CORT) model in mice, we tested if ketamine could protect against depressive-like behavior. Mice were administered a single dose of saline or ketamine and then 1 week later were subjected to 2 weeks of SD, LH training, or 3 weeks of CORT.

RESULTS: SD robustly and reliably induced depressive-like behavior in control mice. Mice treated with prophylactic ketamine were protected against the deleterious effects of SD in the forced swim test and in the dominant interaction test. We confirmed these effects in LH and the CORT model. In the LH model, latency to escape was increased following training, and this effect was prevented by ketamine. In the CORT model, a single dose of ketamine blocked stress-induced behavior in the forced swim test, novelty suppressed feeding paradigm, and the sucrose splash test.

CONCLUSIONS: These data show that ketamine can induce persistent stress resilience and, therefore, may be useful in protecting against stress-induced disorders.

Keywords: Depression, Ketamine, Mice, PTSD, Stress, Stress resilience

http://dx.doi.org/10.1016/j.biopsych.2015.04.022

Stress commonly precipitates psychiatric illness, particularly in vulnerable populations. For example, one in five soldiers returns from combat with posttraumatic stress disorder or combat-associated major depressive disorder (MDD) (1). Perhaps more surprising is that many soldiers do not develop psychopathology. While there has been extensive research on factors promoting susceptibility to psychiatric illnesses, few studies have examined what makes individuals resistant or stress resilient. Until recently, the sparse research on stress resilience has been predicated on the assumption that it is a passive property—more or less the absence of the risk factors that make individuals susceptible to stress-induced pathology (2). Recent work in animal models suggests that stress resilience is mediated through active processes and often distinct, parallel mechanisms to those of susceptibility (3–5).

The idea that increasing stress resilience could protect against the development of psychiatric disorders is appealing, but treatments to increase resilience are still in their infancy. Current interventions fall predominantly on the behavioral side, with psychotherapy and exercise being the best available tools to increase resilience (6–8). Rodent studies further support a role for exercise and enriched environment in stress resilience (9–11). Beyond behavioral manipulations in mice, researchers have successfully increased resilience biochemically through viral and transgenic overexpression methods (12), optogenetic activation (4), and chronic blockade of stress hormones (13,14). However, none of these interventions translates to the clinic. Most promisingly, we have identified the immune system as a novel target for enhancing resilience. Our recent work has shown that manipulating leukocytes is sufficient to increase stress resilience (15) and Hodes *et al.* (16) have shown a similar effect by modulating cytokines. Though hopefully these discoveries will lead to therapeutic interventions in humans, they are not yet clinic ready.

Antidepressants are typically used to treat existing depressive symptoms, but chronic antidepressant treatment also protects against subsequent depressive episodes (17–21). Maintenance treatment in MDD patients is often referred to as prophylaxis against the development of additional depressive episodes (22). Whether this prophylactic effect against symptomatic episodes in disordered individuals extrapolates out to preventing de novo psychiatric disorders remains to be tested.

© 2015 Society of Biological Psychiatry

ISSN: 0006-3223

Ketamine has been shown to have antidepressant effects as rapidly as 2 hours following a single injection in patients with MDD (23). Whereas classic antidepressants require ongoing daily administration to maintain therapeutic efficacy, ketamine has the benefit of being administered as a single dose (23,24). Because ketamine has a window of therapeutic efficacy far beyond its half-life of a few hours (23–25), it is an excellent candidate for a plausible approach to pharmacologically increasing stress resilience.

Therefore, we first utilized social defeat (SD) to examine whether ketamine could increase stress resilience and, thereby protect against de novo induction of psychopathology. We hypothesized that ketamine would confer stress resiliency to mice if administered before stress. We chose to perform SD in 129S6/SvEvTac mice, which robustly and reliably develop a depressive-like phenotype following SD (26). Mice were administered either saline or a single subanesthetic injection of ketamine, and 1 week later, SD was administered to half of the mice. We found that a single injection of ketamine induced robust stress resilience that persisted for at least 3 weeks postinjection. Moreover, we confirmed our effects in two additional models in which depressive/anxious behavior is induced by chronic elevation of glucocorticoids in C57BL/6NTac mice (27) or by repeated, unescapable shocks (learned helplessness [LH]) (28–30). Again, a single subanesthetic dose of ketamine, administered 4 weeks before behavioral assessment, decreased immobility in the forced swim test (FST) and protected against depressive-like behavior in the novelty suppressed feeding (NSF) paradigm and the sucrose splash test (ST). In the LH model, the latency to escape a shock increases with LH training and this effect was prevented by prophylactic ketamine. These findings demonstrate that the protective effect of ketamine extends at least 4 weeks postinjection. To our knowledge, this is the first study to examine the potential of psychopharmaceuticals to provide long-term prophylactic protection against the induction of stress-related disorders.

METHODS AND MATERIALS

Mice

Male 129S6/SvEvTac mice were purchased from Taconic (Hudson, New York). CD-1 mice were purchased from Charles River Laboratories (Wilmington, Massachusetts) at 8 to 10 weeks of age and housed individually until the start of SD. The procedures described herein were conducted in accordance with the National Institutes of Health regulations and approved by the Institutional Animal Care and Use Committees of Columbia University and the New York State Psychiatric Institute.

Male C57BL/6NTac mice were purchased from Taconic Farms (Lille Skensved, Denmark) at 8 weeks of age and were housed five per cage before the start of corticosterone (CORT) treatment. All testing was conducted in compliance with the laboratory animal care guidelines and with protocols approved by the Institutional Animal Care and Use Committee (European Directive, 2010/63/EU for the protection of laboratory animals, permissions # 92-256B, authorization ethical committee CEEA n°26 2012_098).

All mice were housed in a 12-hour (600–1800) light-dark colony room at 22°C. Food and water were provided ad libitum. Behavioral testing was performed during the light phase.

RESULTS

Ketamine Administration Before SD Protects Against the Induction of Depressive-Like Behavior

Mice were administered a single injection of saline or ketamine (30 mg kg^{-1}) (Figure 1A). One week later, mice either remained group housed (Ctrl) or underwent SD. After 2 weeks of SD, mice were weighed (Figure S2A in Supplement 1), and behavior was assessed.

Classically, immobility in the FST has been interpreted as an index of hopelessness or a negative mood (31). Rodents given acute or chronic antidepressants exhibit decreased immobility (32). Here, on day 2 of the FST, there was an overall effect of SD on immobility time. Ctrl-saline (Sal) and Ctrl-ketamine (K) mice displayed equal levels of immobility time (Figure 1B). In SD mice, ketamine (SD-K) significantly decreased immobility time when compared with saline (SD-Sal) (Figure 1C,D). These data indicate that ketamine increases resilience to behavioral despair as measured by the FST.

Dominant interaction is a robust way of testing the induction of depressive-like behavior by SD (10) (Figure 1E). As expected, SD-Sal mice spent significantly more time investigating an empty enclosure quadrant than Ctrl-Sal mice (Figure 1F). Ctrl (Sal or K) mice spent an equivalent amount of time investigating the empty enclosure quadrant. SD-K mice exhibited significantly less time investigating the empty enclosure quadrant when compared with SD-Sal mice. Similarly, SD-K mice exhibited a significantly increased willingness to interact with the CD-1 when compared with SD-Sal mice (Figure 1G). There was an overall effect of SD and of ketamine on decreasing the distance traveled, but the interaction was not significant (Figure 1H).

To determine if this exploration deficit extended to neutral environments, open field exploration was investigated in an arena scented with female urine (Figure S3 in Supplement 1). We did not detect any differences in the empty quadrant or the urine quadrant between Ctrl and SD mice. Furthermore, to determine if social avoidance generalized to other mice, we also assessed social interaction with a novel mouse (Figure S4 in Supplement 1). We did not find an effect of SD or ketamine on social interaction. In summary, these data suggest that SD decreases exploration and willingness to interact with a CD-1 aggressor and that prior ketamine administration protects against this deleterious effect of SD on social behavior.

An Injection of Ketamine Before SD Does Not Impact Anxiety-Like Behavior or Contextual Fear Memory

We next examined the effects of ketamine on anxiety-like behavior and cognitive tests. In the NSF paradigm, we found no significant effect of SD or ketamine on the latency to feed (Figure 2A). In fact, all groups showed similar latencies (Figure 2B). This effect is confounded: despite having comparable body weights before and after SD (Figure 2C), SD mice

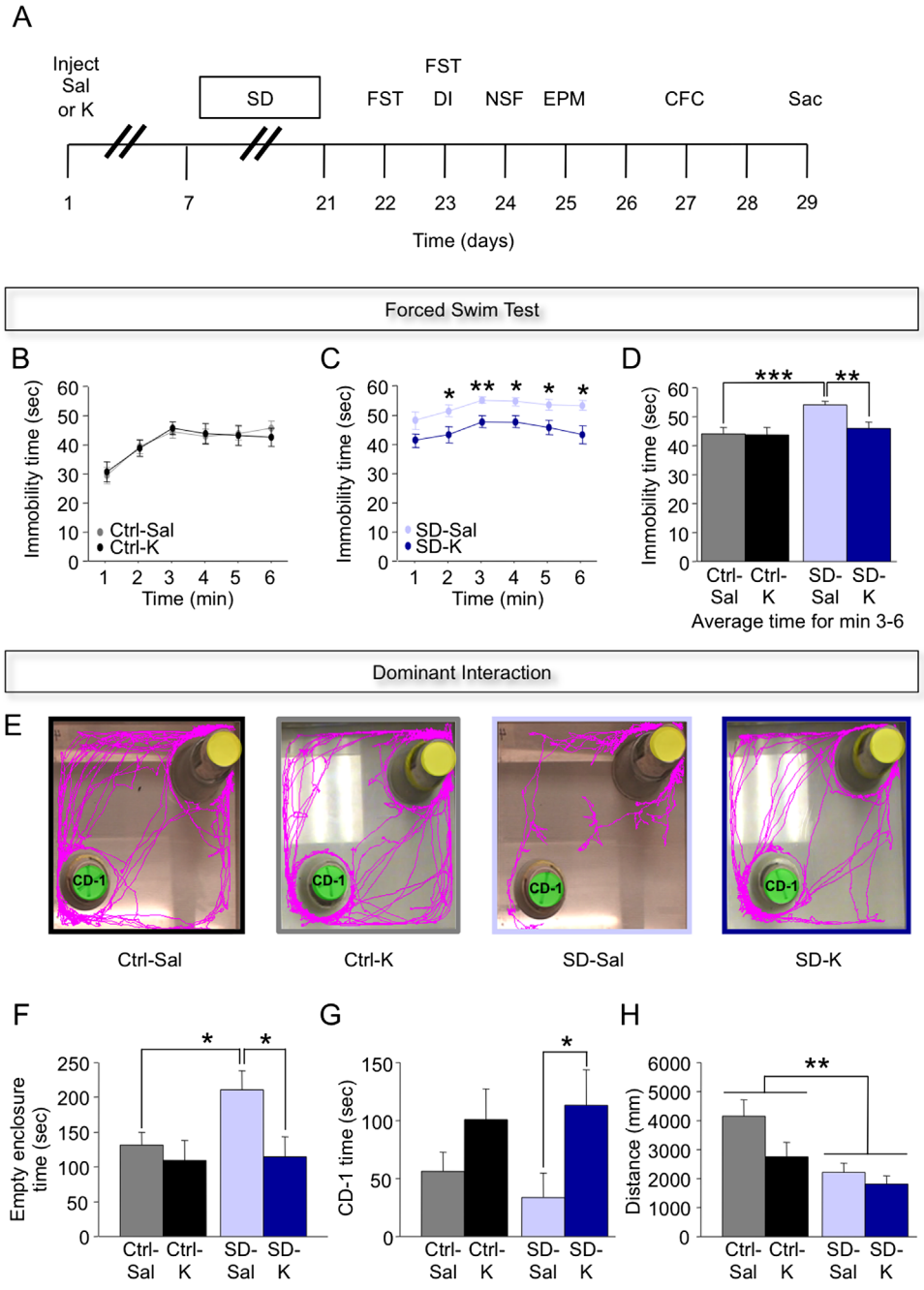


Figure 1. Ketamine protects against depressive-like behavior following social defeat (SD). **(A)** Experimental design. **(B)** On day 2 of the forced swim test (FST), group housed (Ctrl)-saline (Sal) and Ctrl-ketamine (K) mice did not differ from each other. **(C)** SD-K mice exhibited significantly less immobility time when compared with SD-Sal mice. (**D**) Average immobility time for minutes 3 to 6 was increased in the SD-Sal mice when compared with Ctrl-Sal mice. The SD-K mice displayed an average immobility time that was less than the SD-Sal mice. **(E)** Dominant interaction (DI) traces. **(F)** SD-Sal mice spent significantly more time investigating the empty enclosure when compared with the Ctrl-Sal mice. Conversely, SD-K mice spent significantly less time investigating the empty enclosure when compared with the SD-Sal mice. **(G)** SD-K mice spent considerably more time investigating a CD-1 mouse when compared with SD-Sal mice. **(H)** There was an overall effect of SD and of ketamine on decreasing the distance traveled during social interaction, but the interaction did not reach significance. (n = 13–15 male mice per group). Error bars represent ± SEM. $^{*}p < .05$, $^{**}p < .01$, $^{***}p < .001$. CFC, contextual fear conditioning; EPM, elevated plus maze; NSF, novelty suppressed feeding; Sac, sacrifice.

lost significantly more weight during the 12-hour fast preceding NSF than Ctrl mice (Figure 2D). Possibly as a result, SD mice ate more in a home cage following NSF when compared with Ctrl mice (Figure 2E). These findings suggest that SD significantly alters metabolism in 129S6/SvEv mice.

We observed a significant effect of SD in an anxiety-related test, the elevated plus maze (EPM). SD mice spent more time in the closed arms than Ctrl mice (Figure 2F). However, there was no significant effect of ketamine in either group. The absence of an effect of ketamine in the EPM is consistent with previous studies (33,34), as it remains to be established if ketamine is as robust an anxiolytic as it is an antidepressant (35).

Finally, we assessed the impact of prior treatment with ketamine on one-shock contextual fear conditioning (CFC) (36,37) (Figure 2G). One group previously found that SD increased context-elicited fear following three-shock CFC (38). However, we chose to utilize a weak CFC training paradigm, as we have previously shown this one-shock CFC paradigm to be sensitive to the ablation of adult hippocampal neurogenesis (36,37) and to SD (26). Here, we found no effect of either SD or ketamine on baseline freezing levels on day 1 of

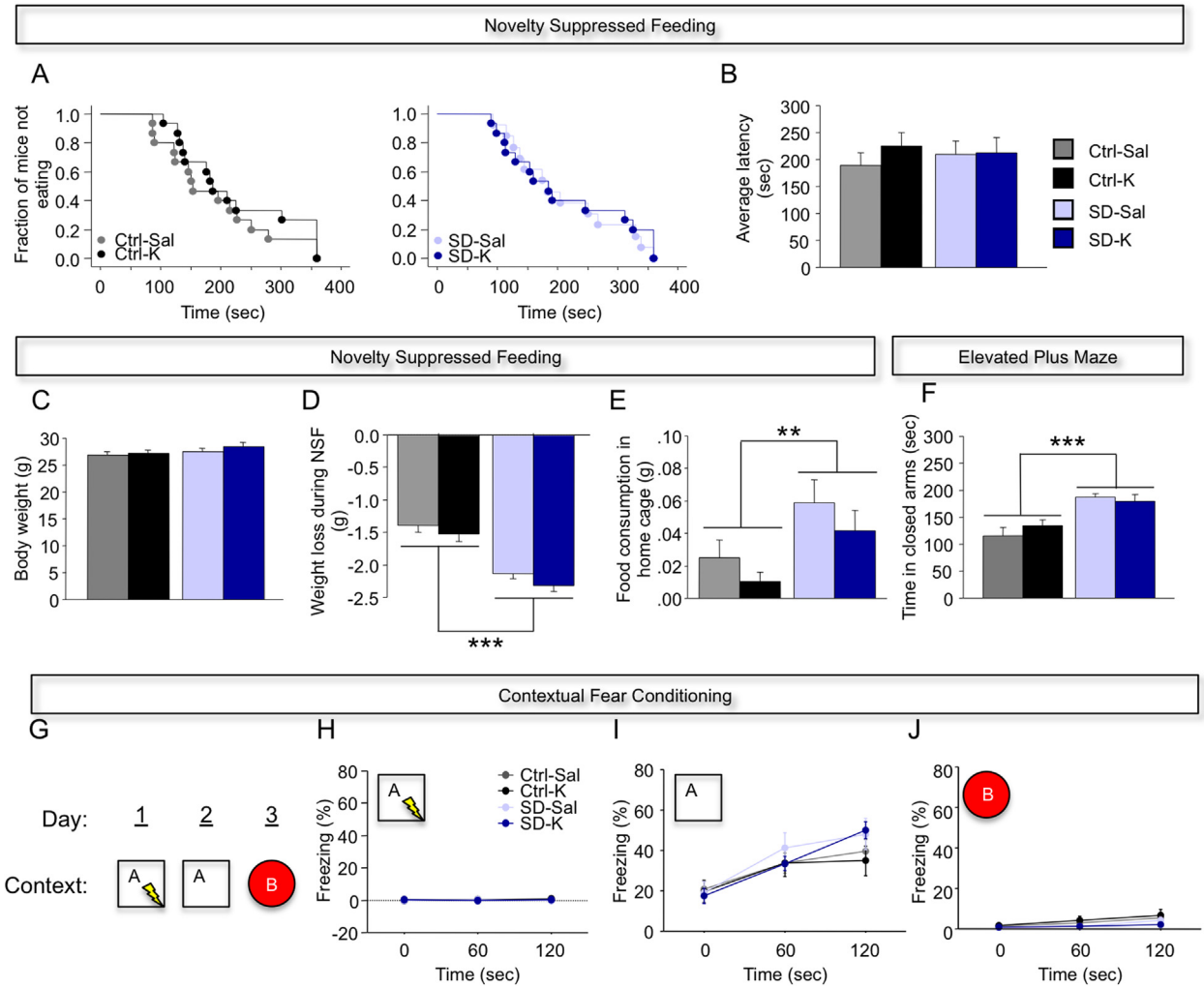


Figure 2. Ketamine does not protect against anxiety-like behavior or impair contextual fear conditioning learning following social defeat (SD). **(A,B)** In the novelty suppressed feeding (NSF) paradigm, all groups had equivalent average latencies to approach the food pellet. **(C)** Body weight did not differ between any of the groups before the start of NSF. **(D)** SD mice lost approximately 25% more body weight than group housed (Ctrl) mice. **(E)** SD mice consumed significantly more food than Ctrl mice. **(F)** In the elevated plus maze test, SD mice spent significantly more time in the closed arms when compared with Ctrl mice. **(G–J)** All groups of mice had comparable levels of freezing during contextual fear conditioning training in context A, following re-exposure to fearful context A, and during exposure to a novel context B. (n = 13–15 male mice per group). Error bars represent ± SEM. $^{**}p < .01$, $^{***}p < .001$. K, ketamine; Sal, saline.

CFC training (Figure 2H). Ketamine or SD had no effect on freezing during exposure to the fearful context A (Figure 2I) or a novel context B (Figure 2J). Though this does not allow us to assess any stress resilience effect of ketamine, as there is no effect of stress to protect against, it does at least demonstrate that a single injection of ketamine does not appear to interfere with the ability to form contextual memories in mice.

The Ketamine-Induced Improvement Is Dose-Specific

We next examined a dose titration curve of ketamine. Mice were administered 0, 10, 30, or 90 mg kg^{-1} of ketamine before the start of SD. After 2 weeks of SD, mice underwent the FST and CORT levels were measured following a brief stressor. We replicated our previous SD effect, as SD-Sal mice displayed significantly more immobility time in the FST when compared with Ctrl-Sal (Figure 3A). However, SD-Sal and SD-K (10 mg kg^{-1}) mice did not differ in immobility time (Figure 3B). SD-K (30 mg kg^{-1}) mice again displayed significantly less immobility when compared with SD-Sal mice (Figure 3C). SD-Sal and SD-K (90 mg kg^{-1}) mice did not differ in immobility time (Figure 3D,E).

As the hypothalamic-pituitary-adrenal (HPA) axis is dysregulated in mice following SD (14), we also tested whether ketamine protected against the deleterious effect of SD on the stress response. Following a brief stressor, SD-Sal mice had significantly lower levels of CORT than Ctrl-Sal mice (Figure 3F), suggesting that SD blunts the response of the HPA axis. However, all ketamine-injected mice did not differ from Ctrl-Sal mice, suggesting that ketamine partially restores the HPA axis. To determine if adult hippocampal neurogenesis

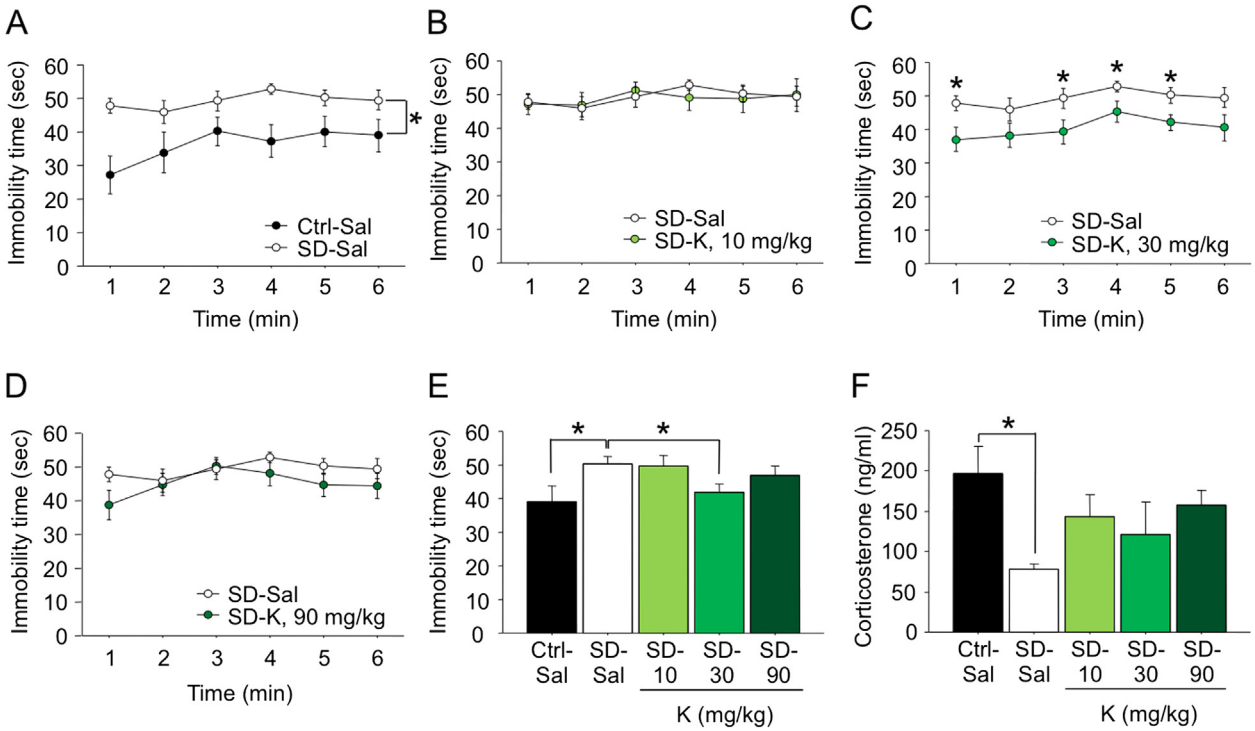


Figure 3. The ketamine-induced protection against depressive-like behavior is dose-specific. **(A)** On day 2 of the forced swim test (FST), social defeat (SD)-saline (Sal) mice displayed significantly more immobility time in the FST when compared with group housed (Ctrl)-Sal mice. **(B)** SD-Sal and SD-ketamine (K) (10 mg kg^{-1}) mice did not differ in immobility. **(C)** SD-K (30 mg kg^{-1}) mice displayed significantly less immobility time when compared with SD-Sal mice. **(D)** SD-Sal and SD-K (90 mg kg^{-1}) mice did not differ in immobility time. **(E)** For minutes 3 to 6 (averaged), SD-Sal mice displayed significantly more immobility in the FST when compared with Ctrl-Sal mice. SD-K (30 mg kg^{-1}) mice again displayed decreased immobility when compared with SD-Sal mice. **(F)** Following a brief stressor, SD-Sal mice had significantly lower levels of corticosterone when compared with Ctrl-Sal mice. (n = 7–8 male mice per group). Error bars represent ± SEM. *$p < .05$.

was modulating, as least in part, these effects, we measured maturation of newborn neurons and proliferation of newborn neurons by quantifying the levels of doublecortin and Ki67, respectively. We did not observe an effect of ketamine on adult hippocampal neurogenesis (Figure S5 in Supplement 1). These data suggest that the ketamine improvement in depressive-like behavior may be mediated in part by changes in HPA functionality but not necessarily by adult hippocampal neurogenesis.

Prophylactic Ketamine Alters Fighting Behavior During SD Bouts

To determine if ketamine also affected behavior during SD, we analyzed individual fighting bouts. The total fighting bout length did not differ between groups (Figure S6A in Supplement 1). However, the average immobility during week 2 was significantly decreased in SD-K mice when compared with SD-Sal mice (Figure S6B in Supplement 1). The percent of time vocalizing (Figure S6C in Supplement 1) and number of approaches to the CD-1 (Figure S6D in Supplement 1) did not differ between the groups. These data suggest that mice administered ketamine may not be as fearful of the CD-1 mice and, therefore, spend less time immobile.

We next analyzed the latency of the CD-1 to attack the 129S6/SvEv mouse (Figure S6E–G in Supplement 1). CD-1s comparably attacked SD-Sal and SD-K (10 or 90 mg kg^{-1}) mice. However, at the start of SD, CD-1s attacked SD-K (30 mg kg^{-1}) mice significantly later than SD-Sal mice. These data suggest that perhaps the mice receiving K (30 mg kg^{-1}) have an advantageous ongoing response to SD when compared with Sal mice.

Fluoxetine Treatment Before SD Does Not Protect Against the Induction of Depressive-Like Behavior

We next determined if this protective effect of ketamine extended to other antidepressants. Mice were administered 3 weeks of fluoxetine (Flx) (18 mg kg^{-1}) treatment before the start of SD (Figure 4A; Figure S7 in Supplement 1). On day 2 of the FST, Ctrl-Vehicle (Veh) and Ctrl-Flx displayed equal levels of immobility time (Figure 4B). In SD mice, fluoxetine did not improve immobility time induced by SD (Figure 4C,D). These data indicate that fluoxetine, unlike ketamine, is not capable of preventing stress-induced behavioral despair as measured by the FST.

We also assessed a number of other behaviors following fluoxetine treatment (Figure S8 in Supplement 1). Fluoxetine treatment did not significantly alter anxiety or cognition but did affect metabolism (Figure S8G–S8H in Supplement 1). Interestingly, unlike SD-K (30 mg kg^{-1}) mice, SD-Flx mice do not display differences during SD bouts when compared with

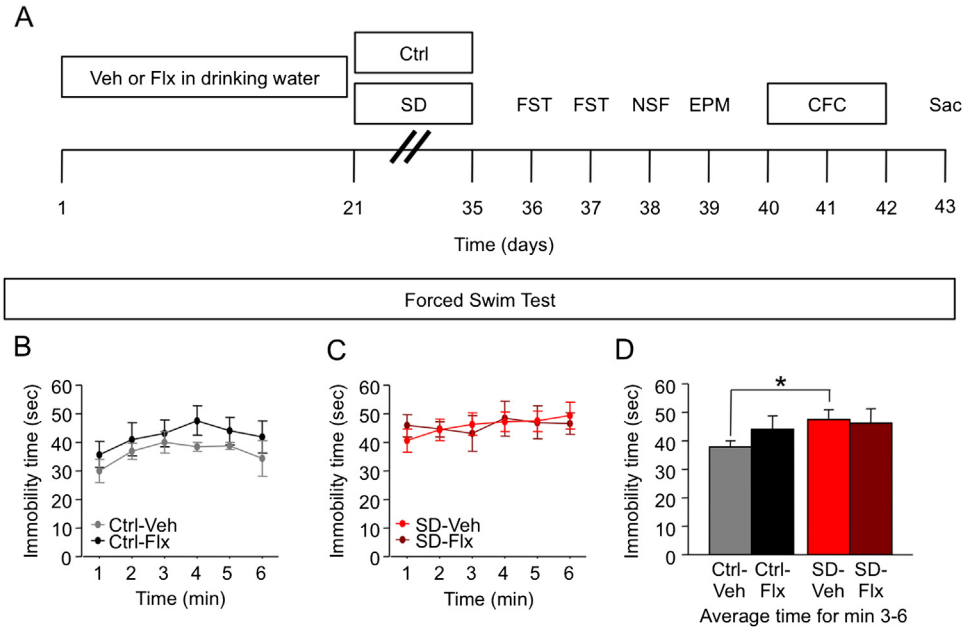


Figure 4. Fluoxetine (Flx) does not protect against depressive-like behavior following social defeat (SD). **(A)** Experimental design. **(B)** On day 2 of the forced swim test (FST), group housed (Ctrl)-vehicle (Veh) and Ctrl-Flx mice did not differ from each other. **(C)** SD-Veh and SD-Flx mice exhibited similar amounts of immobility time. **(D)** Average immobility time for minutes 3 to 6 was increased in the SD-Veh mice when compared with Ctrl-Veh mice. (n = 8 male mice per group). Error bars represent ± SEM. *p < .05. CFC, contextual fear conditioning; EPM, elevated plus maze; NSF, novelty suppressed feeding; Sac, sacrifice.

SD-Veh mice (Figure S9 in Supplement 1). These data suggest that fluoxetine treatment cannot protect against depressive-like behavior as ketamine does.

Ketamine Administered After SD Does Not Improve Depressive-Like Behavior

To compare the robustness of prophylactic ketamine relative to its typical use as an antidepressant, we next asked if ketamine could improve behavioral despair if administered after SD (Figure 5A). Mice were administered 2 weeks of SD and then received one injection of saline or ketamine the day after the final SD session. On day 2 of the FST, Ctrl-Sal and Ctrl-K mice did not display different immobility time (Figure 5B). SD-Sal and SD-K mice had similar levels of immobility time (Figure 5C). We averaged minutes 3 to 6 and found that SD increased immobility time, but ketamine given after SD did not decrease immobility time (Figure 5D). These data indicate that ketamine more potently decreases behavioral despair in the FST when given as a prophylactic before SD than after SD.

We also assessed a number of other behaviors following ketamine treatment (Figure S10 in Supplement 1). In Ctrl mice,

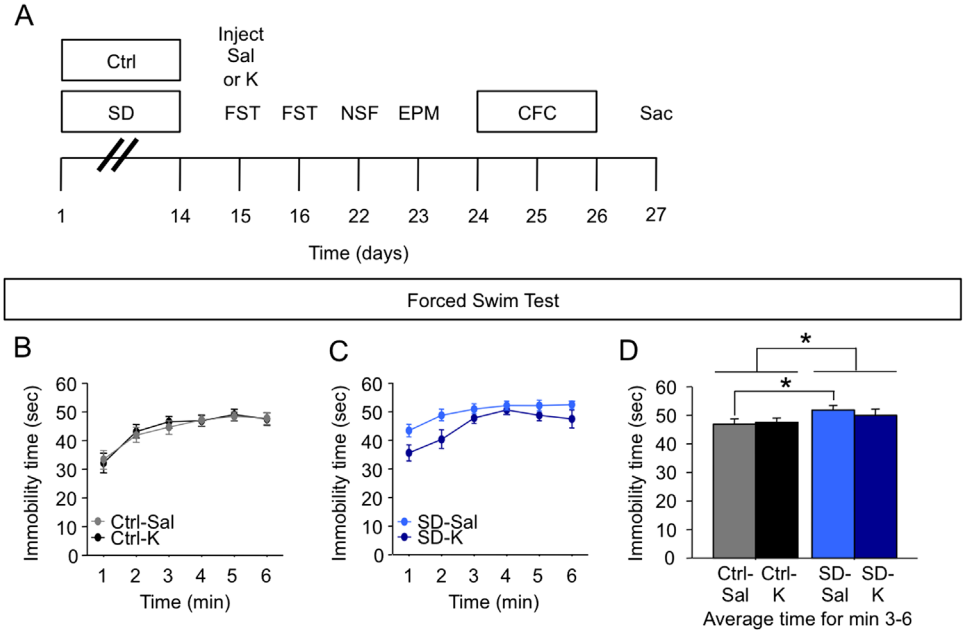


Figure 5. Ketamine (K) given after social defeat (SD) does not improve depressive-like behavior. **(A)** Experimental design. **(B)** On day 2 of the forced swim test (FST), group housed (Ctrl)-saline (Sal) and Ctrl-K mice did not differ from each other. **(C)** SD-Sal and SD-K mice had similar levels of immobility time. **(D)** Average immobility time for minutes 3 to 6 was increased in the SD-Sal mice when compared with Ctrl-Sal mice. (n = 12–15 male mice per group). Error bars represent ± SEM. *p < .05. CFC, contextual fear conditioning; EPM, elevated plus maze; NSF, novelty suppressed feeding; Sac, sacrifice.

ketamine decreased the latency to eat in the NSF when compared with saline (Figure S10A in Supplement 1). This effect was abolished in the SD mice, most likely due to weight loss differences between Ctrl and SD mice (Figure S10B–S10C in Supplement 1). Interestingly, ketamine lessened the percentage of weight loss in the SD mice when compared with saline, possibly by protecting against stress-induced hypophagia (Figure S10D in Supplement 1). Ketamine also did not impact CFC learning (Figure S10G–S10J in Supplement 1). Most importantly, although we did not detect differences from prophylactic ketamine treatment, we did determine that ketamine administered after SD significantly increases the number of $Ki67^{+}$ cells in the dentate gyrus (Figure S10K in Supplement 1).

Prophylactic Ketamine Protects Against Learned Helplessness

We hypothesized that ketamine would protect against LH, a paradigm in which a mouse is exposed to inescapable shocks (28–30). Mice were injected with saline or ketamine and administered an inescapable shock stress protocol (LH training) 1 week later (Figure 6A). Two weeks later, mice were administered a shock escape protocol (LH testing) and the latency to escape the shock was measured. The activity in the habituation phase during testing did not differ between mice administered saline or ketamine (Figure 6B). However, mice injected with ketamine had a decreased latency to escape the shock when compared with mice injected with saline (Figure 6C,D). Moreover, the session length was significantly shorter in the ketamine mice than in the saline mice (Figure 6E). These data indicate that ketamine protection is not just limited to SD stress.

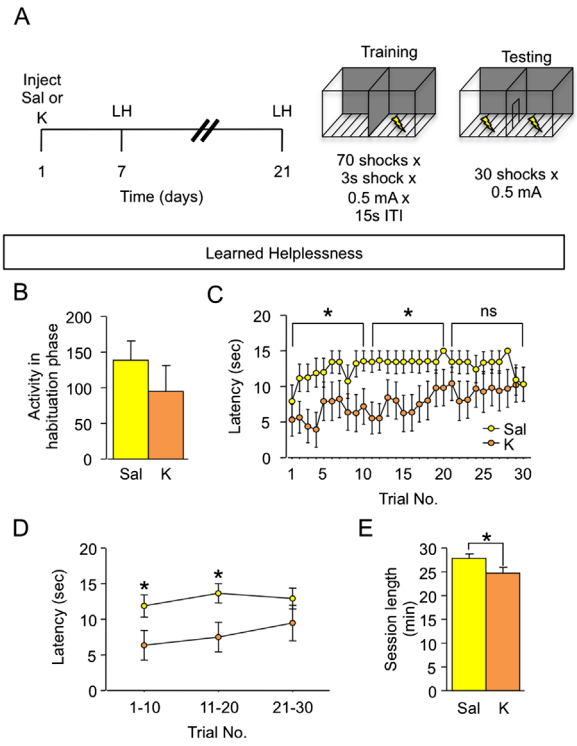


Figure 6. Ketamine (K) protects against depressive-like behavior in learned helplessness (LH). **(A)** Experimental design. **(B)** Activity in the habituation phase during testing did not differ between groups. **(C, D)** The latency to escape the shock was significantly less in the K-injected mice when compared with the saline (Sal)-injected mice. **(E)** The total session length for all 30 trials was significantly less in the K-injected mice when compared with the Sal-injected mice. (n = 8–9 male mice per group). Error bars represent ± SEM. *$p < .05$. ITI, intertrial interval; ns, nonsignificant.

Prophylactic Ketamine Protects Against the Depressive-Like Effects of Chronic Corticosterone Treatment

To address whether ketamine was protective in a third stress model, we utilized a mouse model of anxiety/depression based on elevation of glucocorticoids (3 weeks of chronic CORT administration in C57BL/6NTac mice) (27). We tested the protective effects of a chronic fluoxetine treatment (18 mg kg^{-1} for 3 weeks) or a single injection of ketamine (10, 30, or 90 mg kg^{-1}) given before CORT administration (Figure 7A). We found that ketamine (90 mg kg^{-1}) and fluoxetine prevented the CORT-induced increase in body weight (Figure S11A in Supplement 1).

Both ketamine (90 mg kg^{-1}) and fluoxetine decreased immobility time on day 2 in the FST (Figure 7B,C). Chronic CORT induced depressive-like symptoms (e.g., increased grooming latency) in the ST (Figure 7D). Here, ketamine (90 mg kg^{-1}), but not fluoxetine, prevented the chronic CORT-induced depressive-like phenotype (Figure 7D). These data indicate that the protective effect of ketamine extends to a third depression model.

In the NSF, ketamine (10 and 90 mg kg^{-1}) prevented the chronic CORT-induced increase in latency to feed (Figure 7E; Figure S11 in Supplement 1). However, only ketamine (90 mg kg^{-1}) increased home cage food consumption (Figure 7F). Finally, we assayed anxiety behavior using the EPM (Figure S12 in Supplement 1). CORT-Veh mice spent more time in the closed arms than Veh-Veh mice. Neither ketamine nor fluoxetine robustly protected against this anxiety-like phenotype. In summary, these data suggest that 90 mg kg^{-1} of ketamine is the most effective dose in protecting against depressive-like behavior following chronic CORT treatment in C57BL/6NTac mice.

Ketamine Administered After Chronic Corticosterone Does Not Improve Depressive-Like Behavior

Finally, as in the SD model, we measured the behavioral impact of ketamine when given after CORT (Figure S13A in Supplement 1). In this experimental design, mice were administered 4 weeks of CORT and then received either one injection of saline or ketamine, or vehicle or fluoxetine for 2 weeks. Here, we utilized the tail suspension test (TST) and the NSF to test the same behavior on multiple occasions. Fluoxetine, but not ketamine, decreased immobility time in the TST at both time points tested following CORT (Figure S13B–S13C in Supplement 1). In the NSF, CORT treatment increased the latency to feed when compared with Veh treatment. Fluoxetine, but not ketamine, decreased the latency

to feed 14 days, but not 7 days, after the start of treatment (Figure S13D–S13I in Supplement 1). In summary, as previously demonstrated in the SD model, these data further indicate that ketamine more potently improves depressive-like behavior when given as a prophylactic before CORT treatment rather than after CORT treatment.

DISCUSSION

Here, we have shown that a single injection of ketamine administered before SD protected mice against stress-induced increased immobility time in the FST. Additionally, ketamine protected mice against stress-induced social avoidance of an aggressor mouse. We found that mice administered ketamine before SD were protected against stress-induced depressive-like behavior, but consistent with the literature definition of stress resilience, their behavior in anxiety tests and levels of adult hippocampal neurogenesis were not significantly altered. Interestingly, in the SD paradigm, only a subanesthetic dose (30 mg kg^{-1}) of ketamine was found to be effective.

The prophylactic effect of ketamine was recapitulated in two additional models. In LH, ketamine decreased depressive-like, helpless behavior. In the CORT model, ketamine was protective against depressive-like behaviors (FST, ST), anxiety (NSF), and metabolic changes (body weight), albeit at a slightly higher dose (90 mg kg^{-1}) than in SD or LH. The efficacy of the higher dose in the CORT model is perhaps attributable to mouse strain differences (C57BL/6NTac versus 129S6/SvEv). Nevertheless, the dose administered in the CORT model is in the anesthetic range, whereas the dose in the SD/LH model is subanesthetic. If an equivalent anesthetic dose were required to obtain prophylactic efficacy in humans, acute side effects would need to be considered when developing treatment regimens.

Administration of the classic antidepressant fluoxetine before stress did not consistently or robustly protect against stress-induced depressive-like behavior. In the SD model, fluoxetine did not improve immobility time in the FST, but in the CORT model, fluoxetine protected against immobility time in the FST and body weight alterations. Thus, it remains to be fully determined if antidepressant drugs other than ketamine can protect against depressive-like behavior. Perhaps other drugs may be more useful in protecting against coincident stress-induced pathologies (e.g., anxiety, cognitive deficits, metabolic disturbances).

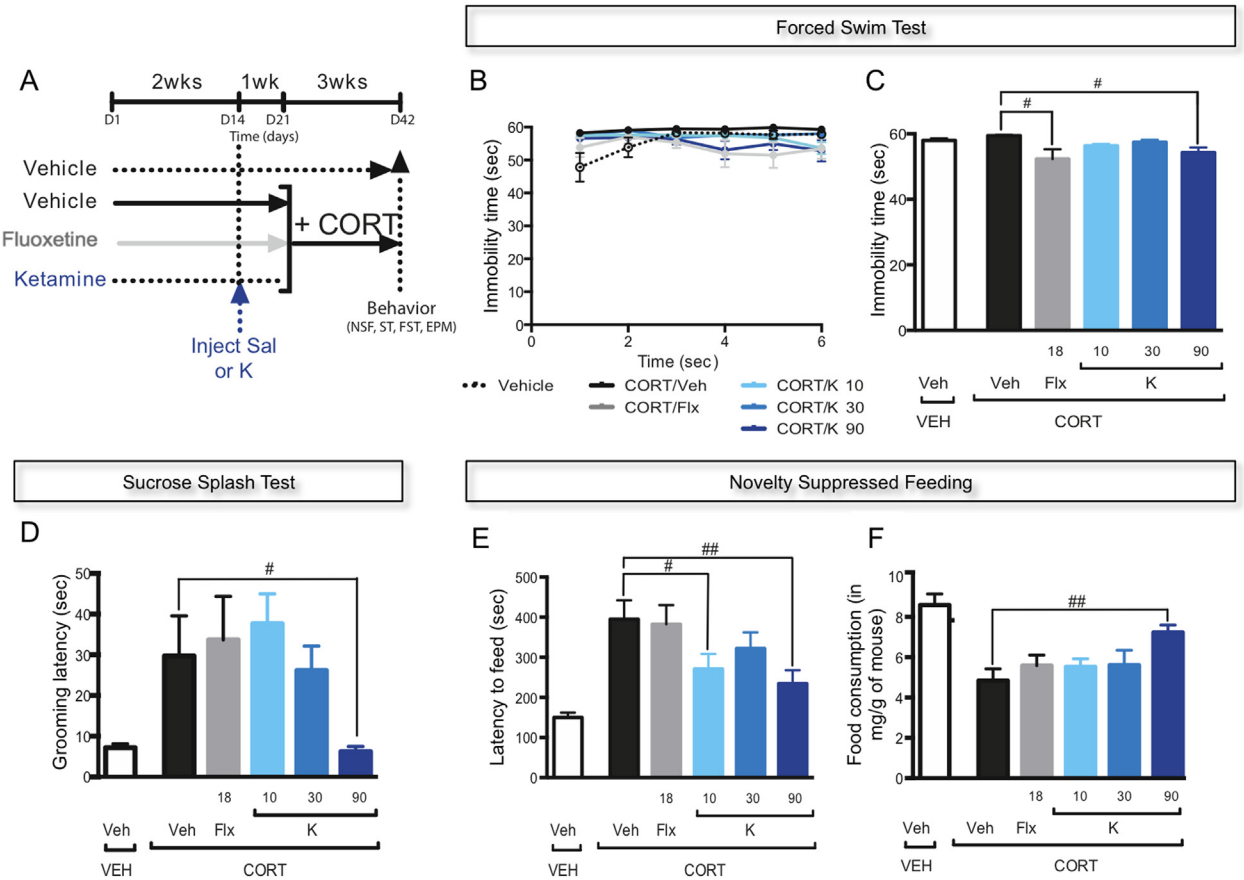


Figure 7. Ketamine (K) protects against depressive-like and anxiety behavior induced with a neuroendocrine model. **(A)** Experimental paradigm schematic. **(B, C)** Corticosterone (CORT) mice administered K (90 mg kg^{-1}) or fluoxetine (Flx) (18 mg kg^{-1}/day) exhibited significantly reduced immobility in the forced swim test (FST). **(D)** Chronic CORT increased the latency to groom during the sucrose splash test (ST). In contrast to Flx, K for the highest doses tested (90 mg kg^{-1}) decreased the latency to groom during the ST. **(E)** K (10 and 90 mg kg^{-1}) decreased the latency to feed in the novelty suppressed feeding (NSF). **(F)** K (90 mg kg^{-1}) increased home food consumption. (n = 10–15 male mice per group). Error bars represent ± SEM. $^{\#}p < .05$, $^{\#\#}p < .01$. EPM, elevated plus maze; Sal, saline; Veh, vehicle.

