



HAL
open science

Contribution des jeunes neurones dans les neurotransmissions dans l'hippocampe après un traitement chronique avec la fluoxétine

Julie Doan

► **To cite this version:**

Julie Doan. Contribution des jeunes neurones dans les neurotransmissions dans l'hippocampe après un traitement chronique avec la fluoxétine. Pharmacologie. Université Paris-Saclay, 2020. Français. NNT : 2020UPASQ023 . tel-03218030

HAL Id: tel-03218030

<https://theses.hal.science/tel-03218030>

Submitted on 5 May 2021

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.

Contribution des jeunes neurones dans les neurotransmissions dans l'hippocampe après un traitement chronique avec la fluoxétine

Thèse de doctorat de l'université Paris-Saclay

École doctorale n° 569, innovation thérapeutique : du fondamental à l'appliqué
(ITFA)

Spécialité de doctorat : Sciences pharmacologiques

Unité de recherche : Université Paris-Saclay, UVSQ, Inserm, CESP, 94807, Villejuif,
France.

Référent : Faculté de pharmacie

Thèse présentée et soutenue à Châtenay-Malabry,
le 16 décembre 2020 par

Julie DOAN

Composition du Jury

Pr Luc ZIMMER Professeur, Univ. Claude Bernard Lyon 1	Président
Pr Michel VIGNES Professeur, Univ. Montpellier 2	Rapporteur & Examineur
Dr Stéphanie DAUMAS Maitre de conférences, Sorbonne Univ.	Rapporteur & Examinatrice
Dr Bernard VIGUÉ PH, CHU Bicêtre, Univ. Paris-Saclay	Examineur
Pr Alain GARDIER Professeur, Univ. Paris-Saclay	Directeur de thèse
Dr Laurent TRITSCHLER Maitre de conférences, Univ. Paris-Saclay	Co-Directeur de thèse

Remerciements

✚ Aux membres du jury,

Je remercie **Monsieur le Professeur Luc Zimmer** d'avoir si gentiment accepté de présider ce jury de thèse. Je tiens à remercier **Madame le Docteur Stéphanie Daumas** et **Monsieur le Professeur Michel Vignes** d'avoir accepté d'évaluer et juger mon travail de thèse, en qualité de rapporteurs. Je remercie **Monsieur le Docteur Bernard Vigué** d'avoir également pris le temps pour examiner mon travail de thèse.

✚ À Monsieur le Professeur Alain Gardier,

Merci de m'avoir accueillie au sein de votre laboratoire dès mon Master 2. Je vous adresse mes remerciements les plus sincères pour l'implication que vous avez porté dans mon travail de thèse. Merci pour vos encouragements et votre encadrement lorsque les résultats attendus n'étaient pas là. Merci de m'avoir toujours fait bénéficier de votre expérience et de m'avoir prodiguée vos sages conseils avec beaucoup de pédagogie.

✚ À Monsieur le Docteur Laurent Tritschler,

Je tiens particulièrement et chaleureusement à te remercier pour avoir supervisé ce travail de thèse durant ces 4 dernières années. J'ai énormément appris à tes côtés, notamment grâce à ton expertise des techniques de microdialyse et d'optogénétique. Merci d'avoir été si accessible et compréhensif (notamment malgré mes quelques TOC de propreté !). Tu as toujours été disponible pour m'aider que ce soit pour m'aider pour une manip ou pour vérifier avec moi de simples conversions (pas toujours si simples). Tu m'as également aidée à développer un esprit critique. Tu as su garder ton enthousiasme malgré les nombreuses embûches que nous avons pu rencontrer tout au long de ce projet. Je t'adresse toute ma gratitude pour la bienveillance que tu as eue à mon égard, tu as toujours pensé à ce qui était le mieux pour moi et à ce qui était important pour moi.

✚ À Monsieur le Professeur Denis David,

Merci de ta disponibilité, de ton implication et de ton aide tout au long de mon travail. Tu m'as enseignée la rigueur et l'organisation nécessaires afin de bien mener les tests

comportementaux. Tu m'as également fait bénéficier de ta précieuse expertise scientifique afin de mener à bien mon projet.

 **À Monsieur le Docteur Jean-Philippe Guilloux,**

Merci de m'avoir permise de m'initier au monde de la Recherche au cours de mes deux stages au sein du laboratoire. Ces premiers stages en neuropharmacologie ont largement influencé mon envie de continuer mon parcours par cette thèse. Merci d'avoir encore été disponible pour moi durant ces années de thèse afin de me conseiller et de m'aider dans mes travaux de recherche, notamment durant ces quelques semaines où je t'ai beaucoup sollicité pour les manips de biologie moléculaire.

 **Aux membres du laboratoire,**

Céline, merci d'avoir contribué à rendre le quotidien meilleur durant ces 4 années. Tu m'as apportée ton aide considérable tout au long de mon projet, pour le dosage de mes échantillons de microdialyse, pour me remplacer le temps d'une manip de microdialyse le temps d'une pause déjeuner, pour la relecture de ma thèse, ou pour tes services que tu m'as spontanément et gentiment proposés. J'ai énormément apprécié ta sympathie et ton enthousiasme communicatif. Indira, tu m'as apportée une aide précieuse tout au long de ma thèse. Tu as patiemment et pertinemment répondu à mes multiples questions sur la gestion des élevages, le génotypage ou encore l'immunohistochimie. Lorsque j'ai rencontré des problèmes, tu t'es acharnée avec moi pour faire fonctionner les manips. Merci de m'avoir fait profiter de ton expérience et de tes conseils avec gentillesse. Françoise et Louise, merci pour votre générosité et pour votre bonne humeur.

 **À Monsieur le Professeur René Hen,**

Merci de nous avoir fourni les souris génétiquement modifiées et de m'avoir permis de travailler avec ces animaux tissus-spécifiques pour les expériences d'optogénétique. Merci également pour avoir contribué à faire avancer ce projet.

 **Aux doctorants et stagiaires, d'hier et d'aujourd'hui,**

Aux doctorantes d'hier : Maryam, Ha et Charlène, merci de m'avoir montré l'exemple et de m'avoir donné tant de conseils pour ma thèse. Je garderai de très bons souvenirs des discussions que nous avons pu avoir autour de ce bureau que nous avons partagé des années. Merci pour tous ces bons moments partagés aussi bien au laboratoire qu'en dehors ! Merci en

particulier Charlène pour ta gentillesse, ton écoute et ton soutien depuis le début de ma thèse. Tu as été présente en toutes circonstances, lorsque j'avais simplement besoin de discuter ou de relativiser, même après être partie du labo. Je te suis grandement reconnaissante pour ces inestimables conseils que tu m'as donnée, autant sur le plan personnel que sur des détails scientifiques de mon travail de thèse. Ces longues discussions partagées avec toi au CROUS, lors de nos soirées à l'Opéra ou lors de nos soirées Overcooked m'ont donnée beaucoup de joie et de réconfort.

Aux doctorants et stagiaires d'aujourd'hui : Loan, Laura, Sarah, Timothée, Inès, Valentine et Lyès, merci pour l'intérêt que vous avez apporté à mon projet et pour les moments que nous avons partagés qui ont permis de me changer les idées dans les moments difficiles. Je vous souhaite à tous beaucoup de réussite pour la suite de votre parcours.

À l'équipe du Professeur Jean-Pierre Mothet,

Brigitte, Jean-Pierre et Patrick, merci pour votre sympathie et pour les réponses d'électrophysie que vous m'avez expliquée. Nos discussions de couloir ont été enrichissantes.

Aux personnels de la plateforme Animalerie,

Merci à Valérie Domergue, Ayma et Olivier pour votre gentillesse, votre aide et vos conseils dans la gestion des élevages. Merci également à Pauline, Manon et Julie pour votre aide au quotidien et pour avoir permis que mes études de comportement se passent dans les meilleures conditions.

Aux personnels de la plateforme SAMM,

Je remercie en particulier Audrey Solgadi pour avoir permis le dosage de nombreux échantillons de microdialyse pour le glutamate et le GABA.

Aux personnels de la plateforme Trans-Prot,

Je remercie en particulier Claudine Delomenie pour la formation et les conseils fournis.

À mes amis

Je remercie mes amis pour vos encouragements qui m'ont permis de mener à bien cette thèse. Célia et Laura-May et Mathilde, notre amitié m'a redonnée du baume au cœur toutes ces années. Nos soirées m'ont toujours remotivée. Merci de m'avoir encouragée et écoutée, et d'avoir su me changer les idées. Anna et Dima, merci pour votre présence et soutien

inépuisable, et de m'avoir fait me sentir comprise et soutenue à de nombreuses occasions. Adeline, Anne, Alex, Eleni, Marina et Mathilde, merci pour ces soirées qui m'ont permis de décompresser et durant lesquelles nous avons partagé beaucoup d'anecdotes et de rire. Un merci tout particulier à Anne, avec qui j'ai partagé de nombreuses sorties culturelles et qui a été un soutien important. Barbara, Charlotte et Alexander, merci pour votre présence chaleureuse et votre écoute. Merci en particulier Barbara pour ta présence lors de nombreux déjeuners au CROUS, lors de notre semaine passée ensemble à ULLA ou à d'autres occasions !

À ma famille

Merci aux meilleurs parents d'avoir pris soin de moi et de m'avoir soutenue jusqu'à la fin de ces très longues années d'études. Vous avez toujours tout fait pour m'offrir les meilleures conditions possibles pour ma réussite. Merci pour tout ce que vous avez fait pour moi durant ces 27 années. Merci aussi à mon frère Thierry de m'avoir écoutée sur les difficultés rencontrées. Merci également à mes cousins et cousines pour votre soutien et pour ces bons moments passés. Enfin, merci à Jérémy d'avoir fait preuve de patience et pour tes tendres encouragements. Tu m'as écoutée, accompagnée et supportée, et tu m'as apporté énormément de réconfort et de joie tout au long de ces années.