Though preventing psychopathology has obvious advantages over noncurative medication regimens, we also wanted to assess the relative potencies of ketamine's protective and antidepressant effects. Interestingly, when ketamine was administered following stress, we did not observe a significant decrease in immobility time in the FST or TST. In our SD model, we utilized a 30 mg kg^{-1} dose, but in the CORT model, we utilized a 10 mg kg^{-1} dose to compare with more recent studies using ketamine as an antidepressant in C57BL mice (12,33). This suggests that the beneficial effects of ketamine on stress-induced pathology may be more robust when given before stress. In contrast, Donahue *et al.* (12) recently found the converse when they administered ketamine either 1 hour after the final SD session or 24 hours before the first SD session. A high (20 mg kg^{-1})—but not low (2.5 mg kg^{-1})—dose of ketamine following the final SD session attenuated social avoidance but not anhedonia. Conversely, when ketamine (20 mg kg^{-1}) was administered before SD, it did not attenuate social avoidance. The lack of effect in their experiments, however, does not mean that ketamine's protective effect is not as robust as we suggest. The effect of ketamine is less likely effective, as a C57BL/6J strain is utilized in the Donahue *et al.* (12) study, but as we have shown in the CORT model, a higher dose is necessary for prophylactic efficacy in C57BL mice. For future studies, we believe that a dose titration curve is necessary in each model. Based on our data, we predict that ketamine dosing for prophylactic administration may likely differ from antidepressant administration.

Ketamine-induced resilience is robust and long lasting—persisting at least 3 weeks postinjection in the SD model and 4 weeks postinjection in the CORT model. It is worth noting that as the half-life of ketamine is only a few hours in rodents (39), ketamine is not bioactive at any point during the SD fighting bouts, LH, or CORT administration. Thus, the process by which ketamine protects against depressive-like behavior is necessarily self-maintaining. Further investigation will be required to identify the mechanisms underlying this process. We have shown, however, that ketamine can alter ongoing response to a chronic stressor. In the SD model, our data suggest that ketamine alters the way in which mice react to the fighting bouts, which may contribute to the differences in developing depressive-like behavior at a later time point. Not only do the SD-K (30 mg kg^{-1}) mice have a decreased immobility time during the fighting bouts, but also the CD-1 mice attack the SD-K (30 mg kg^{-1}) mice at greater latencies.

Work done characterizing stress resilience in other models has implicated a series of mechanisms, including adult hippocampal neurogenesis, HPA axis output (10,13,14), ΔFosB expression in the prefrontal cortex (11,40) and striatum (12), activation of the infralimbic cortex and the mesolimbic dopaminergic system (4,5,11,12,41–44), glutamatergic tone (38), and altered leukocyte and cytokine profiles (15,16). Additionally, ketamine has been shown to induce rapid and persistent remodeling of synapses (45). In our model, ketamine administration acutely, but transiently, increased proliferative adult hippocampal neurogenesis. Whether this contributes to mechanisms of prophylactic or antidepressant ketamine remains to be determined. As ketamine prevents SD-induced HPA axis dysregulation, we hypothesize that the HPA axis may partially mediate the differences in how the SD-K mice respond to the SD fighting bouts. Further analysis will be needed to elucidate the mechanisms underlying ketamine's resilience-enhancing properties. It is worth noting that these mechanisms are likely divergent from those of ketamine's antidepressant effects.

In summary, these experiments demonstrate that ketamine has a long-lasting resilience-enhancing effect and protects against the deleterious effects of chronic stress on depressive-like behaviors. Because the protective effect of ketamine persists beyond its half-life of 2 to 2.5 hours, assuming the prophylactic effect translates to humans, it is potentially useful as a vaccine-like strategy in at-risk populations where high-stress conditions can be predicted. Active combat soldiers offer a good example of a predictably at-risk patient population. Administration of ketamine before deployment may mitigate the emergence of posttraumatic stress disorder or other stress-related disorders in this vulnerable population. How far out this prophylaxis persists is as of yet unknown. Whether subsequent injections would have a similar, increasing, or deleterious effect on stress resilience also has yet to be tested. If these effects do translate from mice to humans, ketamine may offer a novel, clinic-ready approach to protect and prevent at-risk patients from developing stress-induced disorders.

ACKNOWLEDGMENTS AND DISCLOSURES

RAB was supported by National Institute of Child Health and Human Development T32HD07430. DJD currently was supported by Lundbeck and the Brain & Behavior Research Foundation (formerly National Alliance for Research on Schizophrenia and Depression). The lab UMR S 1178 is funded by Agence Nationale pour la Recherche SAMENTA (ANR-12-SAMA-0007). RH was supported by R37 MH068542, R01 AG043688, and a Hope for Depression Research Foundation grant. CAD was supported by National Institutes of Health T32 MH015174-36, National Institutes of Health DP5 OD017908-01, a National Alliance for Research on Schizophrenia and Depression Young Investigator Grant from the Brain & Behavior Research Foundation, and New York Stem Cell Science N13S-006. Cognitive and behavioral phenotyping experiments utilized the facilities of the Rodent Models Neurobehavioral Analysis Core of the Lieber Center for Schizophrenia Research at Columbia University and the New York State Psychiatric Institute.

We thank the animal care facility ANIMEX of SFR-UMRS Institut Paris-Saclay d'Innovation Thérapeutique of Universite Paris-Sud for their technical assistance. We thank members of the Denny and Hen laboratories for insightful comments on this project and manuscript and M. Drew and Z. Donaldson for assistance with statistical analyses. We thank A. Jonathan for his constant assistance in the Rodent Models Neurobehavioral Analysis Core.

DJD serves as a consultant for Lundbeck, Roche, and Servier. RH receives compensation as a consultant for Lundbeck, Servier, and Roche. All other authors report no biomedical financial interests or potential conflicts of interest.

ARTICLE INFORMATION

From the Departments of Neuroscience (RAB) and Psychiatry (JCM, JNP, SCL, RH, CAD), Columbia University, New York; and Division of Integrative Neuroscience (JCM, JNP, SCL, RH, CAD), New York State Psychiatric Institute/Research Foundation for Mental Hygiene, Inc., New York, New York; Institut National de la Santé et de la Recherche Médicale UMR-S 1178 Santé Mentale et Santé Publique, Université Paris-Sud, Fac Pharmacie, Université Paris Saclay, Châtenay-Malabry, France; and Department of Pharmacology (RH), Columbia University, New York, New York.

Address correspondence to Christine Ann Denny, Ph.D., Columbia University/Research Foundation for Mental Hygiene, Inc., Psychiatry, NYSPI Kolb Research Annex, Room 777, 1051 Riverside Drive, Unit 87, New York, NY 10032-2695; E-mail: cad2125@cumc.columbia.edu.

Received Dec 30, 2014; revised Apr 14, 2015; accepted Apr 14, 2015.

Supplementary material cited in this article is available online at http://dx.doi.org/10.1016/j.biopsych.2015.04.022.

REFERENCES

1. Tanielian T, Jaycox LH, Schell TL, Marshall GN, Burnam MA, Eibner C, *et al*. (2008): Invisible Wounds of War: Summary and Recommendations for Addressing Psychological and Cognitive Injuries. Santa Monica, CA: RAND Corporation.
2. Russo SJ, Murrough JW, Han MH, Charney DS, Nestler EJ (2012): Neurobiology of resilience. Nat Neurosci 15:1475–1484.
3. Walsh JJ, Friedman AK, Sun H, Heller EA, Ku SM, Juarez B, *et al*. (2014): Stress and CRF gate neural activation of BDNF in the mesolimbic reward pathway. Nat Neurosci 17:27–29.
4. Chaudhury D, Walsh JJ, Friedman AK, Juarez B, Ku SM, Koo JW, *et al*. (2013): Rapid regulation of depression-related behaviours by control of midbrain dopamine neurons. Nature 493:532–536.
5. Krishnan V, Han MH, Graham DL, Berton O, Renthal W, Russo SJ, *et al*. (2007): Molecular adaptations underlying susceptibility and resistance to social defeat in brain reward regions. Cell 131:391–404.
6. Levine S (1957): Infantile experience and resistance to physiological stress. Science 126:405.
7. Lyons DM, Parker KJ (2007): Stress inoculation-induced indications of resilience in monkeys. J Trauma Stress 20:423–433.
8. Meredith LD (2011): Promoting psychological resilience in the U.S. military. Santa Monica, CA: RAND Corporation.
9. Schoenfeld TJ, Rada P, Pieruzzini PR, Hsueh B, Gould E (2013): Physical exercise prevents stress-induced activation of granule neurons and enhances local inhibitory mechanisms in the dentate gyrus. J Neurosci 33:7770–7777.
10. Schloesser RJ, Lehmann M, Martinowich K, Manji HK, Herkenham M (2010): Environmental enrichment requires adult neurogenesis to facilitate the recovery from psychosocial stress. Mol Psychiatry 15: 1152–1163.
11. Lehmann ML, Herkenham M (2011): Environmental enrichment confers stress resiliency to social defeat through an infralimbic cortex-dependent neuroanatomical pathway. J Neurosci 31:6159–6173.
12. Donahue RJ, Muschamp JW, Russo SJ, Nestler EJ, Carlezon WA Jr (2014): Effects of striatal deltaFosB overexpression and ketamine on social defeat stress-induced anhedonia in mice. Biol Psychiatry 76:550–558.
13. Lehmann ML, Mustafa T, Eiden AM, Herkenham M, Eiden LE (2013): PACAP-deficient mice show attenuated corticosterone secretion and fail to develop depressive behavior during chronic social defeat stress. Psychoneuroendocrinology 38:702–715.
14. Lehmann ML, Brachman RA, Martinowich K, Schloesser RJ, Herkenham M (2013): Glucocorticoids orchestrate divergent effects on mood through adult neurogenesis. J Neurosci 33:2961–2972.
15. Brachman RA, Lehmann ML, Maric D, Herkenham M (2015): Lymphocytes from chronically stressed mice confer antidepressant-like effects to naïve mice. J Neurosci 35:1530–1538.
16. Hodes GE, Pfau ML, Leboeuf M, Golden SA, Christoffel DJ, Bregman D, *et al*. (2014): Individual differences in the peripheral immune system promote resilience versus susceptibility to social stress. Proc Natl Acad Sci U S A 111:16136–16141.
17. Keller MB, Boland RJ (1998): Implications of failing to achieve successful long-term maintenance treatment of recurrent unipolar major depression. Biol Psychiatry 44:348–360.
18. Montgomery SA, Dufour H, Brion S, Gailledreau J, Laqueille X, Ferrey G, *et al*. (1988): The prophylactic efficacy of fluoxetine in unipolar depression. Br J Psychiatry Suppl 3:69–76.
19. Montgomery SA, Dunbar G (1993): Paroxetine is better than placebo in relapse prevention and the prophylaxis of recurrent depression. Int Clin Psychopharmacol 8:189–195.
20. Montgomery SA, Rasmussen JG, Tanghoj P (1993): A 24-week study of 20 mg citalopram, 40 mg citalopram, and placebo in the prevention of relapse of major depression. Int Clin Psychopharmacol 8:181–188.
21. Doogan DP, Caillard V (1992): Sertraline in the prevention of depression. Br J Psychiatry 160:217–222.
22. Frank E, Prien RF, Jarrett RB, Keller MB, Kupfer DJ, Lavori PW, *et al*. (1991): Conceptualization and rationale for consensus definitions of terms in major depressive disorder. Remission, recovery, relapse, and recurrence. Arch Gen Psychiatry 48:851–855.
23. Zarate CA Jr, Singh JB, Carlson PJ, Brutsche NE, Amelia R, Luckenbaugh DA, *et al*. (2006): A randomized trial of an N-methyl-D-aspartate antagonist in treatment-resistant major depression. Arch Gen Psychiatry 63:856–864.
24. Murrough JW, Perez AM, PIllemer S, Stern J, Parides MK, aan het Rot M, *et al*. (2013): Rapid and longer-term antidepressant effects of repeated ketamine infusions in treatment-resistant major depression. Biol Psychiatry 74:250–256.
25. Idvall J, Ahlgren I, Aronsen KR, Stenberg P (1979): Ketamine infusions: Pharmacokinetics and clinical effects. Br J Anaesth 51:1167–1173.
26. Denny CA, Kheirbek MA, Alba EL, Tanaka KF, Brachman RA, Laughman KB, *et al*. (2014): Hippocampal memory traces are differentially modulated by experience, time, and adult neurogenesis. Neuron 83: 189–201.
27. David DJ, Samuels BA, Rainer Q, Wang JW, Marsteller D, Mendez I, *et al*. (2009): Neurogenesis-dependent and -independent effects of fluoxetine in an animal model of anxiety/depression. Neuron 62:479–493.
28. Hammack SE, Cooper MA, Lezak KR (2012): Overlapping neurobiology of learned helplessness and conditioned defeat: Implications for PTSD and mood disorders. Neuropharmacology 62:565–575.
29. Maier SF, Seligman MEP (1976): Learned helplessness: Theory and evidence. J Exp Psychol 105:3–46.
30. Muller JM, Morelli E, Ansorge M, Gingrich JA (2011): Serotonin transporter deficient mice are vulnerable to escape deficits following inescapable shocks. Genes Brain Behav 10:166–175.
31. Porsolt RD, Le Pichon M, Jalfre M (1977): Depression: A new animal model sensititve to antidepressant treatments. Nature 266:730–732.
32. Dulawa SC, Holick KA, Gundersen B, Hen R (2004): Effects of chronic fluoxetine in animal models of anxiety and depression. Neuropsychopharmacology 29:1321–1330.
33. Autry AE, Adachi M, Nosyreva E, Na ES, Los MF, Cheng PF, *et al*. (2011): NMDA receptor blockade at rest triggers rapid behavioural antidepressant responses. Nature 475:91–95.
34. da Silva FC, do Carmo de Oliveira Cito M, da Silva MA, Moura BA, de Aquino Neto MR, Feitosa ML, *et al*. (2010): Behavioral alterations and pro-oxidant effect of a single ketamine administration to mice. Brain Res Bull 83:9–15.
35. Caddy C, Giaroli G, White TP, Shergill SS, Tracy DK (2014): Ketamine as the prototype glutamatergic antidepressant: Pharmacodynamic actions, and a systematic review and meta-analysis of efficacy. Ther Adv Psychopharmacol 4:75–99.
36. Denny CA, Burghardt NS, Schachter DM, Hen R, Drew MR (2012): 4- to 6-week-old adult-born hippocampal neurons influence novelty-evoked exploration and contextual fear conditioning. Hippocampus 22:1188–1201.
37. Drew MR, Denny CA, Hen R (2010): Arrest of adult hippocampal neurogenesis in mice impairs single- but not multiple-trial contextual fear conditioning. Behav Neurosci, 124, 446–454.
38. Yu T, Guo M, Garza J, Rendon S, Sun XL, Zhang W, Lu XY (2011): Cognitive and neural correlates of depression-like behaviour in socially defeated mice: An animal model of depression with cognitive dysfunction. Int J Neuropsychopharmacol 14:303–317.
39. Williams ML, Mager DE, Parenteau H, Gudi G, Tracy TS, Mulheran M, Wainer IW (2004): Effects of protein calorie malnutrition on the pharmacokinetics of ketamine in rats. Drug Metab Dispos 32: 786–793.
40. Vialou V, Bagot RC, Cahill ME, Ferguson D, Robison AJ, Dietz DM, *et al*. (2014): Prefrontal cortical circuit for depression- and anxiety-related behaviors mediated by cholecystokinin: Role of DeltaFosB. J Neurosci 34:3878–3887.
41. Vialou V, Robison AJ, Laplant QC, Covington HE 3rd, Dietz DM, Ohnishi YN, *et al*. (2010): DeltaFosB in brain reward circuits mediates resilience to stress and antidepressant responses. Nat Neurosci 13: 745–752.

42. Vialou V, Maze I, Renthal W, LaPlant QC, Watts EL, Mouzon E, *et al*. (2010): Serum response factor promotes resilience to chronic social stress through the induction of DeltaFosB. J Neurosci 30:14585–14592.
43. Cao JL, Covington HE 3rd, Friedman AK, Wilkinson MB, Walsh JJ, Cooper DC, *et al*. (2010): Mesolimbic dopamine neurons in the brain reward circuit mediate susceptibility to social defeat and antidepressant action. J Neurosci 30:16453–16458.
44. Covington HE 3rd, Lobo MK, Maze I, Vialou V, Hyman JM, Zaman S, *et al*. (2010): Antidepressant effect of optogenetic stimulation of the medial prefrontal cortex. J Neurosci 30:16082–16090.
45. Li N, Lee B, Liu RJ, Banasr M, Dwyer JM, Iwata M, *et al*. (2010): mTOR-dependent synapse formation underlies the rapid antidepressant effects of NMDA antagonists. Science 329: 959–964.

Ketamine as a Prophylactic Against Stress-Induced Depressive-Like Behavior

Supplemental Information

Supplemental Methods and Materials

Drugs

Experiment 1 (Pre-ketamine in social defeat (SD)): At 8 weeks of age, a single injection of saline (0.9% NaCl) or ketamine (K) (10, 30, or 90 mg kg^{-1}) (Ketaset III, Ketamine HCl, Fort Dodge Animal Health, Forth Dodge, IA) was administered. Ketamine was prepared in physiological saline and all injections were administered intraperitoneally (i.p.) in volumes of 0.1 cc per 10 mg body weight. A dose of 30 mg kg^{-1} of ketamine was chosen for the 129S6/SvEv experiments, as pilot studies indicated that this dose did not affect immobility 2 h after administration (**Figure S1**). At 9 weeks of age, 1 week following this injection, SD was started.

Experiment 2 (Post-ketamine in SD): At 9 weeks of age, SD was administered for 2 weeks. Twenty-four h after the last bout of SD, a single injection of saline or ketamine (30 mg kg^{-1}) was administered (mice were 11 weeks old). The forced swim test (FST) was administered 2 h following the injection.

Experiment 3 (Pre-fluoxetine in SD): At 6 weeks of age, fluoxetine hydrochloride (Flx) (BioTrend Chemicals AG, BG197) was administered in the drinking water (18 mg kg^{-1}/day) for 3 weeks before the start of SD. Starting at 9 weeks of age, SD was then administered for 2 weeks without vehicle or Flx in the drinking water.

Experiment 4 (Pre-ketamine in learned helplessness (LH)): At 8 weeks of age, a single injection of saline or ketamine (30 mg kg^{-1}) was administered. One week following this injection, LH training (inescapable shock) was administered. Two weeks later, mice were administered LH testing (shock escape).

Experiment 5 (Pre-ketamine and pre-fluoxetine in corticosterone (CORT)): C57BL/6NTac mice were injected with ketamine (10, 30, 90 mg kg^{-1}, i.p.) 1 week before the start of CORT, or administered fluoxetine (18 mg kg^{-1} per day) in the drinking water for 3 weeks before the start of CORT. Ketamine was purchased from Merial (100 mg/ml stock solution). Fluoxetine hydrochloride (160 μg/mL, equivalent to 18 mg kg^{-1} per day in the drinking water) was purchased from Anawa Trading (Zurich, Switzerland) and dissolved in 0.45% hydroxypropyl-β-cyclodextrin (β-CD) (Sigma-Aldrich, Saint-Quentin Fallavier, France) solution. Following ketamine or fluoxetine treatment, CORT was administered for 3 weeks in the drinking water. CORT (4-pregnen-11b-DIOL-3 20-DIONE 21-hemisuccinate) (35 μg/ml) from Sigma Aldrich (Saint-Quentin Fallavier, France) was dissolved in vehicle (0.45% β-CD). Control animals received vehicle (0.45% β-CD) throughout the duration of the experiment.

Experiment 6 (Post-ketamine and post-fluoxetine in CORT): In C57BL/6NTac mice, vehicle or CORT was administered for 4 weeks in the drinking water. While administration with 0.45% β-CD or CORT continued, mice were injected with saline or ketamine (10 mg kg^{-1}), or were administered vehicle or chronic fluoxetine (18 mg kg^{-1} per day in the drinking water).

Social Defeat

Adult aggressor CD-1 male mice were single-housed in Macrolon® polycarbonate resin cages (15.25 in x 7.8 in x 9.5 in) (Animal Care Systems, Inc., Centennial, CO). Male 129S6/SvEvTac mice (9 weeks of age) were subsequently placed into the resident CD-1 mouse's cage. Three antagonistic encounters were allowed between the CD-1 mouse and the intruder. Each of these encounters typically lasted less than 5 min. Following the encounters, mice were separated by a polished stainless steel cage divider (Animal Care Systems, Inc., Centennial, CO, P/N C79171), which allowed for olfactory and auditory communication, but limited visual or tactile contact. The partition was removed daily for 2 weeks and 3 antagonistic encounters were allowed between the mice each day. This procedure consistently yielded a submissive phenotype in the experimental intruder mice. Control (Ctrl) mice were group housed 4 to 5 per cage in Macrolon® polycarbonate resin cages without dividers.

Corticosterone Model

The hypothalamic-pituitary-adrenal (HPA) axis is often dysregulated in clinical depression. In this model, glucocorticoid levels are exogenously increased. This chronic CORT elevation results in dysregulation of the HPA axis. For example, there is a blunting of the HPA axis response to stress in CORT-treated mice, as shown by marked attenuation of stress-induced CORT levels (1, 2). This model reliably induces anxious and depressive-like behavior in mice.

The dose and duration of CORT treatment was selected based on previous studies (1, 2, 3). CORT (35 μg/ml, equivalent to approximately 5 mg/kg/d) or vehicle (0.45 % β–CD) was available *ad libitum* in the drinking water in opaque bottles to protect it from light. CORT-treated water was changed every 3 d to prevent any possible degradation.

Learned Helplessness

The LH paradigm was used to induce depressive-like behavior (4). In this paradigm, mice are exposed to unpredictable and uncontrollable stress (shocks) and then develop coping deficits to deal with the inescapable shocks. We modified a previously published paradigm (5). Briefly, the procedure was conducted in a two-chamber shuttle box (model ENV 010MD; Med Associates, St. Albans, VT) located within a sound-attenuated cubicle. The grid floor was made of stainless steel and connected to a shock generator. The scrambled shock generator (model ENV 414S, Med Associates) created varying electrical potential differences between bars preventing an animal from avoiding shock.

Inescapable shock (training): At approximately 9 weeks of age, mice were trained in the LH paradigm. For each shuttle box, 2 animals were administered the protocol at the same time; the central door was closed, with one animal in the chamber on each side. After a 3 min habituation period, the shock deliveries began. The training protocol consisted of 70 shocks, each with a 3 s average duration, at 0.5 mA, and with an intertrial interval (ITI) of approximately 15 s. This protocol was the same as the "Med Protocol" published by Muller *et al.* (2011) (5), with the exception of the intensity (0.5 mA versus 0.6 mA).

Shock escape (testing): Mice were tested in the same shuttle box used in the inescapable shock training. The box consisted of two identical chambers (17 l x 20 w x 17 h), separated by an automated door that opened vertically. The shuttle box was equipped with 8 infrared beams (4 on each side) for detecting position and activity of the animal (Med Associates, St. Albans, VT). Each mouse was placed into the right chamber with the door raised and was allowed to freely explore both chambers for 3 min. Then the door then closed automatically.

At the beginning of each trial, the door was raised and 5 s later a foot shock (0.5 mA) was delivered. The subject's exit from the shocked side ended the trial. If the mouse did not exit after 15 s, the shock was turned off and the trial ended. The door was lowered at the end of the trial. A session consisted of 30 trials, each separated by a 30 s ITI. Escape latencies were computed as the time from shock onset to the end of trial. If the subject failed to make a transition the maximum 15 s was used for the escape latency score.

Forced Swim Test

The FST is typically used in rodents to screen for potential human antidepressants (6-7). In fact, many papers examining ketamine in mouse models only observe effects in the FST (8-10). In the FST, time spent immobile, as opposed to swimming, is used as a measure of depressive behavior.

The FST was administered as previously described (11). Briefly, mice were placed into clear plastic buckets 20 cm in diameter and 23 cm deep filled 2/3 of the way with 22°C water. Mice were videotaped from the side for 6 min and were exposed to the swim test on 2 consecutive days. For the SD experiments, scoring was performed using an automated Viewpoint Videotrack software package (http://www.viewpoint.fr/en/a/anxiety-and-depression). For the CORT experiments, automated scoring was done using the automated X'PERT FST software suite (Bioseb, Vitrolles, France). The dependent variable was immobility.

Tail Suspension Test (TST)

The TST was administered as previously described (2). Briefly, animals were suspended for 6 min and immobility during this period was assessed using an automated TST apparatus (Bioseb,

Vitrolles, France). A specific strain gauge linked to a computer quantifies the time spent by each mouse trying to escape.

Dominant Interaction

Dominant interaction was performed as previously described (12). Briefly, mice were placed into a large open field containing 2 upside-down wire mesh pencil cups. One pencil cup served as a novel object or empty container. The other pencil cup contained the CD-1 aggressor mouse. Mice were placed in the middle of the open field arena and allowed to explore for 10 min. Sessions were videotaped and the first 5 min were later analyzed using behavioral tracking software (TopScan, CleverSys, Reston, VA).

Social Interaction

Mice were placed into a large open field containing 2 upside-down wire mesh pencil cups. One pencil cup served as a novel object or empty container. The other pencil cup contained a novel 129S6/SvEv male mouse. Mice were placed in the middle of the open field arena and allowed to explore for 10 min. Sessions were videotaped and the first 5 min were later analyzed using behavioral tracking software (TopScan, CleverSys, Reston, VA).

Novelty Suppressed Feeding (NSF)

Testing was performed as previously described (13). Briefly, the testing apparatus consisted of a plastic box (50 x 50 x 20 cm). The floor was covered with approximately 2 cm of wooden bedding and the arena was brightly lit (1100-1200 lux). For 129S6/SvEv experiments, mice were food restricted for 12 h. For the C57BL/6N experiments, mice were food restricted for 24 h. All

food was removed from the home cage. At the time of testing, a single pellet of food (regular chow) was placed on a white paper platform positioned in the center of the box. Each animal was placed in a corner of the box, and a stopwatch was immediately started. The latency of the mice to begin eating was recorded. Immediately after the latency was recorded, the food pellet was removed from the arena. The mice were then placed into a cage and the amount of food consumed in 5 min was measured (home cage consumption), followed by an assessment of post-restriction weight. We used the Kaplan-Meier survival analysis due to the lack of normal distribution of data. The Mantel-Cox log-rank test was used to evaluate differences between the experimental groups.

Elevated Plus Maze (EPM)

Testing was performed as previously described (14). Briefly, the maze is a plus-cross-shaped apparatus consisting of four arms, two open and two enclosed by walls, linked by a central platform at a height of 50 cm from the floor. Mice were individually placed in the center of the maze facing an open arm and were allowed to explore the maze for 5 min. The time spent in and the number of entries into the open arms was used as an anxiety index. For the 129S6/SvEv experiments, videos were scored using behavioral tracking software (TopScan, CleverSys, Reston, VA). For the C57BL/6Ntac experiments, all parameters were measured using a videotracker (EPM3C, Bioseb, Vitrolles, France).

Contextual Fear Conditioning (CFC)

The 1-shock CFC procedure was performed as previously published (15). Briefly, mice were placed into context A and administered a 2-s shock (0.75 mA) 180 s later. Mice were removed

from the context 15 s following the termination of shock (at 197 s). For context retrieval, mice were placed back into context A for 180 s. For alternate contexts, mice were placed into the contexts for 180 s. A table of context information is listed below.

	Context A	**Context A'**	**Context B**
Scent	Lemon	No scent	Anise
Grids	Exposed	Exposed	Covered with a white plastic and bedding on top
Room Lights	ON	ON	OFF
Red Lamps	OFF	OFF	ON
House Fan	ON	ON	ON
House Lights	ON	ON	ON
Transfer Cage	Square cage	Square cage	White bucket
Cleaning	95% EtOH	95% EtOH	Saniwipes
Box Doors	Closed	Closed	Open
Modified Walls	-	Rounded green walls	Rounded green walls

Splash Test

This test consisted of squirting 200 µl of a 10% sucrose solution on the mouse's snout. The grooming duration was quantified using Stopwatch+ (Center for Behavioral Neuroscience, Georgia State University.

Open Field (OF)

The open field protocol was administered as previously described (11), with the exception that 1 quadrant was scented with female urine. Total distance traveled in each quadrant was quantified in 1-min bins.

Corticosterone Enzyme Immunoassay (EIA)

Mice were exposed to a minor stressor for 10 min and then returned to their home cages. Blood was collected from awake mice 70 min after the start of the stressor from the retro-orbital sinus using hematocrit tubes. Blood was then transferred to Eppendorf tubes pre-coated with 5 µl 0.5 M EDTA, placed on ice, and immediately spun down to obtain plasma for subsequent EIA. Plasma was stored at -80°C until analysis. EIA was performed using a DetectX Corticosterone EIA Kit (#K014-H1, Arbor Assays).

Immunohistochemistry

Mice were deeply anesthetized with ketamine (100 mg kg^{-1}) and transcardially perfused with 1X phosphate buffer saline (PBS), followed by chilled 4% paraformaldehyde (PFA)/1X PBS (15). Brains were postfixed overnight in 4% PFA at 4°C, then cryoprotected in 30% sucrose/1X PBS, and stored at 4°C. Serial coronal sections (35 µm) were cut through the entire hippocampus on a cryostat and stored in 1X PBS with 0.1% NaN_3. Doublecortin (DCX) immunohistochemistry was performed as previously described (15). For DCX immunohistochemistry, sections were washed in 1X PBS containing 0.5% Triton and then quenched in 0.3% H_2O_2 in 1X PBS/CH_3OH (1:1) for 15 min at room temperature. Sections were blocked in 10% normal donkey serum in 1X PBS with 0.5% Triton X-100 for 2 h at room temperature. Incubation with primary antibody was

performed at 4°C overnight (goat anti-DCX, 1:500, Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA, #SC 8,066) in 1X PBS with 0.5% Triton X-100. Sections were then incubated with a biotinylated secondary antibody (donkey anti-goat; 1:250, Jackson ImmunoResearch, West Grove, PA) for 2 h at room temperature. Sections were treated with avidin-biotin-peroxidase complex (ABC Elite Kit, Vector Labs, Burlingame, CA) followed by 3,3' diaminobenzidine as a substrate for staining (Vector, Burlingame, CA).

Ki67 immunohistochemistry was performed as previously described (16). For Ki67 immunohistochemistry, sections were washed in 1X PBS containing 0.5% Triton, and then blocked in 10% normal donkey serum in 1X PBS with 0.5% Triton X-100 for 2 h at room temperature. Incubation with primary antibody was performed at 4°C overnight (rabbit anti-Ki67, 1:100, Vector Laboratories, Burlingame, CA, #VP-RM04) in 1X PBS with 0.5% Triton X-100. Sections were then incubated with a biotinylated secondary antibody (donkey anti-rabbit; 1:250, Jackson ImmunoResearch, West Grove, PA) for 2 h at room temperature. Sections were treated with avidin-biotin-peroxidase complex (ABC Elite Kit, Vector Labs, Burlingame, CA) followed by 3,3' diaminobenzidine as a substrate for staining (Vector, Burlingame, CA).

Cell Quantification

An investigator blind to treatment used a Zeiss Axioplan-2 upright microscope (Oberkochen, Germany) to count cells bilaterally in the granule cell layer of the dentate gyrus throughout the entire rostro-caudal axis of the hippocampus (HPC). Every sixth section throughout the entire extent of the HPC was included in the analysis. Cells were counted bilaterally using a 20X objective. The average cells per section are presented throughout the text.

Statistical Analysis

Results from data analyses are expressed as means ± SEM. Alpha was set to 0.05 for all analyses. Data were analyzed using StatView 5.0 software (SAS Institute, Cary, NC) for the SD experiments and were analyzed using GraphPad Prism v6.0f for the CORT experiments. For all experiments, one-way or one-way ANOVAs with repeated-measures were applied to the data as appropriate. Significant main effects and/or interactions were followed by Fisher's protected least significant difference post-hoc analysis or unpaired *t*-tests. All main effects and interactions are noted throughout the text.

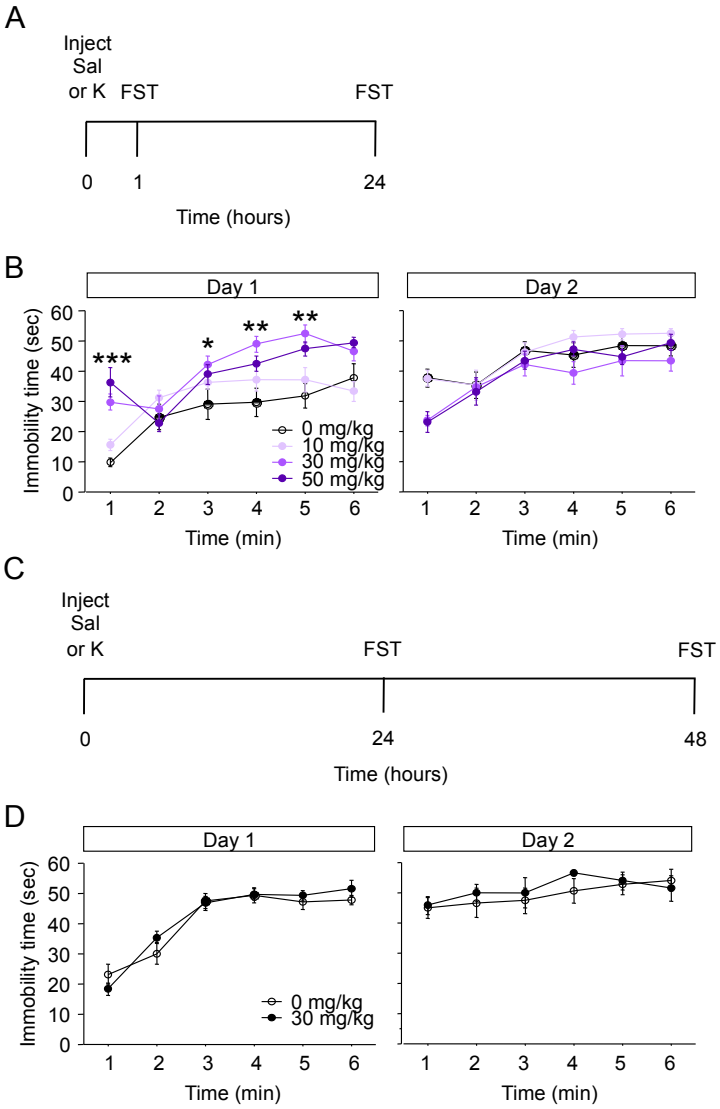


Figure S1. *Ketamine does not alter immobility long term in the FST.* (**A**) Mice were injected with saline or ketamine (10, 30, or 50 mg kg^{-1}) and administered the FST 1 h later. (**B**) Ketamine altered immobility on day 1. Mice injected with 30 mg kg^{-1} of ketamine were significantly different than mice injected with saline (0 mg kg^{-1}) at minutes 1, 3, 4, and 5 (p's < 0.05). Asterisks indicated significance for the 30 mg kg^{-1} group. Mice injected with 50 mg kg^{-1} of ketamine were significantly different than mice injected with saline (0 mg/kg) at minutes 1, 4, 5, and 6 (p's < 0.05). All groups had similar levels of immobility on day 2. (**C**) Mice were injected with saline or ketamine (30 mg kg^{-1}) and administered the FST 24 h and 48 h later. (**D**) All groups have similar levels of immobility on day 1 and day 2 of the FST. n = 8 male 129S6/SvEv mice per group. Error bars represent $\pm$ SEM. * p < 0.05, ** p < 0.01, *** p < 0.001.

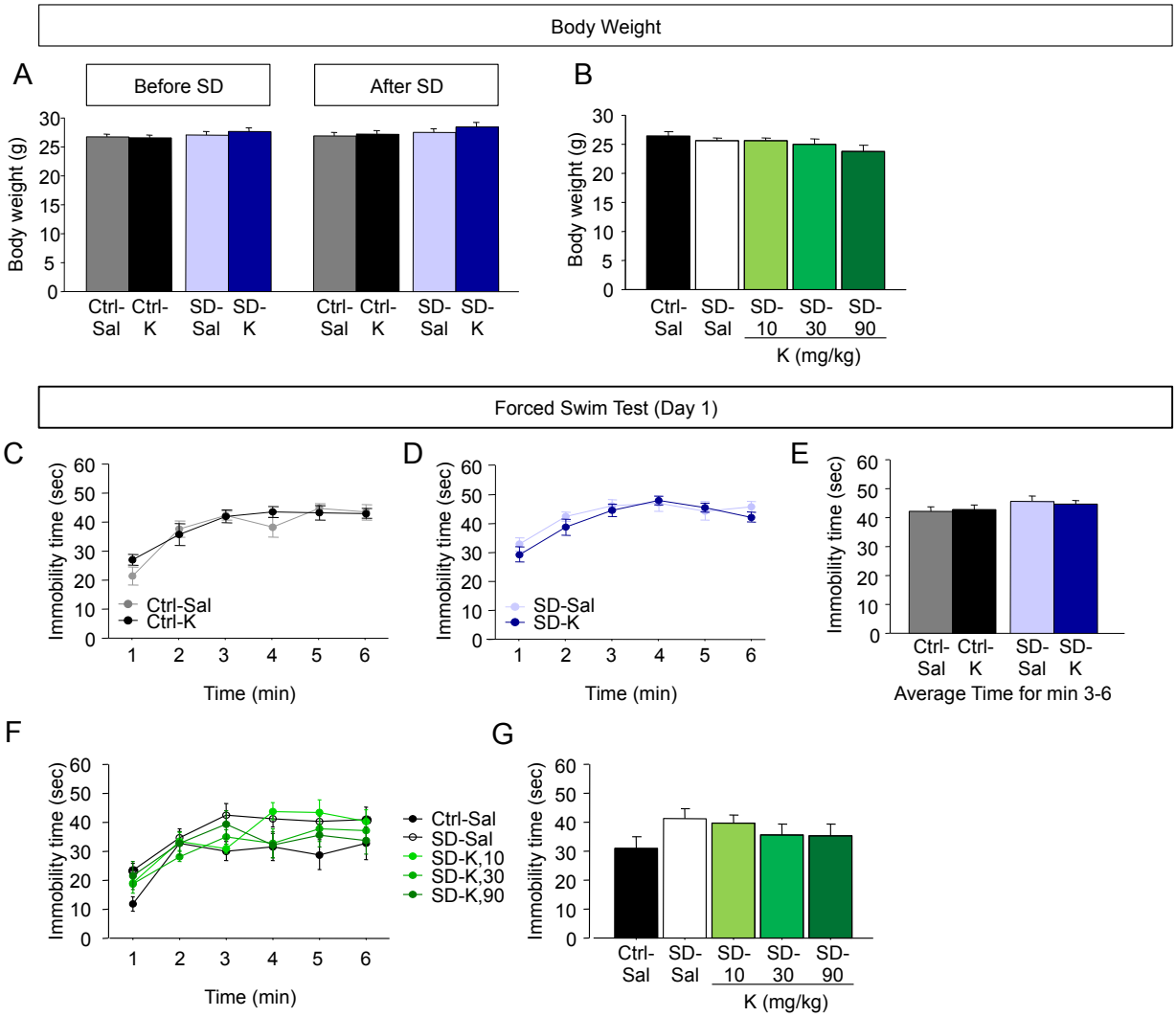


Figure S2. *Neither ketamine nor social defeat impact body weight.* (**A**) Ctrl and SD mice had comparable body weights before the start of SD and following SD. Ketamine did not affect body weight in either of these groups. (**B**) Varying doses of ketamine did not alter body weight. (**C-D**) Ketamine or SD did not affect immobility time on day 1 of the FST. (**E**) The average immobility time for min 3-6 did not differ between groups. (**F**) Varying doses of ketamine did not alter immobility time on day 1 of the FST. (**G**) The average immobility time for minutes 3-6 did not differ between groups. n = 7-15 male 129S6/SvEv mice per group. Error bars represent ± SEM.

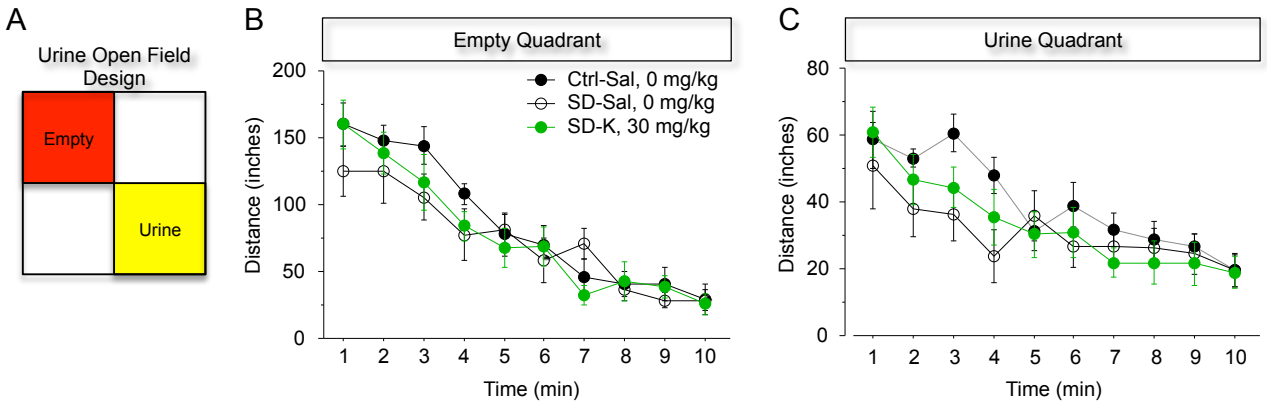


Figure S3. *Neither ketamine nor social defeat impact open field exploration.* (**A**) Experimental design. One quadrant of the open field was scented with female 129S6/SvEv urine. (**B-C**) All groups of mice displayed comparable levels of exploration in the empty quadrant and in the urine scented quadrant. n = 8 male 129S6/SvEv mice per group. Error bars represent ± SEM.

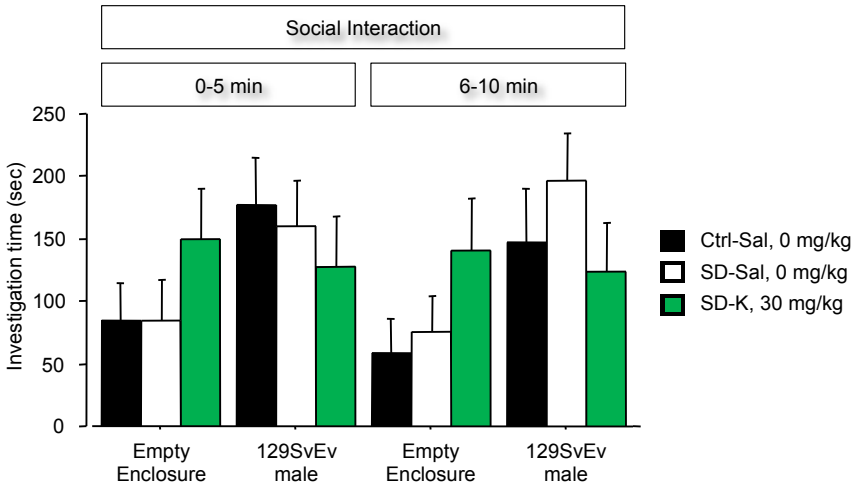


Figure S4. *Ketamine does not alter social interaction investigation time.* All groups of mice explored an empty enclosure and a novel 129S6/SvEv male for comparable amounts of time during a social interaction paradigm. n = 8 male 129S6/SvEv mice per group. Error bars represent ± SEM.

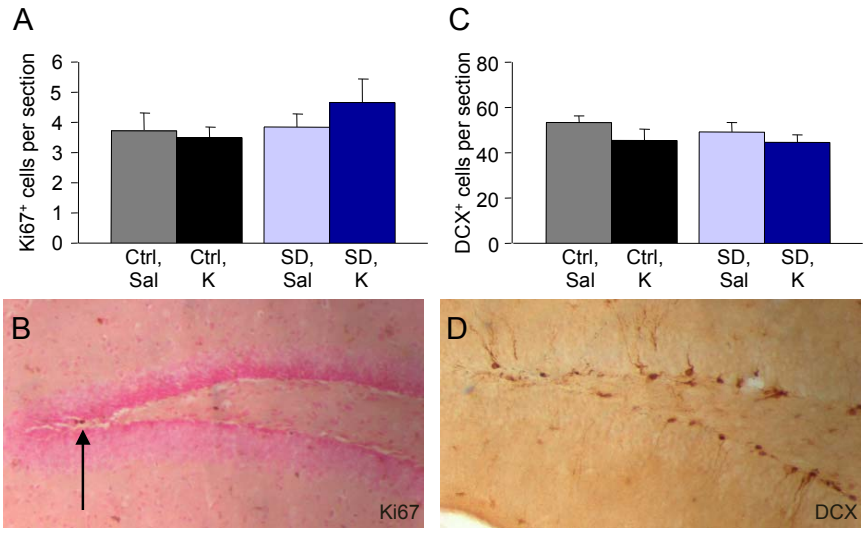


Figure S5. *Ketamine-induced improvement in depressive-like behaviors is not mediated by proliferative adult hippocampal neurogenesis.* (**A**) There was no effect of SD or of ketamine on the average number of Ki67$^+$ cells. (**B**) Representative image of Ki67 immunohistochemistry in the dentate gyrus. The arrow indicates a Ki67$^+$ cell. (**C**) There was no effect of SD or of ketamine on the average number of doublecortin$^+$ (DCX$^+$) cells. (**D**) Representative image of DCX immunohistochemistry in the dentate gyrus. n = 8-9 male 129S6/SvEv mice per group. Error bars represent $\pm$ SEM.

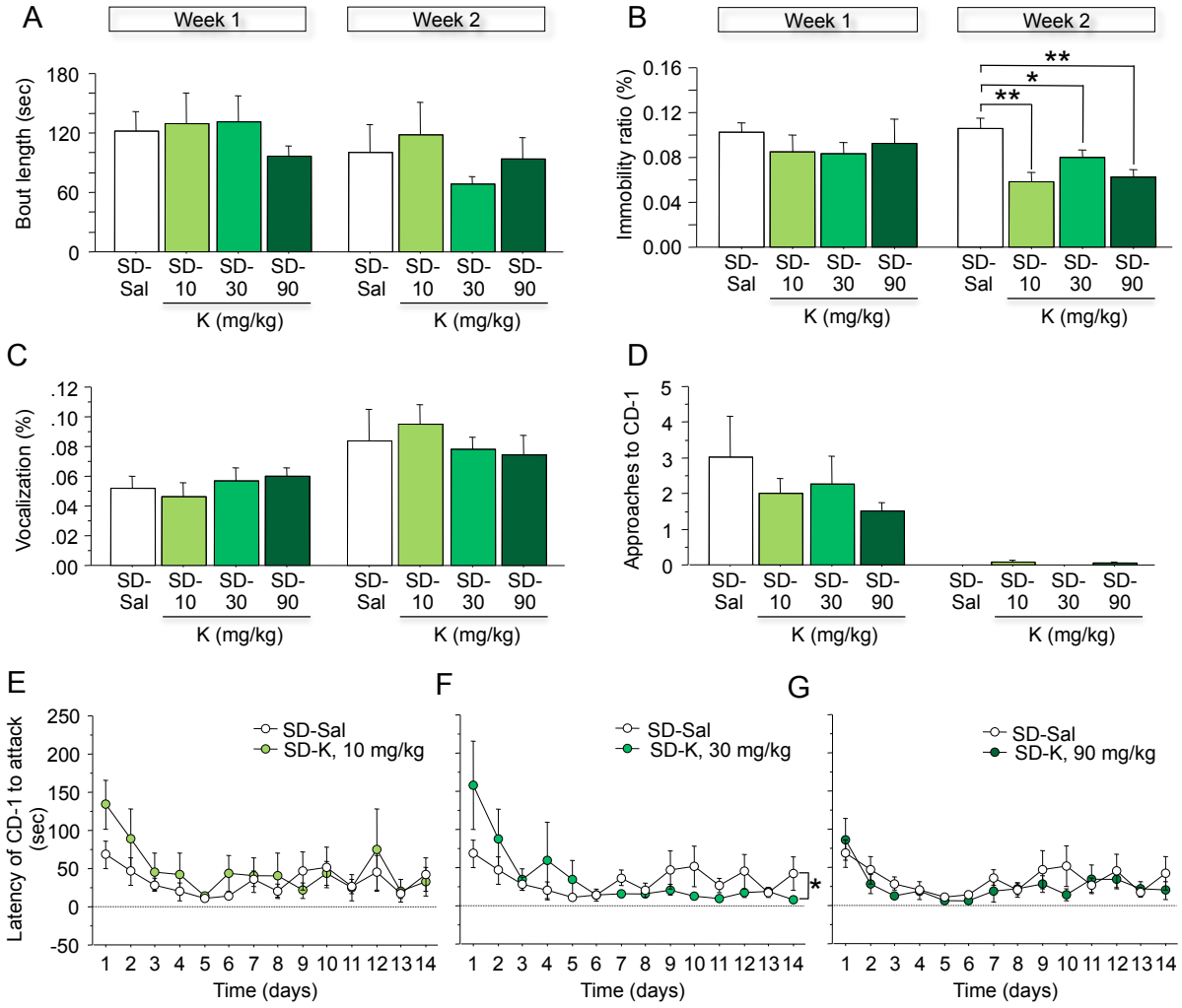


Figure S6. *Ketamine alters fighting behavior during social defeat bouts.* (**A**) The bout length did not differ for all groups of mice during week 1 or week 2. (**B**) Average immobility time during week 1 was not significantly different in all groups of mice. However, average immobility during week 2 of SD was significantly altered in mice administered ketamine. (**C**) The percent of time vocalizing did not differ between groups. (**D**) The number of approaches by the 129S6/SvEv mouse to the CD-1 did not differ between the groups. (**E-G**) Interestingly, the latency of the CD-1 to attack the 129S6/SvEv mouse only differed in SD-K (30 mg kg^{-1}) mice when compared with SD-Sal mice. n = 7-8 male 129S6/SvEv mice per group. Error bars represent $\pm$ SEM. * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$; *** $p < 0.001$.

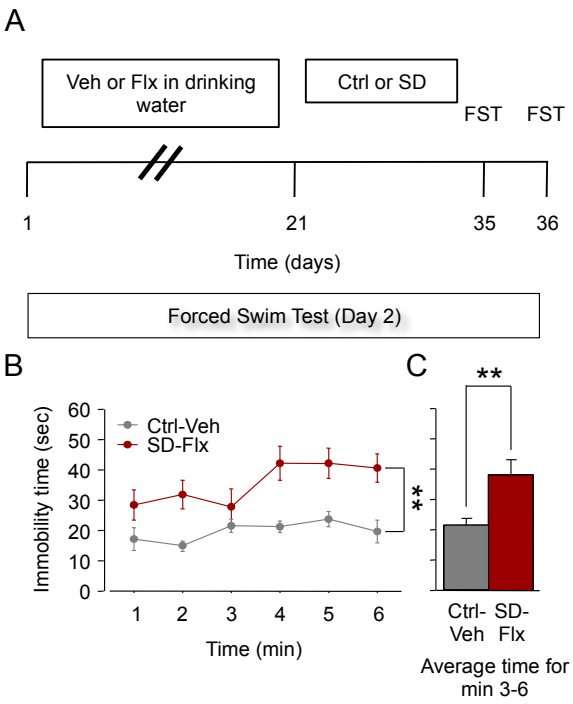


Figure S7. *Fluoxetine treatment does not prevent behavioral despair following SD in the FST*. (**A**) Experimental design. Mice were administered 3 weeks of Flx in the drinking water (18 mg/kg). Mice were then either group housed or administered SD for 2 weeks. The FST was administered for 2 days following SD. (**B**) SD-Flx mice display increased immobility time when compared with Ctrl-Veh mice. (**C**) SD-Flx mice have an increased average immobility time when compared with Ctrl-Sal mice. n = 6-8 male 129S6/SvEv mice per group. Error bars represent ± SEM. * $p < 0.05$; ** $p < 0.01$; *** $p < 0.001$.

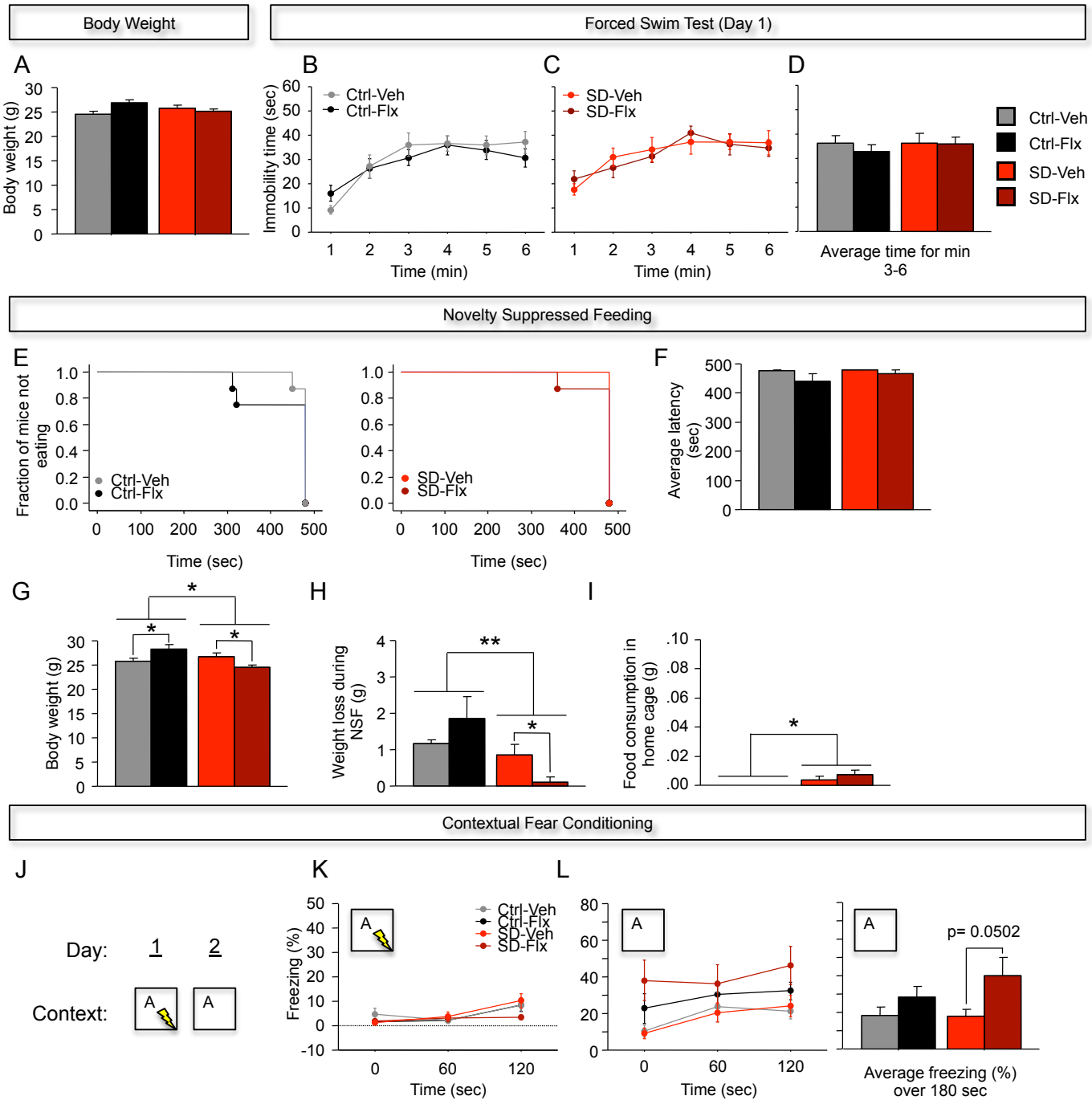


Figure S8. *Fluoxetine treatment before SD does not alter anxiety or cognition*. (**A**) All groups had similar body weights before the start of SD. (**B-D**) All groups of mice had similar levels of immobility on day 1 of the FST. (**E-F**) Three weeks of fluoxetine before SD did not alter the latency to eat in the NSF. (**G**) SD and Ctrl mice differed in body weight following SD. Whereas Ctrl mice gained weight with Flx treatment, SD mice lost weight with Flx treatment. (**H**) SD mice lost less weight than Ctrl mice during the fast for NSF. Interestingly, SD-Flx mice lost less weight than SD-Veh mice. (**I**) SD mice consumed more food in the home cage when compared with Ctrl mice. (**J-K**) Ctrl and SD mice did not differ in freezing levels before administration of 1-shock CFC. (**L**) There was an overall effect of Drug on 1-shock CFC retrieval. However, the individual groups failed to reach significance. n = 8 male 129S6/SvEv mice per group. Error bars represent ± SEM. * $p < 0.05$; ** $p < 0.01$; *** $p < 0.001$.

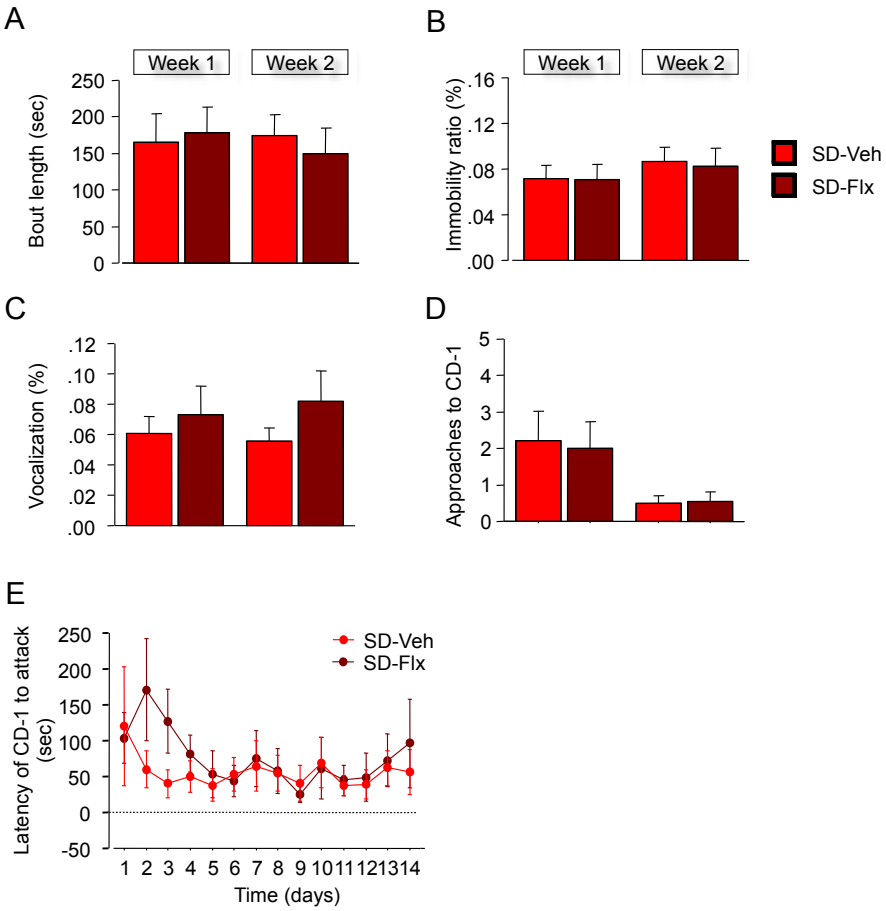


Figure S9. *Fluoxetine does not alter fighting behavior during SD bouts.* In this experiment, fluoxetine was given for 3 weeks before the start of SD. (**A**) The bout length did not differ between the groups of mice during week 1 or week 2. (**B**) Average immobility did not differ between the groups of mice. (**C**) The percent of time vocalizing did not differ between groups. (**D**) The number of approaches by the 129S6/SvEv mouse to the CD-1 did not differ between the groups. (**E**) The latency of the CD-1 to attack the 129S6/SvEv mouse did not differ between the groups. n = 8 male 129S6/SvEv mice per group. Error bars represent ± SEM.

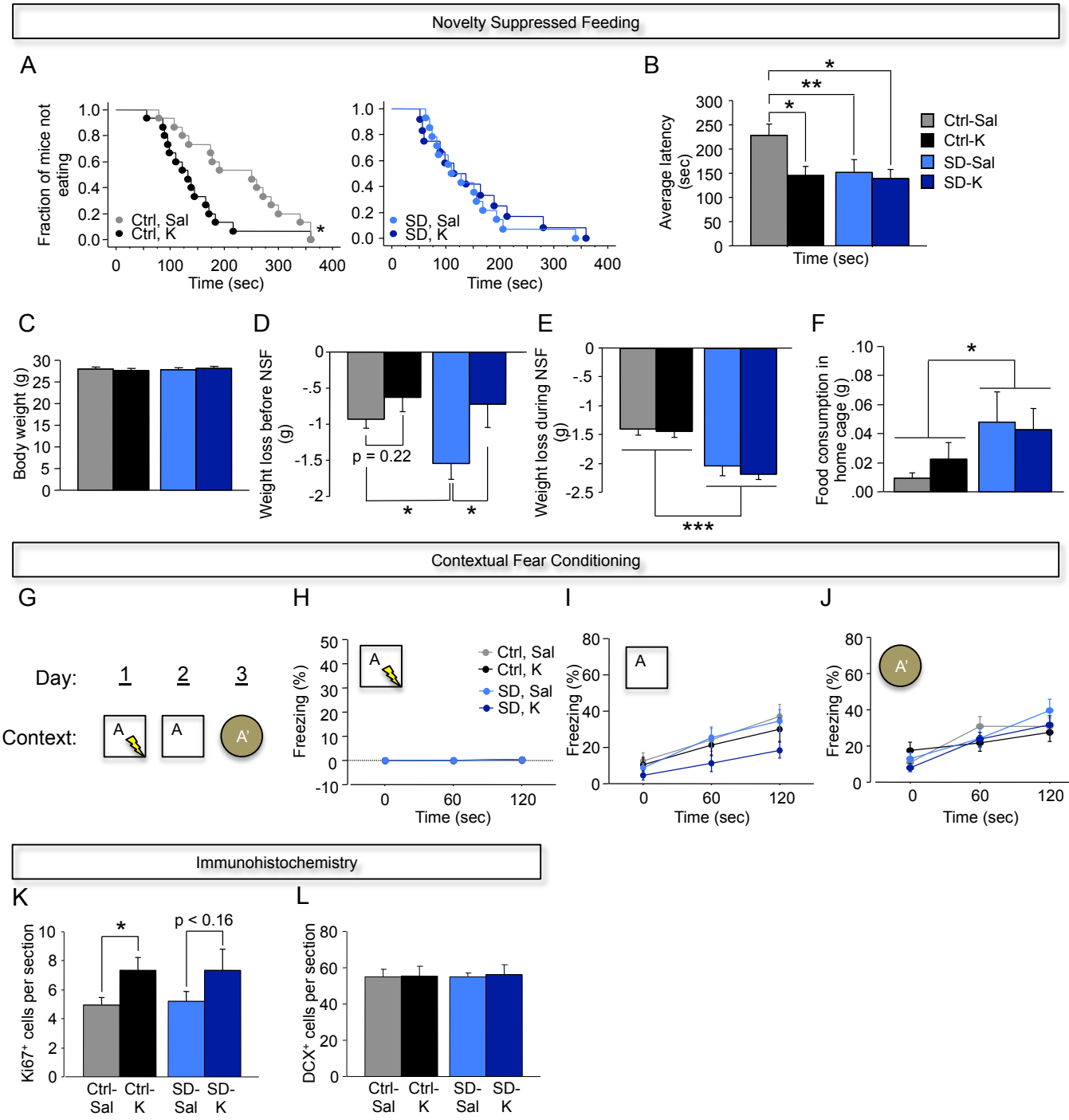


Figure 10. *Ketamine, as an antidepressant, increases adult hippocampal neurogenesis.* (**A-B**) Ketamine significantly decreased the latency to approach the food pellet in Ctrl mice. SD-Sal and SD-K mice did not differ from one another. (**C**) Body weight did not differ in any of the groups of mice before the start of NSF. (**D**) Before NSF, SD-Sal mice lost more body weight than Ctrl-Sal mice. Ketamine attenuated this weight loss. (**E**) SD mice lost more body weight than Ctrl mice during the fast for NSF. (**F**) SD mice consumed significantly more food than Ctrl mice. (**G-J**) All groups of mice had comparable levels of freezing during CFC training and following re-exposure to the fearful context A and to a similar context A'. n = 13-15 129S6/SvEv male mice per group. (**K**) Ketamine increases the number of Ki67$^+$ cells when compared to saline in Ctrl mice but not in SD mice. (**L**) Ketamine does not alter DCX levels. n = 6-9 129S6/SvEv male mice per group. Error bars represent $\pm$ SEM. * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$.

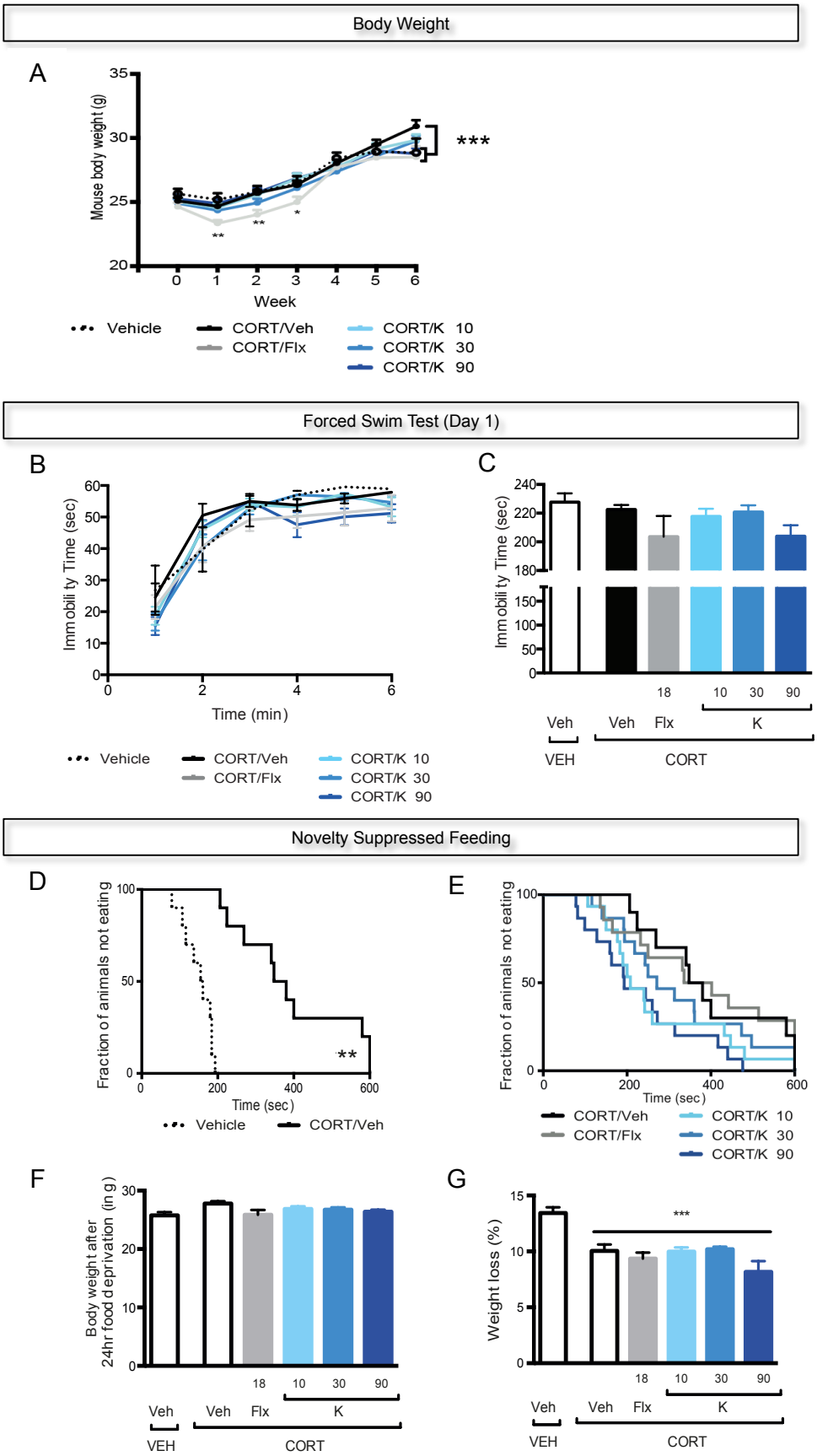

Body Weight
A
Mouse body weight (g)
Week
***
Vehicle
CORT/Veh
CORT/Flx
CORT/K 10
CORT/K 30
CORT/K 90
Forced Swim Test (Day 1)
B
Immobility Time (sec)
Time (min)
C
Veh
Veh
Flx
K
VEH
CORT
Novelty Suppressed Feeding
D
Fraction of animals not eating
Time (sec)
E
F
Body weight after 24hr food deprivation (in g)
G
Weight loss (%)

Figure S11. *Ketamine and fluoxetine both prevent chronic CORT-induced increases in body weight.* (**A**) Of note, mice treated with CORT significantly gain weight. Administration of ketamine (90 mg kg^{-1}) or fluoxetine (18 mg kg^{-1}/day), but not ketamine (10 or 30 mg kg^{-1}), prevented the chronic CORT-induced increase in mouse body. Error bars represent $\pm$ SEM. (**B-C**) Ketamine injection for all the doses tested or fluoxetine did not induce antidepressant-like activity. Ketamine or fluoxetine treatment did not change immobility duration measured during the last 4-min of the test. (**D-E**) Ketamine prevents the chronic CORT-induced anxiety/depressive-like phenotype in the NSF. Chronic CORT increased the latency to feed in the NSF. Ketamine (90 mg kg^{-1}) prevented this chronic CORT-induced increase in latency (Survival plot shown here as opposed to the main text). (**F**) Food deprivation did not affect body weight differently among CORT-treated mice. (**G)** Mice treated with CORT lost a significantly greater percentage of body weight when compared with Veh mice during the 24-hour period of food deprivation preceding the NSF. n = 10-15 male C57BL/6NTac mice per group. Error bars represent ± SEM. * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$.

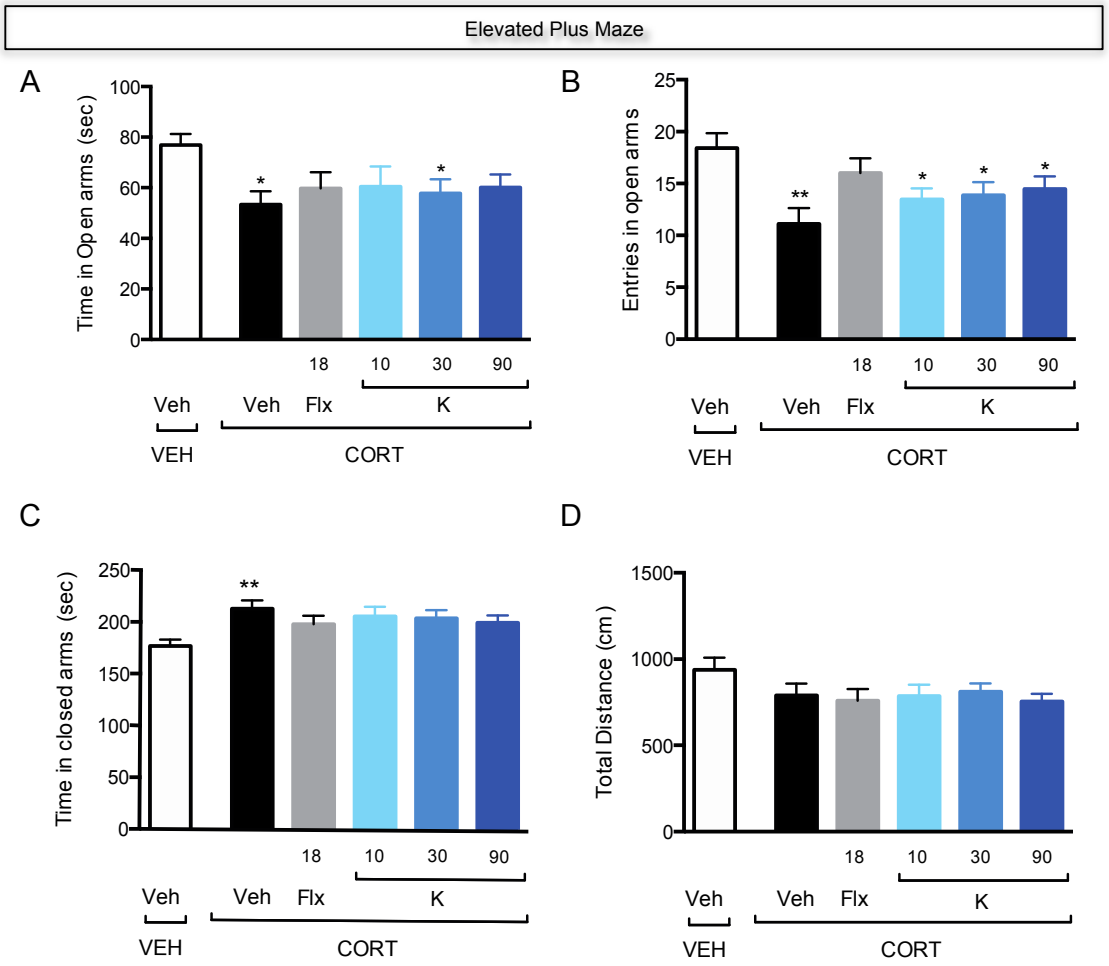


Figure S12. *Ketamine does not prevent the chronic CORT-induced anxiety-like phenotype in the EPM.* (**A-C**) Chronic CORT induced anxiety-like symptoms. Both ketamine injection for all of the doses tested and fluoxetine did not protect against the chronic CORT-induced anxiety-like phenotype. (**D**) No change in locomotor activity was observed between groups. n = 10-15 male C57BL/6NTac mice per group. Error bars represent ± SEM. * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$.

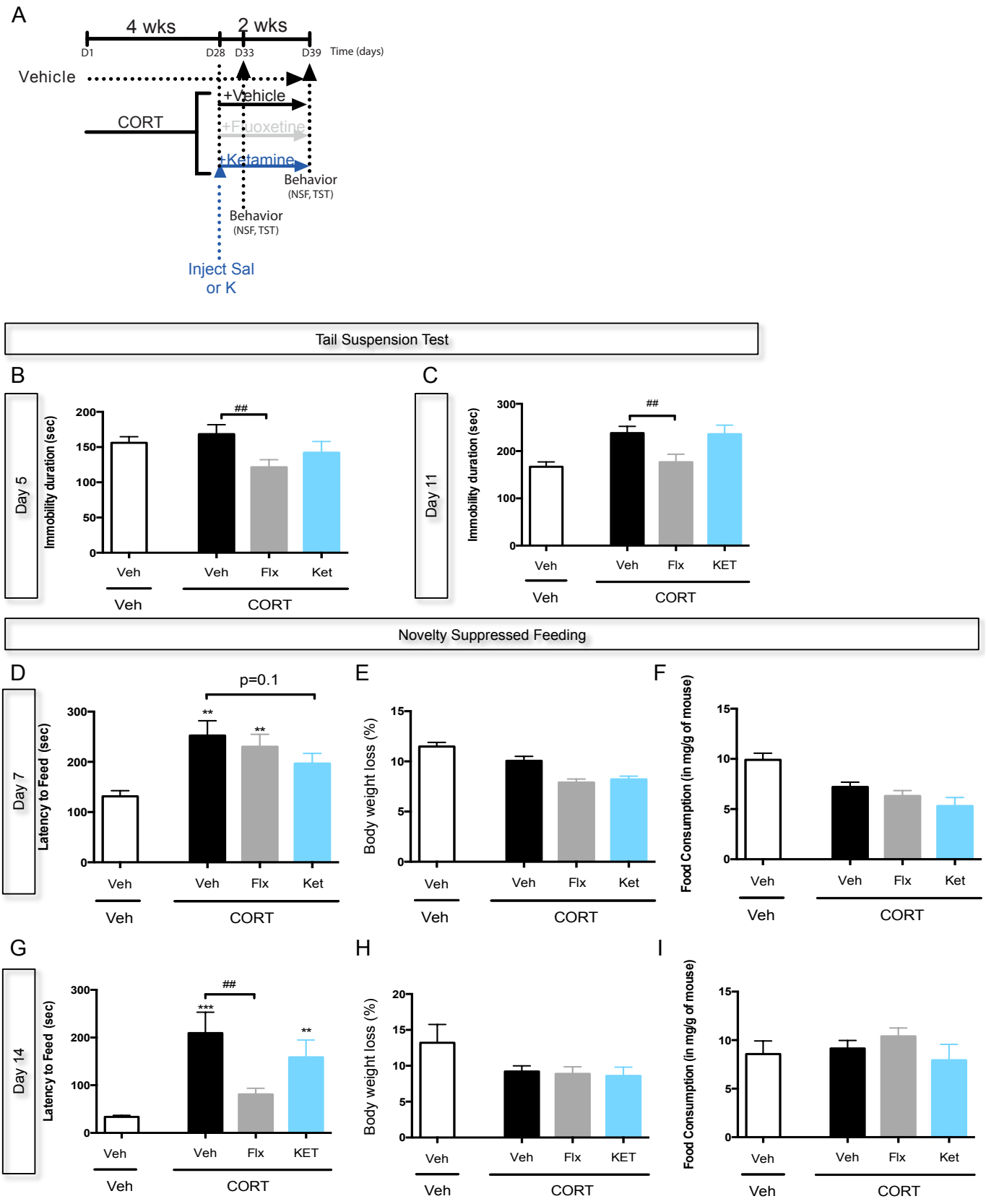

A
4 wks
2 wks
D1
D28
D33
D39
Time (days)
Vehicle
+Vehicle
CORT
+Fluoxetine
+Ketamine
Behavior
(NSF, TST)
Behavior
(NSF, TST)
Inject Sal
or K
Tail Suspension Test
B
Day 5
Immobility duration (sec)
##
Veh
Veh
Flx
Ket
Veh
CORT
C
Day 11
Immobility duration (sec)
##
Veh
Veh
Flx
KET
Veh
CORT
Novelty Suppressed Feeding
D
Day 7
Latency to Feed (sec)
p=0.1
**
**
Veh
Veh
Flx
Ket
Veh
CORT
E
Body weight loss (%)
Veh
Veh
Flx
Ket
Veh
CORT
F
Food Consumption (in mg/g of mouse)
Veh
Veh
Flx
Ket
Veh
CORT
G
Day 14
Latency to Feed (sec)
##
***
**
Veh
Veh
Flx
KET
Veh
CORT
H
Body weight loss (%)
Veh
Veh
Flx
KET
Veh
CORT
I
Food Consumption (in mg/g of mouse)
Veh
Veh
Flx
Ket
Veh
CORT

Figure S13. *Ketamine and fluoxetine given after CORT treatment are less effective than when given before CORT treatment.* (**A**) Experimental design. Mice were administered Veh or CORT in the drinking water for 4 weeks. Mice were then administered saline, ketamine (10 mg/kg), or fluoxetine (18 mg/kg). (**B-C**) Fluoxetine, but not ketamine, decreases immobility time in the FST on day 5 and day 11 following CORT treatment. (**D**) At 7 days following CORT treatment, chronic CORT increased the latency to feed in the NSF. Ketamine or fluoxetine did not decrease the latency to feed in the NSF. (**E**) All groups of mice lost a comparable amount of body weight during the NSF fast. (**F**) All groups of mice consumed a comparable amount of food in the home cage. (**G**) At 14 days following CORT treatment, chronic CORT increased the latency to feed in the NSF. Fluoxetine, but not ketamine, decreased the latency to feed in the NSF. (**H**) All groups of mice lost a comparable amount of body weight during the NSF fast. (**I**) All groups of mice consumed a comparable amount of food in the home cage. n = 10-15 male C57BL/6NTac mice per group. Error bars represent ± SEM. * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$.

Supplemental References

1. David DJ, Samuels BA, Rainer Q, Wang JW, Marsteller D, Mendez I, Drew M, Craig DA, Guiard BP, Guilloux JP, Artymyshyn RP, Gardier AM, Gerald C, Antonijevic IA, Leonardo ED, Hen R (2009): Neurogenesis-dependent and -independent effects of fluoxetine in an animal model of anxiety/depression. *Neuron* 62(4):479-493.
2. Mendez-David I, David DJ, Darcet F, Wu MV, Kerdine-Romer S, Gardier AM *et al.* (2014): Rapid anxiolytic effects of a 5-HT(4) receptor agonist are mediated by a neurogenesis-independent mechanism. *Neuropsychopharmacology* 39(6):1366-1378.
3. Rainer Q, Xia L, Guilloux JP, Gabriel C, Mocaer E, Hen R, *et al*. (2011): Beneficial behavioural and neurogenic effects of agomelatine in a model of depression/anxiety. *Int J Neuropsychopharmacol* 15(3):321-335.
4. Chourbaji S, Zacher C, Sanchis-Segura C, Dormann C, Vollmayr B, Gass P. (2005): Learned helplessness: validty and reliability of depressive-like states in mice. *Brain Research Protocols* 16:70-78.
5. Muller JM, Morelli E, Ansorge M, Gingrich JA. (2011): Serotonin transporter deficient mice are vulnerable to escape deficits following inescapable shocks. *Gene Brain Behav* 10(2):166-175.
6. Holmes PV (2003): Rodent models of depression: reexamining validity without anthropomorphic inference. *Crit Rev Neurobiol* 15(2): 143-174.
7. Petit-Demouliere B, Chenu F, Bourin M (2005): Forced swimming test in mice: a review of antidepressant activity. *Psychopharmacology (Berl)* 177(3): 245-255.
8. Lindholm JS, Autio H, Vesa L, Antila H, Lindemann L, Hoener MC, *et al*. (2012): The antidepressant-like effects of glutamatergic drugs ketamine and AMPA receptor potentiator LY 451646 are preserved in bdnf(+)/(-) heterozygous null mice. *Neuropharmacology* 62(1): 391-397.
9. Ghasemi M, Raza M, Dehpour AR (2010): NMDA receptor antagonists augment antidepressant-like effects of lithium in the mouse forced swimming test. *J Psychopharmacol* 24(4): 585-594.
10. Liu RJ, Lee FS, Li XY, Bambico F, Duman RS, Aghajanian GK (2012): Brain-derived neurotrophic factor Val66Met allele impairs basal and ketamine-stimulated synaptogenesis in prefrontal cortex. *Biological Psychiatry* 71(11): 996-1005.
11. Richardson-Jones JW, Craige CP, Guiard BP, Stephen A, Metzger KL, Kung HF, *et al.* (2010): 5-HT1A Autoreceptor Levels Determine Vulnerability to Stress and Response to Antidepressants. *Neuron* 65(1): 40-52.
12. Schloesser RJ, Lehmann M, Martinowich K, Manji HK, Herkenham M (2010): Environmental enrichment requires adult neurogenesis to facilitate the recovery from psychosocial stress. *Mol Psychiatry*: 15(12): 1152-1163.
13. David DJ, Klemenhagen KC, Holick KA, Saxe MD, Mendez I, Santarelli L, *et al.* (2007): Efficacy of the MCHR1 antagonist N-(3-(1-{(4-(3,4-difluorophenoxy)phenyl)methyl}(4-piperidyl))-4-methylphenyl)-2-m ethylpropanamide (SNAP 94847) in mouse models of

anxiety and depression following acute and chronic administration is independent of hippocampal neurogenesis. *J Pharmacology Exp Ther* 321(1): 237-248.

14. Saxe MD, Battaglia F, Wang J-W, Malleret G, David DJ, Monckton JE, *et al.* (2006): Ablation of hippocampal neurogenesis impairs contextual fear conditioning and synaptic plasticity in the dentate gyrus. *Proc Natl Acad Sci USA* 103(46): 17501-17506.
15. Denny CA, Burghardt NS, Schachter DM, Hen R, Drew MR (2012): 4- to 6-week-old adult-born hippocampal neurons influence novelty-evoked exploration and contextual fear conditioning. *Hippocampus* 22(5):1188-1201.
16. Scobie KN, Hall BJ, Wilke SA, Klemenhagen KC, Fujii-Kuriyama Y, Ghosh A, *et al.* (2009) Kruppel-like factor 9 is necessary for late-phase neuronal maturation in the developing dentate gyrus and during adult hippocampal neurogenesis. *J Neurosci* 29(31): 9875-9887.