Publications scientifiques

Revue

Doan J, Gardier AM, Tritschler L. (2019) « *Role of adult-born granule cells in the hippocampal functions: focus on the GluN2B-containing NMDA receptors* ». *Eur Neuropsychopharmacol*, 29(10), 1065-1082 (Article 1)

Articles originaux

Doan J, Defaix C, Mendez-David I, Gardier AM, David DJ, Guilloux JP, Tritschler L. « *Antidepressant-like effect of intrahippocampal Ro25-6981 administration in a neurogenesis-dependent task and induction of GABA and glutamate neurotransmissions* » (en préparation) (Article 2)

Tritschler L, Kheirbek MA, Le Dantec Y, Mendez-David I, Guilloux JP, Faye C, **Doan J**, Pham TH, Hen R, David DJ, Gardier AM. (2018) « *Optogenetic activation of granule cells in the dorsal dentate gyrus enhances dopaminergic neurotransmission in the Nucleus Accumbens* ». *Neurosci Res*. 2018 Sep;134:56-60

Résumé publié

P088. Doan J, Defaix C, Gardier AM, Tritschler L. (2020) « *Targeting adult-born granule cells through GluN2B-containing NMDA receptor antagonist enhances the inhibitory GABA transmission in the dentate gyrus* ». *Br J of Pharmacol* 177: 2542-2543. <https://doi.org/10.1111/bph.15035>

Communications affichées

Doan J, Defaix C, Gardier AM, Tritschler L. « *Adult hippocampal neurogenesis contribution in the hippocampus neurotransmission: The role of adult-born granule cells in antidepressant treatment* ». *ULLA Summer School*, Helsinki, Finlande (JUL 2019)

Doan J, Defaix C, Gardier AM, Tritschler L. (2020) « *Targeting adult-born granule cells through GluN2B-containing NMDA receptor antagonist enhances the inhibitory GABA transmission in the dentate gyrus* ». *Pharmacology* 2019, Édimbourg, Écosse (DEC 2019)

Doan J, Defaix C, Gardier AM, Tritschler L. « *Adult hippocampal neurogenesis contribution in the hippocampus neurotransmission: The role of adult-born granule cells in antidepressant treatment* ». Journée de la Recherche, Châtenay-Malabry, France (JANV 2020). 1^{er} prix poster

Participations au travail de relecture d'articles ou de revues soumis aux journaux

Biological Psychiatry (IF 11,5)

Hippocampus (IF 3,3)

Molecular Psychiatry (IF 12,0)

Neuropsychopharmacology (IF 7,2)

Pharmacology and Therapeutics (IF 9,4)

Progress in Neuropsychopharmacology and Biological Psychiatry (IF 4,3)

Sommaire

Remerciements	1
Publications scientifiques	5
Participations au travail de relecture d'articles ou de revues soumis... 7	7
Sommaire	9
Abréviations.....	13
Liste des figures.....	15
Liste des tableaux.....	18
Résumé.....	19
INTRODUCTION.....	21
I. LES EPISODES DEPRESSIFS CARACTERISES.....	22
I.1 <i>Symptômes et épidémiologie des épisodes dépressifs caractérisés.....</i>	22
I.2 <i>Physiopathologie des épisodes dépressifs caractérisés.....</i>	24
I.2.1 Hypothèse des monoamines	24
I.2.2 Déficit dans la régulation du système de réponse au stress : l'axe hypothalamo-hypophyso-surrénalien ..	25
I.2.3 Origine inflammatoire	26
I.2.4 Hypothèse glutamatergique	27
I.2.5 Altération de la plasticité synaptique	29
I.2.6 Vulnérabilité génétique	31
I.3 <i>Les traitements pharmacologiques actuels et leurs limites</i>	32
II. LES JEUNES NEURONES ISSUS DE LA NEUROGENESE HIPPOCAMPIQUE ADULTE, ACTEURS DE L'ACTIVITE ANTIDEPRESSIVE	34
II.1 <i>Découverte du renouvellement des neurones dans le cerveau adulte.....</i>	34
II.2 <i>Présentation de la neurogenèse hippocampique adulte.....</i>	36
II.2.1 Prolifération.....	38
II.2.2 Survie et différenciation	39
II.2.3 Maturation.....	40
II.3 <i>Neurogenèse et antidépresseurs.....</i>	41
III. IMPORTANCE DE LA SOUS-UNITE GLUN2B DU RECEPTEUR NMDA DES JEUNES NEURONES.....	43
III.1 <i>Généralités sur le récepteur NMDA du glutamate</i>	43
III.2 <i>Rôle des jeunes neurones dans les fonctions hippocampiques : Lien avec les récepteurs NMDA contenant la sous-unité GluN2B.....</i>	46
IV. OBJECTIFS	71

MATÉRIELS ET MÉTHODES.....	73
I. ANIMAUX.....	74
I.1 <i>Fond génétique et conditions d'élevage des souris</i>	74
I.2 <i>Souris tissus-spécifiques Nestine-CreERT2/Chr2-YFP et Nestine-CreERT2/Arch-GFP pour l'étude d'optogénétique</i>	74
I.2.1 Génération des lignées	74
I.2.2 Induction de l'expression de l'opsine	77
I.2.2.a Préparation du tamoxifène	77
I.2.2.b Mécanisme moléculaire de l'expression spécifique de l'opsine.....	77
I.2.3 Génotypage des animaux	79
II. TRAITEMENTS PHARMACOLOGIQUES.....	81
III. TESTS COMPORTEMENTAUX	82
III.1 <i>Novelty Suppressed Feeding (NSF)</i>	84
III.2 <i>Open Field (OF)</i>	84
IV. MICRODIALYSE	85
IV.1 <i>Principe de la technique de microdialyse</i>	85
IV.2 <i>Fabrication des sondes de microdialyse</i>	86
IV.3 <i>Implantation des sondes de microdialyse</i>	89
IV.4 <i>Sessions de microdialyse</i>	90
IV.5 <i>Vérification de l'implantation des sondes</i>	91
IV.6 <i>Dosage de neurotransmetteurs</i>	91
V. ADMINISTRATION LOCALE DE Ro25-6981	92
V.1 <i>Fabrication des fibres d'injection et des sondes de microdialyse couplées avec une fibre d'injection</i>	92
V.2 <i>Injection locale de Ro25-6981 dans le gyrus dentelé ventral</i>	92
V.3 <i>Implantation des fibres d'injection</i>	93
V.4 <i>Injection locale de Ro25-6981 et NSF chez le même animal</i>	93
V.5 <i>Implantation des sondes de microdialyse couplée avec une fibre d'injection</i>	94
V.6 <i>Sessions de microdialyse couplée à l'injection locale de Ro25-6981</i>	94
VI. MISE EN EVIDENCE DU NIVEAU D'EXPRESSION DE GLUN2B DANS LE GYRUS DENTELE	95
VI.1 <i>Extraction de l'ARNm à partir de tissus cérébraux</i>	95
VI.2 <i>Contrôle qualité de l'ARNm</i>	96
VI.3 <i>Transcription inverse des ARNm</i>	97
VI.4 <i>Amplification de l'ADN par PCR quantitative</i>	98
VII. ETUDE DE LA PROLIFERATION DES NOUVEAUX NEURONES	99
VII.1 <i>Perfusion intracardiaque de paraformaldéhyde</i>	99
VII.2 <i>Détection de Ki67 par immunohistochimie</i>	99
VIII. OPTOGENETIQUE	100

VIII.1	<i>Principe</i>	100
VIII.2	<i>Fabrication des optrodes et des sondes de microdialyse couplées avec une optrode</i>	101
VIII.3	<i>Implantation des sondes de microdialyse couplées avec une optrode</i>	103
VIII.4	<i>Stimulation optique in vivo</i>	103
VIII.5	<i>Inhibition optique in vivo</i>	103
VIII.6	<i>Sessions de microdialyse couplée à l'optogénétique durant le NSF chez le même animal</i>	103
VIII.7	<i>Optogénétique durant l'OF chez le même animal</i>	104
VIII.8	<i>Vérification de l'expression de l'opsine au niveau des jeunes neurones par immunohistochimie</i>	
	105
VIII.8.1	Perfusion intracardiaque de paraformaldéhyde	105
VIII.8.2	Détection de GFP par immunohistochimie.....	105
IX.	ANALYSE STATISTIQUE.....	106
RÉSULTATS		107
I.	OBJECTIF 1 : EFFET NEUROCHIMIQUE D'UN TRAITEMENT A LA FLUOXÉTINE DANS LE GD VENTRAL	108
I.1	<i>Absence d'effet neurochimique d'un traitement aigu à la fluoxétine dans le GD ventral</i>	109
I.2	<i>Le traitement chronique à la fluoxétine diminue la transmission glutamatergique dans le GD ventral</i>	109
I.3	<i>Vérification de l'implantation des sondes</i>	110
II.	OBJECTIF 2 : EFFETS COMPORTEMENTAL ET NEUROCHIMIQUE DE L'INJECTION DE Ro25-6981 DANS LE GD APRES UN TRAITEMENT CHRONIQUE AVEC LA FLUOXÉTINE.....	112
	<i>Article 2 en préparation</i>	113
	<i>Résultats complémentaires</i>	137
III.	OBJECTIF 3 : EFFET COMPORTEMENTAL ET NEUROCHIMIQUE DE LA STIMULATION OU DE L'INHIBITION DES JEUNES NEURONES CHEZ LE MEME ANIMAL.....	141
III.1	<i>Vérification de l'expression de la Channelrhodopsine 2 et de Archærhodopsine au niveau des jeunes neurones du GD</i>	141
III.2	<i>La stimulation des jeunes neurones augmente la transmission GABAergique dans le GD</i>	143
III.3	<i>Absence d'effet comportemental après stimulation des jeunes neurones ou après un traitement chronique à la fluoxétine</i>	145
III.4	<i>Résultats complémentaires : Effet comportemental de l'inhibition des jeunes neurones dans un modèle d'anxiété/dépression</i>	148
DISCUSSION		151
I.	LIEN DES JEUNES NEURONES AVEC LES CELLULES GRANULAIRES MATURES : DEUX HYPOTHESES.....	152
II.	OBJECTIF 1 : LA DIMINUTION DE LA TRANSMISSION GLUTAMATERGIQUE APRES UN TRAITEMENT CHRONIQUE AVEC LA FLUOXÉTINE SUGGERE L'IMPLICATION D'INTERNEURONES GABAERGIQUES	155
III.	OBJECTIF 2 : L'AUGMENTATION DE LA TRANSMISSION GLUTAMATERGIQUE APRES DIMINUTION DE L'ACTIVITE ELECTRIQUE DES JEUNES NEURONES SERAIT DUE A LA DESINHIBITION D'INTERNEURONES GABAERGIQUES	157

IV. OBJECTIF 3 : L'AUGMENTATION DE LA TRANSMISSION GABAERGIQUE APRES LA STIMULATION DES JEUNES NEURONES CONFIRME L'IMPLICATION D'INTERNEURONES GABAERGIQUES	161
CONCLUSIONS	163
PERSPECTIVES	165
BIBLIOGRAPHIE	167