Cohort	Behavioral Paradigm	Abbrev	Measurement	Statistical Test	Comparison	F	° of freedom	p	*	Fig.
Pre-K	Forced Swim Test	FST	Immobility time (sec) on day 2	RMANOVA	Group	13.999	1,49	0.0005	***	1B-1C
					Drug	3.73	1,49	0.06	-	
					Group x Drug	3.411	1,49	0.07	-	
					Time	19.117	5,245	<0.0001	***	
					Time x Group	3.936	5,245	0.0019	**	
			Immobility time (sec) on day 2 for Ctrl mice		Drug	0.004	1,28	0.95	-	1B
					Time	16.12	5,14	<0.0001	***	
					Drug x Time	0.362	5,14	0.87	-	
			Immobility time (sec) on day 2 for SD mice	RMANOVA	Drug	8.094	1,21	<0.01	**	1C
					Time	6.949	5,105	<0.0001	***	
					Drug x Time	0.367	5,105	0.87	-	
				Planned Comparison, *t*-test	Minute 1	-	-	0,0818	-	
					Minute 2	-	-	0,0355	*	
					Minute 3	-	-	0,0057	**	
					Minute 4	-	-	0,0123	*	
					Minute 5	-	-	0,0215	*	
					Minute 6	-	-	0,0171	*	
			Average Immobility time (sec) for minutes 3-6	ANOVA	Group	7.788	1,49	0.0075	**	1D
					Drug	3.848	1,49	0.0555	-	
					Group x Drug	3.107	1,49	0.0842	-	
				t-test	Ctrl-Sal v. SD-Sal	-	-	0.0009	***	
				t-test	SD-Sal v. SD-K	-	-	0.0073	**	
	Dominant Interaction	DI	Empty Enclosure Time (sec)	ANOVA	Group	2.599	1,54	0.1128	-	1F
					Drug	5.326	1,54	0.0249	*	
					Group x Drug	2.061	1,54	0.1568	-	
				t-test	Ctrl-Sal v. SD-Sal	-	-	0.0199	*	
				t-test	SD-Sal v. SD-K			0.022	*	
			CD-1 Time (sec)	ANOVA	Group	0.039	1,54	0.845	-	1G
					Drug	6.392	1,54	0.0144	*	
					Group x Drug	0.517	1,54	0.4753	-	
				t-test	SD-Sal v. SD-K			0.0461		
			Distance	ANOVA	Group	11.302	1,54	0.0014	**	1H
					Drug	4.391	1,54	0.0408	*	
					Group x Drug	1.395	1,54	0.2427	-	
Pre-K	Novelty Suppressed Feeding	NSF	Latency to feed (sec)	Mantel-Cox logrank test	Ctrl-Sal v. Ctrl-K	-	-	0.37	-	2A
					SD-Sal v. SD-K	-	-	0.75	-	
				ANOVA	Group	0.029	1,54	0.8659	-	2B
					Drug	0.569	1,54	0.4539	-	
					Group x Drug	0.375	1,54	0.5431	-	
			Body Weight (g)	ANOVA	Group	2.303	1,54	0.135	-	2C
					Drug	1.12	1,54	0.2947	-	
					Group x Drug	0.217	1,54	0.6435	-	
			Weight loss during NSF (g)	ANOVA	Group	62.335	1,54	<0.0001	***	2D
					Drug	2.768	1,54	0.102		
					Group x Drug	0.083	1,54	0.7742		
			Food consumption (g)	ANOVA	Group	8.373	1,54	0.0055	**	2E
					Drug	2.045	1,54	0.1585	-	
					Group x Drug	0.015	1,54	0.9037	-	
	Elevated Plus Maze	EPM	Time in closed arms (sec)	ANOVA	Group	23.993	1,54	<0.0001	***	2F
					Drug	0.176	1,54	0.6765	-	
					Group x Drug	1.202	1,54	0.2777	-	
	Contextual Fear Grouping	CFC	Freezing on day 1 (sec) for context A	RMANOVA	Drug	1.11	1,54	0.2967	-	2H
					Group	1.11	1,54	0.2967	-	
					Drug x Group	0.434	1,54	0.5129	-	
					Time	1.073	2,108	0.3455	-	
					Time x Drug	0.999	2,108	0.3715	-	
					Time x Group	0.576	2,108	0.5638	-	
					Time x Drug x Group	0.399	2,108	0.6722	-	
			Freezing on day 2 (sec) for context A	RMANOVA	Drug	0.183	1,54	0.6709	-	2I
					Group	0.749	1,54	0.3905	-	
					Drug x Group	0.002	1,54	0.9652	-	
					Time	75.62	2,108	<0.0001	***	
					Time x Drug	0.215	2 108	0.8066	-	
					Time x Group	6.15	2,108	0.003	**	
					Time x Drug x Group	1.707	2,108	0.1862	-	
			Freezing on day 3 (sec) for context B	RMANOVA	Drug	0.06	1,54	0.808	-	2J
					Group	3.191	1,54	0.0797	-	
					Drug x Group	0.34	1,54	0.5622	-	
					Time	15.508	2,108	<0.0001	***	
					Time x Drug	0.187	2,108	0.8299	-	
					Time x Group	1.592	2,108	0.2082	-	
					Time x Drug x Group	0.55	2,108	0.5788	-	
	Forced Swim Test	FST	Immobility time (sec) on day 2 for Ctrl-Sal v. SD-Sal	RMANOVA	Group	6.318	1,14	0.0248	*	3A
					Time	5.762	5,70	0.0002	**	
					Group x Drug	2.579	5,70	0.0337	*	
			Immobility time (sec) on day 2 for SD-Sal v. SD-K,10	RMANOVA	Dose	0.012	1,14	0.9132	-	3B
					Time	1.106	5,70	0.3652	-	
					Dose x Time	0.39	5,70	0.8542	-	
			Immobility time (sec) on day 2 for SD-Sal v. SD-K,30	RMANOVA	Dose	7.108	1,14	0.0184	*	3C
					Time	2.829	5,70	0.022	*	
					Dose x Time	0.192	5,70	0.9645	-	
				Planned Comparison, *t*-test	Minute 1	-	-	0.0244	*	
					Minute 2	-	-	0.1514	-	
					Minute 3	-	-	0.0439	*	

Dosing				Planned Comparison, *t*-test	Minute 4	-	-	0.0494	*	
					Minute 5	-	-	0.0321	*	
					Minute 6	-	-	0.0917	-	
			Immobility time (sec) on day 2 for SD-Sal v. SD-K,90	RMANOVA	Dose	1.233	1,13	0.287	-	3D
					Time	4.178	5,65	0.0024	**	
					Dose x Time	1.773	5,65	0.1307	-	
			Average Immobility time (sec) for minutes 3-6	ANOVA	Ctrl v. SD	2.479	4,34	0.0624	-	3E
				t-test	Ctrl-Sal v. SD-Sal	-	-	0.0377	*	
				t-test	Ctr-Sal v. SD-K,30	-	-	0.0229	*	
	Corticosterone	CORT	Corticosterone (ng/ml)	ANOVA	Group	2.015	4,14	0.1476	-	3F
				Fisher's PLSD	Ctrl-Sal v. SD-Sal	-	-	0.0179	*	
					Ctrl-Sal v. SD-K,10	-	-	0.2159	-	
					Ctrl-Sal v. SD-K,30	-	-	0.0852	-	
					Ctrl-Sal v. SD-K,90	-	-	0.361	-	
Pre-Flx	Forced Swim Test	FST	Immobility time (sec) on day 2	RMANOVA	Group	3,076	1,28	0,0904	-	4B
					Drug	0,602	1,28	0,4442	-	
					Group x Drug	0,606	1,28	0,443	-	
					Time	3,769	5 140	0,0031	**	
					Time x Group	1,168	5 140	0,3278	-	
					Time x Drug	0,615	5 140	0,6882	-	
					Time x Group x Drug	0,426	5 140	0,8302	-	
			Immobility time (sec) on day 2 for Ctrl mice	RMANOVA	Drug	1,253	1,14	0,2818	-	
					Time	3,447	5,70	0,0077	**	
					Drug x Time	0,323	5,70	0,8973	-	
			Immobility time (sec) on day 2 for SD mice	RMANOVA	Drug	2,38E-06	1,14	0,9988	-	4C
					Time	1,265	5,70	0,2889	-	
					Drug x Time	0,763	5,70	0,5795	-	
			Average Immobility time (sec) for minutes 3-6	ANOVA	Group	2,15	1,28	0,1537	-	4D
					Drug	0,377	1,28	0,5439	-	
					Group x Drug	0,905	1,28	0,3495	-	
				Planned comparision, *t*-test	Ctrl-Veh v. SD-Veh	-	-	0,0344	*	
					SD-Veh v. SD-Veh	-	-	0,8275	-	
Post-K	Forced Swim Test	FST	Immobility time (sec) on day 2	RMANOVA	Group	4,187	1,52	0,0458	*	5B-5C
					Drug	0,54	1,52	0,4656	-	
					Group x Drug	0,899	1,52	0,3473	-	
					Time	49,234	5 260	<0.0001	***	
					Time x Group	1,322	5 260	0,2552	-	
					Time x Drug	0,762	5 260	0,5778	-	
					Time x Group x Drug	0,579	5 260	0,7159	-	
			Immobility time (sec) on day 2 for Ctrl mice	RMANOVA	Drug	0,027	1,28	0,8709	-	5B
					Time	23,396	5 140	<0.0001	***	
					Drug x Time	0,19	5 140	0,966	-	
			Immobility time (sec) on day 2 for SD mice	RMANOVA	Drug	1,198	1,24	0,2845	-	5C
					Time	35,512	5 120	<0.0001	***	
					Drug x Time	1,931	5 120	0,0942	-	
			Average Immobility time (sec) for minutes 3-6	ANOVA	Group	4,301	1,52	0,0431	*	5D
					Drug	1,39	1,52	0,7105	-	
					Group x Drug	0,47	1,52	0,4958	-	
				Fisher's PLSD	C v. SD	-	-	0,039	*	
					Sal v. K	-	-	0,6877	-	
				t-test	Ctrl-Sal v. SD-Sal	-	-	0,0458	*	
				t-test	SD-Sal v. SD-K	-	-	0,4859	-	
Pre-K	Learned Helplessness	LH	Activity in habituation phase	*t*-test	Drug	-	-	0,3416	-	6B
			Latency (sec) for trials 1-10	RMANOVA	Drug	4,609	1,15	0,0486	*	6C
					Time	2,423	9 135	0,0139	*	
					Drug x Time	0,742	9 135	0,6699	-	
			Latency (sec) for trials 11-20	RMANOVA	Drug	6,166	1,15	0,0253	*	
					Time	1,680	9 135	0,0995	-	
					Drug x Time	1,006	9 135	0,4381	-	
			Latency (sec) for trials 21-30	RMANOVA	Drug	1,513	1,15	0,2376	-	
					Time	1,141	9 135	0,3383	-	
					Drug x Time	2,330	9 135	0,0180	*	
			Latency (sec) for all trails	RMANOVA	Drug	3,505	1,15	0,0808	-	
					Time	1,336	19 285	0,1593	-	
					Drug x Time	2,124	19 285	0,0046	**	
			Latency (sec) for data binned into 10-trial bins (3 bins total)	RMANOVA	Drug	4,072	1,15	0,0618	-	6D
					Time	4,992	2,30	0,0134	*	
					Drug x Time	2,11	2,30	0,1389	-	
				t-test	-	-	-	0,0486	*	
				t-test	-	-	-	0,0253	*	
				t-test	-	-	-	0,2376	-	
			Session length (min)	*t*-test	Drug	-	-	0,0432	*	6E
			Immobility time (sec) on day 2	RMANOVA	Drug	1.75	5,73	0.13	-	7B
					Time	0.12	5,36	0.13	-	
					Drug x Time	1.97	25,36	<0.01	**	
				ANOVA	Group	2.25	5,73	0,0313	*	
					Vehicle vs. CORT/Vehicle	-	-	0,5643	-	

	Forced Swim Test	FST	Average Immobility time (sec) for min3-6	Fisher's PLSD	Vehicle vs. CORT/Fluoxetine 18mg/kg/day	-	-	0,0192	*	7C
					Vehicle vs. CORT/ketamine 10mg/kg	-	-	0,4824	-	
					Vehicle vs. CORT/ketamine 30mg/kg	-	-	0,8276	-	
					Vehicle vs. CORT/ketamine 90mg/kg	-	-	0,1185	-	
					CORT/Vehicle vs. CORT/Fluoxetine 18mg/kg/day	-	-	0,0035	**	
					CORT/Vehicle vs. CORT/ketamine 10mg/kg	-	-	0,1843	-	
					CORT/Vehicle vs. CORT/ketamine 30mg/kg	-	-	0,3965	-	
					CORT/Vehicle vs. CORT/ketamine 90mg/kg	-	-	0,0300	*	
					CORT/Fluoxetine 18mg/kg/day vs. CORT/ketamine 10mg/kg	-	-	0,0623	-	
					CORT/Fluoxetine 18mg/kg/day vs. CORT/ketamine 30mg/kg	-	-	0,0176	*	
					CORT/Fluoxetine 18mg/kg/day vs. CORT/ketamine 90mg/kg	-	-	0,3535	-	
					CORT/ketamine 10mg/kg vs. CORT/ketamine 30mg/kg	-	-	0,5874	-	
					CORT/ketamine 10mg/kg vs. CORT/ketamine 90mg/kg	-	-	0,3320	-	
					CORT/ketamine 30mg/kg vs. CORT/ketamine 90mg/kg	-	-	0,1324	-	
CORT	Splash Test	ST	Grooming duration (sec)	ANOVA	Group	2.76	5,73	0,0241	*	7D
				Fisher's PLSD	Vehicle vs. CORT/Vehicle	-	-	0,0281	*	
					Vehicle vs. CORT/Fluoxetine 18mg/kg/day	-	-	0,1273	-	
					Vehicle vs. CORT/ketamine 10mg/kg	-	-	0,2844	-	
					Vehicle vs. CORT/ketamine 30mg/kg	-	-	0,0096	**	
					Vehicle vs. CORT/ketamine 90mg/kg	-	-	0,9589	-	
					CORT/Vehicle vs. CORT/Fluoxetine 18mg/kg/day	-	-	0,3834	-	
					CORT/Vehicle vs. CORT/ketamine 10mg/kg	-	-	0,1733	-	
					CORT/Vehicle vs. CORT/ketamine 30mg/kg	-	-	0,8372	-	
					CORT/Vehicle vs. CORT/ketamine 90mg/kg	-	-	0,0189	*	
					CORT/Fluoxetine 18mg/kg/day vs. CORT/ketamine 10mg/kg	-	-	0,5951	-	
					CORT/Fluoxetine 18mg/kg/day vs. CORT/ketamine 30mg/kg	-	-	0,2327	-	
					CORT/Fluoxetine 18mg/kg/day vs. CORT/ketamine 90mg/kg	-	-	0,1009	-	
					CORT/ketamine 10mg/kg vs. CORT/ketamine 30mg/kg	-	-	0,0812	-	
					CORT/ketamine 10mg/kg vs. CORT/ketamine 90mg/kg	-	-	0,2548	-	
					CORT/ketamine 30mg/kg vs. CORT/ketamine 90mg/kg	-	-	0,0047	**	

	Novelty Suppressed Feeding	NSF	Latency to feed (sec)	Mantel-Cox logrank test	-	-	-	<0.01	**	7E
				ANOVA	Group	4.73	5,73	<0.001	***	
				Fisher's PLSD	Vehicle vs. CORT/Vehicle	-	-	0,0003	***	
					Vehicle vs. CORT/Fluoxetine 18mg/kg/day	-	-	0,0002	***	
					Vehicle vs. CORT/ketamine 10mg/kg	-	-	0,0432	-	
					Vehicle vs. CORT/ketamine 30mg/kg	-	-	0,0046	**	
					Vehicle vs. CORT/ketamine 90mg/kg	-	-	0,154	-	
					CORT/Vehicle vs. CORT/Fluoxetine 18mg/kg/day	-	-	0,8355	-	
					CORT/Vehicle vs. CORT/ketamine 10mg/kg	-	-	0,0385	*	
					CORT/Vehicle vs. CORT/ketamine 30mg/kg	-	-	0,2193	-	
					CORT/Vehicle vs. CORT/ketamine 90mg/kg	-	-	0,008	**	
					CORT/Fluoxetine 18mg/kg/day vs. CORT/ketamine 10mg/kg	-	-	0,0407	*	
					CORT/Fluoxetine 18mg/kg/day vs. CORT/ketamine 30mg/kg	-	-	0,2626	-	
					CORT/Fluoxetine 18mg/kg/day vs. CORT/ketamine 90mg/kg	-	-	0,0073	**	
					CORT/ketamine 10mg/kg vs. CORT/ketamine 30mg/kg	-	-	0,3346	-	
					CORT/ketamine 10mg/kg vs. CORT/ketamine 90mg/kg	-	-	0,4923	-	
					CORT/ketamine 30mg/kg vs. CORT/ketamine 90mg/kg	-	-	0,1009	-	
			Home cage food consumption (g)	ANOVA	Group	5.81	5,73	<0.001	***	7F
K Pilot 1	Forced Swim Test	FST	Immobility Time (sec) on day 1	RMANOVA	Dose	9.435	3,28	0.002	**	S1B
					Time	32.748	5,14	<0.0001	***	
					Dose x Time	3.445	15,14	<0.0001	***	
			Minute 1 Immobility Time (sec)	Fisher's PLSD	0 mg/kg v. 10 mg/kg	-	-	0.1721	-	
					0 mg/kg v. 30 mg/kg	-	-	<0.0001	***	
					0 mg/kg v. 50 mg/kg	-	-	<0.0001	***	
			Minute 2 Immobility Time (sec)		0 mg/kg v. 10 mg/kg	-	-	0.1974	-	
					0 mg/kg v. 30 mg/kg	-	-	0.5611	-	
					0 mg/kg v. 50 mg/kg	-	-	0.7078	-	
			Minute 3 Immobility Time (sec)		0 mg/kg v. 10 mg/kg	-	-	0.1605	-	
					0 mg/kg v. 30 mg/kg	-	-	0.0122	*	
					0 mg/kg v. 50 mg/kg	-	-	0.0564	-	
			Minute 4 Immobility Time (sec)		0 mg/kg v. 10 mg/kg	-	-	0.1453	-	
					0 mg/kg v. 30 mg/kg	-	-	0.0007	**	
					0 mg/kg v. 50 mg/kg	-	-	0.0177	*	
			Minute 5 Immobility Time (sec)		0 mg/kg v. 10 mg/kg	-	-	0.2711	-	
					0 mg/kg v. 30 mg/kg	-	-	0.0002	**	
					0 mg/kg v. 50 mg/kg	-	-	0.0033	**	
			Minute 6 Immobility Time (sec)		0 mg/kg v. 10 mg/kg	-	-	0.3481	-	
					0 mg/kg v. 30 mg/kg	-	-	0.0815	-	
					0 mg/kg v. 50 mg/kg	-	-	0.0231	*	
			Immobility time (sec) on day 2	RMANOVA	Dose	2.145	3,28	0.117	-	
					Time	36.836	5,14	<0.0001	***	
					Dose x Time	1.703	15,14	0.0567	-	
K Pilot 2	Forced Swim Test	FST	Immobility time (sec) on day 1	RMANOVA	Dose	0.169	1,16	0.6862	-	S1D
					Time	76.083	5,80	<0.0001	***	
					Dose x Time	1.71	5,80	0.1419	-	
			Immobility time (sec) on day 2	RMANOVA	Dose	0.186	1,16	0.6723	-	
					Time	4.186	5,80	0.002	**	
					Dose x Time	0.741	5,80	0.5953	-	
Pre-K	Body Weight (Before SD)	BW	Body weight (g)	ANOVA	Group	2.39	1,54	0.1279	-	S2A
					Drug	0.145	1,54	0.7045	-	
					Group x Drug	0.751	1,54	0.3901	-	
	Body Weight (After SD)				Group	2.303	1,54	0.135	-	
					Drug	1.12	1,54	0.2947	-	
					Group x Drug	0.217	1,54	0.6435	-	
Dosing	Body Weight (After SD)				Group	2.652	1,37	0.1119	-	S2B
					Group	4.754	1,56	0.0335	*	

Pre-K	Forced Swim Test	FST	Immobility time (sec) on day 1	RMANOVA	Drug	0.035	1,56	0.8521	-	S2C
					Group x Drug	0.857	1,56	0.3584	-	
					Time	43.962	5,28	<0.0001	***	
					Time x Group	1.1483	5,28	0.1953	-	
			Immobility time (sec) on day 1 for Ctrl mice		Drug	0.268	1,28	0.609	-	
					Time	22.45	5,14	<0.0001	***	
					Drug x Time	1.189	5,14	0.3177	-	
			Immobility time (sec) on day 1 for SD mice	RMANOVA	Drug	0.693	1,26	0.4128	-	S2D
					Time	19.898	5,13	<0.0001	***	
					Drug x Time	0.746	5,13	0.5905	-	
			Average Immobility time (sec) for minutes 3-6	ANOVA	Group	2.422	1,56	0.1253	-	S2E
					Drug	0.004	1,56	0.9489	-	
					Group x Drug	0.258	1,56	0.6132	-	
Dosing			Immobility time (sec) on day 1	RMANOVA	Group	1.33	4,34	0.2786	-	SSF
					Time	37.807	5,17	<0.0001	***	
					Group x Time	1.735	20,17	0.032	*	
			Average Immobility time (sec) for minutes 3-6	ANOVA	Group	1.283	4,34	0.2959	-	S2G
Pre-K	Open Field	OF	Distance in empty quandrant (in)	RMANOVA	Group	0.004	2,21	0.9961	-	S3B
					Time	19.156	9,189	<0.0001	***	
					Group x Time	0.794	18,189	0.7057	-	
			Distance in urine quandrant (in)		Group	1.261	2,21	0.3039	-	S3C
					Time	13.122	9,189	<0.0001	***	
					Group x Time	0.919	18,189	0.5564	-	
Pre-K	Social Interaction	SI	Investigation time of empty enclosure (sec) for min 0-5	ANOVA	Group	1.19	2,21	0.3238	-	S4
			Investigation time of 129SvEv male (sec) for min 0-5	ANOVA	Group	0.419	2,21	0.6628	-	
			Investigation time of empty enclosure (sec) for min 6-10	ANOVA	Group	1.723	2,21	0.2028	-	
			Investigation time of 129SvEv male (sec) for min 6-10	ANOVA	Group	0.878	2,21	0.4304	-	

Cohort	Gene	Region	Measurement	Statistical Test	Comparison	F	° of freedom	p	*	Fig.
Pre-K	Ki-67	DG	Ki67+ cells per section	ANOVA	Group	1.204	1,30	0.2813	-	S5A
					Drug	2,580	1,30	0.6149	-	
					Group x Drug	0,725	1,30	0.4013	-	
			Total Ki67+ cells	ANOVA	Group	0,775	1,30	0,3857	-	data not shown
					Drug	0,368	1,30	0,5489	-	
					Group x Drug	1,969	1,30	0,1709	-	
				-	Ctrl-Sal sum	86,667	-	-	-	
				-	Ctrl-K sum	76,125	-	-	-	
				-	SD-Sal sum	79,750	-	-	-	
				-	SD-K sum	106,333	-	-	-	
	Doublecortin (DCX)		DCX+ cells per section	ANOVA	Group	0.409	1,30	0.5271	-	S5B
					Drug	2.622	1,30	0.1158	-	
					Group x Drug	0.131	1,30	0.7199	-	
			Total DCX+ cells	ANOVA	Group	0,096	1,30	0,7582	-	data not shown
					Drug	2,453	1,30	0,1278	-	
					Group x Drug	0,122	1,30	0,7294	-	
				-	Ctrl-Sal sum	1142,000	-	-	-	
				-	Ctrl-K sum	951,500	-	-	-	
				-	SD-Sal sum	1076,375	-	-	-	
				-	SD-K sum	955,333	-	-	-	

Cohort	Behavioral Paradigm	Abbrev	Measurement	Statistical Test	Comparison	F	° of freedom	p	*	Fig.
Pre-K	Social Defeat	SD	Bout Length (sec) for week 1	ANOVA	Group	0.437	3,27	0.7285	-	S6A
			Bout Length (sec) for week 2	ANOVA	Group	0.719	3,27	0.5493	-	
			Immobility Ratio (%) for week 1	ANOVA	Group	0.387	3,27	0.7633	-	S6B
			Immobility Ratio (%) for week 2	ANOVA	Group	7.462	3,27	0.0009	***	
				Fisher's PLSD	SD-Sal v. SD-K,10	-	-	0.0002	***	
					SD-Sal v. SD-K,30	-	-	0.0289	*	
					SD-Sal v. SD-K,90	-	-	0.0008	***	
					SD-K,10 v. SD-K,30	-	-	0.0584	-	
					SD-K,10 v. SD-K,90	-	-	0.724	-	
					SD-K,30 v. SD-K,90	-	-	0.1322	-	
			Vocalization (%) for week 1	ANOVA	Group	0.536	3,27	0.6617	-	S6C
			Vocalization (%) for week 2	ANOVA	Group	0.366	3,27	0.7783	-	
			Approaches (No.) for week 1	ANOVA	Group	0.667	3,27	0.5795	-	S6D

Pre-K	Social Defeat	SD	Approaches (No.) for week 2	ANOVA	Group	1.373	3,27	0.2721	-	S6D
			Latency of the CD-1 to attack (sec)	RMANOVA	SD-Sal v. SD-K,10: Group	0.148	1,13	0.7068	-	S6E
					SD-Sal v. SD-K,10: Time	5.198	13,169	<0.0001	***	
					SD-Sal v. SD-K,10: Group x Time	1.298	13,169	0.2185	-	
					SD-Sal v. SD-K,30: Group	0.016	1,14	0.9025	-	S6F
					SD-Sal v. SD-K,30: Time	4.144	13,182	<0.0001	***	
					SD-Sal v. SD-K,30: Group x Time	1.978	13,182	0.0247	*	
					SD-Sal v. SD-K,90: Group	0.469	1,13	0.5102	-	S6G
					SD-Sal v. SD-K,90: Time	4.012	13,169	<0.0001	***	
					SD-Sal v. SD-K,90: Group x Time	0.745	13,169	0.7167	-	
Flx Pilot	Forced Swim Test	FST	Immobility time (sec) on day 2 for Ctrl-Sal v. SD-Flx mice	RMANOVA	Group	11.51	1,12	0.0053	**	S7B
					Time	8.163	5,60	<0.0001	***	
					Group x Time	3.554	5,60	0.007	**	
				t-test	Minute 1	-	-	0.0963	-	
					Minute 2	-	-	0.0028	**	
					Minute 3	-	-	0.2846	-	
					Minute 4	-	-	0.002	**	
					Minute 5	-	-	0.0038	**	
					Minute 6	-	-	0.0039	**	
			Average Immobility time (sec) for minutes 3-6	ANOVA	Ctrl-Sal v. SD-Flx	11.997	1,12	0.0047	**	S7C
Pre-Flx	Body Weight (Before SD)	BW	Body weight (g)	ANOVA	Group	0,381	1,27	0,5422	-	S8A
					Drug	1,654	1,27	0,2094	-	
					Group x Drug	5,07	1,27	0,0327	*	
	Forced Swim Test	FST	Immobility time (sec) on day 1	RMANOVA	Group	0,887	1,28	0,3544	-	S8B
					Drug	0,112	1,28	0,7399	-	
					Group x Drug	0,042	1,28	0,8396	-	
					Time	26,792	5 140	<0.0001	***	
					Time x Group	0,686	5 140	0,6347	-	
					Time x Drug	1,531	5 140	0,1841	-	
					Time x Group x Drug	0,316	5 140	0,9026	-	
			Immobility time (sec) on day 1 for Ctrl mice		Drug	0,18	1,14	0,6777	-	
					Time	14,351	5,70	<0.0001	***	
					Drug x Time	0,999	5,70	0,4246	-	
			Immobility time (sec) on day 1 for SD mice	RMANOVA	Drug	0,007	1,14	0,9336	-	S8C
					Time	12,854	5,70	<0.0001	***	
					Drug x Time	0,813	5,70	0,5442	-	
			Average Immobility time (sec) for minutes 3-6	ANOVA	Group	0,208	1,28	0,6518	-	S8D
					Drug	0,404	1,28	0,5300	-	
					Group x Drug	0,237	1,28	0,6302	-	
	Novelty Suppressed Feeding	NSF	Latency to feed (sec)	Mantel-Cox logrank test	Ctrl-Veh v. Ctrl-Flx	-	-	0,4832	-	S8E
					SD-Veh v. SD-Flx	-	-	0,3173	-	
				ANOVA	Group	0,918	1,28	0,3461	-	S8F
					Drug	2,843	1,28	0,1029	-	
					Group x Drug	0,512	1,28	0,4801	-	
			Body Weight (g) (Before NSF)	ANOVA	Group	4,234	1,28	0,0490	*	S8G
					Drug	0,032	1,28	0,8593	-	
					Group x Drug	11,926	1,28	0,0018	**	
				t-test	Ctrl-Veh v. Ctrl-Flx	-	-	0,0318	*	
					Ctrl-Veh v. SD-Veh	-	-	0,3261	-	
					SD-Veh v. SD-Flx	-	-	0,0242	*	
			Weight loss during NSF (g)	ANOVA	Group	8,86	1,28	0,0060	**	S8H
					Drug	0,003	1,28	0,9572	-	
					Group x Drug	4,304	1,28	0,0473	*	
				t-test	Ctrl-Veh v. Ctrl-Flx	-	-	0,2677	-	
					Ctrl-Veh v. SD-Veh			0,3512	-	
					SD-Veh v. SD-Flx	-	-	0,0450	*	
			Food consumption (g)	ANOVA	Group	7,56	1,28	0,0103	*	S8I
					Drug	0,84	1,28	0,3672	-	
					Group x Drug	0,84	1,28	0,3672	-	
				t-test	Ctrl-Veh v. Ctrl-Flx	-	-	-	-	
					Ctrl-Veh v. SD-Veh	-	-	0,1759	-	
					SD-Veh v. SD-Flx	-	-	0,4120	-	
					Drug	1,677	1,28	0,2060	-	

	Contextual Fear Grouping	CFC	Freezing on day 1 (sec) for context A	RMANOVA	Group	0,283	1,28	0,5986	-	S8K
					Drug x Group	0,211	1,28	0,6494	-	
					Time	14,619	2,56	<0.0001	***	
					Time x Drug	0,996	2,56	0,3760	-	
					Time x Group	1,244	2,56	0,2961	-	
					Time x Drug x Group	2,979	2,56	0,0590	-	
			Freezing on day 2 (sec) for context A	RMANOVA	Drug	6,633	1,28	0,0156	*	S8L
					Group	0,804	1,28	0,3776	-	
					Drug x Group	0,924	1,28	0,3447	-	
					Time	5,964	2,56	0,0045	**	
					Time x Drug	1,045	2,56	0,3584	-	
					Time x Group	0,694	2,56	0,5036	-	
					Time x Drug x Group	0,206	2,56	0,8148	-	
				ANOVA	Group	0,804	1,28	0,3776	-	
					Drug	6,633	1,28	0,0156	*	
					Time	0,924	1,28	0,3447	-	
					Ctrl-Veh v. Ctrl-Flx	-	-	0,1749	-	
					SD-Veh v. SD-Flx	-	-	0,0502	-	
Pre-Flx	Social Defeat	SD	Bout Length (sec) for week 1	ANOVA	Drug	0,07	1,14	0,7957	-	S9A
			Bout Length (sec) for week 2	ANOVA	Drug	0,317	1,14	0,5824	-	
			Immobility Ratio (%) for week 1	ANOVA	Drug	0,005	1,14	0,9456	-	S9B
			Immobility Ratio (%) for week 2	ANOVA	Drug	0,041	1,14	0,8417	-	
			Vocalization (%) for week 1	ANOVA	Group	0,342	1,14	0,5677	-	S9C
			Vocalization (%) for week 2	ANOVA	Group	1,432	1,14	0,2513	-	
			Approaches (No.) for week 1	ANOVA	Group	0,033	1,14	0,8592	-	S9D
			Approaches (No.) for week 2	ANOVA	Group	0,026	1,14	0,8740	-	
			Latency of the CD-1 to attack (sec)	RMANOVA	Group	0,345	1,14	0,5666	-	S9E
					Time	1,586	12 168	0,0997	-	
					Group x Time	0,899	12 168	0,5489	-	
Post-K	Novelty Suppressed Feeding	NSF	Latency to feed (sec)	Mantel-Cox logrank test	Ctrl-Sal v. Ctrl-K	-	-	0,024	-	S10A
					SD-Sal v. SD-K	-	-	0,5691	-	
				ANOVA	Group	3,344	1,52	0,0732	-	S10B
					Drug	2,385	1,52	0,1286	-	
					Group x Drug	4,466	1,52	0,0394	*	
				t -test	Ctrl-Sal v. Ctrl-K	-	-	0,0116	*	
				t -test	Ctrl-Sal v. SD-Sal	-	-	0,0087	**	
				t -test	Ctrl-Sal v. SD-K			0,0474	*	
				t -test	SD-Sal v. SD-K	-	-	0,7026	-	
			Body Weight (g) before the start of SD	ANOVA	Group	0,117	1,52	0,7341	-	S10C
					Drug	0,007	1,52	0,9331	-	
					Group x Drug	0,400	1,52	0,5298	-	
			Weight loss before NSF (g)	ANOVA	Group	2,685	1,52	0,1073	-	S10D
					Drug	6,518	1,52	0,0136	*	
					Group x Drug	1,395	1,52	0,2429	-	
				t -test	Ctrl-Sal v. Ctrl-K	-	-	0,2218	-	
				t -test	Ctrl-Sal v. SD-Sal	-	-	0,0229	*	
				t -test	SD-Sal v. SD-K	-	-	0,0420	*	
			Weight loss during NSF (g)	ANOVA	Group	31,758	1,52	<0.0001	***	S10E
					Drug	0,504	1,52	0,4809	-	
					Group x Drug	0,192	1,52	0,6634	-	
			Food consumption in the home cage (g)	ANOVA	Group	4,969	1,52	0,0301	*	S10F
					Drug	0,506	1,52	0,4801	-	
					Group x Drug	0,086	1,52	0,7701	-	
	Contextual Fear Grouping	CFC	Freezing on day 1 (sec) for context A	RMANOVA	Group	0,096	1,52	0,7578	-	S10H
					Drug	0,364	1,52	0,5488	-	
					Drug x Group	0,588	1,52	0,4467	-	
					Time	6,783	2 104	0,0017	**	
					Time x Drug	1,592	2 104	0,2084	-	
					Time x Group	0,276	2 104	0,7597	-	
					Time x Drug x Group	0,658	2 104	0,5200	-	
			Freezing on day 2 (sec) for context A	RMANOVA	Group	1,393	1,52	0,2433	-	S10I
					Drug	2,82	1,52	0,0991	-	
					Drug x Group	0,656	1,52	0,4215	-	
					Time	49,941	2 104	<0.0001	***	
					Time x Drug	0,214	2 104	0,8075	-	
					Time x Group	2,068	2 104	0,1317	-	
					Time x Drug x Group	0,654	2 104	0,5221	-	
					Group	0,002	1,52	0,9605	-	
					Drug	0,632	1,52	0,4302	-	

			Freezing on day 3 (sec) for context A'	RMANOVA	Drug x Group	0,097	1,52	0,7565	-	S10J
					Time	44,699	2 104	<0.0001	***	
					Time x Drug	3,323	2 104	0,0399	*	
					Time x Group	1,352	2 104	0,2633	-	
					Time x Drug x Group	2,727	2 104	0,0701	-	

Cohort	Gene	Region	Measurement	Statistical Test	Comparison	F	° of freedom	p	*	Fig.
Post-K	Ki67	DG	Ki67+ cells per section	ANOVA	Group	0,019	1,28	0,8906	-	S10K
					Drug	7,267	1,28	0,0117	*	
					Group x Drug	0,02	1,28	0,8891	-	
				t -test	Ctrl-Sal v. Ctrl-K	-	-	0,0278	*	
				t -test	SD-Sal v. SD-K	-	-	0,1589	-	
			Total Ki67+ cells	ANOVA	Group	0,039	1,28	0,8440	-	data not shown
					Drug	5,823	1,28	0,0226	*	
					Group x Drug	0,205	1,28	0,6544	-	
				-	Ctrl-Sal sum	111,111	-	-	-	
				-	Ctrl-K sum	174,444	-	-	-	
				-	SD-Sal sum	125,500	-	-	-	
				-	SD-K sum	168,833	-	-	-	
	Doublecortin (DCX)		DCX+ cells per section	ANOVA	Group	0,005	1,28	0,9466	-	S10L
					Drug	0,029	1,28	0,8653	-	
					Group x Drug	0,011	1,28	0,9171	-	
			Total DCX+ cells	ANOVA	Group	0,434	1,28	0,5156	-	data not shown
					Drug	0,554	1,28	0,4628	-	
					Group x Drug	0,138	1,28	0,7132	-	
				-	Ctrl-Sal sum	1208,333	-	-	-	
				-	Ctrl-K sum	1252,889	-	-	-	
				-	SD-Sal sum	1252,625	-	-	-	
				-	SD-K sum	1375,833	-	-	-	

Cohort	Behavioral Paradigm	Abbrev	Measurement	Statistical Test	Comparison	F	° of freedom	p	*	Fig.
Pre-CORT	Body Weight	BW	Body weight (g)	ANOVA	Group	1.42	5,73	0.22	-	S11A
					Time	312.5	6,438	<0.001	***	
					Group x Time	2.59	30,438	<0.001	***	
	Forced Swim Test	FST	Immobility time (sec) on day 1	RMANOVA	Group	0.88	5,73	0.49	-	S11B
					Time	170.7	5,36	<0.001	***	
					Group x Time	1.583	25,36	<0.05	*	
			Average Immobility time (sec) for minutes 3-6	ANOVA	Group	0.41	5,73	0.23	-	S11C
	Novelty Suppressed Feeding	NSF	Latency to feed (sec)	Mantel-cox logrank test	Veh v. CORT-Veh	-	-	<0.01	**	S11D
					CORT-Sal v. CORT-K,90	-	-	<0.01	**	S11E
				ANOVA	Group	4.73	5,73	<0.001	***	
			Body Weight (g)	ANOVA	Group	1.69	5,73	0.14	-	S11F
			Weight loss during NSF (%)	ANOVA	Group	7.43	5,73	<0.01	**	S11G
				Fisher's PLSD	Vehicle vs. CORT/Vehicle	-	-	0,0008	***	
					Vehicle vs. CORT/Fluoxetine 18mg/kg/day	-	-	<0.0001	***	
					Vehicle vs. CORT/ketamine 10mg/kg	-	-	0,0002	***	
					Vehicle vs. CORT/ketamine 30mg/kg	-	-	0,0005	***	
					Vehicle vs. CORT/ketamine 90mg/kg	-	-	<0.0001	***	
					CORT/Vehicle vs. CORT/Fluoxetine 18mg/kg/day	-	-	0,444	-	
					CORT/Vehicle vs. CORT/ketamine 10mg/kg	-	-	0,9461	-	
					CORT/Vehicle vs. CORT/ketamine 30mg/kg	-	-	0,8628	-	
					CORT/Vehicle vs. CORT/ketamine 90mg/kg	-	-	0,0381	*	
					CORT/Fluoxetine 18mg/kg/day vs. CORT/ketamine 10mg/kg	-	-	0,4362	-	

					CORT/Fluoxetine 18mg/kg/day vs. CORT/ketamine 30mg/kg	-	-	0,2980	-	
					CORT/Fluoxetine 18mg/kg/day vs. CORT/ketamine 90mg/kg	-	-	0,1479	-	
					CORT/ketamine 10mg/kg vs. CORT/ketamine 30mg/kg	-	-	0,7881	-	
					CORT/ketamine 10mg/kg vs. CORT/ketamine 90mg/kg	-	-	0,0252	*	
					CORT/ketamine 30mg/kg vs. CORT/ketamine 90mg/kg	-	-	0,0127	*	
Pre-CORT	Elevated Plus Maze	EPM	Time in open arms (sec)	*t*-test	Veh v. CORT-Veh	t=3.41	-	<0.05	*	S12A
				ANOVA	Group	1.31	5,73	0.26	-	
			Entries in open arms (No.)	*t*-test	Veh v. CORT-Veh	t=3.47	-	<0.01	**	S12B
				ANOVA	Group	2.82	5,73	<0.02	*	
				Fisher's PLSD	Vehicle vs. CORT/Vehicle	-	-	0,0010	**	
					Vehicle vs. CORT/Fluoxetine 18mg/kg/day	-	-	0,2281	-	
					Vehicle vs. CORT/ketamine 10mg/kg	-	-	0,0134	*	
					Vehicle vs. CORT/ketamine 30mg/kg	-	-	0,0227	*	
					Vehicle vs. CORT/ketamine 90mg/kg	-	-	0,0470	*	
					CORT/Vehicle vs. CORT/Fluoxetine 18mg/kg/day	-	-	0,0154	*	
					CORT/Vehicle vs. CORT/ketamine 10mg/kg	-	-	0,2281	-	
					CORT/Vehicle vs. CORT/ketamine 30mg/kg	-	-	0,1596	-	
					CORT/Vehicle vs. CORT/ketamine 90mg/kg	-	-	0,0880	-	
					CORT/Fluoxetine 18mg/kg/day vs. CORT/ketamine 10mg/kg	-	-	0,1572	-	
					CORT/Fluoxetine 18mg/kg/day vs. CORT/ketamine 30mg/kg	-	-	0,2326	-	
					CORT/Fluoxetine 18mg/kg/day vs. CORT/ketamine 90mg/kg	-	-	0,3898	-	
					CORT/ketamine 10mg/kg vs. CORT/ketamine 30mg/kg	-	-	0,8190	-	
					CORT/ketamine 10mg/kg vs. CORT/ketamine 90mg/kg	-	-	0,5676	-	
					CORT/ketamine 30mg/kg vs. CORT/ketamine 90mg/kg	-	-	0,7314	-	
			Time in closed arms (sec)	*t*-test	Veh v. CORT-Veh	t=3.60	-	0,0020	**	S12C
				ANOVA	Group	1.82	5,73	0.11	-	
			Total distance (cm)	ANOVA	Grouop	1.03	5,73	0.4	-	S12D
				ANOVA	Group	2.947	3,41	0,0428	*	
					Veh/Veh v. CORT/Veh	-	-	0,4957	-	
					Veh/Veh v. CORT/Flx	-	-	0,0634	-	

Post-CORT	Tail Suspension Test	TST	Day 5	Fisher's PLSD	Veh/Veh v. CORT/K,10	-	-	0,4803	-	S13B
					CORT/Veh v. CORT/Flx	-	-	0,0062	**	
					CORT/Veh v. CORT/K,10	-	-	0,1495	-	
			Day 11	ANOVA	Group	2.82	3,41	0,0021	**	S13C
				Fisher's PLSD	Veh/Veh v. CORT/Veh	-	-	0,0027	**	
					Veh/Veh v. CORT/Flx	-	-	0,6738	-	
					Veh/Veh v. CORT/K,10	-	-	0,0074	**	
					CORT/Veh v. CORT/Flx	-	-	0,0042	**	
					CORT/Veh v. CORT/K,10	-	-	0,9203	-	
	Novelty Supressed Feeding	NSF Day 7	Latency to Feed	ANOVA	Group	4.206	3,41	<0.05	*	S13D
				Fisher's PLSD	Vehicle/Vehicle vs. CORT/Vehicle	-	-	0,00140	**	
					Vehicle/Vehicle vs. CORT/Fluoxetine 18mg/kg/day	-	-	0,00900	**	
					Vehicle/Vehicle vs. CORT/Ketamine 10 mg/kg	-	-	0,10240	-	
					CORT/Vehicle vs. CORT/Fluoxetine 18mg/kg/day	-	-	0,49750	-	
					CORT/Vehicle vs. CORT/Ketamine 10 mg/kg	-	-	0,12420	-	
					CORT/Fluoxetine 18mg/kg/day vs. CORT/Ketamine 10 mg/kg	-	-	0,35690	-	
			Body weight loss	ANOVA	Group	15.73	3,41	<0.001	***	S13E
			Food consumption	ANOVA	Group	8.858	3,41	<0.01	***	S13F
	Novelty Supressed Feeding	NSF Day 14	Latency to Feed	ANOVA	Group	6.26	3,41	0,0012	**	S13G
				Fisher's PLSD	Vehicle/Vehicle vs. CORT/Vehicle	-	-	0,0003	***	
					Vehicle/Vehicle vs. CORT/Fluoxetine 18mg/kg/day	-	-	0,3061	-	
					Vehicle/Vehicle vs. CORT/Ketamine 10 mg/kg	-	-	0,0149	*	
					CORT/Vehicle vs. CORT/Fluoxetine 18mg/kg/day	-	-	0,0030	**	
					CORT/Vehicle vs. CORT/Ketamine 10 mg/kg	-	-	0,2661	-	
					CORT/Fluoxetine 18mg/kg/day vs. CORT/Ketamine 10 mg/kg	-	-	0,0958	-	
			Body weight loss	ANOVA	Group	2.16	3,41	0.10	-	S13H
			Food consumption	ANOVA	Group	0.87	3,41	0.46	-	S13I

Résultats complémentaires

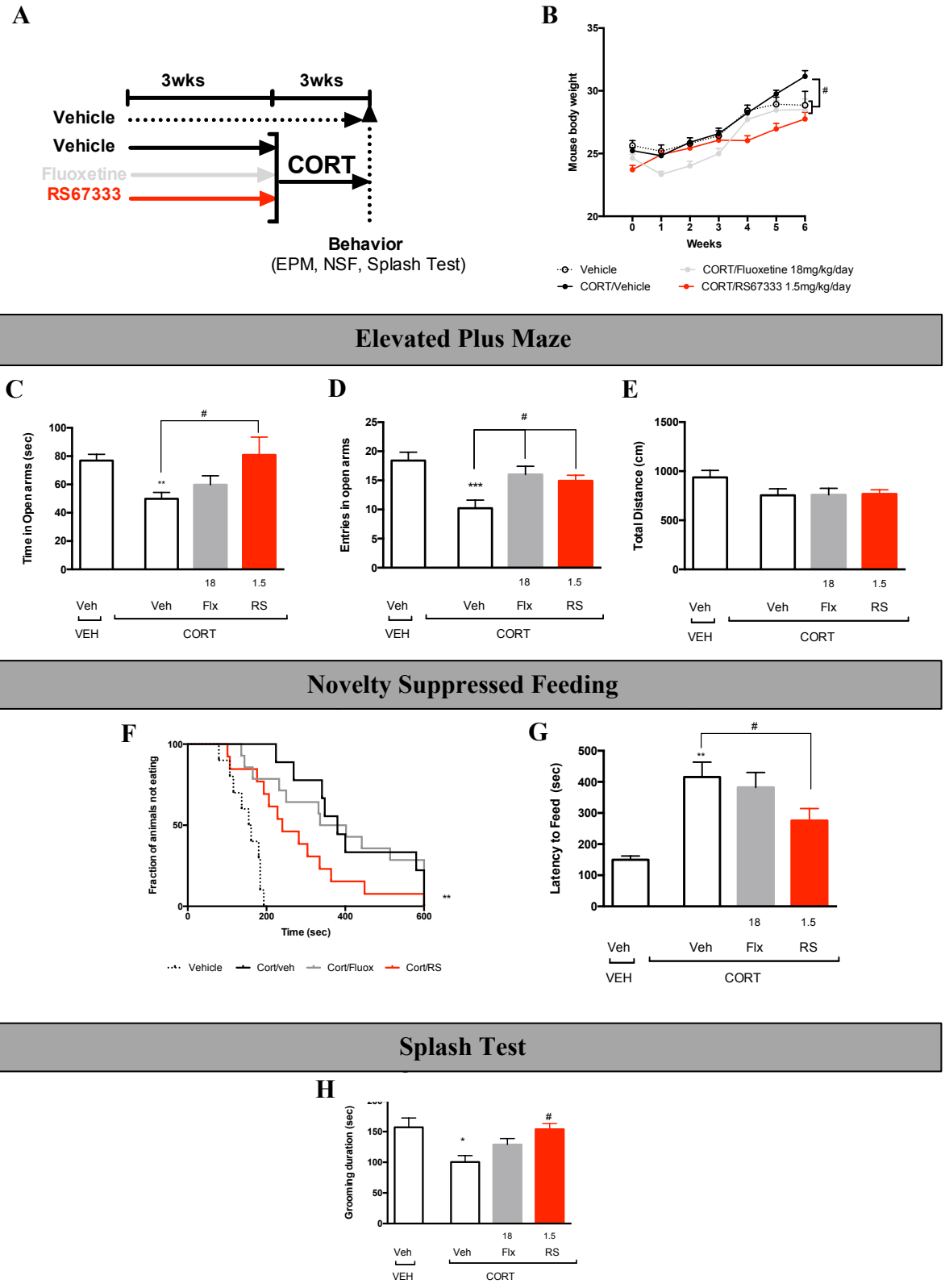
Détermination des propriétés prophylactiques du RS 67333 sur le phénotype anxio-dépressif induit par corticostérone chez la souris C57BL/6JRj mâle (***rapport d'invention #CU19088***) :

L'activité anxiolytique du RS 67333 dans une souche de souris anxieuse a nettement été démontrée tout au long de ce travail et ce dans divers tests prédictifs d'une activité anxiolytique. En vue de déterminer les propriétés prophylactiques du RS 67333, un modèle murin de résilience a été développé selon une étude originale conceptualisée par le professeur Denis David (Université Paris-Saclay, France) et les docteurs Indira David (Université Paris-Saclay, France) et Christine Denny (Columbia University, NYC, USA). Ce modèle consiste à administrer chez la souris naïve, ici des souris C57BL/6JRj mâles, une molécule donc le pouvoir prophylactique veut être évalué, avant d'induire chez ces mêmes animaux, un phénotype anxio-dépressif, provoqué par un traitement chronique de corticostérone (35 µg/ml) (David *et al.*, 2009; Mendez-David *et al.*, 2014) (**Figure 34A**). Les animaux naïfs ont été traités pendant 3 semaines avec de la fluox »tine (160 mg/ml, équivalent à une dose de 18 mg/kg/j), administrée dans l'eau de boisson ou avec du RS 67333 (1,5 mg/kg), délivré grâce à des mini-pompes osmotiques ALZET®, selon un protocole déjà utilisé au laboratoire (Mendez-David *et al.*, 2014). À la fin de cette période, les traitements pharmacologiques ont été arrêtés et le traitement chronique par corticostérone a été initié pour une période de 3 semaines. Les animaux ont ensuite été testés successivement dans l'EPM, le NSF et le Splash Test (*Figure 34A*). Les animaux contrôles, non stressés, ont reçu une solution véhicule pendant toute la durée de l'expérience.

Nous avons observé que la corticostérone induit une augmentation du poids des animaux, un effet qui n'est pas observé chez les animaux prétraités par fluoxétine ou RS 67333, suggérant que ces molécules protègent contre la prise de poids induite par la corticostérone (RMANOVA : effet traitement $F_{3,43}$ = 3,523, p=0,0227 ; effet temps $F_{6,258}$ = 132,3, p<0,0001 ; interaction traitement x temps $F_{18,258}$ = 5,728, p<0,0001) (**Figure 34B**). Comme escompté, un traitement par corticostérone induit un phénotype anxieux et dépressif, comme indiqué par la diminution du temps passé et du nombre d'entrées dans les bras ouverts de l'EPM, l'augmentation de la latence pour se nourrir dans le NSF et la réduction du temps de toilettage dans le Splash Test (**Figures 34C-H**). Contrairement à un prétraitement chronique par fluoxétine, un prétraitement par RS 67333 prévient la diminution du temps passé dans les bras ouverts de l'EPM induit par la corticostérone ($F_{3,43}$ = 2,554, p = 0,05), sans affecter l'activité locomotrice totale (**Figures 34C-E**). Toutefois, l'administration de RS 67333 et de fluoxétine prévient les effets délétères de la corticostérone sur le nombre d'entrés dans les bras ouverts de l'EPM ($F_{3,43}$ = 25,548, p = 0,026) (**Figure 34D**). Contrairement à la fluoxétine, le RS induit une diminution de la latence pour se nourrir dans le NSF ($F_{3,43}$ = 7,528, p<0,0001) (**Figures 34F-G**) et une augmentation du temps de toilettage dans le Splash Test ($F_{3,43}$ = 4,909, p = 0,005) (**Figure 34H**), comparativement aux animaux traités par la corticostérone seule.

Nos résultats laissent donc à penser qu'une activation chronique du récepteur 5-HT_4 protège contre le développement des comportements de type anxieux et dépressif induits, dans un modèle murin neuroendocrine. Tout comme la kétamine, mais à l'instar de la fluoxétine, le RS 67333 possède donc un pouvoir prophylactique. Cette découverte concernant la capacité du RS 67333 à promouvoir une résilience a été officiellement déposée auprès des autorités compétentes de Columbia University (NYC, USA) dans le but d'être brevetée (rapport d'invention #CU19088, « RS 67333 (1-(4-Amino-5-chloro-2-methoxyphenyl)-3-[1-butyl-4-piperidinyl]-1-propanone hydro-chloride), comme composé prophylactique et anxiolytique »).

Figure 34. *La stimulation chronique du récepteur 5-HT$_4$ prévient le développement des comportements de type anxieux et dépressif induits par la corticostérone chez la souris C57BL/6JRj.*



Abréviations *: *p<0,05 ; **p<0,01 versus véhicule ; #p<0,05 versus véhicule + corticostérone ; CORT : corticostérone ; FLX : fluoxétine 18 mg/kg ; RS : RS 67333 1,5 mg/kg ; V : véhicule.*

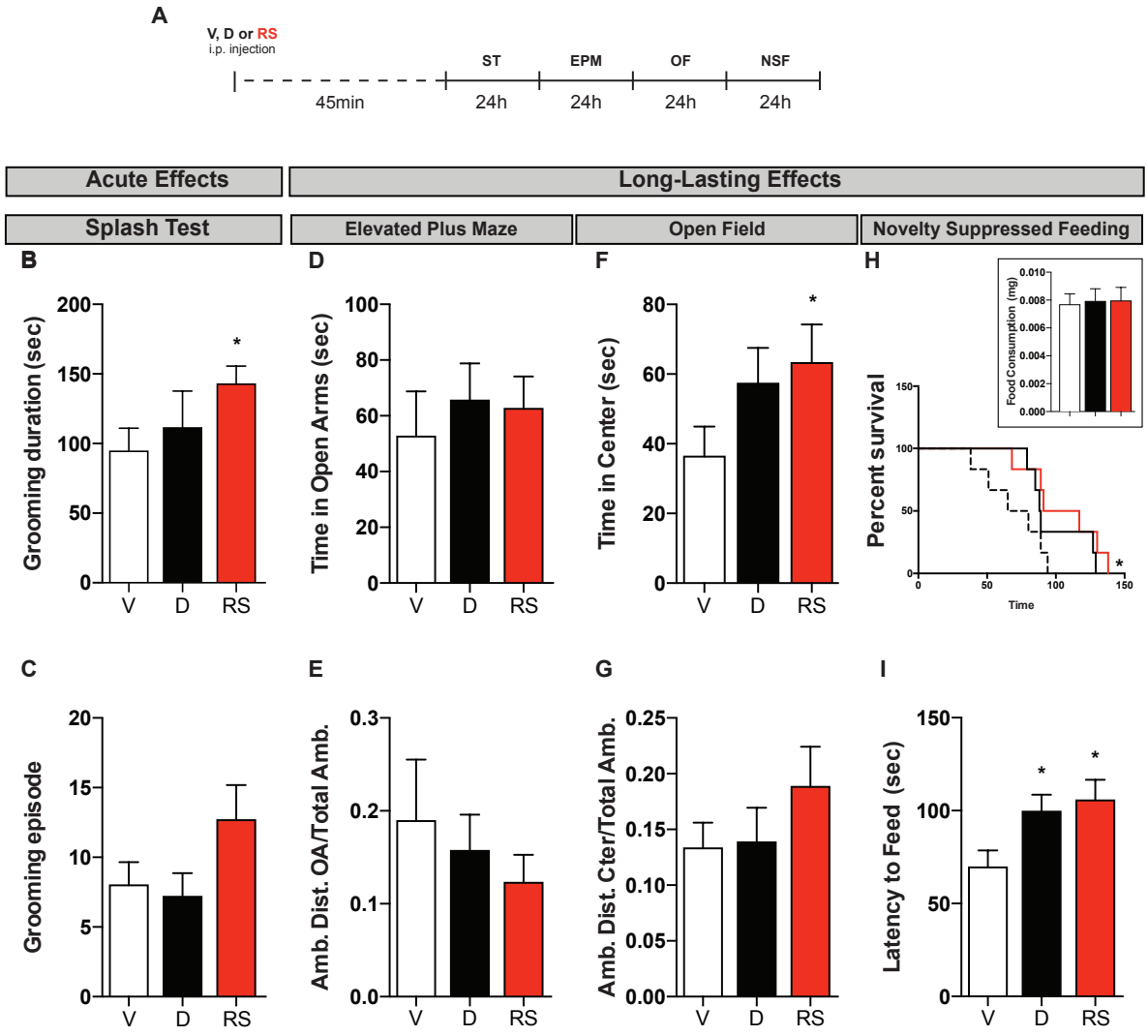
Évaluation de l'activité à long-terme d'un agoniste du récepteur 5-HT_4 chez la souris BALB/cJRj :

Après avoir montré que le RS 67333 était pourvu de propriétés prophylactiques, nous avons ensuite cherché à connaître l'activité de cette molécule au long-terme, c'est-à-dire si la réponse anxiolytique que le RS 67333 provoque est durable dans le temps. Pour cela, les souris BALB/cJRj ont été injectées par voie systémique avec une unique dose de RS 67333 (1,5 mg/kg) ou de diazépam (1,5 mg/kg), 45 minutes avant de réaliser le Splash Test. Le lendemain, les souris ont été soumises à l'EPM, sans avoir reçu de nouvelle dose de RS, puis à l'open field 24 h après et pour finir au NSF 24 h après l'open field (**Figure 35A**).

Comme pressenti, le RS 67333 a augmenté la durée de toilettage ($t = 2,294$; $p<0,05$) dans le Splash Test, sans en affecter le nombre d'épisodes ($t = 1,546$; $p=0,1531$) (**Figures 35B-C)**, après une administration unique. Nous n'avons pas retrouvé les effets anxiolytiques attendus du RS 67333 dans l'EPM ($t = 0,4990$; $p=0,6286$) (**Figures 35D-E**), 24 heures après l'injection. Pourtant le RS 67333 a augmenté le temps passé dans le centre de l'OF ($t = 1,924$; $p<0,05$), sans affecter le ratio de la distance dans le centre sur la distance ambulatoire totale ($t = 1,281$; $p=2292$) (**Figures 35F-G**), 48 heures après l'injection et a diminué la latence pour se nourrir dans le NSF ($t = 2,520$; $p<0,05$), sans affecter la consommation de nourriture en environnement familier ($t = 0,2203$; $p=0,4151$) (**Figures 35H-I**), 72 heures après l'injection. Le diazépam ne possédant pas d'activité de type antidépresseur, il est donc normal de ne retrouver aucun effet dans le Splash Test. Nous n'avons pas non plus observé d'activité à long-terme pour le diazépam.

Par conséquent, bien que cette étude devrait être répétée, le RS pourrait avoir des effets persistants jusqu'à 72 heures post-injection.

Figure 35. *La stimulation unique du récepteur 5-HT$_4$ pourrait induire des effets de type anxiolytique et antidépresseur à long-terme chez la souris BALB/cJRj.*



Abréviations *: *p<0,05 versus véhicule ; D : diazépam 1,5 mg/kg ; i.p. : injection intrapéritonéale RS : RS 67333 1,5 mg/kg ; V : véhicule.*

DISCUSSION GÉNÉRALE

Les troubles anxieux constituent des désordres psychiatriques fréquents et invalidants mais heureusement sensibles aux traitements disponibles sur le marché, tels que les BZD ou les antidépresseurs. En dépit de leur efficacité après une administration unique, les BZD ne sont plus indiquées en première intention dans le traitement des troubles anxieux, ce sont désormais les antidépresseurs, notamment les ISRS, qui les ont remplacées. Néanmoins le développement de nouvelles stratégies est un problème de santé majeur, puisque l'efficacité des traitements antidépresseurs est limitée par un long délai d'action thérapeutique et surtout un nombre important de patients non répondeurs ou résistants. Le besoin de mettre au point de nouvelles molécules est d'autant plus urgent que, récemment, il a été démontré que les BZD étaient plus efficaces que les antidépresseurs pour réduire les symptômes du TAG (Gomez *et al.*, 2018).

De ce fait, la compréhension des mécanismes impliqués dans la réponse anxiolytique rapide devrait offrir de nouvelles opportunités thérapeutiques. Il se pourrait que le récepteur 5-HT_4 soit une cible à privilégier dans ce domaine, puisqu'une administration chronique d'un agoniste du récepteur 5-HT_4, le RS 67333, induit des effets anxiolytiques chez le rat (Pascual-Brazo *et al.*, 2012), mais aussi corrige le phénotype anxio-dépressif induit par la corticostérone chez la souris C57BL/6 (Mendez-David *et al.*, 2014). De plus, le récepteur 5-HT_4 est majoritairement exprimé dans les régions limbiques du cerveau (Vilaro *et al.*, 2005), et notamment sur les neurones pyramidaux du CPF_m, dont les terminaisons se projetant sur le NRD ont été montrées pour jouer un rôle dans la régulation des troubles de l'humeur (Lucas *et al.*, 2005; Warden *et al.*, 2012; Jean *et al.*, 2017). Dès lors, ce travail avait pour but d'évaluer d'une part, les effets anxiolytiques du RS 67333, dans un modèle de souris anxieuse BALB/cJRj, après une administration aiguë, et d'autre part, d'estimer le rôle du circuit cortex-raphé dans la réponse anxiolytique rapide du RS 67333. Nos résultats rapportent que la stimulation unique du récepteur 5-HT_4 provoque une réponse anxiolytique rapide, en partie expliquée par l'activation du circuit cortex-raphé, de manière nécessaire mais non suffisante.

Les troubles anxieux constituent un facteur de risque majeur dans le développement des pathologies dépressives. Traiter rapidement et à long-terme les symptômes anxieux permettrait de prévenir l'apparition des premiers symptômes de dépression, ainsi qu'une meilleure prise en charge des EDC, d'autant plus que la comorbidité anxieuse favorise la résistance au traitement antidépresseur chez ces patients (Baldwin, 2009). De plus, la majorité des personnes faisant face à des événements défavorables ou stressants au quotidien ne développe pas de troubles psychiatriques (**Article 1**). Il est donc primordial de comprendre les facteurs neurobiologiques qui caractérisent cette résilience et d'identifier des cibles thérapeutiques qui pourraient potentiellement favoriser une telle résilience. Dans un premier temps, ce travail avait pour objectif d'établir un modèle murin de résilience, puis, dans un deuxième temps, de tester dans ce modèle, les effets prophylactiques du RS 67333. Nos résultats révèlent que contrairement à la fluoxétine, la kétamine et le RS 67333 sont capables d'induire des effets protecteurs à long-terme contre les effets comportementaux néfastes, induits par un stress de défaite sociale ou par un traitement chronique par corticostérone.

1. La stimulation aiguë, par voie systémique, du récepteur 5-HT_4 induit un effet de type anxiolytique rapide chez la souris anxieuse BALB/cJRj mâle.

En utilisant une souche de souris anxieuse à l'état basale, la souris BALB/cJRj, nous avons d'abord étudié l'effet de type anxiolytique rapide d'un agoniste du récepteur 5-HT_4, le RS 67333 (pKi = 8,7), après une administration unique par voie systémique, dans trois tests comportementaux prédictifs d'un phénotype anxieux (**Article 2**). Le **Tableau 19** regroupe les résultats comportementaux obtenus en fonction des molécules administrées. Dans l'EPM, le NSF et l'OF, l'administration unique par voie systémique de RS 67333 (1,5 mg/kg) induit un effet de type anxiolytique rapide similaire à celui du diazépam (1,5 mg/kg). Sans surprise, la fluoxétine (18 mg/kg) n'a eu aucun effet sur les paramètres mesurés dans ces tests, attestant ainsi du délai d'action thérapeutique des ISRS, qui a précédemment été démontré (David *et al.*, 2007; Guilloux *et al.*, 2013). Cependant, la capacité de la fluoxétine à corriger un phénotype anxieux n'est pas contestable, mais nécessite au moins 28 jours de traitement

(Mendez-David *et al.*, 2014), contrastant ainsi avec la rapidité d'action des agonistes du récepteur 5-HT_4.

Bien que l'affinité du RS 67333 pour le récepteur 5-HT_4 soit élevée, nous avons tout de même vérifié la sélectivité de l'effet anxiolytique, en administrant le RS 67333 en association avec un antagoniste sélectif du récepteur 5-HT_4, le GR 125487 (1,0 mg/kg, pKi = 10,6). Plusieurs études ont montré qu'administré seul, le GR 125487 n'a pas d'effet direct sur le comportement de type anxieux dans différents tests comportementaux comme le LDT (Costall & Naylor, 1997), l'OF, l'EPM ou encore le NSF (Mendez-David *et al.*, 2014). Cependant, en co-administration avec le RS 67333, le GR 125487 bloque les effets de l'agoniste du récepteur 5-HT_4, confirmant ainsi que la réponse de type anxiolytique du RS 67333 nécessite l'activation du récepteur 5-HT_4 (**Tableau 19**).

En outre, l'activation de ce récepteur n'est pas seulement nécessaire à l'activité anxiolytique du RS 67333, elle l'est aussi à l'activité anxiolytique et antidépressive de la fluoxétine, et à l'activité anxiolytique du diazépam. Dans le cas de la fluoxétine, il a été rapporté que le blocage du récepteur 5-HT_4 prévient les effets de type anxiolytique et antidépresseur induits par un traitement chronique de 28 jours par fluoxétine (Mendez-David *et al.*, 2014). De plus, chez la souris, un traitement chronique par fluoxétine (20 mg/kg) conduit à une augmentation spécifique de l'ARNm du récepteur 5-HT_4 dans les neurones pyramidaux de la couche 5 du CPF (Schmidt *et al.*, 2012), ce qui démontre bien l'importance du récepteur 5-HT_4 dans les effets anxiolytiques et antidépresseurs de la fluoxétine. Dans le cas du diazépam, Costall et Naylor ont montré que les effets anxiolytiques du diazépam dans le LDT étaient inhibés par une administration unique d'antagonistes du récepteur 5-HT_4 comme le GR 113808 ou le SB 204070. Nos résultats font état d'observations similaires concernant le diazépam puisque la réponse anxiolytique qu'il induit dans l'EPM est partiellement supprimée par un prétraitement au GR 125487 (diminution du temps passé dans les BO de l'EPM de 34%, comparativement au traitement par diazépam seul).

Tableau 19. *Résumé des résultats comportementaux après une administration par voie systémique.*

Traitements	EPM	NSF	OF
Diazépam (1,5 mg/kg ; i.p.)	✓	✓	✓
Fluoxétine (18 mg/kg ; i.p.)	✗	✗	✗
RS 67333 (1,5 mg/kg ; i.p.)	✓	✓	✓
GR 125487 (1,0 mg/kg ; i.p.) + diazépam (1,5 mg/kg ; i.p.)	✗	-	-
GR 125487 (1,0 mg/kg ; i.p.) + RS 67333 (1,5 mg/kg ; i.p.)	✗	✗	-

Abréviations : ✓ : activité anxiolytique par rapport au groupe contrôle ; ✗ : pas d'activité anxiolytique ; EPM : elevated plus maze ; NSF : novelty suppressed feeding ; OF : open field.

Ensemble, ces données suggèrent que l'activité de type anxiolytique rapide requière l'activation sélective de certains récepteurs post-synaptiques, dont le récepteur 5-HT_4, plutôt qu'une augmentation globale de la neurotransmission sérotoninergique. Toutefois, cette hypothèse peut être contestée par les données des études précliniques sur les auto- et hétéro-récepteurs 5-HT_{1A}, puisqu'il semblerait que seuls les autorécepteurs, influençant donc la synthèse de 5-HT, soient directement impliqués dans les comportements anxieux (Richardson-Jones *et al.*, 2011; Donaldson *et al.*, 2014). Cette supposition est confortée par les expériences de pharmacologie, qui montrent que les agonistes du récepteur 5-HT_{1A}, comme la buspirone ou le 8-OH-DPAT, agissent sur les comportements anxieux de manière comparable aux traitements antidépresseurs (Samuels *et al.*, 2016).

2. L'activation aiguë du récepteur 5-HT$_4$ dans le CPF$_m$ et l'HPC$_v$ participe aux effets de type anxiolytique rapide chez la souris anxieuse BALB/cJRj mâle.

La deuxième partie de notre travail avait pour but de comprendre les différents circuits impliqués dans l'anxiété, en décrivant plus précisément celui engagé dans les effets de type anxiolytique rapide induits par l'activation du récepteur 5-HT$_4$ (**Article 1**). Dans un premier temps, nous avons cartographié l'expression des transcrits du récepteur 5-HT$_4$ dans le cerveau de souris BALB/cJRj. Sans surprise, nous avons retrouvé une expression des transcrits du récepteur 5-HT$_4$ dans le CPF et dans l'HPC, des régions limbiques impliquées dans la régulation de l'humeur, comme ce qui a été décrit dans la littérature (Waeber *et al.*, 1993; Vilaro *et al.*, 2005).

En plus d'exprimer la cible d'intérêt, le CPF$_m$ semble être activé de manière persistante chez les sujets atteints de TAG, y compris pendant les phases de repos qui suivent le stimulus déclenchant l'inquiétude chez ces patients (Paulesu *et al.*, 2010). Dans un deuxième temps, nous avons donc exploré les conséquences comportementales de l'activation spécifique du récepteur 5-HT$_4$ exprimé dans le CPF$_m$. Pour cela, nous avons réalisé des injections bilatérales de RS 67333 (0,2 ou 1 µg) directement dans le CPF$_m$, suivies par des tests comportementaux prédictifs d'une activité de type anxiolytique. À notre connaissance, aucune étude n'a à ce jour évalué les effets d'une administration intracorticale d'un agoniste du récepteur 5-HT$_4$ sur les comportements anxieux. Nos résultats, résumés dans le **Tableau 20**, montrent que l'activation intracorticale du récepteur 5-HT$_4$ reproduit la réponse anxiolytique obtenue après une injection par voie systémique de RS 67333, en induisant une activité de type anxiolytique rapide dans l'EPM et le NSF, toujours de manière similaire à celle du diazépam. Ces résultats sont en accord avec une étude récente montrant que la surexpression du récepteur 5-HT$_4$ dans le CPF$_m$ de souris *wild-type* C57BL/6, grâce à un virus AAV9-HTR4-RFP, augmente le temps passé dans les BO de l'EPM (Castello *et al.*, 2018).

Nous avons par la suite souhaité confirmer ces résultats dans une autre structure exprimant le récepteur 5-HT_4, qui est également impliquée dans la physiopathologie des troubles anxieux, comme c'est le cas pour l'HPC (Shin & Liberzon, 2010). De la même manière, une infusion de RS 67333 directement dans l'HPC_v provoque une réponse anxiolytique chez la souris BALB/cJRj dans l'EPM et dans le NSF (**Tableau 20**). Nos résultats obtenus dans l'HPC_v semblent cohérents au regard de la littérature puisqu'une étude a révélé que la stimulation par optogénétique des cellules granulaires du gyrus denté de l'HPC, augmente le temps passé dans les BO de l'EPM (Kheirbek *et al.*, 2013).

Tableau 20. *Résumé des résultats comportementaux après administration locale en fonction de la structure étudiée.*

Traitements	EPM		NSF	
	CPF_m	HPC_v	CPF_m	HPC_v
Diazépam (1,5 mg/kg ; i.p.)	✓	✓	✓	✓
RS 67333 (0,2 ou 1 µg)	✓	✓	✓	✓

Abréviations : ✓ : activité anxiolytique par rapport au groupe contrôle ; CPF_m : cortex préfrontal médian ; EPM : elevated plus maze ; HPC_v : hippocampe ventral ; NSF : novelty suppressed feeding ; OF : open field.

Ces résultats laissent ainsi penser que les effets de type anxiolytique rapide du RS 67333 seraient portés, entre autres, par le CPF_m et l'HPC_v. A notre connaissance, c'est l'une des premières études qui s'intéresse aux effets anxiolytiques induits par une administration intracérébrale de RS 67333. La toute première étude qui s'y est intéressée a rapporté qu'une administration bilatérale de RS 67333 dans la BLA n'a pas d'effet sur les paramètres d'anxiété mesurés dans l'EPM chez la souris (Chegini *et al.*, 2014). Cependant, lorsque les animaux sont exposés une seconde fois à l'EPM, 24 heures après la première exposition, on observe une augmentation du temps passé dans les BO de l'EPM suggérant non pas un effet anxiolytique, mais plutôt un défaut de l'apprentissage aversif et donc une réduction de la formation de la mémoire émotionnelle (Chegini *et al.*, 2014). Plusieurs autres études ont été réalisées pour évaluer le rôle du récepteur 5-HT_4 hippocampique dans la peur conditionnée ou encore dans

l'apprentissage et les déficits d'acquisition de la mémoire émotionnelle. Ainsi, une injection bilatérale de RS 67333 à différentes doses, dans la région CA1 ou CA3 de l'hippocampe chez la souris NMRI mâle avant l'apprentissage, augmente respectivement le temps de latence du *freezing* dans deux tâches de conditionnement de la peur contexte- et son-dépendant, et diminue la latence dans une tâche d'évitement passif à un essai, traduisant une altération de l'acquisition de la mémoire et un défaut d'apprentissage de la peur lors du conditionnement (Nasehi *et al.*, 2015a; Nasehi *et al.*, 2016). De même, une injection de RS 67333 dans la région CA1 de l'hippocampe altère la consolidation de la mémoire, révélant un effet amnésiant du composé lorsque celui-ci est injecté après l'apprentissage (Nasehi *et al.*, 2015b). Ces résultats sont plutôt surprenants quand on sait que l'administration chronique par voie systémique de RS 67333 (1,5 mg/kg) restaure tous les déficits cognitifs induits par la corticostérone chez la souris C57BL/6JRj (Darcet *et al.*, 2016), ou encore que l'administration unique par voie systémique de RS 67333 avant l'acquisition améliore les performances de mémoire épisodique chez la souris NMRI dans le test de la reconnaissance d'un nouvel objet (Freret *et al.*, 2012), et de mémoire spatiale chez le rat Sprague-Dawley dans le test de la piscine de Morris (Lelong *et al.*, 2001). Toutefois, on retrouve les effets pro-cognitifs du RS 67333 lorsque ce composé est injecté dans une région exprimant le récepteur 5-HT_4, mais différente de l'HPC. En effet, une administration bilatérale de RS 67333 dans le noyau basal de Meynert, augmente l'acquisition et la consolidation de la mémoire spatiale, un effet prévenu par l'administration de RS 39604, un antagoniste du récepteur 5-HT_4 (Orsetti *et al.*, 2003). De la même manière, une injection de RS 67333 dans le NAc, après une première exposition dans l'EPM, diminue le pourcentage de temps passé et d'entrées dans les BO de l'EPM, signifiant que ce composé consolide la mémoire émotionnelle (Khodayar *et al.*, 2016).

Ces résultats soulignent donc l'importance de comprendre l'implication d'une région précise dans l'activité d'une molécule, puisque les effets d'un composé après administration par voie systémique peuvent s'avérer contraires lorsque ce composé est administré dans une région spécifique.

3. Le circuit CPF_m-NRD est un carrefour nécessaire mais non suffisant à l'activité anxiolytique rapide du RS 67333.

Après avoir déterminé l'une des structures qui pourrait être impliquée dans l'activité anxiolytique rapide liée à l'activation du récepteur 5-HT_4, nous avons essayé de décortiquer le circuit qui sous-tend cette activité. Une étude anatomique ayant cartographié les afférences présynaptiques des neurones sérotoninergiques et GABAergiques du NRD, grâce à l'utilisation d'un traceur trans-synaptique rétrograde basé sur le virus de la rage modifié, nous avons pu identifier qu'une majorité des neurones glutamatergiques du PrL se projettent préférentiellement sur les neurones sérotoninergiques du NRD, plutôt que sur les neurones GABAergiques (Weissbourd *et al.*, 2014). Cette connexion entre le CPF_m, plus précisément l'aire PrL, et le NRD a suscité un grand intérêt en tant que circuit potentiellement impliqué dans la modulation du stress et des comportements dépressifs. Par exemple, la stimulation par optogénétique des projections glutamatergiques du CPF_m sur le NRD réduit l'immobilité dans le FST et augmente la fréquence des coups de pattes chez le rat Long-Evans, sans affecter l'activité locomotrice non-spécifique dans l'OF (Warden *et al.*, 2012). De manière intéressante, si la stimulation du circuit cortex-raphé exerce une activité de type antidépresseur, la stimulation des corps cellulaires des neurones pyramidaux du CPF_m n'a aucun effet sur les paramètres mesurés dans le FST et dans l'OF, suggérant ainsi que c'est le circuit qui est impliqué dans cette réponse et non pas seulement le CPF_m (Warden *et al.*, 2012). Autre exemple chez le rat Sprague-Dawley, la réponse de type antidépresseur, obtenue dans le FST après une stimulation électrique profonde des neurones du CPF_{vm}, est complétement supprimée chez les rats dont le NRD et le NRM ont été déplétés en sérotonine à l'aide de 5,7-dihydroxytryptamine (Hamani *et al.*, 2010).

Ces données indiquent donc que le CPF_m exerce un contrôle sur l'activité neuronale du NRD et que les effets de type antidépresseur dont il est responsable dépendent de l'intégrité du système sérotoninergique prenant sa source dans le NRD. Cependant, il n'existe que peu de preuves qui impliquent les projections du CPF_m vers le NRD dans les comportements de type anxieux. Pour répondre à cette question, nous avons utilisé un virus exprimant un promoteur CaMKII pour cibler uniquement les neurones pyramidaux glutamatergiques et ainsi

évaluer le circuit neuronal nécessaire aux effets anxiolytiques rapides. Nous avons ainsi montré que la stimulation des terminaisons neuronales glutamatergiques du CPF_m exprimant ChR2, dans le NRD, induit un effet anxiolytique rapide qui se traduit par une augmentation du temps passé dans les BO de l'EPM (**Tableau 21**). Ce résultat confirme donc que tout comme pour l'activité de type antidépresseur, le circuit cortex-raphé est également impliqué dans les effets de type anxiolytique. Ces résultats sont confirmés par des études menées chez des animaux stressés en conditions aversives. Tout d'abord, chez la souris ayant subi un stress chronique de défaite sociale, l'activation chronique par optogénétique des cellules pyramidales du CPF_m augmente le temps passé dans les BO de l'EPM (Kumar *et al.*, 2013), alors que cette même stimulation n'a aucun effet sur le comportement anxieux chez des souris naïves (Covington *et al.*, 2010; Kumar *et al.*, 2013). Ensuite, la stimulation cérébrale profonde du CPF_{vm} de manière chronique chez des souris C57BL/6 mâle annule les déficits socio-affectifs prolongés induits par un stress chronique de défaite sociale, un effet corrélé à l'augmentation du nombre de cellules c-Fos positives dans le NRD et au rétablissement de l'excitabilité des neurones sérotoninergiques du NRD (Veerakumar *et al.*, 2014). Enfin, l'inhibition des terminaisons des neurones du CPF_m se projetant sur le NRD prévient la diminution de l'interaction sociale dans le SIT chez des souris socialement défaites (Challis *et al.*, 2014), laissant supposer que le circuit cortex-raphé dorsal est bien impliqué dans les comportements anxieux.

De plus en plus de preuves laissent sous-entendre que le contrôle du CPF_m sur le NRD pourrait avoir lieu *via* l'activation du récepteur 5-HT_4. D'une part, des injections bilatérales d'un virus permettant de surexprimer le récepteur 5-HT_4, soit dans le striatum, soit dans l'hippocampe des rats Sprague-Dawley, ne modifie pas l'activité électrique des neurones sérotoninergiques du NRD, alors qu'une surexpression du récepteur 5-HT_4 dans le CPF_m de ces animaux est la seule à induire une activité excitatrice sur les neurones du NRD (Lucas *et al.*, 2005). D'autre part, les souris mâles adultes, génétiquement modifiées pour ne pas exprimer le récepteur 5-HT_4 (5-HT_4R KO), présentent une réduction de l'activité spontanée des neurones sérotoninergiques du NRD d'environ 50%, comparées aux animaux *wild-type*, en plus d'une diminution des concentrations en 5-HT dans le NRD et le NRM (Conductier *et al.*, 2006). Pour finir, alors qu'un stress de contention augmente la concentration en 5-HT,

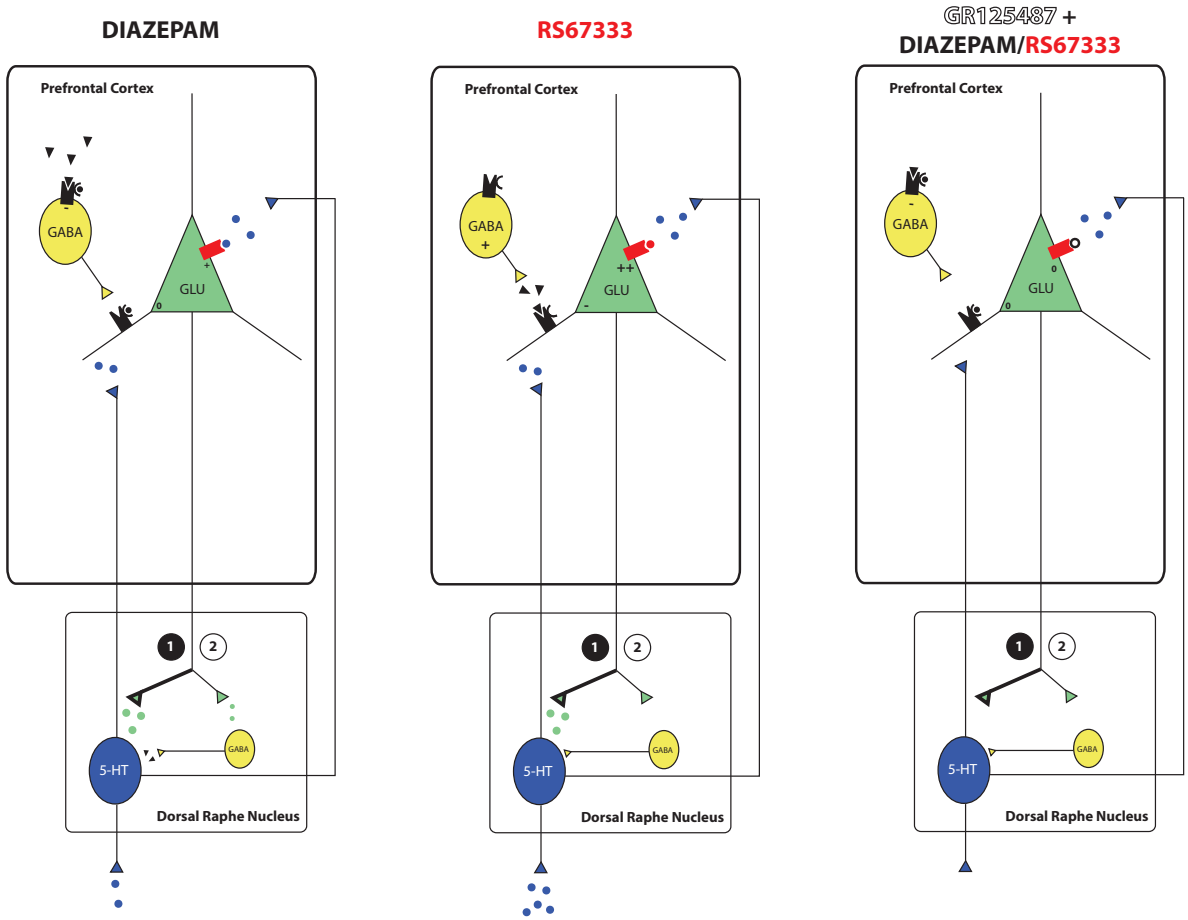
mesurée par microdialyse, dans le NRD des souris 129SvTer *wild-type*, il n'a aucun effet chez les animaux 5-HT_4R KO (Jean *et al.*, 2017). Néanmoins, la réexpression du gène du récepteur 5-HT_4 dans le cortex des souris 129SvTer 5-HT_4R KO, grâce à un herpès virus HSV-HT_4R, reproduit l'augmentation de 5-HT observée chez les animaux WT suite au stress (Jean *et al.*, 2017). Notre étude montre qu'une administration unique par voie systémique de RS 67333 augmente l'activité électrique des neurones sérotoninergiques du NRD chez la souris BALB/cJRj, suggérant que l'activité anxiolytique des agonistes du récepteur 5-HT_4 est dépendante de l'activation de cette population neuronale, en dépit du fait que le récepteur 5-HT_4 ne soit pas exprimé dans le NRD (Vilaro *et al.*, 2005). Nous avons ainsi confirmé les résultats précédemment obtenus chez le rat avec des administrations par voie systémique de RS 67333 ou de cisapride à différents moments (30 min, 3 jours et 21 jours) (Lucas & Debonnel, 2002; Lucas *et al.*, 2005). De manière intéressante, cette excitabilité des neurones sérotoninergiques du NRD, induite par une administration par voie systémique de RS 67333, est totalement prévenue par la lésion électrolytique du CPF_m chez le rat Sprague-Dawley (Moha ou Maati *et al.*, 2016), confirmant ainsi l'importance du CPF_m dans le contrôle du NRD.

Ces résultats sont supportés par le fait qu'une déplétion en 5-HT cérébrale par un prétraitement au *p*-CPA prévient le phénotype anxiolytique induit par l'activation du récepteur 5-HT_4 cortical, suite à l'administration unique de RS 67333 (1 µg) dans le CPF_m. Il est important de noter que le *p*-CPA administré seul n'affecte pas le comportement anxieux des animaux, une observation précédemment retrouvée dans les tests de performance cognitive ou les tests caractéristiques d'une activité de type antidépresseur (du Jardin *et al.*, 2016; Pham *et al.*, 2017). Plus surprenant, nous avons retrouvé que la déplétion en 5-HT cérébrale bloque également la réponse anxiolytique induite par une administration intracorticale de diazépam (3 µg). Ainsi, en dépit de cibles pharmacologiques différentes, les agonistes du récepteur 5-HT_4 et les BZD semblent partager une activité anxiolytique avec une efficacité similaire qui nécessite l'activation de la neurotransmission sérotoninergique et éventuellement le recrutement de circuits neuronaux communs (**Figure 36**). Pour autant et contrairement au RS 67333, le diazépam ne semble pas affecter directement le système sérotoninergique. En effet, une administration unique par voie intraveineuse de diazépam chez le rat Albino ne modifie pas l'activité électrique spontanée des neurones sérotoninergiques du NRD, une

conséquence qui pourrait toutefois être confondue par l'interaction de l'hydrate de chloral, l'anesthésique utilisé pour endormir les rats, avec les récepteurs GABAergiques (Gallager, 1978). De même, une lésion spécifique des neurones sérotoninergiques du NRD chez le rat Wistar n'altère pas la réponse anxiolytique du diazépam dans un test de punition liée à la prise alimentaire (Thiebot *et al.*, 1984). Toutefois, il a été rapporté que l'administration de diazépam diminue le métabolisme de la sérotonine. C'est le cas chez le rat Lister hooded, où une injection intrapéritonéale de diazépam (2,5 mg/kg) réduit significativement l'augmentation extracellulaire de 5-HT dans l'HPC_v, induite par une exposition à l'EPM (Wright *et al.*, 1992). C'est également le cas chez le rat Sprague-Dawley, où une injection de diazépam (20 mg/kg), 10 minutes après une injection de sérotonine radiomarquée (5-HT-C^{14}), augmente la rétention de 5-HT exogène (Chase *et al.*, 1970).