Abréviations

5-HT :	5-hydroxytryptamine, sérotonine
A :	<i>actimeter</i>
ACTH :	<i>adrenocorticotropic hormone</i> , adrénocorticotropine
ADN :	acide désoxyribonucléique
ADNc :	acide désoxyribonucléique complémentaire
AMPA :	α -amino-3-hydroxy-5-méthylisozazol-4-propionate
ANOVA :	<i>analysis of variance</i> , analyse de variance
Arch :	archaerhodopsine
ARN :	acide ribonucléique
AUC :	<i>area under the curve</i> , aire sous la courbe
BDNF :	<i>brain-derived neurotrophic factor</i>
BET :	bromure d'éthidium
BHE :	barrière hémato-encéphalique
BrdU :	bromodéoxyuridine
CA :	corne d'Ammon
ChR2 :	channelrhodopsine 2
CI₅₀ :	concentration inhibitrice médiane
Cq :	cycle de quantification
Cre :	<i>cyclization recombination</i>
CRH :	<i>corticotropin-releasing hormone</i> , corticolibérine
CRP :	<i>C-reactive protein</i> , protéine C réactive
CS :	<i>coat state</i>
Cy :	cyanine
DCX :	doublecortine
DMSO :	diméthylsulfoxyde
EAAT :	<i>excitatory amino acid transporter 2</i> , transporteur des acides aminés excitateurs
EDC :	épisodes dépressifs caractérisés
EPM :	<i>elevated plus maze</i> , labyrinthe en croix surélevé
ER^{T2} :	<i>mutated human estrogen receptor</i> , forme mutée du récepteur humain aux œstrogènes
FST :	<i>forced swim test</i> , test de la nage forcée
GABA :	<i>γ-aminobutyric acid</i> , acide γ -aminobutyrique
GAD :	glutamate décarboxylase
GAPDH :	glycéraldéhyde-3-phosphate déshydrogénase
GD :	gyrus dentelé
GFAP :	<i>glial fibrillary acidic protein</i> , protéine acide fibrillaire gliale
GFP :	<i>green fluorescent protein</i> , protéine fluorescente verte
GIRK :	<i>G protein-coupled inwardly rectifying potassium channel</i> , canal potassique rectifiant entrant couplé à une protéine G

HPLC :	<i>high performance liquid chromatography</i> , chromatographie en phase liquide à haute performance
IGF-1 :	<i>insulin-like growth factor-1</i> , somatomédine C
IL-1 :	interleukine 1
IL-6 :	interleukine 6
ISRS :	inhibiteur sélectif de la recapture de la sérotonine
LCR :	liquide céphalo-rachidien
LTD :	<i>long-term depression</i> , dépression à long terme
LTP :	<i>long-term potentiation</i> , potentialisation à long terme
Nestine-Arch :	Nestine-CreER ^{T2-/+} / Arch-GFP ^{+/+}
Nestine-ChR2 :	Nestine-CreER ^{T2-/+} / ChR2-YFP ^{+/+}
NeuroD :	<i>neurogenic differentiation</i> , différenciation neurogène
NIH :	<i>novelty induced hypophagia</i> , hypophagie induite par la nouveauté
NMDA :	<i>N-méthyl-D-aspartate</i>
NSF :	<i>novelty suppressed feeding</i> , test d'alimentation supprimée par la nouveauté
OF :	<i>open field</i> , test en champ ouvert
PBS :	<i>phosphate buffered saline</i> , tampon phosphate salin
PCR :	amplification en chaîne par polymérase
RIN :	<i>RNA Integrity Number</i> , facteur d'intégrité de l'ARN
SC :	<i>sucrose consumption</i> , consommation du sucrose
SEM :	<i>standard error of mean</i> , écart type de la moyenne
SM :	spectrométrie de masse
SNAT :	<i>sodium-dependent neutral amino acid transporter</i> , transporteur des acides aminés neutres dépendant du sodium
Sox2 :	<i>sex determining region Y-box2</i>
TNF-α :	<i>tumor necrosis factor- α</i> , facteur de nécrose tumorale α
TrkB :	<i>tropomyosin receptor kinase B</i> , kinase de récepteur de la tropomyosine B
TST :	<i>tail suspension test</i> , test de suspension caudale
VEGF :	<i>vascular endothelial growth factor</i> , facteur de croissance de l'endothélium vasculaire
WT :	<i>wild type</i> , sauvage
YFP :	<i>yellow fluorescent protein</i> , protéine fluorescente jaune

Liste des figures

FIGURE 1 – SCHEMA DU METABOLISME DU GLUTAMATE : SYNAPSE GLUTAMATERGIQUE TRIPARTITE ET CYCLE GABA-GLUTAMATE-GLUTAMINE.	28
FIGURE 2 – CONCENTRATIONS EXTRACELLULAIRES DE 5-HT DANS LE NOYAU DU RAPHE ET DANS L’HIPPOCAMPE DE SOURIS BALBC, APRES 7, 14, 21 OU 28 JOURS DE TRAITEMENT A LA FLUOXETINE (18 MG/KG/JOUR), AINSI QUE 14 JOURS APRES ARRET DU TRAITEMENT	33
FIGURE 3 - AUTORADIOGRAPHIES DU GD DE L’HIPPOCAMPE D’UN RAT AYANT REÇU DE LA THYMIDINE TRITIEE	35
FIGURE 4 – DETECTION SIMULTANEE DU BRDU, D’UN MARQUEUR NEURONAL (NEUN) AINSI QUE D’UN MARQUEUR GLIAL (GFAP, GLIAL FIBRILLARY ACIDIC PROTEIN) AU NIVEAU D’UN GD ADULTE HUMAIN PAR IMMUNOHISTOCHEMIE.....	35
FIGURE 5 - ORGANISATION DE L’HIPPOCAMPE.	37
FIGURE 6 - REPRESENTATION SCHEMATIQUE DES ETAPES IMPLIQUEES ET TYPES CELLULAIRES DE LA NEUROGENESE HIPPOCAMPIQUE ADULTE.....	38
FIGURE 7 – PROLIFERATION DES CELLULES SOUCHES LORS DE LA NEUROGENESE EMBRYONNAIRE ET DE LA NEUROGENESE ADULTE	39
FIGURE 8 – LES NEUROGENESES EMBRYONNAIRE ET ADULTE PARTAGE LES MEMES ETAPES	40
FIGURE 9 - LE RECEPTEUR NMDA DU GLUTAMATE EST UN RECEPTEUR IONOTROPIQUE COMPOSE DE 4 SOUS-UNITES	44
FIGURE 10 - CONTROLE DE L’ACTIVITE ELECTRIQUE DES JEUNES NEURONES ET DES NEURONES MATURES DANS LE GD DE L’HIPPOCAMPE PAR LE CORTEX ENTORHINAL	69
FIGURE 11 – CROISEMENTS NECESSAIRES POUR L’OBTENTION DES SOURIS NESTINE-CREER ^{T2/+} /CHR2-YFP ^{+/+} ET NESTINE-CREER ^{T2/+} /ARCH-GFP ^{+/+}	76
FIGURE 12 - REPRESENTATION SCHEMATIQUE DU MECANISME DE L’EXPRESSION DE L’OPSINE APRES ADMINISTRATION DU TAMOXIFENE	78
FIGURE 13 – SCHEMA RECAPITULATIF DE L’OBTENTION DES SOURIS TISSUS-SPECIFIQUES POUR LES EXPERIENCES DE STIMULATION (NESTINE-CREERT2/CHR2-YFP) OU D’INHIBITION (NESTINE-CREERT2/ARCH-GFP) OPTOGENETIQUE.	79
FIGURE 14 – ILLUSTRATION D’UNE MIGRATION ELECTROPHORETIQUE D’ECHANTILLONS APRES L’AMPLIFICATION DU GENE CHR2 PAR PCR.....	81
FIGURE 15 - NOVELTY SUPPRESSED FEEDING.....	84
FIGURE 16 – OPEN FIELD	85
FIGURE 17 - ILLUSTRATION D’UNE SONDE DE MICRODIALYSE.....	86
FIGURE 18 – IMPLANTATION DES SONDES DE MICRODIALYSE DANS LE GD VENTRAL.....	90
FIGURE 19 – COLLECTE DE DIALYSATS CONTENANT DES NEUROTRANSMETTEURS PAR MICRODIALYSE <i>IN VIVO</i> CHEZ LA SOURIS EVEILLEE	91
FIGURE 20 - REALISATION DU NSF A LA SUITE DE L’INJECTION LOCALE DE Ro25-6981.....	93
FIGURE 21 – REALISATION DE L’INJECTION LOCALE DE Ro25-6981 A L’AIDE DES SONDES DE MICRODIALYSE COUPLEES AVEC UNE FIBRE D’INJECTION	94
FIGURE 22 – HOMOGENEISATION MECANIQUE DES GD PAR PIPETAGE.....	95
FIGURE 23 – CONTROLE QUALITE DE L’ARNM EXTRAIT PAR ELECTROPHORESE CAPILLAIRE SUR PUCE RNA NANO CHIP : MESURE DU RIN	97

FIGURE 24 – AMPLIFICATION DE L’ADNC PAR PCR QUANTITATIVE SUR UNE PLAQUE 96 PUIITS : MESURE DU CQ.....	98
FIGURE 25 – SIMULATION ET INHIBITION DES JEUNES NEURONES CHEZ DES SOURIS NESTINE-CREERT2/CHR2-YFP ET NESTINE-CREERT2/ARCH-GFP RESPECTIVEMENT PAR OPTOGENETIQUE.....	101
FIGURE 26 - ILLUSTRATION DU COUPLAGE D’UNE OPTRODE AVEC SONDE DE MICRODIALYSE	102
FIGURE 27 – COUPLAGE DE LA MICRODIALYSE AVEC L’OPTOGENETIQUE DURANT LE NSF.....	104
FIGURE 28 – COUPLAGE DE L’OPTOGENETIQUE AVEC L’OF.....	105
FIGURE 29 – EFFETS NEUROCHIMIQUES D’UN TRAITEMENT AIGU DE 2 JOURS A LA FLUOXETINE (18 MG/KG/JOUR) DANS LE GD VENTRAL CHEZ DES SOURIS 129SVPAS.....	109
FIGURE 30 - EFFETS NEUROCHIMIQUES D’UN TRAITEMENT CHRONIQUE A LA FLUOXETINE (18 MG/KG/JOUR) DANS LE GD VENTRAL CHEZ DES SOURIS 129SVPAS.	110
FIGURE 31 – EFFETS D’UN TRAITEMENT CHRONIQUE A LA FLUOXETINE (18 MG/KG/JOUR) CHEZ DES SOURIS 129SVPAS SUR LA BALANCE GABA/BGLUTAMATE DANS LE GD VENTRAL	110
FIGURE 32 - VERIFICATION DE L’IMPLANTATION DES SONDES	111
FIGURE 33 – EFFETS COMPORTEMENTAUX DANS LE NSF(1) DE L’ADMINISTRATION INTRA-HIPPOCAMPIQUE BILATERALE DE Ro25-6981 APRES 4 SEMAINES DE TRAITEMENT A LA FLUOXETINE (18 MG/KG/JOUR) DANS LE MODELE CORT CHEZ DES SOURIS IMPLANTEES AVEC LES FIBRES D’INJECTION	137
FIGURE 34 – EFFETS COMPORTEMENTAUX DANS LE NSF(1) D’UN TRAITEMENT DE 4 SEMAINES A LA FLUOXETINE (18 MG/KG/JOUR) DANS LE MODELE CORT CHEZ DES SOURIS SANS CHIRURGIE.....	138
FIGURE 35 – AUGMENTATION DE L’ACTIVITE PROLIFERATIVE APRES LE TRAITEMENT CHRONIQUE AVEC LA FLUOXETINE	140
FIGURE 36 – MARQUAGE DES PROTEINES YFP CO-EXPRIMEES PAR LES CELLULES QUI PRESENTENT CHANNELRHODOPSINE 2 (CHR2-YFP) ET DES PROTEINES GFP CO-EXPRIMEES PAR LES CELLULES QUI PRESENTENT L’ARCHAERHODOPSINE (ARCH-GFP) AU NIVEAU DES JEUNES NEURONES ET COLORATION DES NOYAUX AU DAPI	142
FIGURE 37 - EFFETS NEUROCHIMIQUES DANS LE GD VENTRAL DE LA STIMULATION DES JEUNES NEURONES APRES 4 SEMAINES DE TRAITEMENT A LA FLUOXETINE (18 MG/KG/JOUR) CHEZ DES SOURIS WT ET CHEZ DES SOURIS NESTINE-CHR2 (CHR2).	144
FIGURE 38 - EFFETS DE LA STIMULATION DES JEUNES NEURONES APRES 4 SEMAINES DE TRAITEMENT A LA FLUOXETINE (18 MG/KG/JOUR) CHEZ DES SOURIS WT ET CHEZ DES SOURIS NESTINE-CHR2 (CHR2) SUR LA BALANCE GABA/GLUTAMATE DANS LE GD VENTRAL.....	145
FIGURE 39 - EFFETS COMPORTEMENTAUX DANS LE NSF DE LA STIMULATION DES JEUNES NEURONES APRES 4 SEMAINES DE TRAITEMENT A LA FLUOXETINE (18 MG/KG/JOUR) CHEZ DES SOURIS WT ET CHEZ DES SOURIS NESTINE-CHR2 (CHR2), OBTENUS SIMULTANEMENT A LA MICRODIALYSE.....	145
FIGURE 40 - EFFETS COMPORTEMENTAUX DANS L’OF DE LA STIMULATION DES JEUNES NEURONES APRES 4 SEMAINES DE TRAITEMENT A LA FLUOXETINE (18 MG/KG/JOUR) CHEZ DES SOURIS WT ET CHEZ DES SOURIS NESTINE-CHR2 (CHR2), EN FONCTION DE LA SEQUENCE A LAQUELLE L’ILLUMINATION A ETE REALISEE.....	147
FIGURE 41 - EFFETS COMPORTEMENTAUX DANS LE NSF DE L’INHIBITION DES JEUNES NEURONES APRES 4 SEMAINES DE TRAITEMENT A LA FLUOXETINE (18 MG/KG/JOUR) DANS LE MODELE CORT CHEZ DES SOURIS WT ET CHEZ DES SOURIS NESTINE-ARCH (ARCH)	148