Il est donc certain que les systèmes sérotoninergique et GABAergique interagissent entre eux pour induire une réponse anxiolytique, bien qu'on ne connaisse pas précisément la nature de cette interaction, surtout que la vaste majorité des neurones sérotoninergiques expriment le récepteur $GABA_A$ (Olivier *et al.*, 2013). La **Figure 36** propose une explication hypothétique de l'implication du système sérotoninergique, et plus précisément du récepteur $5\text{-}HT_4$ dans les effets anxiolytiques du diazépam.

Figure 36. *Hypothèse d'un circuit partagé entre le diazépam et le RS 67333, malgré des cibles pharmacologiques différentes*



Le diazépam (●) se fixe sur son site (☾) situé sur le récepteur $GABA_A$ (▙) localisé sur les interneurones GABAergiques du CPF_m, potentialisant ainsi les effets du GABA. Le GABA, en se fixant à son tour sur le récepteur $GABA_A$, favorise l'ouverture du canal chlore, ce qui a pour conséquence d'hyperpolariser et donc d'inhiber l'interneurone GABAergique. Il s'en suit une levée d'inhibition du neurone pyramidal glutamatergique, qui est activé, entre autres, par la sérotonine (●) synthétisée de manière spontanée par le NRD. Les neurones pyramidaux du CPF_m se projetant majoritairement sur les neurones sérotoninergiques du NRD (1), activent ces neurones qui synthétisent alors de la sérotonine, mais dans une moindre mesure car nous pensons que le diazépam utilise également la voie indirecte (2) qui consiste à activer les interneurones GABAergiques du NRD, qui induisent une inhibition des neurones sérotoninergiques du NRD. Le RS 67333 se fixe sur le récepteur 5-HT_4 (▬), exclusivement exprimés par les neurones pyramidaux du CPF_m. En se fixant sur son récepteur, le RS 67333 (●) favorise la production d'AMPc dans le neurone pyramidal, ce qui a pour but d'augmenter la synthèse de glutamate (●) dans le NRD. Aux vues des résultats d'électrophysiologie, nous pensons que le RS 67333 utilise préférentiellement la voie d'activation directe (1), ce qui a pour conséquence d'augmenter la libération de sérotonine par le NRD dans le cerveau et dans le CPF_m. Le GR 125487 (○), en antagonisant le récepteur 5-HT_4, bloque les effets du RS 67333 mais aussi de la sérotonine synthétisée spontanément, diminuant ainsi l'activité des neurones pyramidaux du CPF_m. Dans le cas du diazépam, bien que l'inhibition des interneurones GABAergiques sur les neurones pyramidaux soit levée, le neurone pyramidal ne peut plus être activé par la stimulation du récepteur 5-HT_4, bloqué par le GR 125487. Mais dans le cas du diazépam, la diminution de l'activité des neurones pyramidaux, provoque une levée d'inhibition des neurones GABAergiques dans le NRD, sous le contrôle excitateur des neurones pyramidaux du CPF_m, ce qui pourrait expliquer que l'activité anxiolytique du diazépam dépende de la synthèse de sérotonine par le NRD et ne soit que partiellement bloquée par un antagoniste du récepteur 5-HT_4.

Pour finir, nous nous sommes assurés que la réponse comportementale de type anxiolytique, obtenue après injection intracorticale de RS 67333, était en accord avec l'idée que les neurones pyramidaux glutamatergiques du CPF_m modulent les effets anxiolytiques induits par le récepteur 5-HT_4 en jouant sur l'activité des neurones sérotoninergiques du NRD. Pour cela, nous avons optogénétiquement inhibés les terminaisons des neurones glutamatergiques du CPF_m dans le NRD, ce qui a eu pour conséquences de supprimer l'activité anxiolytique induite par une administration intracorticale de RS 67333 (1 µg) et de diazépam (1,5 µg) (**Tableau 21**), confirmant ainsi que le recrutement du circuit cortex-raphé est essentiel à la réponse de type anxiolytique rapide. Si ces résultats ne sont pas surprenant pour l'agoniste du récepteur 5-HT_4, ils le sont nettement plus pour le diazépam. L'étape suivante a été de définir si le recrutement du circuit cortex-raphé est nécessaire et/ou suffisant aux effets anxiolytiques rapides liés à l'activation du récepteur 5-HT_4. Puisque le récepteur 5-HT_4 est présent dans d'autres structures limbiques impliquées dans la régulation des troubles affectifs (Waeber *et al.*, 1994; Vilaro *et al.*, 2005), le cortex circuit-raphé pourrait ne pas être le seul à intervenir dans l'activité anxiolytique du RS 67333. Nous avons ainsi évalué les conséquences comportementales d'une inhibition par optogénétique des terminaisons des neurones pyramidaux du CPF_m dans le NRD, après une injection unique et par voie systémique de RS 67333 (1,5 mg/kg) et de diazépam (1,5 mg/kg) chez la souris BALB/cJRj exprimant ArchT. Nous avons trouvé que la réponse anxiolytique des deux molécules est significativement et partiellement atténuée après une inhibition des projections du CPF_m dans le NRD (**Tableau 21**), suggérant ainsi l'implication d'autres structures dans l'activité anxiolytique des BZD et des agonistes du récepteur 5-HT_4.

Ce dernier résultat n'est pas surprenant sachant que dans la littérature on retrouve d'autres sous-ensembles de circuits essentiels au comportement anxieux ou, à l'inverse, à une activité anxiolytique. En partant du principe que le CPF_m serait à la base de la physiopathologie des troubles anxieux, des études se sont intéressées aux rôles des projections de cette région sur d'autres structures également mises en cause dans les troubles anxieux. Par exemple, il a été démontré que la stimulation optogénétique des projections des neurones glutamatergiques de l'aire PrL dans la BLA exerce un effet anxiolytique dans l'EPM, sans prévenir le retrait social dans le SIT, induit par une infusion intracorticale de cholescystokinine-

8 (CCK-8), un agent connu pour induire un phénotype anxio-dépressif (Vialou *et al.*, 2014) (**Tableau 21**). A l'inverse, une stimulation des projections neuronales glutamatergiques de l'aire PrL dans le NAc n'a aucun effet anxiolytique dans l'EPM, mais prévient le retrait social induit par CCK-8 et augmente la préférence pour le sucrose, un comportement synonyme d'une diminution de l'anhédonie et donc d'un effet de type antidépresseur (Vialou *et al.*, 2014). Ces résultats, ainsi que nos données, suggèrent donc que l'activité anxiolytique pourrait être la conséquence directe d'une activation spécifique du CPF_m. Seulement, le CPF_m pourrait jouer le rôle d'un carrefour secondaire régulé par l'intermédiaire de structures telles que l'amygdale ou l'HPC_v. En effet, une inhibition par optogénétique de 40% des terminaisons neuronales glutamatergiques de l'HPC_v, dans le CPF_m, provoque une augmentation du temps passé dans les BO de l'EPM et diminue la latence pour se nourrir dans le NSF, chez les souris exprimant Arch (Padilla-Coreano *et al.*, 2016), un effet qui semblerait être corrélé avec une désynchronisation de la fréquence des ondes thêtas entre l'HPC_v et le CPF_m (**Tableau 21**). De manière intéressante, ces observations sont circuit-spécifiques et non pas dus à une diminution de l'excitabilité du CPF_m puisque l'inhibition bilatérale des terminaisons du thalamus dans le CPF_m n'a pas d'effet sur le comportement anxieux des animaux (Padilla-Coreano *et al.*, 2016). De même, la stimulation des projections glutamatergiques de la BLA vers le CPF_m produit des effets anxiogènes dans l'EPM et l'OF et réduit l'interaction sociale dans le SIT, alors qu'à l'inverse, l'inhibition de ce circuit facilite l'interaction sociale chez les souris exprimant NpHR (Felix-Ortiz *et al.*, 2016) (**Tableau 21**).

Évidemment, d'autres circuits sont responsables de la régulation des comportements anxieux, sans directement incriminer le CPF_m. Ainsi, l'activation optogénétique des projections des neurones pyramidaux de la BLA sur l'HPC_v promeut les comportements anxieux dans l'EPM et l'OF, alors qu'à l'inverse, une inhibition de ces projections augmente le temps passé dans les BO de l'EPM et dans le centre de l'OF (Felix-Ortiz *et al.*, 2013) (**Tableau 21**). La stimulation des projections de la BLA sur le BNST antérodorsal a un effet anxiolytique dans l'EPM et diminue la fréquence respiratoire des souris exprimant ChR2 (Kim *et al.*, 2013) (**Tableau 21**). Comme attendu, l'inhibition de ces projections produit l'effet inverse, à savoir que les souris exprimant NpHR évitent de manière équivoque les BO de l'EPM et le centre de l'OF, synonyme d'un phénotype anxieux, qui plus est associé à une augmentation de la

fréquence respiratoire (Kim *et al.*, 2013). Enfin, en utilisant la lignée de souris TpH2-ChR2-EYFP BAC, exprimant spécifiquement ChR2 dans les neurones sérotoninergiques du NRD et du NRM et dont l'expression est retrouvée dans les terminaisons au niveau du BNST antéro-dorsal et de la CeA, il a été mis en évidence qu'une stimulation des projections du NRD sur le BNST augmente le temps passé dans le centre de l'OF et dans les BO de l'EPM, sans affecter l'activité locomotrice totale, et réduit la latence pour se nourrir dans le NSF, sans affecter la consommation de nourriture dans l'environnement familier (Garcia-Garcia *et al.*, 2018) (**Tableau 21**). La stimulation des projections du NRD sur la CeA n'induit, quant à elle, aucune modification des paramètres mesurés dans les trois tests, bien qu'une diminution de l'expression des cellules c-Fos positives dans la CeA ait été détectée (Garcia-Garcia *et al.*, 2018). En utilisant une lignée murine Pet-Arch-GFP, qui exprime Arch de manière robuste dans les corps cellulaires et les terminaisons neuronales des neurones sérotoninergiques, respectivement dans le raphé et dans le BNST, cette étude a également montré que l'inhibition des projections du NRD sur le BNST augmente le phénotype anxieux des animaux dans l'EPM et l'OF (Garcia-Garcia *et al.*, 2018).

De manière intéressante, toutes ces structures expriment le récepteur 5-HT_4 mais, actuellement, seuls les effets d'une administration de RS 67333 dans la BLA, l'HPC ou le noyau basal de Meynert, sur la formation et la consolidation de la mémoire ont été évalués (Orsetti *et al.*, 2003; Chegini *et al.*, 2014; Nasehi *et al.*, 2015a; Nasehi *et al.*, 2015b).

Tableau 21. *Résumé des résultats comportementaux (issus de la littérature) obtenus après modulation par optogénétique des différents circuits impliqués dans l'anxiété.*

Corps cellulaires (virus)	Terminaisons neuronales (optrode)	Souche	Virus/lignée	Type de stimulation (laser ON)	Résultats	Références
CPF_m	NRD	souris BALB/cJRj (7 sem, ♂)	AAV5-CaMKIIa-ChR2(H134R)-eYFP AAV5-CaMKII-ArchT-GFP	stimulation inhibition	EPM, OF : anxiolytique EPM, OF : Ø (*versus laser OFF*) EPM, OF : prévient effets anxiolytiques du DZ et du RS	Faye et al., soumis
CPF_m (PrL) CPF_m (PrL)	BLA NAc	souris C57BL/6J (8 sem, ♂)	AAV-CaMKII-ChR2-eYFP	stimulation stimulation	EPM : anxiolytique EPM : Ø	(Vialou *et al.*, 2014)
HPC_V	CPF_m	souris 129SvevTac (8-12 sem, ♂)	AAV5-CaMKIIa-eArch3.0-eYFP	inhibition	EPM, NSF : anxiolytique	(Padilla-Coreano *et al.*, 2016)
BLA	CPF_m	souris C57BL/6 (6-7 sem, ♂)	AAV5-CaMKIIa-ChR2(H134R)-eYFP AAV5-CaMKIIa-eNpHR3.0-eYFP	stimulation inhibition	EPM, OF, SIT : anxiogène EPM, OF : anxiolytique	(Felix-Ortiz *et al.*, 2016)
BLA	HPC_v	souris C57BL/6J (5-6 sem, ♂)	AAV5-CaMKIIa-ChR2(H134R)-eYFP AAV5-CaMKIIa-eNpHR3.0-eYFP	stimulation inhibition	EPM, OF : anxiogène EPM, OF : anxiolytique	(Felix-Ortiz *et al.*, 2013)
BLA	BNST	souris C57BL/6 (6-8 sem, ♂)	AAV:CaMKIIα::hChR2(H134R)-eYFP AAV:CaMKIIα::eNpHR3.0-eYFP	stimulation inhibition	EPM : anxiolytique Fréquence respiratoire : ↓ EPM : anxiogène fréquence respiratoire : ↑	(Kim *et al.*, 2013)
NRD	BNST	C57BL/6 129SvEv	lignée TpH2-ChR2-EYFP BAC lignée Pet-Arch-GFP	stimulation inhibition	EPM, OF, NSF : anxiolytique EPM, OF : anxiogène	(Garcia-Garcia *et al.*, 2018)
NRD	CeA	C57BL/6	lignée TpH2-ChR2-EYFP BAC	stimulation	EPM, OF, NSF : Ø	

Abréviations *: Ø : pas d'effet ; BLA : amygdale basolatérale ; BNST : noyau du lit de la strie terminale ; CeA : amygdale centrale ; CPF_m : cortex prefrontal médian ; EPM : elevated plus maze ; HPC_v : hippocampe ventral ; NAc : noyau accumbens ; NRD : noyau du raphé dorsal ; NSF : novelty suppressed feeding ; OF : open field.*

NB: l'illumination a toujours lieu au niveau des terminaisons neuronales

4. Mise en place d'un modèle murin pour l'étude des effets prophylactiques de molécules

Après avoir confirmé les effets anxiolytiques du RS 67333, la troisième et dernière partie de ce travail avait pour but de valider un modèle murin de résilience dans lequel il serait possible de tester le potentiel prophylactique du RS 67333, à l'image de l'étude réalisée par nos collaborateurs sur les effets prophylactiques de la kétamine (**Article 3**). Le modèle a été pensé à l'inverse des protocoles de *screening* couramment utilisés, dans lesquels un stress chronique est d'abord appliqué à l'animal pour induire un phénotype anxieux et/ou dépressif, avant d'administrer une molécule dans le but d'évaluer son potentiel anxiolytique et/ou antidépresseur, par réversion du phénotype induit. Dans notre étude publiée dans *Biological Psychiatry*, les traitements de kétamine (10, 30 ou 90 mg/kg, i.p.) ou de fluoxétine (18 mg/kg/j ; 3 semaines, *per os*) ont été administrés à dose unique pour la kétamine ou de manière chronique pour la fluoxétine, avant d'interrompre le traitement puis de soumettre l'animal à un stress chronique de défaite sociale (2 semaines) ou à un traitement chronique de corticostérone (3 semaines). A la fin de la période de stress, les tests comportementaux prédictifs d'une activité anxiolytique et antidépresseur ont été réalisés.

Des expériences réalisées à Columbia University, nous avons observé qu'une injection unique de kétamine (30 mg/kg), administrée avant le stress de défaite sociale chez la souris 129S6/SvEv, prévient le développement d'un comportement de désespoir dans le FST, qui se concrétise par une augmentation de l'immobilité, et prévient l'évitement social dans le SIT, qui se manifeste par une diminution de l'interaction sociale. Nous n'avons ainsi démontré que la kétamine protège contre le comportement dépressif induit par un stress, mais nous n'avons cependant pas retrouvé d'effet prophylactique de ce composé contre le développement d'un phénotype anxieux (**Tableau 22**). Ces observations sont consistantes avec les résultats d'une étude réalisée au laboratoire, où il a été rapporté que la kétamine induit des effets de type antidépresseur chez la souris BALB/CJRj, dans le FST et dans le splash test, mais ne modifie pas les paramètres mesurés dans les tests prédictifs d'un phénotype anxieux (EPM, OF, NSF) (Pham *et al.*, 2017). Les propriétés prophylactiques de la kétamine ont ensuite été confirmées dans un second modèle de stress d'impuissance acquise, dans lequel le prétraitement par kétamine diminue le comportement d'impuissance, se traduisant par une diminution de la latence à éviter les chocs électriques (**Tableau 22**).

Au laboratoire, nous avons confirmé les effets prophylactiques de la kétamine dans un troisième modèle de stress, le modèle CORT. Nous avons trouvé qu'une administration unique de kétamine (90 mg/kg) chez la souris C57BL/6NTac mâle prévient l'augmentation de l'immobilité dans le FST, la diminution du temps de toilettage dans le splash test et la réduction de la latence pour se nourrir dans le NSF, des conséquences néfastes induites après un traitement chronique par corticostérone (**Tableau 22**). L'efficacité de la kétamine à une dose plus élevée que celle administrée dans les deux précédents modèles (90 mg/kg *versus* 30 mg/kg) s'explique probablement par un métabolisme différent entre les deux souches de souris utilisées (C57BL/6NTac *versus* 129S6/SvEv). Lorsque la kétamine est administrée à la suite d'un stress, que ce soit après un stress de défaite sociale ou un traitement chronique par corticostérone, nous n'avons pas observé d'amélioration significative des paramètres mesurés dans le FST, le TST, l'EPM, le splash test ou encore le NSF (**Tableau 22**). Ceci suggère donc que les effets antidépresseurs de la kétamine sont plus efficaces dans les pathologies induites par le stress, lorsque celle-ci est administrée avant l'exposition au stress.

La fluoxétine a été utilisée dans cette étude, comme molécule de référence traditionnellement utilisée pour traiter les troubles de l'humeur. Les effets curatifs de la fluoxétine sont désormais bien connus (David *et al.*, 2009; Rainer *et al.*, 2012; Mendez-David *et al.*, 2014), mais aucune étude n'a réellement évalué les propriétés prophylactiques de la fluoxétine. Dans notre étude, nous avons constaté qu'une administration chronique de fluoxétine pendant 3 semaines dans l'eau de boisson, ne protège pas systématiquement, ni de manière robuste, contre le développement d'un phénotype dépressif induit par un stress (**Tableau 22**). En effet, dans le modèle de défaite sociale, la fluoxétine n'améliore pas le temps d'immobilité dans le FST, alors que dans le modèle CORT, la fluoxétine prévient l'augmentation de l'immobilité induite par la corticostérone. Contrairement à notre étude, une administration de fluoxétine (7,5 mg/kg/j ; 3 semaines) chez le rat Lewis, une souche hautement sensible au stress, de manière préalable à l'application d'un stress de défaite sociale protège contre l'induction d'un phénotype anxieux dans l'EPM (Berton *et al.*, 1999). Toutefois, ces résultats doivent être interprétés avec précaution puisqu'aucune comparaison n'a été faite entre les rats stressés ayant reçu la solution véhicule et les rats stressés ayant reçu la fluoxétine. De manière intéressante, la fluoxétine a montré en clinique, des effets profitables dans la prévention des récidives liées aux EDC puisque dans une étude randomisée et contrôlée menée

en double aveugle, les patients atteints d'EDC unipolaire et traités par fluoxétine (20 mg/j) ont présenté des périodes de rémission plus longues que les patients assignés au placébo (Montgomery *et al.*, 1988; Gilaberte *et al.*, 2001).

5. L'administration chronique par voie systémique de RS67333 prévient l'apparition du phénotype anxio-dépressif induit par un traitement chronique par corticostérone.

Pour tester le potentiel protecteur lié à la stimulation du récepteur 5-HT_4, le RS 67333 (1,5 mg/kg ; mini-pompes) a été administré de manière chronique et par voie systémique pendant 3 semaines, avant d'interrompre le traitement puis de soumettre les animaux à un traitement chronique de corticostérone (3 semaines). Tout comme la kétamine, nous avons montré que le RS 67333 possède un pouvoir protecteur, mais à l'instar de la kétamine, le RS 67333 est capable de protéger contre le développement d'un phénotype dépressif, mais aussi anxieux. En effet, nous avons observé que le RS 67333, administré pendant 3 semaines, par diffusion osmotique continue grâce des mini-pompes implantées en sous-cutanée chez la souris C57BL/6NTac, augmente le temps passé dans les BO de l'EPM et le temps de toilettage dans le splash test, et diminue la latence pour se nourrir dans le NSF, comparativement aux animaux qui n'ont reçu aucun traitement avant la corticostérone (**Tableau 22**).

Tableau 22. *Résumé des résultats comportementaux suite à l'administration des traitements avant et après l'exposition à un stress*

Traitements	FST	SIT	ST	EPM	NSF
Modèle de défaite sociale (souris 129S6/SvEv)					
Fluoxétine avant SD	Ø	Ø	-	Ø	Ø
Kétamine (30 mg/kg) avant SD	✓	✓	-	Ø	Ø
Kétamine après SD	Ø	-	-	Ø	-
Modèle CORT (souris C57BL/6NTac)					
Fluoxétine avant CORT	✓	-	Ø	Ø	Ø
Kétamine (90 mg/kg) avant CORT	✓	-	✓	Ø	✓
RS 67333 (1,5 mg/kg) avant CORT	-	-	✓	✓	✓
Kétamine après CORT	-	-	Ø	Ø	Ø

Abréviations *: ✓ : protection contre les effets néfastes du stress ; Ø : pas d'effet prophylactique ; EPM : elevated plus maze ; FST : forced swimming test ; NSF : novelty suppressed feeding ; OF : open field; SIT : social interaction test; ST : splash test.*

En résumé, nos résultats démontrent que la kétamine et le RS 67333 possèdent des effets prophylactiques durables dans le temps, capables d'induire une résilience au long-terme en réponse à un stress chronique, permettant ainsi de prévenir le développement de phénotypes anxieux et dépressifs. Dans les deux cas, ces résultats sont encourageants mais assez surprenants, quand on sait que la demi-vie de la kétamine est comprise entre 2 et 2,5 heures et que celle du RS 67333 se situe entre 1 à 3 heures (Hotte *et al.*, 2012), bien que pour ce dernier composé, il s'agisse d'une estimation basée sur les résultats des études comportementales, car aucun dosage n'a été réalisé chez l'animal. Ces observations sont d'autant plus étonnantes pour le RS 67333, puisque le récepteur 5-HT_4 est connu pour se désensibiliser très rapidement après exposition à un agoniste (Ansanay *et al.*, 1992).

6. La stimulation aiguë, par voie systémique, du récepteur 5-HT$_4$ est responsable d'effets qui perdurent dans le temps.

Pour confirmer les effets au long-terme du RS 67333, nous avons réalisé une batterie de tests comportementaux sur plusieurs jours, à raison d'un test par jour, à partir d'une unique dose de RS 67333 (1,5 mg/kg) administrée par voie systémique. À J0, jour de l'administration de RS 67333 (1,5 mg/kg), les animaux ont été soumis au splash test, 45 minutes après l'injection. Sans surprise, nous avons retrouvé une augmentation de la durée de toilettage. Les jours suivants, les animaux ont été successivement testés dans l'EPM à J2, puis dans l'OF à J3 puis dans le NSF à J4, sans jamais recevoir de dose supplémentaire de RS 67333. Bien que nous n'ayons pas retrouvé d'effet significatif dans l'EPM le lendemain de l'injection ($p = 0,1006$), le RS 67333 induit 2 et 3 jours après l'administration respectivement, une augmentation significative du temps passé dans le centre de l'OF et une réduction significative de la latence pour se nourrir dans le NSF. Si après une administration unique, le RS 67333 est capable d'induire des effets à moyen-terme, il n'est donc plus si surprenant d'obtenir une résilience au stress après un traitement chronique de 3 semaines par RS 67333.

Il est cependant à noter que ces résultats sont des résultats préliminaires et devront bien sûr être confirmés par une approche biologique et cellulaire, comme par exemple l'étude de la neurogenèse hippocampique. En effet, notre laboratoire a montré que les effets anxiolytiques et antidépresseurs rapides à long-terme du RS 67333 étaient médiés par des mécanismes à la fois neurogenèse-indépendants, notamment dans l'OF, l'EPM, le splash test mais aussi neurogenèse-dépendants, en particulier dans le NSF (Mendez-David *et al.*, 2014). Par ailleurs, une étude très récente a démontré que l'activité du gyrus denté est nécessaire et suffisante pour induire une résilience au stress (Anacker *et al.*, 2018). En effet, l'inactivation DREADD-dépendante des nouveaux neurones adultes induit une augmentation de l'excitabilité du GD$_v$ et favorise la susceptibilité au stress chez les souris C57BL/6J génétiquement modifiées, alors que l'excitation DREADD-dépendante de cette même population confère une résilience au stress, en restaurant l'activité du GD$_v$. Ces résultats suggèrent donc que l'activité du GD$_v$ pourrait être un facteur clé dans la détermination des niveaux individuels de vulnérabilité au stress et aux troubles psychiatriques associés.

La compréhension des mécanismes sous-jacents de la résilience au stress, bien qu'encore à ses balbutiements, fait preuve d'un intérêt croissant depuis quelques années. À notre connaissance, le RS 67333, avec la kétamine, est l'une des premières molécules dont les propriétés prophylactiques ont été mises en évidence dans le domaine de la psychiatrie. Néanmoins, de nombreux travaux, mettant en jeu une série de mécanismes impliqués dans la résilience au stress, ont proposé des pistes de développement pour de nouvelles stratégies thérapeutiques capables d'augmenter la résilience. Par exemple, la résilience au stress pourrait être obtenue en modulant l'activité du système dopaminergique mésolimbique et plus particulièrement l'activité des neurones dopaminergiques de l'aire tegmentale ventrale (ATV). Il a été rapporté que les souris C57BL/6J mâles adultes, susceptibles à un stress de défaite sociale, présentent une fréquence de décharge des neurones dopaminergiques de l'ATV plus élevée que les souris résilientes au stress (Krishnan *et al.*, 2007; Cao *et al.*, 2010). Ainsi, réduire l'activité électrique des neurones dopaminergiques de l'ATV, en surexprimant un canal potassique voltage-dépendant dans ces neurones, est suffisant à convertir la susceptibilité des souris en un phénotype résilient (Krishnan *et al.*, 2007). La résilience au stress pourrait aussi être obtenue en modulant l'activité noradrénergique, puisque les souris C57BL/6 résilientes à un stress de défaite sociale affichent une augmentation de la concentration en NA dans l'ATV, mais pas dans les autres structures limbiques, comparées aux animaux susceptibles (Isingrini *et al.*, 2016). En conséquence, stimuler chroniquement les terminaisons des neurones noradrénergiques du locus cœruleus se projetant sur les neurones dopaminergiques de l'ATV suffit à transformer le phénotype susceptible en un phénotype résilient au stress de défaite sociale (Isingrini *et al.*, 2016). Enfin, la résilience au stress pourrait également être acquise en modulant l'activité glutamatergique, notamment *via* le récepteur AMPA, puisque les souris, résilientes à un stress chronique de défaite sociale de 10 jours, montrent une expression accrue de l'ARNm de la sous-unité GluR2 par rapport aux souris contrôles alors, qu'à l'inverse, les souris susceptibles au stress présentent une diminution des transcrits de GluR2 dans le NAc (Vialou *et al.*, 2010). De ce fait, surexprimer ΔFosB, un facteur de transcription ciblant le récepteur AMPA contenant GluR2, spécifiquement dans le NAc, prévient le retrait social des animaux, induit par un stress de défaite sociale, alors qu'à l'inverse, la répression de ΔFosB favorise la susceptibilité au stress (Vialou *et al.*, 2010).

La liste des modulations possibles, fournie ici, pour induire une résilience au stress chez l'animal n'est bien sûr pas exhaustive. Il est possible d'influencer la résilience en agissant sur d'autres systèmes de neurotransmission, sur la neurogenèse hippocampique ou encore sur la réactivité de l'axe hypothalamo-hypophyso-surrénalien (**Article 1**).

Conclusion & Perspectives

Ce travail a mis en évidence le rôle des projections des neurones glutamatergiques du cortex préfrontal médian sur le noyau du raphé dorsal, dans l'activité du type anxiolytique rapide liée à l'activation du récepteur 5-HT_4. Bien que de nombreuses autres structures expriment le récepteur 5-HT_4, il semblerait que le circuit cortex-raphé soit un carrefour nécessaire mais pas suffisant à l'activité anxiolytique rapide du RS 67333, et plus surprenant encore, à celle du diazépam. Cette observation suggère que les systèmes sérotoninergique et GABAergique interagissent étroitement dans les troubles anxieux, bien que les données actuellement disponibles sur ce sujet soient pour le moins contradictoires (Olivier *et al.*, 2013). Des questions restent néanmoins en suspens concernant le rôle de l'HPC_v dans l'activité du RS 67333. L'activation du récepteur 5-HT_4 hippocampique suffit-elle à induire des effets anxiolytiques rapides à elle seule, ou bien ces effets passent-ils par le recrutement du circuit hippocampe-cortex-raphé ? Pour répondre à cette question, il serait intéressant d'inhiber, par optogénétique, les projections glutamatergiques du CPF_m, consécutivement à une injection intra-hippocampique de RS 67333 puis d'évaluer le comportement des souris BALB/cJRj dans des tests prédictif d'une activité anxiolytique.

Dans l'ensemble, notre étude révèle que recruter le circuit cortex-raphé en stimulant le récepteur 5-HT_4 localisé dans le CPF_m, pourrait représenter une approche thérapeutique innovante et rapide pour traiter les troubles anxieux. De ce fait, le RS 67333 pourrait être un bon candidat médicament pour le traitement des troubles anxieux en clinique, s'il n'était pas limité par ses effets extra-cérébraux, notamment dans le cœur et le système digestif. Cependant, une nouvelle molécule, le donécopride, laisse entrevoir une lueur d'espoir en ce qui concerne le développement clinique des agonistes du récepteur 5-HT_4 (Lecoutey *et al.*, 2014). En effet, cette molécule, analogue structural du RS 67333, a fait ses preuves en préclinique, en améliorant les troubles cognitifs liés à la Maladie d'Alzheimer. En plus de son

activité pro-cognitive induite par l'activation du récepteur 5-HT_4, le donécopride possède une activité anticholinestérase, cible thérapeutique de la majorité des traitements disponibles dans la Maladie d'Alzheimer. Le donécopride combine ainsi l'activité du RS 67333 et du donépezil, un inhibiteur de l'acétylcholinestérase utilisé dans le traitement de la Maladie d'Alzheimer, sans pour autant présenter les effets indésirables liés à l'activation périphérique du récepteur 5-HT_4, en particulier au niveau des canaux hERG (de l'anglais *human Ether-à-go-go Related Gene*), pour lesquels il ne possède pas d'affinité significative (Lecoutey *et al.*, 2014).

De plus, une étude récente, dans laquelle des modifications structurelles apportées au RS 67333 ont permis d'étendre son affinité biologique au récepteur 5-HT_6, a mis en évidence qu'il était désormais possible d'obtenir de nouveaux ligands du récepteur 5-HT_4 prometteurs dans la maladie d'Alzheimer (Yahiaoui *et al.*, 2016), en combinant des profils d'action divers (agoniste /antagoniste). En se basant sur cette étude, il serait intéressant de développer des molécules capables d'allier une activité agoniste du récepteur 5-HT_4 avec une activité inhibitrice de la recapture de la sérotonine, afin de potentialiser les effets anxiolytiques et antidépresseurs des deux classes pharmacologiques et surtout d'obtenir une réponse thérapeutique rapide.

Des études ont montré qu'il n'existe pas de consensus strict entre la rémission clinique, définie par le fait de ne plus remplir les critères diagnostiques d'une pathologie comme le TAG ou l'EDC, et la rémission fonctionnelle, définie par le retour au statut professionnel et de vie quotidienne antérieur (Spadone, 2008). La rémission fonctionnelle survient de manière beaucoup plus tardive, avec un délai pour l'atteindre d'environ 2 à 3 fois plus long que celui nécessaire à l'obtention de la rémission clinique. Dans notre étude, les résultats anxiolytiques bénéfiques et prophylactiques, obtenus avec le RS 67333, s'apparenteraient plus à une rémission clinique que fonctionnelle. Cependant, le RS 67333 possède l'avantage de soulager au long-terme, à la fois les dysfonctionnements affectifs (anxiété, isolement social) et les anomalies cognitives (déficit d'apprentissage et de mémoire), des symptômes quasi systématiquement associés aux EDC. De par son activité multifactorielle, le RS 67333 pourrait ainsi faciliter et accélérer la rémission fonctionnelle, mais à l'heure actuelle, aucune étude préclinique ne s'est penchée sur cette hypothèse. C'est pourquoi, il serait intéressant de

poursuivre cette étude avec un protocole qui permettrait d'évaluer les capacités du RS 67333 à prévenir les rechutes et ainsi favoriser la rémission fonctionnelle. Le protocole consisterait à induire un phénotype anxio-dépressif chez les souris C57BL/6JRj, par l'administration chronique de corticostérone. A la fin de cette période, les animaux subiraient une première batterie de tests comportementaux, puis un traitement chronique de fluoxétine ou de RS 67333 de plusieurs semaines serait ensuite instauré, toujours sous traitement à la corticostérone. De nouveau, à la fin de la période de traitement par fluoxétine ou RS 67333, les animaux seraient soumis à une deuxième batterie de tests comportementaux pour évaluer la réponse thérapeutique, et donc la rémission clinique. Pour finir, les traitements par fluoxétine et RS 67333 seraient arrêtés et les animaux continueraient d'être traités par corticostérone pendant encore plusieurs semaines. Une troisième batterie de tests comportementaux serait finalement réalisée pour estimer le pourcentage d'animaux résilients ou en rechute

BIBLIOGRAPHIE

A

Airan, R.D., Thompson, K.R., Fenno, L.E., Bernstein, H. & Deisseroth, K. (2009) Temporally precise in vivo control of intracellular signalling. *Nature*, 458, 1025-1029.

Akbarian, S., Huntsman, M.M., Kim, J.J., Tafazzoli, A., Potkin, S.G., Bunney, W.E., Jr. & Jones, E.G. (1995) GABAA receptor subunit gene expression in human prefrontal cortex: comparison of schizophrenics and controls. *Cereb Cortex*, 5, 550-560.

Allgulander, C., Nutt, D., Detke, M., Erickson, J., Spann, M., Walker, D., Ball, S. & Russell, J. (2008) A non-inferiority comparison of duloxetine and venlafaxine in the treatment of adult patients with generalized anxiety disorder. *J Psychopharmacol*, 22, 417-425.

Altamura, A.C., Montresor, C., Salvadori, D. & Mundo, E. (2004) Does comorbid subthreshold anxiety affect clinical presentation and treatment response in depression? A preliminary 12-month naturalistic study. *Int J Neuropsychopharmacol*, 7, 481-487.

Anacker, C., Luna, V.M., Stevens, G.S., Millette, A., Shores, R., Jimenez, J.C., Chen, B. & Hen, R. (2018) Hippocampal neurogenesis confers stress resilience by inhibiting the ventral dentate gyrus. *Nature*, 559, 98-102.

Andrews, N., Hogg, S., Gonzalez, L.E. & File, S.E. (1994) 5-HT1A receptors in the median raphe nucleus and dorsal hippocampus may mediate anxiolytic and anxiogenic behaviours respectively. *Eur J Pharmacol*, 264, 259-264.

Ansanay, H., Sebben, M., Bockaert, J. & Dumuis, A. (1992) Characterization of homologous 5-hydroxytryptamine4 receptor desensitization in colliculi neurons. *Mol Pharmacol*, 42, 808-816.

Aron, C., Simon, P., Larousse, C. & Boissier, J.R. (1971) Evaluation of a rapid technique for detecting minor tranquilizers. *Neuropharmacology*, 10, 459-469.

Association, A.P. (2013) *Diagnostic and statistical manual of mental disorders*. Author Washington, DC.

Aulich, D. (1976) Escape versus exploratory activity: An interpretation of rats' behaviour in the open field and a light-dark preference test. *Behav Processes*, 1, 153-164.

B

Baldwin, D.S.L., A. T. V. (2009) The influence of comorbid anxiety disorders on outcome in major depressive disorder. *MEDICOGRAPHIA*, 31, 126-131.

Baldwin, S.A., Imel, Z.E. & Atkins, D.C. (2012) The influence of therapist variance on the dependability of therapists' alliance scores: a brief comment on "The dependability of alliance assessments: the alliance-outcome correlation is larger than you think" (Crits-Christoph et al., 2011). *J Consult Clin Psychol*, 80, 947-951.

Balon, R. (2007) Rating scales for anxiety/anxiety disorders. *Curr Psychiatry Rep*, 9, 271-277.

Bandelow, B. & Michaelis, S. (2015) Epidemiology of anxiety disorders in the 21st century. *Dialogues Clin Neurosci*, 17, 327-335.

Bandelow, B., Stein, D.J., Dolberg, O.T., Andersen, H.F. & Baldwin, D.S. (2007) Improvement of quality of life in panic disorder with escitalopram, citalopram, or placebo. *Pharmacopsychiatry*, 40, 152-156.

Bang-Andersen, B., Ruhland, T., Jorgensen, M., Smith, G., Frederiksen, K., Jensen, K.G., Zhong, H., Nielsen, S.M., Hogg, S., Mork, A. & Stensbol, T.B. (2011) Discovery of 1-[2-(2,4-dimethylphenylsulfanyl)phenyl]piperazine (Lu AA21004): a novel multimodal compound for the treatment of major depressive disorder. *J Med Chem*, 54, 3206-3221.

Bannerman, D.M., Deacon, R.M., Offen, S., Friswell, J., Grubb, M. & Rawlins, J.N. (2002) Double dissociation of function within the hippocampus: spatial memory and hyponeophagia. *Behav Neurosci*, 116, 884-901.

Bannerman, D.M., Grubb, M., Deacon, R.M., Yee, B.K., Feldon, J. & Rawlins, J.N. (2003) Ventral hippocampal lesions affect anxiety but not spatial learning. *Behav Brain Res*, 139, 197-213.

Bannerman, D.M., Rawlins, J.N., McHugh, S.B., Deacon, R.M., Yee, B.K., Bast, T., Zhang, W.N., Pothuizen, H.H. & Feldon, J. (2004) Regional dissociations within the hippocampus--memory and anxiety. *Neurosci Biobehav Rev*, 28, 273-283.

Beaulieu, J.M., Zhang, X., Rodriguiz, R.M., Sotnikova, T.D., Cools, M.J., Wetsel, W.C., Gainetdinov, R.R. & Caron, M.G. (2008) Role of GSK3 beta in behavioral abnormalities induced by serotonin deficiency. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 105, 1333-1338.

Belzung, C. & Lemoine, M. (2011) Criteria of validity for animal models of psychiatric disorders: focus on anxiety disorders and depression. *Biol Mood Anxiety Disord*, 1, 9.

Benton, D. & Nastiti, K. (1988) The influence of psychotropic drugs on the ultrasonic calling of mouse pups. *Psychopharmacology (Berl)*, 95, 99-102.

Berton, O., Durand, M., Aguerre, S., Mormede, P. & Chaouloff, F. (1999) Behavioral, neuroendocrine and serotonergic consequences of single social defeat and repeated fluoxetine pretreatment in the Lewis rat strain. *Neuroscience*, 92, 327-341.

Bewernick, B.H., Hurlemann, R., Matusch, A., Kayser, S., Grubert, C., Hadrysiewicz, B., Axmacher, N., Lemke, M., Cooper-Mahkorn, D., Cohen, M.X., Brockmann, H., Lenartz, D., Sturm, V. & Schlaepfer, T.E. (2010) Nucleus accumbens deep brain stimulation decreases ratings of depression and anxiety in treatment-resistant depression. *Biol Psychiatry*, 67, 110-116.

Biggio, G., Concas, A., Serra, M., Salis, M., Corda, M.G., Nurchi, V., Crisponi, C. & Gessa, G.L. (1984) Stress and beta-carbolines decrease the density of low affinity GABA binding sites; an effect reversed by diazepam. *Brain Res*, 305, 13-18.

Bisaga, A., Katz, J.L., Antonini, A., Wright, C.E., Margouleff, C., Gorman, J.M. & Eidelberg, D. (1998) Cerebral glucose metabolism in women with panic disorder. *Am J Psychiatry*, 155, 1178-1183.

Blair, K., Shaywitz, J., Smith, B.W., Rhodes, R., Geraci, M., Jones, M., McCaffrey, D., Vythilingam, M., Finger, E., Mondillo, K., Jacobs, M., Charney, D.S., Blair, R.J., Drevets, W.C. & Pine, D.S. (2008) Response to emotional expressions in generalized social phobia and generalized anxiety disorder: evidence for separate disorders. *Am J Psychiatry*, 165, 1193-1202.

Bloom, F.E. & Iversen, L.L. (1971) Localizing 3H-GABA in nerve terminals of rat cerebral cortex by electron microscopic autoradiography. *Nature*, 229, 628-630.

Bockaert, J., Claeysen, S., Compan, V. & Dumuis, A. (2004) 5-HT4 receptors. *Curr Drug Targets CNS Neurol Disord*, 3, 39-51.

Bodnoff, S.R., Suranyi-Cadotte, B., Aitken, D.H., Quirion, R. & Meaney, M.J. (1988) The effects of chronic antidepressant treatment in an animal model of anxiety. *Psychopharmacology (Berl)*, 95, 298-302.

Booij, L., Turecki, G., Leyton, M., Gravel, P., Lopez De Lara, C., Diksic, M. & Benkelfat, C. (2012) Tryptophan hydroxylase(2) gene polymorphisms predict brain serotonin synthesis in the orbitofrontal cortex in humans. *Mol Psychiatry*, 17, 809-817.

Boshuisen, M.L., Ter Horst, G.J., Paans, A.M., Reinders, A.A. & den Boer, J.A. (2002) rCBF differences between panic disorder patients and control subjects during anticipatory anxiety and rest. *Biol Psychiatry*, 52, 126-135.

Botta, P., Demmou, L., Kasugai, Y., Markovic, M., Xu, C., Fadok, J.P., Lu, T., Poe, M.M., Xu, L., Cook, J.M., Rudolph, U., Sah, P., Ferraguti, F. & Luthi, A. (2015) Regulating anxiety with extrasynaptic inhibition. *Nat Neurosci*, 18, 1493-1500.

Boyden, E.S., Zhang, F., Bamberg, E., Nagel, G. & Deisseroth, K. (2005) Millisecond-timescale, genetically targeted optical control of neural activity. *Nat Neurosci*, 8, 1263-1268.

Brachman, R.A., McGowan, J.C., Perusini, J.N., Lim, S.C., Pham, T.H., Faye, C., Gardier, A.M., Mendez-David, I., David, D.J., Hen, R. & Denny, C.A. (2016) Ketamine as a Prophylactic Against Stress-Induced Depressive-like Behavior. *Biol Psychiatry*, 79, 776-786.

Brewerton, T.D.L., R.B.; Johnson, M.; Ballenger, J.C.; Fossey, M.D.; Zealberg, J.J.; Roberts J.E. (1995) CSF serotonin: Diagnostic and seasonal differences. *Biological Psychiatry*, 37, 655.

Britton, J.C., Gold, A.L., Deckersbach, T. & Rauch, S.L. (2009) Functional MRI study of specific animal phobia using an event-related emotional counting stroop paradigm. *Depress Anxiety*, 26, 796-805.

Brown, C., Schulberg, H.C., Madonia, M.J., Shear, M.K. & Houck, P.R. (1996a) Treatment outcomes for primary care patients with major depression and lifetime anxiety disorders. *Am J Psychiatry*, 153, 1293-1300.

Brown, C., Schulberg, H.C. & Shear, M.K. (1996b) Phenomenology and severity of major depression and comorbid lifetime anxiety disorders in primary medical care practice. *Anxiety*, 2, 210-218.