FIGURE 42 - EFFETS COMPORTEMENTAUX DANS L'OF DE L'INHIBITION DES JEUNES NEURONES APRES 4 SEMAINES DE TRAITEMENT A LA FLUOXETINE (18 MG/KG/JOUR) DANS LE MODELE CORT CHEZ DES SOURIS WT ET CHEZ DES SOURIS NESTINE-ARCH (ARCH), EN FONCTION DE LA SEQUENCE A LAQUELLE L'ILLUMINATION A ETE REALISEE.....	149
FIGURE 43 – EFFERENCES DES JEUNES NEURONES IMMATURES DANS LE GYRUS DENTELE DE L'HIPPOCAMPE, SELON LA LITTERATURE	154
FIGURE 44 - EFFERENCES DES JEUNES NEURONES IMMATURES DANS LE GYRUS DENTELE DE L'HIPPOCAMPE APRES TRAITEMENT CHRONIQUE AVEC LA FLUOXETINE.....	157
FIGURE 45 - EFFERENCES DES JEUNES NEURONES IMMATURES DANS LE GYRUS DENTELE DE L'HIPPOCAMPE APRES TRAITEMENT CHRONIQUE AVEC LA FLUOXETINE ET APRES ADMINISTRATION LOCALE INTRA-HIPPOCAMPIQUE DE Ro25-6981	159
FIGURE 46 - EFFERENCES DES JEUNES NEURONES IMMATURES DANS LE GYRUS DENTELE DE L'HIPPOCAMPE APRES TRAITEMENT CHRONIQUE AVEC LA FLUOXETINE ET APRES STIMULATION OPTOGENETIQUE DES JEUNES NEURONES.	162

Liste des tableaux

TABLEAU 1 - CRITERES DE DIAGNOSTIC D'UN EDC SELON LE DSM-5.....	23
TABLEAU 2 – RECAPITULATIF DES EFFETS COMPORTEMENTAUX OBTENUS CHEZ DES SOURIS C57BL/6NTAC APRES 7 OU 28 JOURS DE TRAITEMENT A LA FLUOXETINE (18 MG/KG/JOUR).....	34
TABLEAU 3 - IMPLICATION DES JEUNES NEURONES ISSUS DE LA NEUROGENESE DANS L'ACTIVITE DE TYPE ANTIDEPRESSIF DES ISRS	42
TABLEAU 4 – DESCRIPTIF DES AMORCES UTILISEES EN PCR POUR LE GENOTYPAGE DES SOURIS NESTINE-CREER ^{T2} /ARCH-GFP	80
TABLEAU 5 – PROGRAMMES PCR DES GENES A AMPLIFIER	80
BOX 1 – PRINCIPAUX TESTS COMPORTEMENTAUX PREDICTIFS D'UNE ACTIVITE DE TYPE DEPRESSIVE OU ANXIOLYTIQUE CHEZ LA SOURIS	82
BOX 2 - LES DIFFERENTES SONDES DE MICRODIALYSE ET DE FIBRES D'INJECTION	87
TABLEAU 6 – RECAPITULATIF DES RESULTATS NEUROCHIMIQUES OBTENUS	163

Résumé

Les épisodes dépressifs caractérisés (EDC) constituent une affection psychiatrique associée à un risque élevé de suicide. Il s'agit d'un problème de santé publique grave et un des troubles mentaux les plus courants, représentant désormais la première cause d'incapacité dans le monde selon l'OMS. Les inhibiteurs sélectifs de la recapture de la sérotonine (ISRS) sont la classe d'antidépresseurs la plus prescrite dans la prise en charge des EDC. Ils agissent en bloquant sélectivement le transporteur sérotoninergique. Cependant, ils ont un délai d'action retardé et de nombreux patients sont résistants. L'activation de la transmission sérotoninergique n'explique pas à elle seule le délai d'action retardé des ISRS, et d'autres facteurs doivent également être impliqués.

L'administration chronique d'un ISRS améliore les différentes étapes de la neurogenèse hippocampique adulte qui a lieu dans le gyrus dentelé (GD) de l'hippocampe. A l'inverse, une perturbation de cette neurogenèse affecte cette réponse des ISRS. Les jeunes neurones issus de cette neurogenèse présentent une période critique au cours de l'étape de maturation, 4 à 6 semaines après leur division. Durant cette période critique, les jeunes neurones ont notamment une plus grande excitabilité, avec une induction de potentialisations à long terme (LTP) facilitée et une amplitude de LTP plus grande. De manière coïncidente, les jeunes neurones influencent la réponse des ISRS durant cette période (**Article 1**).

Le premier objectif de ma thèse a été d'évaluer le rôle des transmissions glutamatergique et GABAergique dans le GD ventral après un traitement chronique avec la fluoxétine. Ce travail a été réalisé grâce à la microdialyse intracérébrale *in vivo* chez la souris éveillée et a révélé une diminution des concentrations extracellulaires de glutamate dans le GD ventral de l'hippocampe suite à un traitement chronique avec la fluoxétine. Cette diminution pourrait s'expliquer par la stimulation de la neurogenèse lors du traitement chronique à la fluoxétine.

Le second objectif de cette thèse a été d'étudier, par une approche pharmacologique, les conséquences comportementales ainsi que les modifications des transmissions glutamatergique et GABAergique dans le GD ventral suite à l'injection locale du Ro25-6981, un antagoniste sélectif de la sous-unité GluN2B du récepteur NMDA du glutamate, après un traitement chronique avec la fluoxétine dans un modèle d'anxiété/dépression (modèle CORT). La sous-unité GluN2B du récepteur NMDA des jeunes neurones, dont l'expression est

importante durant une période critique pour ces jeunes neurones, nous a intéressée car elle semble jouer un rôle important dans les effets antidépresseurs. Nous avons constaté un effet de type antidépresseur de l'administration locale du Ro25-6981 dans le test d'alimentation supprimée par la nouveauté, indépendamment du traitement avec la fluoxétine. Ce travail a révélé une augmentation dans le GD de l'hippocampe des concentrations extracellulaires de glutamate indépendante du traitement chronique avec la fluoxétine (**Article 2**, en préparation). Afin d'affiner les résultats obtenus par cette approche pharmacologique, une approche par optogénétique a été utilisée.

Le troisième objectif de ma thèse a été d'étudier les modifications des transmissions glutamatergique et GABAergique dans le GD ventral produites sélectivement par les jeunes neurones suite à un traitement par la fluoxétine. Pour cela, nous avons mis au point la combinaison des techniques de microdialyse intracérébrale, et d'optogénétique avec un test comportemental afin de manipuler l'activité électrique des jeunes neurones durant la période critique. Ce travail a montré que la stimulation sélective des jeunes neurones induit une augmentation des concentrations extracellulaires de GABA dans le GD de l'hippocampe.

Mes travaux de thèse apportent donc des nouvelles connaissances sur les variations de neurotransmissions dans le GD ventral lors d'un traitement chronique par un ISRS. Ces résultats confirment que les jeunes neurones issus de la neurogenèse adulte hippocampique, bien qu'ils ne constituent qu'une petite population neuronale du GD, modulent de façon précoce les neurotransmissions glutamatergique et GABAergique du GD. Du fait de son long temps d'analyse de la technique de microdialyse intracérébrale, il serait intéressant de voir si la technique d'électrophysiologie *in vitro* confirme nos résultats de microdialyse *in vivo*, qui ne permettent pas de se positionner sur un lien direct ou indirect via un interneurone GABAergique entre les jeunes neurones et les neurones matures. Mes travaux apportent des éléments indirects et directs des effets neurochimiques des jeunes neurones. Ces variations de neurotransmissions glutamatergique et GABAergique dans le GD ventral après stimulation des différentes étapes de la neurogenèse hippocampique adulte constituent un lien important entre les effets électrophysiologiques et comportementaux attribués aux jeunes neurones de l'hippocampe et pourraient expliquer en partie le délai d'action retardé des ISRS.

INTRODUCTION

I. Les épisodes dépressifs caractérisés

I.1 *Symptômes et épidémiologie des épisodes dépressifs caractérisés*

Les épisodes dépressifs caractérisés (EDC) constituent une affection psychiatrique associée à un risque élevé de suicide. Il s'agit d'un problème de santé publique grave et un des troubles mentaux les plus courants, représentant désormais la première cause d'incapacité dans le monde (Stringaris, 2017).

Les EDC se caractérisent par des perturbations de l'humeur, avec des symptômes de gravité légère à sévère, et de durée variable (de mois à années). D'une personne à l'autre, l'association de symptômes caractérisant les EDC sera différente. Dans tous les cas, une humeur dépressive (tristesse constante) ou une perte d'intérêt généralisée sera présente pendant au moins 2 semaines. D'autres symptômes, décrits la cinquième version du Manuel statistique et diagnostique des troubles mentaux (DSM-5, publié en 2013), sont présents dans les EDC (Tableau 1).

Les EDC touchent tous les âges dès l'enfance, et ils peuvent se déclencher aussi bien vers la fin de l'adolescence, qu'à l'âge adulte voire à un âge avancé (Kessler & Bromet, 2013). Les EDC toucheraient 322 millions de personnes dans le monde, soit 4,4% de la population mondiale, avec une prévalence quasiment 2 fois plus importante chez la femme (Picco et al., 2017; WHO, 2017). Les EDC sont responsables de 7,5% des années vécues avec un handicap en 2015. Ils contribuent également majoritairement aux morts par suicide, au nombre de 800 000 chaque année (WHO, 2017).

Le traitement des EDC inclut notamment la psychothérapie ainsi que les traitements pharmacologiques (Gartlehner et al., 2017; Weihs & Wert, 2011). Ces traitements pharmacologiques permettent une guérison chez 60% à 70% des patients traités (Souery et al., 2006). Pour les EDC résistants au traitement et en cas de risque suicidaire très élevé, l'électroconvulsivothérapie permet d'améliorer le taux de rémission (N. Lucas et al., 2017).

Tableau 1 - Critères de diagnostic d'un EDC selon le DSM-5

<p>A. Au moins 5 des symptômes suivants doivent avoir été présents pendant une même période d'une durée de 2 semaines et avoir représenté un changement par rapport à l'état antérieur; au moins un des symptômes est soit (1) une humeur dépressive, soit (2) une perte d'intérêt ou de plaisir.</p> <ol style="list-style-type: none"> 1. Humeur dépressive présente pratiquement toute la journée, presque tous les jours, signalée par le sujet (sentiment de tristesse ou vide) ou observée par les autres (pleurs). NB : éventuellement irritabilité chez l'enfant et l'adolescent. 2. Diminution marquée de l'intérêt ou du plaisir pour toutes ou presque toutes les activités pratiquement toute la journée, presque tous les jours. 3. Perte ou gain de poids significatif (par exemple, changement de poids excédant 5% en un mois) en l'absence de régime, ou diminution ou augmentation de l'appétit tous les jours. NB : Chez l'enfant, prendre en compte l'absence de l'augmentation de poids attendue. 4. Difficulté à s'endormir ou à garder le sommeil (insomnie) ou dormir plus qu'il ne faut (hypersomnie) presque tous les jours. 5. Agitation ou ralentissement psychomoteur presque tous les jours. 6. Fatigue ou perte d'énergie presque tous les jours. 7. Sentiment de dévalorisation ou de culpabilité excessive ou inappropriée (qui peut être délirante) presque tous les jours (pas seulement se faire grief ou se sentir coupable d'être malade). 8. Diminution de l'aptitude à penser ou à se concentrer ou indécision presque tous les jours (signalée par le sujet ou observée par les autres). 9. Pensées de mort récurrentes (pas seulement une peur de mourir), idées suicidaires récurrentes sans plan précis ou tentative de suicide ou plan précis pour se suicider.
<p>B. Les symptômes induisent une détresse cliniquement significative ou une altération du fonctionnement social, professionnel ou dans d'autres domaines importants.</p>
<p>C. Les symptômes ne sont pas imputables aux effets physiologiques directs d'une substance ou d'une affection médicale générale.</p>
<p>D. L'épisode ne répond pas aux critères du trouble schizoaffectif et ne se superpose pas à une schizophrénie, à un trouble schizophréniforme, à un trouble délirant ou à une autre trouble psychotique.</p>
<p>E. Il n'y a jamais eu d'épisode maniaque ou hypomaniaque.</p>

1.2 Physiopathologie des épisodes dépressifs caractérisés

Les EDC sont générés par de multiples et complexes facteurs. La physiopathologie des EDC n'est à ce jour pas bien établie, même si de nombreuses hypothèses sont posées. Des facteurs environnementaux et sociaux (deuil, perte d'emploi, séparation, traumatismes...) peuvent contribuer au développement d'EDC. Divers mécanismes biologiques sont également impliqués.

1.2.1 Hypothèse des monoamines

L'hypothèse des monoamines est la plus ancienne et l'une des principales hypothèses pour la physiopathologie des EDC. Les EDC seraient causés par une altération des concentrations d'une ou de plusieurs monoamines, telles que la sérotonine (5-HT, 5-hydroxytryptamine), la noradrénaline ou encore la dopamine. Elle a été établie après la constatation dans les années 1950 que le traitement de l'hypertension par la réserpine, qui entraîne une déplétion des monoamines, causait des épisodes dépressifs majeurs (Freis, 1954).

La sérotonine est une indolamine qui occupe un rôle clé dans la physiopathologie et le traitement des EDC. Les médicaments en première ligne dans le traitement des EDC augmentent la concentration de sérotonine, ainsi que celle de noradrénaline, après un traitement chronique. D'autre part, la déplétion en tryptophane, acide aminé essentiel précurseur de la synthèse de la sérotonine, chez des patients précédemment traités avec succès par un antidépresseur, entraîne une rechute chez plus de 47% en moyenne de patients, par rapport au groupe de patients contrôles (Ruhe et al., 2007 pour revue). Cette déplétion ne va en revanche pas induire d'EDC chez des sujets sains.

La dopamine est utilisée dans plusieurs voies cérébrales, et notamment la voie mésolimbique. Cette voie décrit les neurones dopaminergiques, également nommé noyau dopaminergique A10, partant de l'aire tegmentale ventrale qui innervent plusieurs structures du système limbique, dont le noyau accumbens. Elle représente le circuit de la récompense. Le symptôme d'anhédonie (l'incapacité à ressentir des émotions positives ou de l'intérêt dans des situations qui devraient provoquer ce genre d'émotions, ou qui ont été considérées antérieurement comme plaisantes) serait lié à un dysfonctionnement du circuit de la récompense. Il a été signalé une diminution d'un métabolite de la dopamine, l'acide homovanillique, dans le liquide céphalo-rachidien de patients atteint d'EDC par rapport à celui de contrôles sains (Asberg et al., 1984; Reddy et al., 1992). De plus, les EDC sont fréquents chez les patients atteints de la maladie de Parkinson (Srivastava et al., 2011), qui est

caractérisée par une dégénérescence des neurones à dopamine dans la substance noire, bien que les neurones à dopamine de l'aire tegmentale ventrale soient bien moins affectés (Dauer & Przedborski, 2003).

La noradrénaline est un dérivé de la dopamine. Ce sont tous deux des catécholamines. Le principal noyau de neurones noradrénergiques est le locus coeruleus, situé dans le tronc cérébral. Ils projettent notamment vers le lobe frontal, l'hippocampe ou encore l'amygdale. Chez des patients atteints d'EDC, la concentration cérébrale de noradrénaline est fortement diminuée par rapport à des sujets sains (Lambert et al., 2000). D'autre part, chez des patients souffrant d'EDC en post-mortem, les taux de transporteurs sont diminués, par rapport à des sujets sains (Moriguchi et al., 2017).

1.2.2 Déficit dans la régulation du système de réponse au stress : l'axe hypothalamo-hypophyso-surrénalien

Le stress est une réaction involontaire de l'organisme, tant sur le plan physiologique que psychologique, en réponse à une situation inattendue ou dangereuse. Il s'agit d'un phénomène d'adaptation du corps, mais dans la durée, la capacité à réagir est altérée, entraînant alors diverses conséquences pathologiques. C'est notamment un facteur qui augmente le risque d'EDC. En situation de stress, la CRH (Corticolibérine, *Corticotropin-Releasing Hormone*) est sécrétée au niveau de l'hypothalamus plus précisément dans le système porte hypothalamo-hypophysaire. Cette hormone va à son tour stimuler la production de l'ACTH (Adrénocorticotropine) par l'hypophyse, qui va circuler dans le système sanguin et atteindre les glandes surrénales, provoquant ainsi la production de cortisol. Ce cortisol va exercer un rétrocontrôle négatif sur l'hypothalamus et l'hypophyse, par l'intermédiaire de récepteurs aux glucocorticoïdes et de récepteurs aux minéralocorticoïdes.

Les EDC sont fréquemment associés à une hyperactivité de l'axe hypothalamo-hypophyso-surrénalien et à un déficit du rétrocontrôle négatif. En effet, les concentrations plasmatiques d'ACTH sont augmentées chez 60% des patients atteints d'EDC (Choi et al., 2018; Stetler & Miller, 2011), et celles de cortisol sont augmentées chez 25% à 30% des patients atteints d'EDC (Young et al., 2001). D'autre part, l'administration de la dexaméthasone - utilisée pour son effet anti-inflammatoire -, un glucocorticoïde de synthèse d'activité similaire à celle du cortisol, agoniste des récepteurs aux glucocorticoïdes, devrait fortement diminuer la concentration de cortisol par rétrocontrôle. Chez des patients atteints d'EDC, cette administration de dexaméthasone entraîne au contraire une augmentation de la concentration

plasmatique d'ACTH ainsi que de cortisol, par rapport aux sujets sains (Horstmann et al., 2009). Dans une étude de suivi, la quantification répétée de réponse d'éveil au stress, mesurée dans la première heure après le réveil, a été effectuée chez des adolescents. Le suivi de ces adolescents l'année suivante a indiqué une association entre une augmentation la réponse d'éveil au stress (l'année précédente) et le développement d'EDC (Adam et al., 2010). Cette dérégulation peut provenir de différentes causes telles qu'une hypersécrétion de CRH, une déficience du rétrocontrôle négatif ou encore des glandes surrénales hypertrophiées (Kunugi et al., 2015). Cette dérégulation de l'axe hypothalamo-hypophyso-surrénalien entraîne notamment des modifications structurelle et fonctionnelle au niveau de l'hippocampe et également de l'amygdale. L'administration chez des sujets sains d'un antagoniste des récepteurs aux minéralocorticoïdes, la spironolactone, modifie l'adaptation face à un stress. Chez le groupe de contrôles sains, un dialogue fonctionnel entre l'hippocampe, l'amygdale et le striatum est activé en réponse à une situation de stress. Chez le groupe ayant reçu la spironolactone, ce dialogue fonctionnel est rompu (Schwabe et al., 2013). En conclusion, des dysfonctionnements des récepteurs aux glucocorticoïdes ou des récepteurs aux minéralocorticoïdes semblent compromettre la bonne adaptation du corps face à une situation inattendue ou dangereuse. Cela pourrait conduire à une altération de l'axe hypothalamo-hypophyso-surrénalien et à l'émergence d'EDC.