Bruhl, A.B., Delsignore, A., Komossa, K. & Weidt, S. (2014) Neuroimaging in social anxiety disorder-a meta-analytic review resulting in a new neurofunctional model. *Neurosci Biobehav Rev*, 47, 260-280.

Buchen, L. (2010) Neuroscience: Illuminating the brain. *Nature*, 465, 26-28.

Bueno, C.H., Zangrossi, H., Jr. & Viana, M.B. (2005) The inactivation of the basolateral nucleus of the rat amygdala has an anxiolytic effect in the elevated T-maze and light/dark transition tests. *Braz J Med Biol Res*, 38, 1697-1701.

Buff, C., Brinkmann, L., Bruchmann, M., Becker, M.P.I., Tupak, S., Herrmann, M.J. & Straube, T. (2017) Activity alterations in the bed nucleus of the stria terminalis and amygdala during threat anticipation in generalized anxiety disorder. *Soc Cogn Affect Neurosci*, 12, 1766-1774.

Bystritsky, A., Kaplan, J.T., Feusner, J.D., Kerwin, L.E., Wadekar, M., Burock, M., Wu, A.D. & Iacoboni, M. (2008) A preliminary study of fMRI-guided rTMS in the treatment of generalized anxiety disorder. *J Clin Psychiatry*, 69, 1092-1098.

Bystritsky, A., Khalsa, S.S., Cameron, M.E. & Schiffman, J. (2013) Current diagnosis and treatment of anxiety disorders. *P T*, 38, 30-57.

Bystritsky, A., Pontillo, D., Powers, M., Sabb, F.W., Craske, M.G. & Bookheimer, S.Y. (2001) Functional MRI changes during panic anticipation and imagery exposure. *Neuroreport*, 12, 3953-3957.

C

Cai, H., Haubensak, W., Anthony, T.E. & Anderson, D.J. (2014) Central amygdala PKC-delta(+) neurons mediate the influence of multiple anorexigenic signals. *Nat Neurosci*, 17, 1240-1248.

Cai, X., Flores-Hernandez, J., Feng, J. & Yan, Z. (2002) Activity-dependent bidirectional regulation of GABA(A) receptor channels by the 5-HT(4) receptor-mediated signalling in rat prefrontal cortical pyramidal neurons. *J Physiol*, 540, 743-759.

Camilleri, M., Vazquez-Roque, M.I., Burton, D., Ford, T., McKinzie, S., Zinsmeister, A.R. & Druzgala, P. (2007) Pharmacodynamic effects of a novel prokinetic 5-HT receptor agonist, ATI-7505, in humans. *Neurogastroenterol Motil*, 19, 30-38.

Cao, J.L., Covington, H.E., 3rd, Friedman, A.K., Wilkinson, M.B., Walsh, J.J., Cooper, D.C., Nestler, E.J. & Han, M.H. (2010) Mesolimbic dopamine neurons in the brain reward circuit mediate susceptibility to social defeat and antidepressant action. *J Neurosci*, 30, 16453-16458.

Carlen, M. (2017) What constitutes the prefrontal cortex? *Science*, 358, 478-482.

Carr, G.V., Schechter, L.E. & Lucki, I. (2011) Antidepressant and anxiolytic effects of selective 5-HT6 receptor agonists in rats. *Psychopharmacology (Berl)*, 213, 499-507.

Castello, J., LeFrancois, B., Flajolet, M., Greengard, P., Friedman, E. & Rebholz, H. (2018) CK2 regulates 5-HT4 receptor signaling and modulates depressive-like behavior. *Mol Psychiatry*, 23, 872-882.

Challis, C., Beck, S.G. & Berton, O. (2014) Optogenetic modulation of descending prefrontocortical inputs to the dorsal raphe bidirectionally bias socioaffective choices after social defeat. *Front Behav Neurosci*, 8, 43.

Chase, T.N., Katz, R.I. & Kopin, I.J. (1970) Effect of diazepam on fate of intracisternally injected serotonin-C14. *Neuropharmacology*, 9, 103-108.

Chegini, H.R., Nasehi, M. & Zarrindast, M.R. (2014) Differential role of the basolateral amygdala 5-HT3 and 5-HT4 serotonin receptors upon ACPA-induced anxiolytic-like behaviors and emotional memory deficit in mice. *Behav Brain Res*, 261, 114-126.

Chen, A., Kelley, L.D. & Janusonis, S. (2012) Effects of prenatal stress and monoaminergic perturbations on the expression of serotonin 5-HT(4) and adrenergic beta(2) receptors in the embryonic mouse telencephalon. *Brain Res*, 1459, 27-34.

Christianson, J.P., Thompson, B.M., Watkins, L.R. & Maier, S.F. (2009) Medial prefrontal cortical activation modulates the impact of controllable and uncontrollable stressor exposure on a social exploration test of anxiety in the rat. *Stress*, 12, 445-450.

Chua, P., Krams, M., Toni, I., Passingham, R. & Dolan, R. (1999) A functional anatomy of anticipatory anxiety. *Neuroimage*, 9, 563-571.

Chudasama, Y., Wright, K.S. & Murray, E.A. (2008) Hippocampal lesions in rhesus monkeys disrupt emotional responses but not reinforcer devaluation effects. *Biol Psychiatry*, 63, 1084-1091.

Ciocchi, S., Herry, C., Grenier, F., Wolff, S.B., Letzkus, J.J., Vlachos, I., Ehrlich, I., Sprengel, R., Deisseroth, K., Stadler, M.B., Muller, C. & Luthi, A. (2010) Encoding of conditioned fear in central amygdala inhibitory circuits. *Nature*, 468, 277-282.

Claeysen, S., Sebben, M., Becamel, C., Bockaert, J. & Dumuis, A. (1999) Novel brain-specific 5-HT4 receptor splice variants show marked constitutive activity: role of the C-terminal intracellular domain. *Mol Pharmacol*, 55, 910-920.

Claeysen, S., Sebben, M., Journot, L., Bockaert, J. & Dumuis, A. (1996) Cloning, expression and pharmacology of the mouse 5-HT(4L) receptor. *FEBS Lett*, 398, 19-25.

Cole, J.C. & Rodgers, R.J. (1994) Ethological evaluation of the effects of acute and chronic buspirone treatment in the murine elevated plus-maze test: comparison with haloperidol. *Psychopharmacology (Berl)*, 114, 288-296.

Compan, V., Daszuta, A., Salin, P., Sebben, M., Bockaert, J. & Dumuis, A. (1996) Lesion study of the distribution of serotonin 5-HT4 receptors in rat basal ganglia and hippocampus. *Eur J Neurosci*, 8, 2591-2598.

Concas, A., Serra, M., Corda, M.G. & Biggio, G. (1984) Foot shock-induced decrease of low affinity GABA receptors in the rat brain: antagonism by diazepam. *Ann Ist Super Sanita*, 20, 53-56.

Conductier, G., Dusticier, N., Lucas, G., Cote, F., Debonnel, G., Daszuta, A., Dumuis, A., Nieoullon, A., Hen, R., Bockaert, J. & Compan, V. (2006) Adaptive changes in serotonin neurons of the raphe nuclei in 5-HT(4) receptor knock-out mouse. *Eur J Neurosci*, 24, 1053-1062.

Costa, E. & Guidotti, A. (1979) Molecular mechanisms in the receptor action of benzodiazepines. *Annu Rev Pharmacol Toxicol*, 19, 531-545.

Costall, B. & Naylor, R.J. (1997) The influence of 5-HT2 and 5-HT4 receptor antagonists to modify drug induced disinhibitory effects in the mouse light/dark test. *Br J Pharmacol*, 122, 1105-1118.

Cottraux, J. (2002) Nonpharmacological treatments for anxiety disorders. *Dialogues Clin Neurosci*, 4, 305-319.

Covington, H.E., 3rd, Lobo, M.K., Maze, I., Vialou, V., Hyman, J.M., Zaman, S., LaPlant, Q., Mouzon, E., Ghose, S., Tamminga, C.A., Neve, R.L., Deisseroth, K. & Nestler, E.J. (2010) Antidepressant effect of optogenetic stimulation of the medial prefrontal cortex. *J Neurosci*,

30, 16082-16090.

Cryan, J.F. & Holmes, A. (2005) The ascent of mouse: advances in modelling human depression and anxiety. *Nat Rev Drug Discov*, 4, 775-790.

D

Darcet, F., Gardier, A.M., David, D.J. & Guilloux, J.P. (2016) Chronic 5-HT4 receptor agonist treatment restores learning and memory deficits in a neuroendocrine mouse model of anxiety/depression. *Neurosci Lett*, 616, 197-203.

David, D.J., Klemenhagen, K.C., Holick, K.A., Saxe, M.D., Mendez, I., Santarelli, L., Craig, D.A., Zhong, H., Swanson, C.J., Hegde, L.G., Ping, X.I., Dong, D., Marzabadi, M.R., Gerald, C.P. & Hen, R. (2007) Efficacy of the MCHR1 antagonist N-[3-(1-{[4-(3,4-difluorophenoxy)phenyl]methyl}(4-piperidyl))-4-methylphenyl]-2-m ethylpropanamide (SNAP 94847) in mouse models of anxiety and depression following acute and chronic administration is independent of hippocampal neurogenesis. *J Pharmacol Exp Ther*, 321, 237-248.

David, D.J., Samuels, B.A., Rainer, Q., Wang, J.W., Marsteller, D., Mendez, I., Drew, M., Craig, D.A., Guiard, B.P., Guilloux, J.P., Artymyshyn, R.P., Gardier, A.M., Gerald, C., Antonijevic, I.A., Leonardo, E.D. & Hen, R. (2009) Neurogenesis-dependent and -independent effects of fluoxetine in an animal model of anxiety/depression. *Neuron*, 62, 479-493.

de Visser, L., Baars, A.M., van 't Klooster, J. & van den Bos, R. (2011) Transient inactivation of the medial prefrontal cortex affects both anxiety and decision-making in male wistar rats. *Front Neurosci*, 5, 102.

Deacon, R.M., Penny, C. & Rawlins, J.N. (2003) Effects of medial prefrontal cortex cytotoxic lesions in mice. *Behav Brain Res*, 139, 139-155.

Deisseroth, K., Feng, G., Majewska, A.K., Miesenbock, G., Ting, A. & Schnitzer, M.J. (2006) Next-generation optical technologies for illuminating genetically targeted brain circuits. *J Neurosci*, 26, 10380-10386.

DiMauro, J., Domingues, J., Fernandez, G. & Tolin, D.F. (2013) Long-term effectiveness of CBT for anxiety disorders in an adult outpatient clinic sample: a follow-up study. *Behav Res Ther*, 51, 82-86.

Donaldson, Z.R., Piel, D.A., Santos, T.L., Richardson-Jones, J., Leonardo, E.D., Beck, S.G., Champagne, F.A. & Hen, R. (2014) Developmental effects of serotonin 1A autoreceptors on anxiety and social behavior. *Neuropsychopharmacology*, 39, 291-302.

du Jardin, K.G., Liebenberg, N., Muller, H.K., Elfving, B., Sanchez, C. & Wegener, G. (2016) Differential interaction with the serotonin system by S-ketamine, vortioxetine, and fluoxetine in a genetic rat model of depression. *Psychopharmacology (Berl)*, 233, 2813-2825.

Duebel, J., Marazova, K. & Sahel, J.A. (2015) Optogenetics. *Curr Opin Ophthalmol*, 26, 226-232.

Dulawa, S.C., Holick, K.A., Gundersen, B. & Hen, R. (2004) Effects of chronic fluoxetine in animal models of anxiety and depression. *Neuropsychopharmacology*, 29, 1321-1330.

Dumuis, A., Bouhelal, R., Sebben, M., Cory, R. & Bockaert, J. (1988) A nonclassical 5-hydroxytryptamine receptor positively coupled with adenylate cyclase in the central nervous system. *Mol Pharmacol*, 34, 880-887.

Ebert, B., Thompson, S.A., Saounatsou, K., McKernan, R., Krogsgaard-Larsen, P. & Wafford, K.A. (1997) Differences in agonist/antagonist binding affinity and receptor transduction using recombinant human gamma-aminobutyric acid type A receptors. *Mol Pharmacol*, 52, 1150-1156.

E

Eglen, R.M., Bonhaus, D.W., Johnson, L.G., Leung, E. & Clark, R.D. (1995a) Pharmacological characterization of two novel and potent 5-HT4 receptor agonists, RS 67333 and RS 67506, in vitro and in vivo. *Br J Pharmacol*, 115, 1387-1392.

Eglen, R.M., Wong, E.H., Dumuis, A. & Bockaert, J. (1995b) Central 5-HT4 receptors. *Trends Pharmacol Sci*, 16, 391-398.

Engel, K.R., Obst, K., Bandelow, B., Dechent, P., Gruber, O., Zerr, I., Ulrich, K. & Wedekind, D. (2016) Functional MRI activation in response to panic-specific, non-panic aversive, and neutral pictures in patients with panic disorder and healthy controls. *Eur Arch Psychiatry Clin Neurosci*, 266, 557-566.

Esler, M., Lambert, E., Alvarenga, M., Socratous, F., Richards, J., Barton, D., Pier, C., Brenchley, C., Dawood, T., Hastings, J., Guo, L., Haikerwal, D., Kaye, D., Jennings, G., Kalff, V., Kelly, M., Wiesner, G. & Lambert, G. (2007) Increased brain serotonin turnover in panic disorder patients in the absence of a panic attack: reduction by a selective serotonin reuptake inhibitor. *Stress*, 10, 295-304.

Etkin, A. & Wager, T.D. (2007) Functional neuroimaging of anxiety: a meta-analysis of emotional processing in PTSD, social anxiety disorder, and specific phobia. *Am J Psychiatry*, 164, 1476-1488.

F

Faye, C., McGowan, J.C., Denny, C.A. & David, D.J. (2018) Neurobiological Mechanisms of Stress Resilience and Implications for the Aged Population. *Curr Neuropharmacol*, 16, 234-270.

Felix-Ortiz, A.C., Beyeler, A., Seo, C., Leppla, C.A., Wildes, C.P. & Tye, K.M. (2013) BLA to vHPC inputs modulate anxiety-related behaviors. *Neuron*, 79, 658-664.

Felix-Ortiz, A.C., Burgos-Robles, A., Bhagat, N.D., Leppla, C.A. & Tye, K.M. (2016) Bidirectional modulation of anxiety-related and social behaviors by amygdala projections to the medial prefrontal cortex. *Neuroscience*, 321, 197-209.

Feltner, D.E., Harness, J., Brock, J., Sambunaris, A., Cappelleri, J.C. & Morlock, R. (2009) Clinical evaluation of the Daily Assessment of Symptoms-Anxiety (DAS-A): a new instrument to assess the onset of symptomatic improvement in generalized anxiety disorder. *CNS Neurosci Ther*, 15, 12-18.

Fernandez, S.P. & Gaspar, P. (2012) Investigating anxiety and depressive-like phenotypes in genetic mouse models of serotonin depletion. *Neuropharmacology*, 62, 144-154.

Ferry, B., Gervasoni, D., Vogt, C. (2012) *Précis de neurochirurgie stéréotaxique appliquée aux rongeurs de laboratoire*.

Filip, M. & Bader, M. (2009) Overview on 5-HT receptors and their role in physiology and pathology of the central nervous system. *Pharmacol Rep*, 61, 761-777.

Fink, M. (1982) ECT in anxiety: an appraisal. *Am J Psychother*, 36, 371-378.

Fisher, P.M., Holst, K.K., Mc Mahon, B., Haahr, M.E., Madsen, K., Gillings, N., Baare, W.F., Jensen, P.S. & Knudsen, G.M. (2012) 5-HTTLPR status predictive of neocortical 5-HT4 binding assessed with [(11)C]SB207145 PET in humans. *Neuroimage*, 62, 130-136.

Fitzgerald, J.M., Phan, K.L., Kennedy, A.E., Shankman, S.A., Langenecker, S.A. & Klumpp, H. (2017) Prefrontal and amygdala engagement during emotional reactivity and regulation in generalized anxiety disorder. *J Affect Disord*, 218, 398-406.

Fitzpatrick, C.J., Knox, D. & Liberzon, I. (2011) Inactivation of the prelimbic cortex enhances freezing induced by trimethylthiazoline, a component of fox feces. *Behav Brain Res*, 221, 320-323.

Fonzo, G.A., Ramsawh, H.J., Flagan, T.M., Sullivan, S.G., Letamendi, A., Simmons, A.N., Paulus, M.P. & Stein, M.B. (2015) Common and disorder-specific neural responses to emotional faces in generalised anxiety, social anxiety and panic disorders. *Br J Psychiatry*, 206, 206-215.

Freret, T., Bouet, V., Quiedeville, A., Nee, G., Dallemagne, P., Rochais, C. & Boulouard, M. (2012) Synergistic effect of acetylcholinesterase inhibition (donepezil) and 5-HT(4) receptor activation (RS67333) on object recognition in mice. *Behav Brain Res*, 230, 304-308.

Frick, A., Ahs, F., Appel, L., Jonasson, M., Wahlstedt, K., Bani, M., Merlo Pich, E., Bettica, P., Langstrom, B., Lubberink, M., Fredrikson, M. & Furmark, T. (2016) Reduced serotonin synthesis and regional cerebral blood flow after anxiolytic treatment of social anxiety disorder. *Eur Neuropsychopharmacol*, 26, 1775-1783.

Frick, A., Ahs, F., Engman, J., Jonasson, M., Alaie, I., Bjorkstrand, J., Frans, O., Faria, V., Linnman, C., Appel, L., Wahlstedt, K., Lubberink, M., Fredrikson, M. & Furmark, T. (2015) Serotonin

Synthesis and Reuptake in Social Anxiety Disorder: A Positron Emission Tomography Study. *JAMA Psychiatry*, 72, 794-802.

G

Gaignault, J.-C., Nédélec, L. (1983) Les benzodiazépines : aspects historiques, éléments de structure-activité et perspectives d'avenir *L'actualité chimique*. La Société Chimique de France et la Société de Chimie Naturelle, pp. 17-23.

Gallager, D.W. (1978) Benzodiazepines: potentiation of a GABA inhibitory response in the dorsal raphe nucleus. *Eur J Pharmacol*, 49, 133-143.

Garcia-Garcia, A.L., Canetta, S., Stujenske, J.M., Burghardt, N.S., Ansorge, M.S., Dranovsky, A. & Leonardo, E.D. (2018) Serotonin inputs to the dorsal BNST modulate anxiety in a 5-HT1A receptor-dependent manner. *Mol Psychiatry*, 23, 1990-1997.

Geng, F., Tian, J., Wu, J.L., Luo, Y., Zou, W.J., Peng, C. & Lu, G.F. (2018) Dorsomedial prefrontal cortex 5-HT6 receptors regulate anxiety-like behavior. *Cogn Affect Behav Neurosci*, 18, 58-67.

Gentsch, C., Lichtsteiner, M. & Feer, H. (1981) Locomotor activity, defecation score and corticosterone levels during an openfield exposure: a comparison among individually and group-housed rats, and genetically selected rat lines. *Physiol Behav*, 27, 183-186.

George, M.S., Ward, H.E., Jr., Ninan, P.T., Pollack, M., Nahas, Z., Anderson, B., Kose, S., Howland, R.H., Goodman, W.K. & Ballenger, J.C. (2008) A pilot study of vagus nerve stimulation (VNS) for treatment-resistant anxiety disorders. *Brain Stimul*, 1, 112-121.

Gerald, C., Adham, N., Kao, H.T., Olsen, M.A., Laz, T.M., Schechter, L.E., Bard, J.A., Vaysse, P.J., Hartig, P.R., Branchek, T.A. & et al. (1995) The 5-HT4 receptor: molecular cloning and pharmacological characterization of two splice variants. *EMBO J*, 14, 2806-2815.

Gilaberte, I., Montejo, A.L., de la Gandara, J., Perez-Sola, V., Bernardo, M., Massana, J., Martin-Santos, R., Santiso, A., Noguera, R., Casais, L., Perez-Camo, V., Arias, M., Judge, R. & Fluoxetine Long-Term Study, G. (2001) Fluoxetine in the prevention of depressive recurrences: a double-blind study. *J Clin Psychopharmacol*, 21, 417-424.

Goddard, A.W., Mason, G.F., Almai, A., Rothman, D.L., Behar, K.L., Petroff, O.A., Charney, D.S. & Krystal, J.H. (2001) Reductions in occipital cortex GABA levels in panic disorder detected with 1h-magnetic resonance spectroscopy. *Arch Gen Psychiatry*, 58, 556-561.

Goddard, A.W., Mason, G.F., Appel, M., Rothman, D.L., Gueorguieva, R., Behar, K.L. & Krystal, J.H. (2004) Impaired GABA neuronal response to acute benzodiazepine administration in panic disorder. *Am J Psychiatry*, 161, 2186-2193.

Gomez, A.F., Barthel, A.L. & Hofmann, S.G. (2018) Comparing the efficacy of benzodiazepines and serotonergic anti-depressants for adults with generalized anxiety disorder: a meta-

analytic review. *Expert Opin Pharmacother*, 19, 883-894.

Gommoll, C., Forero, G., Mathews, M., Nunez, R., Tang, X., Durgam, S. & Sambunaris, A. (2015) Vilazodone in patients with generalized anxiety disorder: a double-blind, randomized, placebo-controlled, flexible-dose study. *Int Clin Psychopharmacol*, 30, 297-306.

Gonzalez, L.E., Rujano, M., Tucci, S., Paredes, D., Silva, E., Alba, G. & Hernandez, L. (2000) Medial prefrontal transection enhances social interaction. I: behavioral studies. *Brain Res*, 887, 7-15.

Greenberg, P.E., Sisitsky, T., Kessler, R.C., Finkelstein, S.N., Berndt, E.R., Davidson, J.R., Ballenger, J.C. & Fyer, A.J. (1999) The economic burden of anxiety disorders in the 1990s. *J Clin Psychiatry*, 60, 427-435.

Griebel, G., Rodgers, R.J., Perrault, G. & Sanger, D.J. (1997) Risk assessment behaviour: evaluation of utility in the study of 5-HT-related drugs in the rat elevated plus-maze test. *Pharmacol Biochem Behav*, 57, 817-827.

Grillon, C. (2008) Models and mechanisms of anxiety: evidence from startle studies. *Psychopharmacology (Berl)*, 199, 421-437.

Gross, C., Zhuang, X., Stark, K., Ramboz, S., Oosting, R., Kirby, L., Santarelli, L., Beck, S. & Hen, R. (2002) Serotonin1A receptor acts during development to establish normal anxiety-like behaviour in the adult. *Nature*, 416, 396-400.

Grossman, C.J., Kilpatrick, G.J. & Bunce, K.T. (1993) Development of a radioligand binding assay for 5-HT4 receptors in guinea-pig and rat brain. *Br J Pharmacol*, 109, 618-624.

Gudex, C. (1991) Adverse effects of benzodiazepines. *Soc Sci Med*, 33, 587-596.

Guiard, B.P., Chenu, F., El Mansari, M. & Blier, P. (2011) Characterization of the electrophysiological properties of triple reuptake inhibitors on monoaminergic neurons. *Int J Neuropsychopharmacol*, 14, 211-223.

Guilloux, J.P., Mendez-David, I., Pehrson, A., Guiard, B.P., Reperant, C., Orvoen, S., Gardier, A.M., Hen, R., Ebert, B., Miller, S., Sanchez, C. & David, D.J. (2013) Antidepressant and anxiolytic potential of the multimodal antidepressant vortioxetine (Lu AA21004) assessed by behavioural and neurogenesis outcomes in mice. *Neuropharmacology*, 73, 147-159.

H

Hackett, D., Haudiquet, V. & Salinas, E. (2003) A method for controlling for a high placebo response rate in a comparison of venlafaxine XR and diazepam in the short-term treatment of patients with generalised anxiety disorder. *Eur Psychiatry*, 18, 182-187.

Hajizadeh Moghaddam, A., Roohbakhsh, A., Rostami, P., Heidary-Davishani, A. & Zarrindast, M.R. (2008) GABA and histamine interaction in the basolateral amygdala of rats in the plus-maze test of anxiety-like behaviors. *Pharmacology*, 82, 59-66.

Hale, M.W., Bouwknecht, J.A., Spiga, F., Shekhar, A. & Lowry, C.A. (2006) Exposure to high- and low-light conditions in an open-field test of anxiety increases c-Fos expression in specific subdivisions of the rat basolateral amygdaloid complex. *Brain Res Bull*, 71, 174-182.

Hale, M.W., Shekhar, A. & Lowry, C.A. (2012) Stress-related serotonergic systems: implications for symptomatology of anxiety and affective disorders. *Cell Mol Neurobiol*, 32, 695-708.

Hall, C., & Ballachey, E. L. (1932) A study of the rat's behavior in a field. A contribution to method in comparative psychology. *University of California Publications in Psychology*, 1-12.

Ham, B.J., Sung, Y., Kim, N., Kim, S.J., Kim, J.E., Kim, D.J., Lee, J.Y., Kim, J.H., Yoon, S.J. & Lyoo, I.K. (2007) Decreased GABA levels in anterior cingulate and basal ganglia in medicated subjects with panic disorder: a proton magnetic resonance spectroscopy (1H-MRS) study. *Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry*, 31, 403-411.

Hamani, C., Diwan, M., Macedo, C.E., Brandao, M.L., Shumake, J., Gonzalez-Lima, F., Raymond, R., Lozano, A.M., Fletcher, P.J. & Nobrega, J.N. (2010) Antidepressant-like effects of medial prefrontal cortex deep brain stimulation in rats. *Biol Psychiatry*, 67, 117-124.

Handley, S.L. & Mithani, S. (1984) Effects of alpha-adrenoceptor agonists and antagonists in a maze-exploration model of 'fear'-motivated behaviour. *Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol*, 327, 1-5.

Hegde, S.S. & Eglen, R.M. (1996) Peripheral 5-HT4 receptors. *FASEB J*, 10, 1398-1407.

Heisler, L.K., Chu, H.M., Brennan, T.J., Danao, J.A., Bajwa, P., Parsons, L.H. & Tecott, L.H. (1998) Elevated anxiety and antidepressant-like responses in serotonin 5-HT1A receptor mutant mice. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 95, 15049-15054.

Hermann, A., Schafer, A., Walter, B., Stark, R., Vaitl, D. & Schienle, A. (2007) Diminished medial prefrontal cortex activity in blood-injection-injury phobia. *Biol Psychol*, 75, 124-130.

Herrmann, M.J., Katzorke, A., Busch, Y., Gromer, D., Polak, T., Pauli, P. & Deckert, J. (2017) Medial prefrontal cortex stimulation accelerates therapy response of exposure therapy in acrophobia. *Brain Stimul*, 10, 291-297.

Higgins, G.A., Bradbury, A.J., Jones, B.J. & Oakley, N.R. (1988) Behavioural and biochemical consequences following activation of 5HT1-like and GABA receptors in the dorsal raphe nucleus of the rat. *Neuropharmacology*, 27, 993-1001.

Higgins, G.A., Jones, B.J., Oakley, N.R. & Tyers, M.B. (1991) Evidence that the amygdala is involved in the disinhibitory effects of 5-HT3 receptor antagonists. *Psychopharmacology (Berl)*, 104, 545-551.

Hill, A.S., Sahay, A. & Hen, R. (2015) Increasing Adult Hippocampal Neurogenesis is Sufficient to Reduce Anxiety and Depression-Like Behaviors. *Neuropsychopharmacology*, 40, 2368-2378.

Hoehn-Saric, R., McLeod, D.R. & Zimmerli, W.D. (1988) Differential effects of alprazolam and imipramine in generalized anxiety disorder: somatic versus psychic symptoms. *J Clin Psychiatry*, 49, 293-301.

Hoehn-Saric, R., Schlund, M.W. & Wong, S.H. (2004) Effects of citalopram on worry and brain activation in patients with generalized anxiety disorder. *Psychiatry Res*, 131, 11-21.

Hofmann, S.G. & Smits, J.A. (2008) Cognitive-behavioral therapy for adult anxiety disorders: a meta-analysis of randomized placebo-controlled trials. *J Clin Psychiatry*, 69, 621-632.

Hogg, S., Andrews, N. & File, S.E. (1994) Contrasting behavioural effects of 8-OH DPAT in the dorsal raphe nucleus and ventral hippocampus. *Neuropharmacology*, 33, 343-348.

Hornung, J.P. (2003) The human raphe nuclei and the serotonergic system. *J Chem Neuroanat*, 26, 331-343.

Hotte, M., Dauphin, F., Freret, T., Boulouard, M. & Levallet, G. (2012) A biphasic and brain-region selective down-regulation of cyclic adenosine monophosphate concentrations supports object recognition in the rat. *PLoS One*, 7, e32244.

Hoyer, D., Hannon, J.P. & Martin, G.R. (2002) Molecular, pharmacological and functional diversity of 5-HT receptors. *Pharmacol Biochem Behav*, 71, 533-554.

I

Isingrini, E., Perret, L., Rainer, Q., Amilhon, B., Guma, E., Tanti, A., Martin, G., Robinson, J., Moquin, L., Marti, F., Mechawar, N., Williams, S., Gratton, A. & Giros, B. (2016) Resilience to chronic stress is mediated by noradrenergic regulation of dopamine neurons. *Nat Neurosci*, 19, 560-563.

Izumi, T., Ohmura, Y., Futami, Y., Matsuzaki, H., Kubo, Y., Yoshida, T. & Yoshioka, M. (2012) Effects of serotonergic terminal lesion in the amygdala on conditioned fear and innate fear in rats. *Eur J Pharmacol*, 696, 89-95.

J

Jacob, T.C., Moss, S.J. & Jurd, R. (2008) GABA(A) receptor trafficking and its role in the dynamic modulation of neuronal inhibition. *Nat Rev Neurosci*, 9, 331-343.

Jacobsen, J.P., Medvedev, I.O. & Caron, M.G. (2012) The 5-HT deficiency theory of depression: perspectives from a naturalistic 5-HT deficiency model, the tryptophan hydroxylase 2Arg439His knockin mouse. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci*, 367, 2444-2459.

Jacobson, L. (2014) Hypothalamic-pituitary-adrenocortical axis: neuropsychiatric aspects. *Compr Physiol*, 4, 715-738.

Janak, P.H. & Tye, K.M. (2015) From circuits to behaviour in the amygdala. *Nature*, 517, 284-292.

Jang, S., Kim, D., Lee, Y., Moon, S. & Oh, S. (2011) Modulation of sphingosine 1-phosphate and tyrosine hydroxylase in the stress-induced anxiety. *Neurochem Res*, 36, 258-267.

Jean, A., Laurent, L., Delaunay, S., Doly, S., Dusticier, N., Linden, D., Neve, R., Maroteaux, L., Nieoullon, A. & Compan, V. (2017) Adaptive Control of Dorsal Raphe by 5-HT4 in the Prefrontal Cortex Prevents Persistent Hypophagia following Stress. *Cell Rep*, 21, 901-909.

Jinks, A.L. & McGregor, I.S. (1997) Modulation of anxiety-related behaviours following lesions of the prelimbic or infralimbic cortex in the rat. *Brain Res*, 772, 181-190.

Johnson, P.L., Hollis, J.H., Moratalla, R., Lightman, S.L. & Lowry, C.A. (2005) Acute hypercarbic gas exposure reveals functionally distinct subpopulations of serotonergic neurons in rats. *J Psychopharmacol*, 19, 327-341.

Kalin, N.H., Shelton, S.E. & Davidson, R.J. (2004) The role of the central nucleus of the amygdala in mediating fear and anxiety in the primate. *J Neurosci*, 24, 5506-5515.

K

Kalisch, R., Salome, N., Platzer, S., Wigger, A., Czisch, M., Sommer, W., Singewald, N., Heilig, M., Berthele, A., Holsboer, F., Landgraf, R. & Auer, D.P. (2004) High trait anxiety and hyporeactivity to stress of the dorsomedial prefrontal cortex: a combined phMRI and Fos study in rats. *Neuroimage*, 23, 382-391.

Kapur, S. & Seeman, P. (2002) NMDA receptor antagonists ketamine and PCP have direct effects on the dopamine D(2) and serotonin 5-HT(2)receptors-implications for models of schizophrenia. *Mol Psychiatry*, 7, 837-844.

Kaschka, W., Feistel, H. & Ebert, D. (1995) Reduced benzodiazepine receptor binding in panic disorders measured by iomazenil SPECT. *J Psychiatr Res*, 29, 427-434.

Kash, S.F., Tecott, L.H., Hodge, C. & Baekkeskov, S. (1999) Increased anxiety and altered responses to anxiolytics in mice deficient in the 65-kDa isoform of glutamic acid decarboxylase. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 96, 1698-1703.

Katzung, G. (2001) Sedative-hypnotic drugs. In Companies, U.T.M.H. (ed) *Basic and clinical pharmacology*.

Kaufman, J. & Charney, D. (2000) Comorbidity of mood and anxiety disorders. *Depress Anxiety*, 12 Suppl 1, 69-76.

Kennett, G.A., Bright, F., Trail, B., Blackburn, T.P. & Sanger, G.J. (1997) Anxiolytic-like actions of the selective 5-HT4 receptor antagonists SB 204070A and SB 207266A in rats. *Neuropharmacology*, 36, 707-712.

Kennett, G.A., Trail, B. & Bright, F. (1998) Anxiolytic-like actions of BW 723C86 in the rat Vogel conflict test are 5-HT2B receptor mediated. *Neuropharmacology*, 37, 1603-1610.

Kessler, R.C., Avenevoli, S., Costello, J., Green, J.G., Gruber, M.J., McLaughlin, K.A., Petukhova, M., Sampson, N.A., Zaslavsky, A.M. & Merikangas, K.R. (2012) Severity of 12-month DSM-IV disorders in the National Comorbidity Survey Replication Adolescent Supplement. *Arch Gen Psychiatry*, 69, 381-389.

Kessler, R.C., Berglund, P., Demler, O., Jin, R., Merikangas, K.R. & Walters, E.E. (2005) Lifetime prevalence and age-of-onset distributions of DSM-IV disorders in the National Comorbidity Survey Replication. *Arch Gen Psychiatry*, 62, 593-602.

Kheirbek, M.A., Drew, L.J., Burghardt, N.S., Costantini, D.O., Tannenholz, L., Ahmari, S.E., Zeng, H., Fenton, A.A. & Hen, R. (2013) Differential control of learning and anxiety along the dorsoventral axis of the dentate gyrus. *Neuron*, 77, 955-968.

Khodayar, E., Oryan, S., Nasehi, M. & Zarrindast, M.R. (2016) Effect of nucleus accumbens shell 5-HT4 receptors on the impairment of ACPA-induced emotional memory consolidation in male Wistar rats. *Behav Pharmacol*, 27, 12-21.

Kilts, C.D., Kelsey, J.E., Knight, B., Ely, T.D., Bowman, F.D., Gross, R.E., Selvig, A., Gordon, A., Newport, D.J. & Nemeroff, C.B. (2006) The neural correlates of social anxiety disorder and response to pharmacotherapy. *Neuropsychopharmacology*, 31, 2243-2253.

Kim, K.H. & Abdi, S. (2014) Rediscovery of nefopam for the treatment of neuropathic pain. *Korean J Pain*, 27, 103-111.

Kim, S.Y., Adhikari, A., Lee, S.Y., Marshel, J.H., Kim, C.K., Mallory, C.S., Lo, M., Pak, S., Mattis, J., Lim, B.K., Malenka, R.C., Warden, M.R., Neve, R., Tye, K.M. & Deisseroth, K. (2013) Diverging neural pathways assemble a behavioural state from separable features in anxiety. *Nature*, 496, 219-223.

Kimmel, R., Roy-Byrne, P. & Cowley, D. (2015) Pharmacological Treatments for Panic Disorder, Generalized Anxiety Disorder, Specific Phobia, and Social Anxiety Disorder. In Nathan, P., Gorman, J. (eds) *A GUIDE TO TREATMENTS THAT WORK*. Oxford University Press, USA.

Kimmel, R., Roy-Byrne, P., & Cowley, D. (2015) Pharmacological Treatments for Panic Disorder, Generalized Anxiety Disorder, Specific Phobia, and Social Anxiety Disorder. In (Eds.), N.J.G. (ed) *A GUIDE TO TREATMENTS THAT WORK*. USA: Oxford University Press.

Kjelstrup, K.G., Tuvnes, F.A., Steffenach, H.A., Murison, R., Moser, E.I. & Moser, M.B. (2002) Reduced fear expression after lesions of the ventral hippocampus. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 99, 10825-10830.

Klein, D.F. & Fink, M. (1962) Psychiatric reaction patterns to imipramine. *Am J Psychiatry*, 119, 432-438.

Koe, B.K. & Weissman, A. (1966) p-Chlorophenylalanine: a specific depletor of brain serotonin. *J Pharmacol Exp Ther*, 154, 499-516.

Krishnan, V., Han, M.H., Graham, D.L., Berton, O., Renthal, W., Russo, S.J., Laplant, Q., Graham, A., Lutter, M., Lagace, D.C., Ghose, S., Reister, R., Tannous, P., Green, T.A., Neve, R.L., Chakravarty, S., Kumar, A., Eisch, A.J., Self, D.W., Lee, F.S., Tamminga, C.A., Cooper, D.C., Gershenfeld, H.K. & Nestler, E.J. (2007) Molecular adaptations underlying susceptibility and resistance to social defeat in brain reward regions. *Cell*, 131, 391-404.

Kumar, S., Black, S.J., Hultman, R., Szabo, S.T., DeMaio, K.D., Du, J., Katz, B.M., Feng, G., Covington, H.E., 3rd & Dzirasa, K. (2013) Cortical control of affective networks. *J Neurosci*, 33, 1116-1129.

Kurhe, Y., Mahesh, R., Devadoss, T. & Gupta, D. (2014) Antidepressant-like effect of a novel 5-HT3 receptor antagonist N-(benzo[d] thiazol-2-yl)-3-ethoxyquinoxalin-2-carboxamide 6k using rodents behavioral battery tests. *J Pharmacol Pharmacother*, 5, 197-202.

L

Lacroix, L., Broersen, L.M., Weiner, I. & Feldon, J. (1998) The effects of excitotoxic lesion of the medial prefrontal cortex on latent inhibition, prepulse inhibition, food hoarding, elevated plus maze, active avoidance and locomotor activity in the rat. *Neuroscience*, 84, 431-442.

Lacroix, L., Spinelli, S., Heidbreder, C.A. & Feldon, J. (2000) Differential role of the medial and lateral prefrontal cortices in fear and anxiety. *Behav Neurosci*, 114, 1119-1130.

Lanzenberger, R.R., Mitterhauser, M., Spindelegger, C., Wadsak, W., Klein, N., Mien, L.K., Holik, A., Attarbaschi, T., Mossaheb, N., Sacher, J., Geiss-Granadia, T., Kletter, K., Kasper, S. & Tauscher, J. (2007) Reduced serotonin-1A receptor binding in social anxiety disorder. *Biol Psychiatry*, 61, 1081-1089.

Lecoutey, C., Hedou, D., Freret, T., Giannoni, P., Gaven, F., Since, M., Bouet, V., Ballandonne, C., Corvaisier, S., Malzert Freon, A., Mignani, S., Cresteil, T., Boulouard, M., Claeysen, S., Rochais, C. & Dallemagne, P. (2014) Design of donecopride, a dual serotonin subtype 4 receptor agonist/acetylcholinesterase inhibitor with potential interest for Alzheimer's disease treatment. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 111, E3825-3830.

Lecrubier, Y. & Judge, R. (1997) Long-term evaluation of paroxetine, clomipramine and placebo in panic disorder. Collaborative Paroxetine Panic Study Investigators. *Acta Psychiatr Scand*, 95, 153-160.

Lelong, V., Dauphin, F. & Boulouard, M. (2001) RS 67333 and D-cycloserine accelerate learning acquisition in the rat. *Neuropharmacology*, 41, 517-522.

Lepola, U.M., Wade, A.G., Leinonen, E.V., Koponen, H.J., Frazer, J., Sjodin, I., Penttinen, J.T., Pedersen, T. & Lehto, H.J. (1998) A controlled, prospective, 1-year trial of citalopram in the treatment of panic disorder. *J Clin Psychiatry*, 59, 528-534.

Licht, C.L., Kirkegaard, L., Zueger, M., Chourbaji, S., Gass, P., Aznar, S. & Knudsen, G.M. (2010) Changes in 5-HT4 receptor and 5-HT transporter binding in olfactory bulbectomized and glucocorticoid receptor heterozygous mice. *Neurochem Int*, 56, 603-610.

Lipsman, N., Neimat, J.S. & Lozano, A.M. (2007) Deep brain stimulation for treatment-refractory obsessive-compulsive disorder: the search for a valid target. *Neurosurgery*, 61, 1-11; discussion 11-13.

Lisboa, S.F., Stecchini, M.F., Correa, F.M., Guimaraes, F.S. & Resstel, L.B. (2010) Different role of the ventral medial prefrontal cortex on modulation of innate and associative learned fear. *Neuroscience*, 171, 760-768.

Lister, R.G. (1987) The use of a plus-maze to measure anxiety in the mouse. *Psychopharmacology (Berl)*, 92, 180-185.

Londborg, P.D., Wolkow, R., Smith, W.T., DuBoff, E., England, D., Ferguson, J., Rosenthal, M. & Weise, C. (1998) Sertraline in the treatment of panic disorder. A multi-site, double-blind, placebo-controlled, fixed-dose investigation. *Br J Psychiatry*, 173, 54-60.

Lucas, G., Compan, V., Charnay, Y., Neve, R.L., Nestler, E.J., Bockaert, J., Barrot, M. & Debonnel, G. (2005) Frontocortical 5-HT4 receptors exert positive feedback on serotonergic activity: viral transfections, subacute and chronic treatments with 5-HT4 agonists. *Biol Psychiatry*, 57, 918-925.

Lucas, G. & Debonnel, G. (2002) 5-HT4 receptors exert a frequency-related facilitatory control on dorsal raphe nucleus 5-HT neuronal activity. *Eur J Neurosci*, 16, 817-822.

Lucas, G., Rymar, V.V., Du, J., Mnie-Filali, O., Bisgaard, C., Manta, S., Lambas-Senas, L., Wiborg, O., Haddjeri, N., Pineyro, G., Sadikot, A.F. & Debonnel, G. (2007) Serotonin(4) (5-HT(4)) receptor agonists are putative antidepressants with a rapid onset of action. *Neuron*, 55, 712-725.

Lucchelli, A., Santagostino-Barbone, M.G., Barbieri, A., Candura, S.M. & Tonini, M. (1995) The interaction of antidepressant drugs with central and peripheral (enteric) 5-HT3 and 5-HT4 receptors. *Br J Pharmacol*, 114, 1017-1025.

M

Maaswinkel, H., Gispen, W.H. & Spruijt, B.M. (1996) Effects of an electrolytic lesion of the prelimbic area on anxiety-related and cognitive tasks in the rat. *Behav Brain Res*, 79, 51-59.

Maddock, R.J., Buonocore, M.H., Kile, S.J. & Garrett, A.S. (2003) Brain regions showing increased activation by threat-related words in panic disorder. *Neuroreport*, 14, 325-328.

Madisen, L., Mao, T., Koch, H., Zhuo, J.M., Berenyi, A., Fujisawa, S., Hsu, Y.W., Garcia, A.J., 3rd, Gu, X., Zanella, S., Kidney, J., Gu, H., Mao, Y., Hooks, B.M., Boyden, E.S., Buzsaki, G., Ramirez, J.M., Jones, A.R., Svoboda, K., Han, X., Turner, E.E. & Zeng, H. (2012) A toolbox of Cre-dependent optogenetic transgenic mice for light-induced activation and silencing. *Nat Neurosci*, 15, 793-802.