1.2.3 Origine inflammatoire

Plusieurs méta-analyses ont étudié les liens entre EDC et cytokines. L'une d'elles, issue de 95 études cliniques, a conclu à une augmentation de la protéine C réactive (CRP) est chez des patients atteints d'EDC. Cette même méta-analyse indique que l'augmentation de l'interleukine 6 (IL-6) est également fortement corrélée à des EDC. La corrélation de l'augmentation de l'interleukine-1 (IL-1) à des EDC révèle une association modérée entre ces 2 facteurs (Howren et al., 2009). Une autre méta-analyse, regroupant 438 patients atteints d'EDC et 350 sujets sains de 13 études, s'est intéressée aux concentrations de cytokines (Dowlati et al., 2010). Les données présentées amènent à la conclusion d'une augmentation des concentrations du facteur de nécrose tumorale α (TNF- α) chez des sujets atteints d'EDC, ceci est corroboré par l'effet bénéfique antidépresseur des biothérapies anti-TNF- α lors de leur utilisation dans diverses pathologies auto-immunes (Abbott et al., 2015). Dans cette même méta-analyse, l'augmentation des concentrations d'IL-6 chez des patients atteints d'EDC a été conclue d'après 16 études, regroupant 492 patients et 400 sujets sains ; en revanche, il n'a pas été montré de lien entre les EDC et l'IL-1 β (Dowlati et al., 2010). De

même, l'induction d'une inflammation par un traitement avec l'IFN- α , notamment pour le traitement d'hépatites virales ou de certaines leucémies, augmente le risque d'EDC. La moitié des personnes ayant été traitées par l'IFN- α développerait ainsi des EDC (Chiu et al., 2017).

Les cytokines en périphérie impactent le cerveau par plusieurs voies, notamment un passage de la barrière hémato-encéphalique (BHE) au niveau de fuites par diffusion au niveau d'organes circumventriculaires (Dantzer et al., 2008) ou encore par des seconds messagers passant la BHE (Vitkovic et al., 2000), ou bien par transport actif ou encore par l'intermédiaire de récepteurs associés aux fibres nerveuses afférentes périphériques qui vont transmettre les signaux inflammatoires dans des régions cérébrales. Les cytokines vont alors interagir à plusieurs niveaux. Elles modifient la synthèse, la libération et la recapture de monoamines (sérotonine, noradrénaline et dopamine) (Al-Hakeim et al., 2020; Scott-Burden, 1995). Elles activent l'axe hypothalamo-hypophysio-surrénalien, et augmentent également le stress oxydatif et l'apoptose de cellules gliales (Buntinx et al., 2004; Miller et al., 2009 pour revue).

1.2.4 Hypothèse glutamatergique

Le glutamate est le principal neurotransmetteur excitateur dans le système nerveux central, son implication dans la régulation de l'humeur est discutée depuis 30 ans. Une première étude chez la souris avait ainsi démontré que des antagonistes du récepteur NMDA du glutamate (notamment le MK-801) avaient des effets de type antidépresseur dans le test de la nage forcée ainsi que dans le test de suspension caudale (Trullas & Skolnick, 1990). Physiologiquement, les concentrations extracellulaires de glutamate sont régulées par les neurones et les cellules gliales au niveau de synapses tripartites (Figure 1). Le glutamate est formé dans les neurones dans la mitochondrie à partir d'un métabolite du cycle de Krebs, l' α -cétoglutarate, transformé en glutamate par une aminotransférase, puis il est stocké dans des vésicules. Une fois celui-ci libéré dans la fente synaptique après dépolarisation des neurones glutamatergiques, le glutamate peut alors activer 2 types de récepteurs localisés au niveau post-synaptique et/ou pré-synaptique : des récepteurs ionotropiques – récepteurs NMDA (*N*-méthyl-D-aspartate), AMPA (α -amino-3-hydroxy-5-méthylisoazol-4-propionate) et kaïnate – ainsi que des récepteurs métabotropiques (mGluR1 à mGluR8). Le glutamate extracellulaire est également recapté majoritairement au niveau astrocytaire mais aussi au niveau neuronal, par un transporteur plasmique des acides aminés excitateurs (EAAT). Le glutamate recapté par les astrocytes sera métabolisé en glutamine par la glutamine synthétase. La glutamine va à son tour être recaptée par les neurones présynaptiques par un transporteur des acides aminés

neutres dépendant du sodium (SNAT), où elle pourra être reconvertie en glutamate par la glutaminase. Le glutamate ainsi que la glutamine vont donc constituer une réserve glutamatergique disponible pour influencer l'activité synaptique.

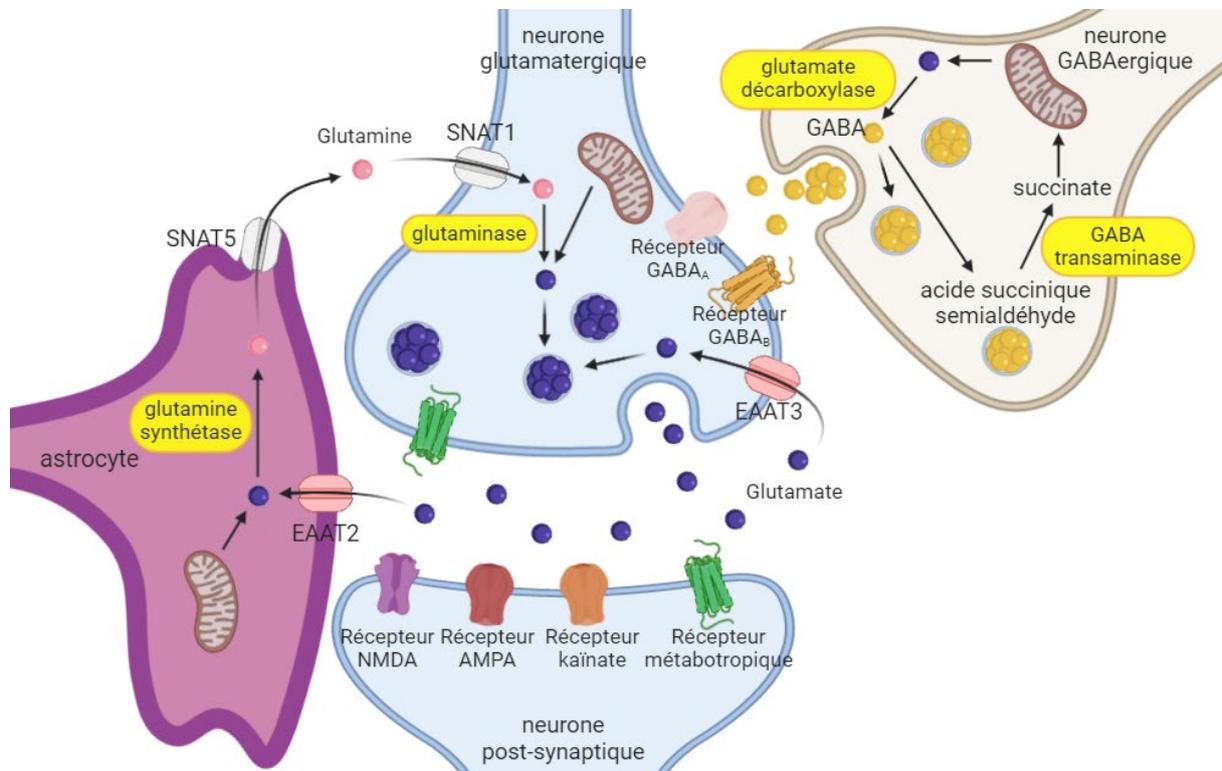


Figure 1 – Schéma du métabolisme du glutamate : synapse glutamatergique tripartite et cycle GABA-glutamate-glutamine. Le glutamate est formé dans les neurones à partir d'un métabolite du cycle de Krebs, l'α-cétoglutarate. Après la libération de glutamate dans le milieu extracellulaire, le glutamate active différents récepteurs postsynaptiques qui peuvent être ionotropiques – récepteurs NMDA, AMPA et kainate – ou métabotropiques. Les prolongements astrocytaires présents autour de la synapse recaptent le glutamate par des transporteurs EAAT. Le glutamate va être converti en glutamine dans les astrocytes par la glutamine synthétase, avant d'être transportée dans le neurone présynaptique par des transporteurs SNAT. Dans ce dernier, la glutamine va être convertie en glutamate puis stocké dans des vésicules synaptiques. Il s'agit donc d'un cycle glutamate-glutamine. Le glutamate est également à l'origine de la synthèse de GABA, pouvant être métabolisé en succinate et ainsi rejoindre le cycle de Krebs.

Le glutamate est également en lien étroit avec le GABA (acide γ-aminobutyrique), le neurotransmetteur inhibiteur majeur du système nerveux central. En effet, la décarboxylation du glutamate par la glutamate décarboxylase (GAD, qui existe sous 2 isoformes : GAD65 et GAD67) est à l'origine de la synthèse de GABA (Figure 1). Par ailleurs, le GABA est métabolisable par la GABA transaminase en acide succinique semialdéhyde, lui-même métabolisable en succinate par la succinate-semi-aldéhyde déshydrogénase (Ravasz et al., 2017). Le succinate peut rejoindre le cycle de Krebs, pouvant ainsi conduire de nouveau à la synthèse de glutamate. Ces 2 neurotransmetteurs constituent une balance entre la neurotransmission excitatrice et inhibitrice.

L'altération de cette balance excitation/inhibition serait en lien avec les EDC. Une méta-analyse basée sur 11 études amène à la conclusion qu'il y aurait des altérations de la transmission glutamatergique chez les patients atteints d'EDC, avec une majorité d'étude concordante sur la diminution de la réserve glutamatergique dosée par spectroscopie par résonance magnétique dans diverses régions cérébrales, telles que le cortex médian préfrontal ou l'hippocampe (Yuksel & Ongur, 2010). D'autre part, une étude post-mortem plus récente a comparé la densité d'astrocytes exprimant la glutamine synthétase chez 14 patients atteints d'EDC et chez 16 contrôles sains. Cette étude a montré une diminution de la densité d'astrocytes exprimant cette enzyme chez les patients atteints d'EDC dans certaines régions cérébrales et notamment dans le cortex dorso-latéral préfrontal (Bernstein et al., 2015), ce qui suggère donc que la transmission glutamatergique est également impactée. Une étude menée chez 20 patients atteints d'EDC et chez 21 contrôles sains indique que les taux de GABA dans le cortex cingulaire sont diminués chez les patients atteints d'EDC (Gabbay et al., 2012). Une autre étude conduite en post-mortem chez 15 patients atteints d'EDC et chez 15 contrôles sains indique que l'expression de la GAD67 est réduite dans l'hippocampe des patients atteints d'EDC (Thompson Ray et al., 2011). Chez les rongeurs, la transmission glutamatergique est modifiée par un stress aigu. Ainsi, chez des rats, l'exposition à un tel stress aigu augmente les concentrations extracellulaires de glutamate et de GABA dans le cortex préfrontal mesurées par microdialyse (Lupinsky et al., 2017). Cette même exposition à un stress aigu chez des rats préalablement soumis à un stress chronique imprédictible, n'affecte cette fois plus transmission glutamatergique dans le cortex préfrontal (Jett et al., 2017). De plus, l'exposition d'un stress chronique imprédictible durant 5 semaines chez des rats diminuent également les concentrations de GAD67 dans le cortex préfrontal ainsi que dans l'hippocampe (Banar et al., 2017). Ces études démontrent l'importance des transmissions glutamatergique et GABAergique et de la balance excitation/inhibition dans l'étiologie des EDC et dans la réponse au stress aigu qui est par ailleurs affectée dans cette pathologie.

1.2.5 Altération de la plasticité synaptique

Le cerveau possède la capacité de créer, supprimer ou réorganiser des synapses, et de changer la structure des neurones, au niveau de leur axone ou de leurs dendrites. Cela conduit au renforcement ou à l'affaiblissement de la transmission synaptique et ainsi de l'efficacité synaptique. Il s'agit de la plasticité synaptique, qui permet l'apprentissage et l'adaptation, en réponse à un changement environnemental. La transmission synaptique et l'efficacité

synaptique peuvent également être modifiées en fonction du nombre et de la composition des récepteurs des neurotransmetteurs. Ces modifications conduisent à des potentialisations à long terme (LTP, *long-term potentiation*) ou à des dépressions à long terme (LTD, *long-term depression*). Les LTP facilitent la dépolarisation postsynaptique par augmentation globale de l'efficacité des récepteurs, lors de la répétition d'une activation synaptique. A l'inverse, lors d'une LTD, l'efficacité de la transmission synaptique est diminuée. Il a été montré chez le rat que l'induction *in vivo* de LTP au niveau de la voie perforante en amont de l'hippocampe conduisait à une augmentation des étapes de proliférations et de survie des nouveaux neurones produits dans l'hippocampe (ce phénomène de neurogenèse hippocampique est décrit en détail ci-dessous, voir chapitre II.2) (Bruehl-Jungerman et al., 2006).

Les EDC entraînent une altération de plusieurs régions neuroanatomiques. Les données extraites de méta-analyses montrent une réduction du volume de l'hippocampe chez des patients atteints d'EDC (Campbell et al., 2004; Schmaal et al., 2016). Concernant les modifications de l'amygdale, les données sont plus hétérogènes. L'apparition d'EDC avant 21 ans est tout de même associée à une tendance de réduction du volume de l'amygdale (Campbell et al., 2004; Schmaal et al., 2016). Les raisons de ces réductions du volume de régions cérébrales ne sont pas bien établies, mais elles pourraient être liées à une perte neuronale ainsi qu'à une atrophie et un remodelage des dendrites, mais aussi à une réduction des synapses. Une étude conduite en post-mortem chez 21 patientes atteintes d'EDC indique que les expressions de BDNF (*Brain-Derived Neurotrophic Factor*) ainsi que de son récepteur TrkB (*Tropomyosin receptor kinase B*) sont réduites dans l'amygdale, par rapport aux 21 contrôles saines (Guilloux et al., 2012). Une autre étude conduite en post-mortem indique que chez 15 patients traités par un antidépresseur, l'expression de BDNF dans l'hippocampe est augmentée (B. Chen et al., 2001). Le BDNF, appartenant à la famille des neurotrophines, agit comme un facteur trophique impliqué dans les mécanismes de survie des neurones. Il module également l'arborisation axonale et dendritique, l'efficacité de la transmission synaptique et la maturation fonctionnelle des synapses (Vaynman et al., 2004). D'autre part, des études chez le rat ont montré que le *knock-out* du BDNF (par interférence ARN (acide ribonucléique) et par injection de lentivirus) dans le gyrus dentelé (GD) dorsal induit un comportement de type dépressif dans les tests de préférence au sucrose et de nage forcée (Taliaz et al., 2010), à l'inverse, l'augmentation de BDNF dans l'hippocampe induit un effet de type antidépresseur dans le test de la nage forcée (Deltheil et al., 2008), et la surexpression du BDNF (par injection de lentivirus) au niveau des astrocytes hippocampiques

chez la souris induit un comportement de type antidépresseur dans le test d'alimentation supprimée par la nouveauté (Quesseveur et al., 2013). Enfin, un traitement par un antidépresseur augmente l'expression d'ARNm du BDNF dans l'hippocampe (Molteni et al., 2006).

I.2.6 Vulnérabilité génétique

Chez toutes les personnes exposées à un même évènement traumatique, la réponse sera variable, et toutes ne vont pas développer d'EDC. Cela suggère l'existence d'une susceptibilité génétique propre à chaque personne. Chez une personne dont les parents sont atteints d'EDC, le risque d'en développer également est augmenté (Rice et al., 2002). De nombreux gènes, et notamment leur polymorphisme, contribueraient à cette vulnérabilité génétique. Une méta-analyse regroupant ainsi 75 067 patients atteints d'EDC et 231 747 contrôles sains a analysé leur génome. Cette méta-analyse met en évidence 17 variations génétiques, pour la plupart localisées dans des gènes exprimés au niveau du système nerveux central et impliqués dans le développement cérébral (Hyde et al., 2016). Parmi ces nombreux gènes, quelques-uns ont été identifiés : Les gènes du transporteur de la sérotonine (Caspi et al., 2010), du récepteur des glucocorticoïdes ou des minéralocorticoïdes (Keller et al., 2017) ou encore du BDNF (Colle et al., 2017; Hennings et al., 2019). La génétique explique la prédisposition à la dépression, mais elle ne semble pas en être une cause directe. Les études sur les gènes restent toujours à prendre en considération avec précaution, car elles peuvent être menées par le biais des connaissances.

Les EDC sont ainsi multifactoriels. Différentes hypothèses permettent d'expliquer en partie la physiopathologie des EDC. Ces hypothèses ne sont pas indépendantes les unes des autres. Par exemple, la CRH produit au niveau de l'hypothalamus serait responsable d'effet de type dépressif par une potentialisation de récepteurs sérotoninergiques 5-HT_{2A} et 5-HT_{2C} (Magalhaes et al., 2010). Les cytokines modifient la synthèse, la libération et la recapture des monoamines comme vu précédemment, et diminuent l'expression de transporteurs gliaux du glutamate (Ida et al., 2008). Le lien entre l'inflammation et l'axe hypothalamo-hypophyso-surrénalien a aussi été décrit précédemment, et ce lien est bidirectionnel : bien que les glucocorticoïdes soient connues pour leur propriétés anti-inflammatoires, elles peuvent également augmenter l'inflammation selon la durée ou la dose d'exposition notamment (Sorrells et al., 2009). Il semblerait également que les cytokines pourraient réduire

l'expression de BDNF (directement ou indirectement par le glutamate) (Calabrese et al., 2014).

1.3 Les traitements pharmacologiques actuels et leurs limites

La découverte des premiers traitements antidépresseurs a été faite par sérendipité. L'amélioration de l'humeur chez des patients atteints d'EDC par l'imipramine a été découverte en 1957 lors de la recherche d'un nouvel antipsychotique (Kuhn, 1957). En parallèle, l'effet euphorisant de l'iproniazide, utilisé comme antituberculeux, a été constaté en 1958 (Kline, 1958). Ces nouvelles découvertes vont donner naissance à différentes classes d'antidépresseurs, qui ont par la suite été identifiées comme les tricycliques (pour l'imipramine) et comme les inhibiteurs de la monoamine oxydase – une enzyme dégradant des amines - (pour l'iproniazide). Les recherches d'antidépresseurs ont ensuite été guidées par l'hypothèse des monoamines, suite à l'effet exacerbant les symptômes dépressifs constaté avec la réserpine (voir chapitre I.2.1).

Parmi les traitements existants découverts par la suite, les inhibiteurs sélectifs de la recapture de la sérotonine (ISRS) sont la classe d'antidépresseurs la plus prescrite dans la prise en charge des EDC (M. Miller et al., 2014). La fluoxétine fait partie de cette classe médicamenteuse. Ils augmentent les concentrations de sérotonine intra-synaptiques en bloquant sélectivement le transporteur de cette monoamine. De tels traitements nécessitent une administration chronique de 3 à 6 semaines pour exercer leurs effets thérapeutiques (Machado-Vieira et al., 2010), et durant l'initiation du traitement, le risque suicidaire est augmenté (Fornaro et al., 2019). Une administration aiguë ou sub-chronique d'ISRS n'induit qu'une augmentation limitée des taux intra-synaptiques de 5-HT (Zanoveli et al., 2010), ceci est dû à un rétrocontrôle négatif exercé par l'activation des autorécepteurs somatodendritiques 5-HT_{1A} et terminaux 5-HT_{1B} présents sur les neurones sérotoninergiques des noyaux du raphé (Guilloux et al., 2006). La désensibilisation fonctionnelle de ces récepteurs présynaptiques induit une augmentation graduelle de la transmission sérotoninergique centrale qui aboutit aux effets antidépresseurs chez l'humain ou aux effets dits de type antidépresseurs dans des modèles animaux d'anxiété/dépression. Ces effets de type antidépresseurs/anxiolytiques sont évalués chez l'animal à l'aide de différents tests comportementaux. Les principaux tests nécessaires à la compréhension de cette thèse sont présentés dans la section des matériels et méthodes (voir paragraphe III, Box 1).

De manière surprenante, après un traitement avec un antidépresseur, l'augmentation graduelle de la transmission sérotoninergique et les effets comportementaux ne présentent pas le même déroulement temporel. Ainsi, un traitement de 7 jours à la fluoxétine induit une augmentation importante des taux extracellulaires de 5-HT, mesurés par microdialyse *in vivo* chez la souris notamment dans l'hippocampe et le noyau du raphé (Popa et al., 2010) (Figure 2), tandis que dans le même temps, ce traitement n'induit pas d'effet de type antidépresseur dans tous les tests (Mendez-David et al., 2014). Un effet comportemental complet n'est observé qu'après un traitement de 21 ou de 28 jours avec un ISRS (Mendez-David et al., 2014) (Tableau 2). Cette contradiction met en lumière que les effets de type antidépresseurs des ISRS impliquent d'autres facteurs que la transmission sérotoninergique. Parmi ces facteurs, nous avons porté un intérêt tout particulier à la neurogenèse hippocampique adulte.