Malizia, A.L., Cunningham, V.J., Bell, C.J., Liddle, P.F., Jones, T. & Nutt, D.J. (1998) Decreased brain GABA(A)-benzodiazepine receptor binding in panic disorder: preliminary results from a quantitative PET study. *Arch Gen Psychiatry*, 55, 715-720.

Margoob, M.A., Ali, Z. & Andrade, C. (2010) Efficacy of ECT in chronic, severe, antidepressant- and CBT-refractory PTSD: an open, prospective study. *Brain Stimul*, 3, 28-35.

Marin, P., Becamel, C., Dumuis, A. & Bockaert, J. (2012) 5-HT receptor-associated protein networks: new targets for drug discovery in psychiatric disorders? *Curr Drug Targets*, 13, 28-52.

Maron, E., Toru, I., Must, A., Tasa, G., Toover, E., Vasar, V., Lang, A. & Shlik, J. (2007) Association study of tryptophan hydroxylase 2 gene polymorphisms in panic disorder. *Neurosci Lett*, 411, 180-184.

Martin, J.L., Sainz-Pardo, M., Furukawa, T.A., Martin-Sanchez, E., Seoane, T. & Galan, C. (2007) Benzodiazepines in generalized anxiety disorder: heterogeneity of outcomes based on a systematic review and meta-analysis of clinical trials. *J Psychopharmacol*, 21, 774-782.

Mathew, S.J., Mao, X., Coplan, J.D., Smith, E.L., Sackeim, H.A., Gorman, J.M. & Shungu, D.C. (2004) Dorsolateral prefrontal cortical pathology in generalized anxiety disorder: a proton magnetic resonance spectroscopic imaging study. *Am J Psychiatry*, 161, 1119-1121.

Matsuno-Yagi, A. & Mukohata, Y. (1977) Two possible roles of bacteriorhodopsin; a comparative study of strains of Halobacterium halobium differing in pigmentation. *Biochem Biophys Res Commun*, 78, 237-243.

McClure, E.B., Monk, C.S., Nelson, E.E., Parrish, J.M., Adler, A., Blair, R.J., Fromm, S., Charney, D.S., Leibenluft, E., Ernst, M. & Pine, D.S. (2007) Abnormal attention modulation of fear circuit function in pediatric generalized anxiety disorder. *Arch Gen Psychiatry*, 64, 97-106.

McHugh, S.B., Deacon, R.M., Rawlins, J.N. & Bannerman, D.M. (2004) Amygdala and ventral hippocampus contribute differentially to mechanisms of fear and anxiety. *Behav Neurosci*, 118, 63-78.

McMahon, L.R. & Cunningham, K.A. (1999) Antagonism of 5-hydroxytryptamine(4) receptors attenuates hyperactivity induced by cocaine: putative role for 5-hydroxytryptamine(4) receptors in the nucleus accumbens shell. *J Pharmacol Exp Ther*, 291, 300-307.

Mechias, M.L., Etkin, A. & Kalisch, R. (2010) A meta-analysis of instructed fear studies: implications for conscious appraisal of threat. *Neuroimage*, 49, 1760-1768.

Mendez-David, I., David, D.J., Darcet, F., Wu, M.V., Kerdine-Romer, S., Gardier, A.M. & Hen, R. (2014) Rapid anxiolytic effects of a 5-HT(4) receptor agonist are mediated by a neurogenesis-independent mechanism. *Neuropsychopharmacology*, 39, 1366-1378.

Michalowski, J.M., Matuszewski, J., Drozdziel, D., Koziejowski, W., Rynkiewicz, A., Jednorog, K. & Marchewka, A. (2017) Neural response patterns in spider, blood-injection-injury and social fearful individuals: new insights from a simultaneous EEG/ECG-fMRI study. *Brain Imaging Behav*, 11, 829-845.

Michelson, D., Allgulander, C., Dantendorfer, K., Knezevic, A., Maierhofer, D., Micev, V., Paunovic, V.R., Timotijevic, I., Sarkar, N., Skoglund, L. & Pemberton, S.C. (2001) Efficacy of usual antidepressant dosing regimens of fluoxetine in panic disorder: randomised, placebo-controlled trial. *Br J Psychiatry*, 179, 514-518.

Michelson, D., Pollack, M., Lydiard, R.B., Tamura, R., Tepner, R. & Tollefson, G. (1999) Continuing treatment of panic disorder after acute response: randomised, placebo-controlled trial with fluoxetine. The Fluoxetine Panic Disorder Study Group. *Br J Psychiatry*, 174, 213-218.

Moha ou Maati, H., Bourcier-Lucas, C., Veyssiere, J., Kanzari, A., Heurteaux, C., Borsotto, M., Haddjeri, N. & Lucas, G. (2016) The peptidic antidepressant spadin interacts with prefrontal 5-HT(4) and mGluR(2) receptors in the control of serotonergic function. *Brain Struct Funct*, 221, 21-37.

Moller, C., Wiklund, L., Sommer, W., Thorsell, A. & Heilig, M. (1997) Decreased experimental anxiety and voluntary ethanol consumption in rats following central but not basolateral amygdala lesions. *Brain Res*, 760, 94-101.

Monk, C.S., Nelson, E.E., McClure, E.B., Mogg, K., Bradley, B.P., Leibenluft, E., Blair, R.J., Chen, G., Charney, D.S., Ernst, M. & Pine, D.S. (2006) Ventrolateral prefrontal cortex activation and attentional bias in response to angry faces in adolescents with generalized anxiety disorder. *Am J Psychiatry*, 163, 1091-1097.

Montgomery, S.A., Dufour, H., Brion, S., Gailledreau, J., Laqueille, X., Ferrey, G., Moron, P., Parant-Lucena, N., Singer, L., Danion, J.M. & et al. (1988) The prophylactic efficacy of fluoxetine in unipolar depression. *Br J Psychiatry Suppl*, 69-76.

Monti, J.M. (2010) The structure of the dorsal raphe nucleus and its relevance to the regulation of sleep and wakefulness. *Sleep Med Rev*, 14, 307-317.

Morris, J.S., deBonis, M. & Dolan, R.J. (2002) Human amygdala responses to fearful eyes. *Neuroimage*, 17, 214-222.

Moser, A., Gieselberg, A., Ro, B., Keller, C. & Qadri, F. (2003) Deep brain stimulation: response to neuronal high frequency stimulation is mediated through GABA(A) receptor activation in rats. *Neurosci Lett*, 341, 57-60.

Mosienko, V., Bert, B., Beis, D., Matthes, S., Fink, H., Bader, M. & Alenina, N. (2012) Exaggerated aggression and decreased anxiety in mice deficient in brain serotonin. *Transl Psychiatry*, 2, e122.

Mozaffari, S., Nikfar, S. & Abdollahi, M. (2014) Efficacy and tolerability of renzapride in irritable bowel syndrome: a meta-analysis of randomized, controlled clinical trials including 2528 patients. *Arch Med Sci*, 10, 10-18.

N

Nadler, J.J., Moy, S.S., Dold, G., Trang, D., Simmons, N., Perez, A., Young, N.B., Barbaro, R.P., Piven, J., Magnuson, T.R. & Crawley, J.N. (2004) Automated apparatus for quantitation of social approach behaviors in mice. *Genes Brain Behav*, 3, 303-314.

Nagel, G., Ollig, D., Fuhrmann, M., Kateriya, S., Musti, A.M., Bamberg, E. & Hegemann, P. (2002) Channelrhodopsin-1: a light-gated proton channel in green algae. *Science*, 296, 2395-2398.

Nasehi, M., Farrahizadeh, M., Ebrahimi-Ghiri, M. & Zarrindast, M.R. (2016) Modulation of cannabinoid signaling by hippocampal 5-HT4 serotonergic system in fear conditioning. *J Psychopharmacol*, 30, 936-944.

Nasehi, M., Kafi, F., Khakpai, F. & Zarrindast, M.R. (2015a) Involvement of the serotonergic system of the ventral hippocampus (CA3) on amnesia induced by ACPA in mice. *Behav Brain Res*, 286, 356-363.

Nasehi, M., Tabatabaie, M., Khakpai, F. & Zarrindast, M.R. (2015b) The effects of CA1 5HT4 receptors in MK801-induced amnesia and hyperlocomotion. *Neurosci Lett*, 587, 73-78.

Nash, J.R., Sargent, P.A., Rabiner, E.A., Hood, S.D., Argyropoulos, S.V., Potokar, J.P., Grasby, P.M. & Nutt, D.J. (2008) Serotonin 5-HT1A receptor binding in people with panic disorder: positron emission tomography study. *Br J Psychiatry*, 193, 229-234.

Neumeister, A., Bain, E., Nugent, A.C., Carson, R.E., Bonne, O., Luckenbaugh, D.A., Eckelman, W., Herscovitch, P., Charney, D.S. & Drevets, W.C. (2004) Reduced serotonin type 1A receptor binding in panic disorder. *J Neurosci*, 24, 589-591.

Neumeister, P., Feldker, K., Heitmann, C.Y., Buff, C., Brinkmann, L., Bruchmann, M. & Straube, T. (2018) Specific amygdala response to masked fearful faces in post-traumatic stress relative to other anxiety disorders. *Psychol Med*, 48, 1209-1217.

Nic Dhonnchadha, B.A., Hascoet, M., Jolliet, P. & Bourin, M. (2003) Evidence for a 5-HT2A receptor mode of action in the anxiolytic-like properties of DOI in mice. *Behav Brain Res*, 147, 175-184.

Nirogi, R., Jayarajan, P., Kandikere, V., Rajesh Babu, M., Benade, V., Ramalingayya, G., Manjunath, L., Ponnamaneni, R., Rasheed, M., Mulla, M., Yarlagadda, S., Srinivasa Rao, R. (2012) SUVN-D1104010: novel 5-ht4 receptor partial agonist for the treatment of Alzheimer's disease. Alzheimer's & Dementia, pp. 399.

Noble, L.J., Meruva, V.B., Hays, S.A., Rennaker, R.L., Kilgard, M.P. & McIntyre, C.K. (2019) Vagus nerve stimulation promotes generalization of conditioned fear extinction and reduces anxiety in rats. *Brain Stimul*, 12, 9-18.

Nutt, D.J. & Malizia, A.L. (2001) New insights into the role of the GABA(A)-benzodiazepine receptor in psychiatric disorder. *Br J Psychiatry*, 179, 390-396.

O

Oesterhelt, D. & Stoeckenius, W. (1971) Rhodopsin-like protein from the purple membrane of Halobacterium halobium. *Nat New Biol*, 233, 149-152.

Ohtsuki, T., Ishiguro, H., Detera-Wadleigh, S.D., Toyota, T., Shimizu, H., Yamada, K., Yoshitsugu, K., Hattori, E., Yoshikawa, T. & Arinami, T. (2002) Association between serotonin 4 receptor gene polymorphisms and bipolar disorder in Japanese case-control samples and the NIMH Genetics Initiative Bipolar Pedigrees. *Mol Psychiatry*, 7, 954-961.

Olivier, B., van Wijngaarden, I. & Soudijn, W. (2000) 5-HT(3) receptor antagonists and anxiety; a preclinical and clinical review. *Eur Neuropsychopharmacol*, 10, 77-95.

Olivier, J.D., Vinkers, C.H. & Olivier, B. (2013) The role of the serotonergic and GABA system in translational approaches in drug discovery for anxiety disorders. *Front Pharmacol*, 4, 74.

Olsen RW, D.T. (1999) GABA Synthesis, Uptake and Release. In Siegel GJ, A.B., Albers RW, et al., editors (ed) *Basic Neurochemistry: Molecular, Cellular and Medical Aspects*. Philadelphia: Lippincott-Raven.

Onaivi, E.S., Bishop-Robinson, C., Darmani, N.A. & Sanders-Bush, E. (1995) Behavioral effects of (+/-)-1-(2,5-dimethoxy-4-iodophenyl)-2-aminopropane, (DOI) in the elevated plus-maze test. *Life Sci*, 57, 2455-2466.

Orsetti, M., Dellarole, A., Ferri, S. & Ghi, P. (2003) Acquisition, retention, and recall of memory after injection of RS67333, a 5-HT(4) receptor agonist, into the nucleus basalis magnocellularis

of the rat. *Learn Mem*, 10, 420-426.

P

Padilla-Coreano, N., Bolkan, S.S., Pierce, G.M., Blackman, D.R., Hardin, W.D., Garcia-Garcia, A.L., Spellman, T.J. & Gordon, J.A. (2016) Direct Ventral Hippocampal-Prefrontal Input Is Required for Anxiety-Related Neural Activity and Behavior. *Neuron*, 89, 857-866.

Pae, C.U., Wang, S.M., Han, C., Lee, S.J., Patkar, A.A., Masand, P.S. & Serretti, A. (2015) Vortioxetine, a multimodal antidepressant for generalized anxiety disorder: a systematic review and meta-analysis. *J Psychiatr Res*, 64, 88-98.

Pallanti, S. & Bernardi, S. (2009) Neurobiology of repeated transcranial magnetic stimulation in the treatment of anxiety: a critical review. *Int Clin Psychopharmacol*, 24, 163-173.

Pascual-Brazo, J., Castro, E., Diaz, A., Valdizan, E.M., Pilar-Cuellar, F., Vidal, R., Treceno, B. & Pazos, A. (2012) Modulation of neuroplasticity pathways and antidepressant-like behavioural responses following the short-term (3 and 7 days) administration of the 5-HT(4) receptor agonist RS67333. *Int J Neuropsychopharmacol*, 15, 631-643.

Paulesu, E., Sambugaro, E., Torti, T., Danelli, L., Ferri, F., Scialfa, G., Sberna, M., Ruggiero, G.M., Bottini, G. & Sassaroli, S. (2010) Neural correlates of worry in generalized anxiety disorder and in normal controls: a functional MRI study. *Psychol Med*, 40, 117-124.

Paxinos, G., Franklin, K. (2007) *Paxinos and Franklin's the Mouse Brain in Stereotaxic Coordinates*. A. Press.

Pellow, S., Chopin, P., File, S.E. & Briley, M. (1985) Validation of open:closed arm entries in an elevated plus-maze as a measure of anxiety in the rat. *J Neurosci Methods*, 14, 149-167.

Penas-Cazorla, R. & Vilaro, M.T. (2015) Serotonin 5-HT4 receptors and forebrain cholinergic system: receptor expression in identified cell populations. *Brain Struct Funct*, 220, 3413-3434.

Pentkowski, N.S., Blanchard, D.C., Lever, C., Litvin, Y. & Blanchard, R.J. (2006) Effects of lesions to the dorsal and ventral hippocampus on defensive behaviors in rats. *Eur J Neurosci*, 23, 2185-2196.

Petit-Demouliere, B., Masse, F., Cogrel, N., Hascoet, M. & Bourin, M. (2009) Brain structures implicated in the four-plate test in naive and experienced Swiss mice using injection of diazepam and the 5-HT2A agonist DOI. *Behav Brain Res*, 204, 200-205.

Pham, T.H., Mendez-David, I., Defaix, C., Guiard, B.P., Tritschler, L., David, D.J. & Gardier, A.M. (2017) Ketamine treatment involves medial prefrontal cortex serotonin to induce a rapid antidepressant-like activity in BALB/cJ mice. *Neuropharmacology*, 112, 198-209.

Phillips, M.L., Young, A.W., Scott, S.K., Calder, A.J., Andrew, C., Giampietro, V., Williams, S.C., Bullmore, E.T., Brammer, M. & Gray, J.A. (1998) Neural responses to facial and vocal expressions of fear and disgust. *Proc Biol Sci*, 265, 1809-1817.

Pillay, S.S., Gruber, S.A., Rogowska, J., Simpson, N. & Yurgelun-Todd, D.A. (2006) fMRI of fearful facial affect recognition in panic disorder: the cingulate gyrus-amygdala connection. *J Affect Disord*, 94, 173-181.

Pollack, M.H., Lepola, U., Koponen, H., Simon, N.M., Worthington, J.J., Emilien, G., Tzanis, E., Salinas, E., Whitaker, T. & Gao, B. (2007) A double-blind study of the efficacy of venlafaxine extended-release, paroxetine, and placebo in the treatment of panic disorder. *Depress Anxiety*, 24, 1-14.

Prinssen, E.P., Nicolas, L.B., Klein, S., Grundschober, C., Lopez-Lopez, C., Kessler, M.S., Bruns, A., von Kienlin, M., Wettstein, J.G., Moreau, J.L. & Risterucci, C. (2012) Imaging trait anxiety in high anxiety F344 rats: Focus on the dorsomedial prefrontal cortex. *Eur Neuropsychopharmacol*, 22, 441-451.

Pritchett, D.B., Luddens, H. & Seeburg, P.H. (1989) Type I and type II GABAA-benzodiazepine receptors produced in transfected cells. *Science*, 245, 1389-1392.

Q

Quesseveur, G., Nguyen, H.T., Gardier, A.M. & Guiard, B.P. (2012) 5-HT2 ligands in the treatment of anxiety and depression. *Expert Opin Investig Drugs*, 21, 1701-1725.

R

Rainer, Q., Xia, L., Guilloux, J.P., Gabriel, C., Mocaer, E., Hen, R., Enhamre, E., Gardier, A.M. & David, D.J. (2012) Beneficial behavioural and neurogenic effects of agomelatine in a model of depression/anxiety. *Int J Neuropsychopharmacol*, 15, 321-335.

Ramboz, S., Oosting, R., Amara, D.A., Kung, H.F., Blier, P., Mendelsohn, M., Mann, J.J., Brunner, D. & Hen, R. (1998) Serotonin receptor 1A knockout: an animal model of anxiety-related disorder. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 95, 14476-14481.

Rang, P., Dale, M., & Ritter, M. (2001) Other peripheral mediators: 5-hydroxytryptamine and purines. *Pharmacology*. Harcourt Publishers Ltd, Edinburgh, UK, pp. 165-176.

Ranjbar, H., Radahmadi, M., Reisi, P. & Alaei, H. (2017) Effects of electrical lesion of basolateral amygdala nucleus on rat anxiety-like behaviour under acute, sub-chronic, and chronic stresses. *Clin Exp Pharmacol Physiol*, 44, 470-479.

Richardson-Jones, J.W., Craige, C.P., Nguyen, T.H., Kung, H.F., Gardier, A.M., Dranovsky, A., David, D.J., Guiard, B.P., Beck, S.G., Hen, R. & Leonardo, E.D. (2011) Serotonin-1A

autoreceptors are necessary and sufficient for the normal formation of circuits underlying innate anxiety. *J Neurosci*, 31, 6008-6018.

Rickels, K., Downing, R., Schweizer, E. & Hassman, H. (1993) Antidepressants for the treatment of generalized anxiety disorder. A placebo-controlled comparison of imipramine, trazodone, and diazepam. *Arch Gen Psychiatry*, 50, 884-895.

Rocca, P., Fonzo, V., Scotta, M., Zanalda, E. & Ravizza, L. (1997) Paroxetine efficacy in the treatment of generalized anxiety disorder. *Acta Psychiatr Scand*, 95, 444-450.

Rosel, P., Arranz, B., Urretavizcaya, M., Oros, M., San, L. & Navarro, M.A. (2004) Altered 5-HT2A and 5-HT4 postsynaptic receptors and their intracellular signalling systems IP3 and cAMP in brains from depressed violent suicide victims. *Neuropsychobiology*, 49, 189-195.

Roshanaei-Moghaddam, B., Pauly, M.C., Atkins, D.C., Baldwin, S.A., Stein, M.B. & Roy-Byrne, P. (2011) Relative effects of CBT and pharmacotherapy in depression versus anxiety: is medication somewhat better for depression, and CBT somewhat better for anxiety? *Depress Anxiety*, 28, 560-567.

Roth, B.L., Gibbons, S., Arunotayanun, W., Huang, X.P., Setola, V., Treble, R. & Iversen, L. (2013) The ketamine analogue methoxetamine and 3- and 4-methoxy analogues of phencyclidine are high affinity and selective ligands for the glutamate NMDA receptor. *PLoS One*, 8, e59334.

Roychowdhury, S., Haas, H. & Anderson, E.G. (1994) 5-HT1A and 5-HT4 receptor colocalization on hippocampal pyramidal cells. *Neuropharmacology*, 33, 551-557.

Ruck, C., Andreewitch, S., Flyckt, K., Edman, G., Nyman, H., Meyerson, B.A., Lippitz, B.E., Hindmarsh, T., Svanborg, P., Mindus, P. & Asberg, M. (2003) Capsulotomy for refractory anxiety disorders: long-term follow-up of 26 patients. *Am J Psychiatry*, 160, 513-521.

S

Salim, S., Chugh, G. & Asghar, M. (2012) Inflammation in anxiety. *Adv Protein Chem Struct Biol*, 88, 1-25.

Samuels, B.A., Mendez-David, I., Faye, C., David, S.A., Pierz, K.A., Gardier, A.M., Hen, R. & David, D.J. (2016) Serotonin 1A and Serotonin 4 Receptors: Essential Mediators of the Neurogenic and Behavioral Actions of Antidepressants. *Neuroscientist*, 22, 26-45.

Santarelli, L., Saxe, M., Gross, C., Surget, A., Battaglia, F., Dulawa, S., Weisstaub, N., Lee, J., Duman, R., Arancio, O., Belzung, C. & Hen, R. (2003) Requirement of hippocampal neurogenesis for the behavioral effects of antidepressants. *Science*, 301, 805-809.

santé, A.N.d.S.d.M.e.d.p.d. (2013) État des lieux 2013 de la consommation des benzodiazepines en France.

santé, O.m.d.l. (2018) *Classification internationale des maladies*.

Schiavi, G.B., Brunet, S., Rizzi, C.A. & Ladinsky, H. (1994) Identification of serotonin 5-HT4 recognition sites in the porcine caudate nucleus by radioligand binding. *Neuropharmacology*, 33, 543-549.

Schienle, A., Schafer, A., Hermann, A., Rohrmann, S. & Vaitl, D. (2007) Symptom provocation and reduction in patients suffering from spider phobia: an fMRI study on exposure therapy. *Eur Arch Psychiatry Clin Neurosci*, 257, 486-493.

Schmidt, E.F., Warner-Schmidt, J.L., Otopalik, B.G., Pickett, S.B., Greengard, P. & Heintz, N. (2012) Identification of the cortical neurons that mediate antidepressant responses. *Cell*, 149, 1152-1163.

Schmuckermair, C., Gaburro, S., Sah, A., Landgraf, R., Sartori, S.B. & Singewald, N. (2013) Behavioral and neurobiological effects of deep brain stimulation in a mouse model of high anxiety- and depression-like behavior. *Neuropsychopharmacology*, 38, 1234-1244.

Schreiber, R., Melon, C. & De Vry, J. (1998) The role of 5-HT receptor subtypes in the anxiolytic effects of selective serotonin reuptake inhibitors in the rat ultrasonic vocalization test. *Psychopharmacology (Berl)*, 135, 383-391.

Seo, C., Guru, A., Jin, M., Ito, B., Sleezer, B., Ho, Y.Y., Wang, E., Boada, C., Krupa, N.A., Kullakanda, D.S., Shen, C. & Warden, M.R. (2019) Intense threat switches dorsal raphe serotonin neurons to a paradoxical operational mode. *Science*, 363, 538-542.

Shah, A. & Northcutt, J. (2018) An open-label, flexible dose adaptive study evaluating the efficacy of vortioxetine in subjects with panic disorder. *Ann Gen Psychiatry*, 17, 19.

Shah, A.A., Sjovold, T. & Treit, D. (2004) Inactivation of the medial prefrontal cortex with the GABAA receptor agonist muscimol increases open-arm activity in the elevated plus-maze and attenuates shock-probe burying in rats. *Brain Res*, 1028, 112-115.

Shah, A.A. & Treit, D. (2003) Excitotoxic lesions of the medial prefrontal cortex attenuate fear responses in the elevated-plus maze, social interaction and shock probe burying tests. *Brain Res*, 969, 183-194.

Shah, A.A. & Treit, D. (2004) Infusions of midazolam into the medial prefrontal cortex produce anxiolytic effects in the elevated plus-maze and shock-probe burying tests. *Brain Res*, 996, 31-40.

Shen, F., Smith, J.A., Chang, R., Bourdet, D.L., Tsuruda, P.R., Obedencio, G.P. & Beattie, D.T. (2011) 5-HT(4) receptor agonist mediated enhancement of cognitive function in vivo and amyloid precursor protein processing in vitro: A pharmacodynamic and pharmacokinetic assessment. *Neuropharmacology*, 61, 69-79.

Shimizu, T., Minami, C. & Mitani, A. (2018) Effect of electrical stimulation of the infralimbic and prelimbic cortices on anxiolytic-like behavior of rats during the elevated plus-maze test, with particular reference to multiunit recording of the behavior-associated neural activity. *Behav Brain Res*, 353, 168-175.

Shin, L.M. & Liberzon, I. (2010) The neurocircuitry of fear, stress, and anxiety disorders. *Neuropsychopharmacology*, 35, 169-191.

Silvestre, J.S., Fernandez, A.G. & Palacios, J.M. (1996) Effects of 5-HT4 receptor antagonists on rat behaviour in the elevated plus-maze test. *Eur J Pharmacol*, 309, 219-222.

Solati, J., Salari, A.A. & Bakhtiari, A. (2011) 5HT(1A) and 5HT(1B) receptors of medial prefrontal cortex modulate anxiogenic-like behaviors in rats. *Neurosci Lett*, 504, 325-329.

Souery, D., Oswald, P., Massat, I., Bailer, U., Bollen, J., Demyttenaere, K., Kasper, S., Lecrubier, Y., Montgomery, S., Serretti, A., Zohar, J., Mendlewicz, J. & Group for the Study of Resistant, D. (2007) Clinical factors associated with treatment resistance in major depressive disorder: results from a European multicenter study. *J Clin Psychiatry*, 68, 1062-1070.

Spadone, C. (2008) [Cognitive and clinical remission of depression]. *Encephale*, 34, 211-213.

Sparta, D.R., Stamatakis, A.M., Phillips, J.L., Hovelso, N., van Zessen, R. & Stuber, G.D. (2011) Construction of implantable optical fibers for long-term optogenetic manipulation of neural circuits. *Nat Protoc*, 7, 12-23.

Sramek, J.J., Zarotsky, V. & Cutler, N.R. (2002) Generalised anxiety disorder: treatment options. *Drugs*, 62, 1635-1648.

Stahl, S.M. (2013) *Stahl's Essential Psychopharmacology: Neuroscientific Basis and Practical Application*. Cambridge University Press, United States of America.

Steimer, T. (2002) The biology of fear- and anxiety-related behaviors. *Dialogues Clin Neurosci*, 4, 231-249.

Stern, C.A., Do Monte, F.H., Gazarini, L., Carobrez, A.P. & Bertoglio, L.J. (2010) Activity in prelimbic cortex is required for adjusting the anxiety response level during the elevated plus-maze retest. *Neuroscience*, 170, 214-222.

Straube, T., Mentzel, H.J. & Miltner, W.H. (2007) Waiting for spiders: brain activation during anticipatory anxiety in spider phobics. *Neuroimage*, 37, 1427-1436.

Straube, T., Schmidt, S., Weiss, T., Mentzel, H.J. & Miltner, W.H. (2009) Dynamic activation of the anterior cingulate cortex during anticipatory anxiety. *Neuroimage*, 44, 975-981.

Strauss, C.V., Vicente, M.A. & Zangrossi, H., Jr. (2013) Activation of 5-HT1A receptors in the rat basolateral amygdala induces both anxiolytic and antipanic-like effects. *Behav Brain Res*, 246, 103-110.

Sullivan, R.M. & Gratton, A. (2002) Behavioral effects of excitotoxic lesions of ventral medial prefrontal cortex in the rat are hemisphere-dependent. *Brain Res*, 927, 69-79.

Surget, A., Saxe, M., Leman, S., Ibarguen-Vargas, Y., Chalon, S., Griebel, G., Hen, R. & Belzung, C. (2008) Drug-dependent requirement of hippocampal neurogenesis in a model of depression and of antidepressant reversal. *Biol Psychiatry*, 64, 293-301.

T

Teissier, A., Chemiakine, A., Inbar, B., Bagchi, S., Ray, R.S., Palmiter, R.D., Dymecki, S.M., Moore, H. & Ansorge, M.S. (2015) Activity of Raphe Serotonergic Neurons Controls Emotional Behaviors. *Cell Rep*, 13, 1965-1976.

Thase, M.E., Chen, D., Edwards, J. & Ruth, A. (2014) Efficacy of vilazodone on anxiety symptoms in patients with major depressive disorder. *Int Clin Psychopharmacol*, 29, 351-356.

Thiebot, M.H., Soubrie, P., Hamon, M. & Simon, P. (1984) Evidence against the involvement of serotonergic neurons in the anti-punishment activity of diazepam in the rat. *Psychopharmacology (Berl)*, 82, 355-359.

Tiihonen, J., Kuikka, J., Rasanen, P., Lepola, U., Koponen, H., Liuska, A., Lehmusvaara, A., Vainio, P., Kononen, M., Bergstrom, K., Yu, M., Kinnunen, I., Akerman, K. & Karhu, J. (1997) Cerebral benzodiazepine receptor binding and distribution in generalized anxiety disorder: a fractal analysis. *Mol Psychiatry*, 2, 463-471.

Toghanian, S., Dibonaventura, M., Jarbrink, K. & Locklear, J.C. (2014) Economic and humanistic burden of illness in generalized anxiety disorder: an analysis of patient survey data in Europe. *Clinicoecon Outcomes Res*, 6, 151-163.

Toni, N. & Schinder, A.F. (2015) Maturation and Functional Integration of New Granule Cells into the Adult Hippocampus. *Cold Spring Harb Perspect Biol*, 8, a018903.

Tripathi, S.J., Chakraborty, S., Srikumar, B.N., Raju, T.R. & Shankaranarayana Rao, B.S. (2019) Basolateral amygdalar inactivation blocks chronic stress-induced lamina-specific reduction in prefrontal cortex volume and associated anxiety-like behavior. *Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry*, 88, 194-207.

Trzesniak, C., Uchida, R.R., Araujo, D., Guimaraes, F.S., Freitas-Ferrari, M.C., Filho, A.S., Santos, A.C., Busatto, G.F., Zuardi, A.W., Del-Ben, C.M., Graeff, F.G. & Crippa, J.A. (2010) (1)H magnetic resonance spectroscopy imaging of the hippocampus in patients with panic disorder. *Psychiatry Res*, 182, 261-265.

Tye, K.M., Prakash, R., Kim, S.Y., Fenno, L.E., Grosenick, L., Zarabi, H., Thompson, K.R., Gradinaru, V., Ramakrishnan, C. & Deisseroth, K. (2011) Amygdala circuitry mediating reversible and bidirectional control of anxiety. *Nature*, 471, 358-362.

V

van den Heuvel, O.A., Veltman, D.J., Groenewegen, H.J., Witter, M.P., Merkelbach, J., Cath, D.C., van Balkom, A.J., van Oppen, P. & van Dyck, R. (2005) Disorder-specific neuroanatomical correlates of attentional bias in obsessive-compulsive disorder, panic disorder, and hypochondriasis. *Arch Gen Psychiatry*, 62, 922-933.

van Dijk, A., Klanker, M., van Oorschot, N., Post, R., Hamelink, R., Feenstra, M.G. & Denys, D. (2013) Deep brain stimulation affects conditioned and unconditioned anxiety in different brain areas. *Transl Psychiatry*, 3, e289.

Varnas, K., Halldin, C., Pike, V.W. & Hall, H. (2003) Distribution of 5-HT4 receptors in the postmortem human brain--an autoradiographic study using [125I]SB 207710. *Eur Neuropsychopharmacol*, 13, 228-234.

Veerakumar, A., Challis, C., Gupta, P., Da, J., Upadhyay, A., Beck, S.G. & Berton, O. (2014) Antidepressant-like effects of cortical deep brain stimulation coincide with pro-neuroplastic adaptations of serotonin systems. *Biol Psychiatry*, 76, 203-212.

Ventura-Silva, A.P., Melo, A., Ferreira, A.C., Carvalho, M.M., Campos, F.L., Sousa, N. & Pego, J.M. (2013) Excitotoxic lesions in the central nucleus of the amygdala attenuate stress-induced anxiety behavior. *Front Behav Neurosci*, 7, 32.

Via, E., Fullana, M.A., Goldberg, X., Tinoco-Gonzalez, D., Martinez-Zalacain, I., Soriano-Mas, C., Davey, C.G., Menchon, J.M., Straube, B., Kircher, T., Pujol, J., Cardoner, N. & Harrison, B.J. (2018) Ventromedial prefrontal cortex activity and pathological worry in generalised anxiety disorder. *Br J Psychiatry*, 213, 437-443.

Vialou, V., Bagot, R.C., Cahill, M.E., Ferguson, D., Robison, A.J., Dietz, D.M., Fallon, B., Mazei-Robison, M., Ku, S.M., Harrigan, E., Winstanley, C.A., Joshi, T., Feng, J., Berton, O. & Nestler, E.J. (2014) Prefrontal cortical circuit for depression- and anxiety-related behaviors mediated by cholecystokinin: role of DeltaFosB. *J Neurosci*, 34, 3878-3887.

Vialou, V., Robison, A.J., Laplant, Q.C., Covington, H.E., 3rd, Dietz, D.M., Ohnishi, Y.N., Mouzon, E., Rush, A.J., 3rd, Watts, E.L., Wallace, D.L., Iniguez, S.D., Ohnishi, Y.H., Steiner, M.A., Warren, B.L., Krishnan, V., Bolanos, C.A., Neve, R.L., Ghose, S., Berton, O., Tamminga, C.A. & Nestler, E.J. (2010) DeltaFosB in brain reward circuits mediates resilience to stress and antidepressant responses. *Nat Neurosci*, 13, 745-752.

Vidal, D. (2015).

Vilaro, M.T., Cortes, R. & Mengod, G. (2005) Serotonin 5-HT4 receptors and their mRNAs in rat and guinea pig brain: distribution and effects of neurotoxic lesions. *J Comp Neurol*, 484, 418-439.

Vogel, J.R., Beer, B. & Clody, D.E. (1971) A simple and reliable conflict procedure for testing anti-anxiety agents. *Psychopharmacologia*, 21, 1-7.

W

Waeber, C., Sebben, M., Grossman, C., Javoy-Agid, F., Bockaert, J. & Dumuis, A. (1993) [3H]-GR113808 labels 5-HT4 receptors in the human and guinea-pig brain. *Neuroreport*, 4, 1239-1242.

Waeber, C., Sebben, M., Nieoullon, A., Bockaert, J. & Dumuis, A. (1994) Regional distribution and ontogeny of 5-HT4 binding sites in rodent brain. *Neuropharmacology*, 33, 527-541.

Warden, M.R., Selimbeyoglu, A., Mirzabekov, J.J., Lo, M., Thompson, K.R., Kim, S.Y., Adhikari, A., Tye, K.M., Frank, L.M. & Deisseroth, K. (2012) A prefrontal cortex-brainstem neuronal projection that controls response to behavioural challenge. *Nature*, 492, 428-432.

Weissbourd, B., Ren, J., DeLoach, K.E., Guenthner, C.J., Miyamichi, K. & Luo, L. (2014) Presynaptic partners of dorsal raphe serotonergic and GABAergic neurons. *Neuron*, 83, 645-662.

Weisstaub, N.V., Zhou, M., Lira, A., Lambe, E., Gonzalez-Maeso, J., Hornung, J.P., Sibille, E., Underwood, M., Itohara, S., Dauer, W.T., Ansorge, M.S., Morelli, E., Mann, J.J., Toth, M., Aghajanian, G., Sealfon, S.C., Hen, R. & Gingrich, J.A. (2006) Cortical 5-HT2A receptor signaling modulates anxiety-like behaviors in mice. *Science*, 313, 536-540.

Wesolowska, A. & Nikiforuk, A. (2007) Effects of the brain-penetrant and selective 5-HT6 receptor antagonist SB-399885 in animal models of anxiety and depression. *Neuropharmacology*, 52, 1274-1283.

West, E.D. & Dally, P.J. (1959) Effects of iproniazid in depressive syndromes. *Br Med J*, 1, 1491-1494.

Whalen, P.J., Shin, L.M., McInerney, S.C., Fischer, H., Wright, C.I. & Rauch, S.L. (2001) A functional MRI study of human amygdala responses to facial expressions of fear versus anger. *Emotion*, 1, 70-83.

Wittchen, H.U., Jacobi, F., Rehm, J., Gustavsson, A., Svensson, M., Jonsson, B., Olesen, J., Allgulander, C., Alonso, J., Faravelli, C., Fratiglioni, L., Jennum, P., Lieb, R., Maercker, A., van Os, J., Preisig, M., Salvador-Carulla, L., Simon, R. & Steinhausen, H.C. (2011) The size and burden of mental disorders and other disorders of the brain in Europe 2010. *Eur Neuropsychopharmacol*, 21, 655-679.

Wittchen, H.U., Kessler, R.C., Pfister, H. & Lieb, M. (2000) Why do people with anxiety disorders become depressed? A prospective-longitudinal community study. *Acta Psychiatr Scand Suppl*, 14-23.

Wong, D.T., Perry, K.W. & Bymaster, F.P. (2005) Case history: the discovery of fluoxetine hydrochloride (Prozac). *Nat Rev Drug Discov*, 4, 764-774.

Wright, I.K., Upton, N. & Marsden, C.A. (1992) Effect of established and putative anxiolytics on extracellular 5-HT and 5-HIAA in the ventral hippocampus of rats during behaviour on the elevated X-maze. *Psychopharmacology (Berl)*, 109, 338-346.

Wscieklica, T., Silva, M., Lemes, J.A., Melo-Thomas, L., Cespedes, I.C. & Viana, M.B. (2017) Deep brain stimulation of the dorsal raphe inhibits avoidance and escape reactions and activates forebrain regions related to the modulation of anxiety/panic. *Behav Brain Res*, 321, 193-200.

Wu, J.C., Buchsbaum, M.S., Hershey, T.G., Hazlett, E., Sicotte, N. & Johnson, J.C. (1991) PET in generalized anxiety disorder. *Biol Psychiatry*, 29, 1181-1199.

Y

Yahiaoui, S., Hamidouche, K., Ballandonne, C., Davis, A., de Oliveira Santos, J.S., Freret, T., Boulouard, M., Rochais, C. & Dallemagne, P. (2016) Design, synthesis, and pharmacological evaluation of multitarget-directed ligands with both serotonergic subtype 4 receptor (5-HT4R) partial agonist and 5-HT6R antagonist activities, as potential treatment of Alzheimer's disease. *Eur J Med Chem*, 121, 283-293.

Yee, A., Ng, C.G. & Seng, L.H. (2018) Vortioxetine Treatment for Anxiety Disorder: A Meta-Analysis Study. *Curr Drug Targets*, 19, 1412-1423.

Yizhar, O., Fenno, L.E., Davidson, T.J., Mogri, M. & Deisseroth, K. (2011) Optogenetics in neural systems. *Neuron*, 71, 9-34.

Z

Zarrindast, M.R., Solati, J., Oryan, S. & Parivar, K. (2008) Effect of intra-amygdala injection of nicotine and GABA receptor agents on anxiety-like behaviour in rats. *Pharmacology*, 82, 276-284.

Zhang, X., Beaulieu, J.M., Sotnikova, T.D., Gainetdinov, R.R. & Caron, M.G. (2004) Tryptophan hydroxylase-2 controls brain serotonin synthesis. *Science*, 305, 217.

Titre : Rôle du récepteur sérotoninergique de type 4 dans le traitement rapide et prophylactique de l'anxiété : implication du circuit cortex-raphé.

Mots clés : anxiété, récepteur 5-HT_4, optogénétique, cortex préfrontal, noyau du raphé dorsal, résilience

Résumé : les benzodiazépines (BZD) et les antidépresseurs sont efficaces pour réduire l'anxiété, mais devant les effets indésirables que les BZD induisent et face au délai d'action des antidépresseurs, le développement de nouvelles stratégies constitue un besoin primordial. Récemment, il a été montré que l'activation du récepteur 5-HT_4 (5-HT_4R) pouvait représenter une cible d'action prometteuse. Bien qu'un certain nombre d'études ait évalué l'activité anxiolytique des agonistes du 5-HT_4R, après une administration chronique, aucune étude n'a examiné leurs effets après une administration unique, ni même le circuit cérébral à la base de cette réponse comportementale. Nous avons donc cherché à savoir si l'activation aiguë du 5-HT_4R via le recrutement des terminaisons neuronales glutamatergiques du cortex préfrontal médian (CPF_m) se projetant sur le noyau du raphé dorsal (NRD), un circuit impliqué dans les processus émotionnels, induisait des effets anxiolytiques rapides, grâce à des outils pharmacologiques, électrophysiologiques et optogénétiques. L'administration unique par voie systémique ou intra-CPF_m d'un agoniste du 5-HT_4R a produit des effets anxiolytiques rapides chez la souris, associés à une augmentation de l'activité des neurones sérotoninergiques du NRD. L'activation des projections glutamatergiques du CPF_m vers le NRD a permis de réduire l'anxiété des souris, alors que l'inhibition de ces projections a bloqué les effets anxiolytiques induits par l'injection unique intra-CPF_m d'une BZD (diazépam) ou d'un agoniste du 5-HT_4R (RS 67333). Toutefois, ces effets ne sont que partiellement bloqués après l'administration par voie systémique de ces composés, suggérant que le circuit cortex-raphé est un carrefour nécessaire mais non suffisant à l'activité anxiolytique du diazépam et du RS 67333. Enfin, l'administration prophylactique d'un agoniste du 5-HT_4R avant l'induction d'un stress a prévenu le développement d'un phénotype anxio-dépressif chez la souris, laissant penser que cette molécule pourrait renforcer la résilience au stress des populations à risque.

Title : Role of serotonin type 4 receptor in rapid and prophylactic treatment of anxiety: involvement of the cortex-brainstem neural circuit.

Keywords : anxiety, 5-HT_4 receptor, optogenetic, prefrontal cortex, dorsal raphe nucleus, resilience

Abstract : benzodiazepines (BZD) and antidepressants are effective in reducing anxiety, but adverse effects of BZD and the delayed onset of action of antidepressants emphasize the need to develop fast-acting new drugs. Recent studies indicated that activation of 5-HT_4 receptor (5-HT_4R) could be a promising target. Although a number of studies have assessed 5-HT_4R agonist anxiolytic activity after chronic treatment, few of them have neither evaluated their anxiolytic profile acutely, neither the brain circuits involved in this behavioral activity. Here, we evaluated whether acute 5-HT_4R activation in glutamatergic axon terminals arising from the medial prefrontal cortex (mPFC) to the dorsal raphe nucleus (DRN), a circuit involved in emotional processes, induced fast anxiolytic effects, using pharmacologic, electrophysiologic and optogenetic tools. Acute systemic administration and intra-mPFC infusion of 5-HT_4R produced fast anxiolytic effects in mice and increased DRN serotonin cell firing. Optogenetically activating mPFC terminals targeting the DRN reduced anxiety in mice whereas silencing this circuit blocked BZD (diazepam) and 5-HT_4R agonist (RS 67333) mPFC infusion -induced anxiolytic effects. However, anxiolytic effects induced by an acute systemic administration of both molecules were partially blocked after optogenetically inhibiting cortical glutamatergic terminals in the DRN, suggesting that cortex-brainstem neural circuit is necessary but not sufficient for a rapid activity of diazepam and RS 67333. Finally, the prophylactic administration of a 5-HT_4R agonist before stress prevented the development of an anxio-depressive phenotype in mice, suggesting that this molecule could reinforce the resilience of population at risk.

Université Paris-Saclay
Espace Technologique / Immeuble Discovery
Route de l'Orme aux Merisiers RD 128 / 91190 Saint-Aubin, France