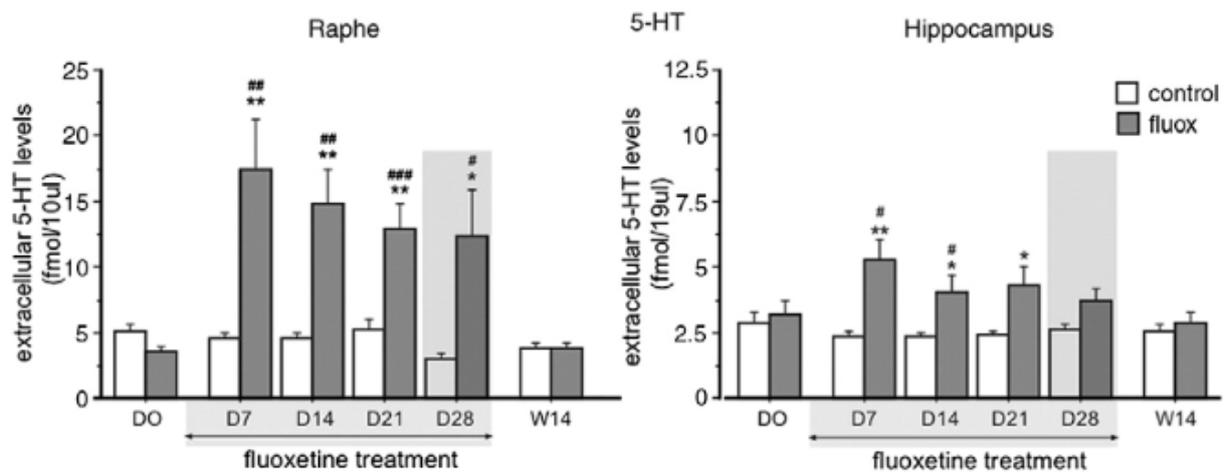


Figure 2 – Concentrations extracellulaires de 5-HT dans le noyau du raphé et dans l'hippocampe de souris BALBc, après 7, 14, 21 ou 28 jours de traitement à la fluoxétine (18 mg/kg/jour), ainsi que 14 jours après arrêt du traitement. Les valeurs représentent les moyennes \pm erreur-type de la moyenne. * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$ par rapport au groupe contrôle du même jour, selon une ANOVA à 1 facteur suivi d'un test de Student. # $p < 0,05$; ## $p < 0,01$; ### $p < 0,001$ par rapport au contrôle au jour 0, selon une ANOVA à 1 facteur suivi d'un test de Student (Popa et al., 2010).

Tableau 2 – Récapitulatif des effets comportementaux obtenus chez des souris C57BL/6Ntac après 7 ou 28 jours de traitement à la fluoxétine (18 mg/kg/jour) (Mendez-David et al., 2014).

Tests comportementaux	Fluoxétine (18 mg/kg/jour)	
	7 jours	28 jours
OF	∅	↑ temps passé dans le centre ↑ distance ambulatoire
EPM	∅	↑ temps passé dans les bras ouverts ↑ nombre d'entrée dans les bras ouverts
NSF	∅	↓ latence pour aller se nourrir
TST	↓ durée d'immobilité	↓ durée d'immobilité
Splash test	↑ durée de toilettage	↑ durée de toilettage

II. Les jeunes neurones issus de la neurogenèse hippocampique adulte, acteurs de l'activité antidépressive

II.1 *Découverte du renouvellement des neurones dans le cerveau adulte*

Au XX^e siècle, le dogme universellement admis indiquait que la structure du cerveau était fixe, et que le cerveau était incapable de produire de nouveaux neurones. Selon ce dogme défendu par Santiago Ramon y Cajal, les neurones se connectaient en circuit durant le développement, et le stock neuronal ne pouvait que décroître par la suite. Santiago Ramon y Cajal avait en effet déclaré que « dans les centres du cerveau adulte, les voies nerveuses sont une chose fixée, finie, immuable. Tout peut mourir, rien ne peut se régénérer » (Cajal, 1928). L'apparition d'une nouvelle méthode de détection de la division cellulaire va permettre la publication des premières preuves anatomiques de la présence de nouvelles cellules par Joseph Altman (Figure 3). Pour cela, des rats ont reçu une administration intrapéritonéale de thymidine tritiée (Altman & Das, 1965). Cet analogue radio-marqué de la thymidine s'incorpore à l'acide désoxyribonucléique (ADN) lors de la réplication dans les cellules en division, et est détectable par autoradiographie. Cependant, en raison de limites techniques, les nouvelles cellules ne sont pas identifiées comme des neurones et cette découverte resta longtemps ignorée.

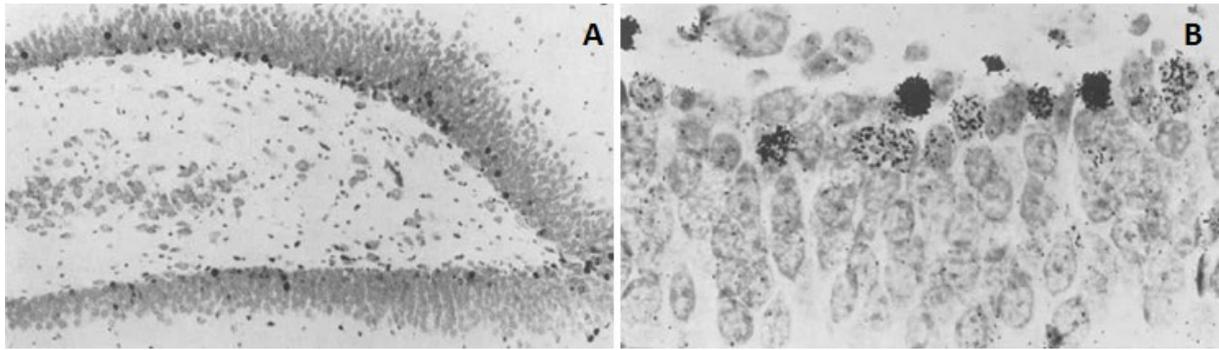


Figure 3 - Autoradiographies du GD de l'hippocampe d'un rat ayant reçu de la thymidine tritiée. A, agrandissement x 100 et B, agrandissement x 640 (Altman & Das, 1965).

Ce n'est qu'à la fin du XX^e siècle que ce dogme a été aboli, notamment avec la publication de la preuve d'une neurogenèse adulte chez les primates dont l'humain. L'équipe de Fred Gage a identifié de nouveaux neurones générés dans le GD de cerveaux adultes humains, ayant reçu par intraveineuse du bromodéoxyuridine (BrdU) (Eriksson et al., 1998). Cet autre analogue de la thymidine s'incorpore dans l'ADN des cellules en division et est détectable par immunohistochimie. Ainsi, l'identité des nouvelles cellules a pu être clairement révélée par couplage avec d'autres marqueurs neuronaux et gliaux (Figure 4). Depuis sa découverte dans le cerveau adulte des mammifères, la neurogenèse adulte a été identifiée principalement dans 2 régions cérébrales : la zone sous-granulaire dans le GD de l'hippocampe et la zone sous-ventriculaire située sur les parois des ventricules latéraux, qui ne sera pas abordée ici.

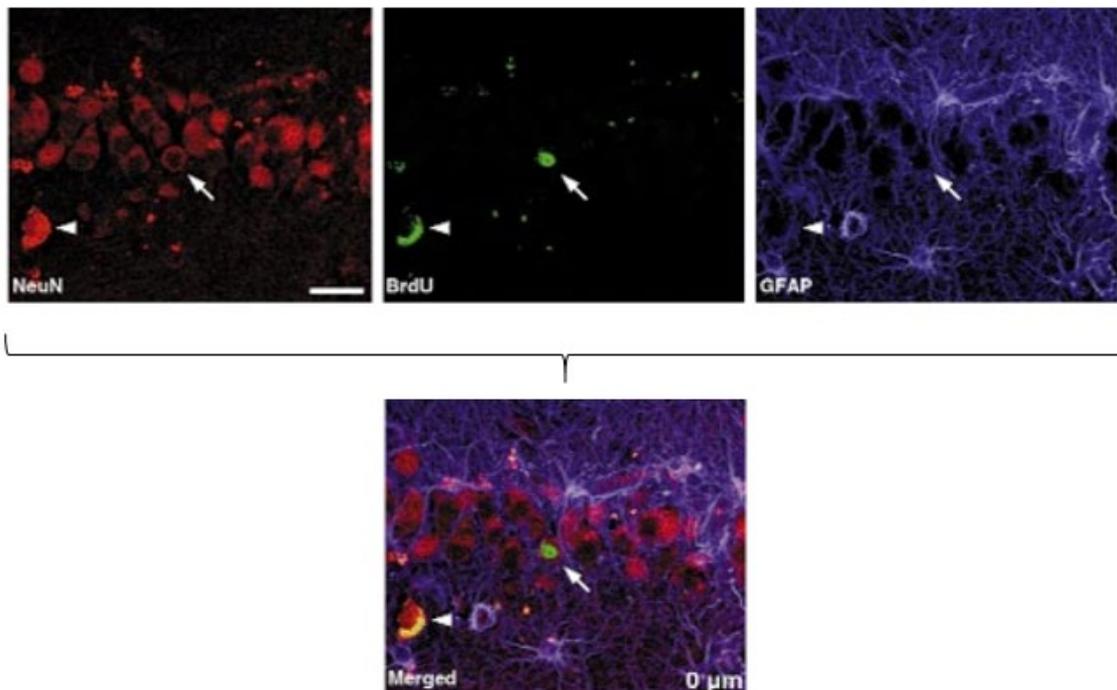


Figure 4 – Détection simultanée du BrdU, d'un marqueur neuronal (NeuN) ainsi que d'un marqueur glial (GFAP, *Glial Fibrillary Acidic Protein*) au niveau d'un GD adulte humain par immunohistochimie (Eriksson et al., 1998).

II.2 *Présentation de la neurogenèse hippocampique adulte*

La neurogenèse hippocampique adulte désigne le processus de division des cellules souches neurales présentes dans la zone sous-granulaire dans le GD de l'hippocampe, produisant ainsi de nouveaux neurones. Ces nouveaux neurones issus de la neurogenèse adulte hippocampique s'intègrent dans les circuits existants de l'unité fonctionnelle que constitue l'hippocampe. Il s'agit d'une structure très organisée avec le GD et la corne d'Ammon (CA) subdivisée en sous-régions (CA1, CA2 et CA3). Le GD porte notamment les cellules granulaires et des interneurons, alors que la CA porte des neurones pyramidaux ainsi que des interneurons (Acsady et al., 1996; Lorincz & Nusser, 2008). Cette organisation structurelle est associée à une organisation fonctionnelle définie comme le circuit trisynaptique (Figure 5). Dans ce circuit unidirectionnel, la voie afférente est constituée par les fibres perforantes qui sont un ensemble d'axones émis par des neurones dont les corps cellulaires sont situés dans le cortex entorhinal médian ou latéral. Ces axones font la première connexion du circuit, au niveau de la couche moléculaire, avec les dendrites des cellules granulaires du GD. Ces cellules granulaires projettent leurs axones jusqu'aux dendrites des cellules pyramidales de l'aire CA3, cette projection forme les fibres moussues. Les cellules pyramidales de l'aire CA3 projettent alors soit vers l'hippocampe controlatéral via le corps calleux, formant les fibres commissurales ; soit vers la CA1, formant les collatérales de Schaffer. Cette connexion constitue la troisième synapse de ce circuit. Enfin la voie efférente qui véhicule les informations traitées par l'hippocampe est constituée des axones issus des neurones pyramidaux de la CA1 et qui projettent notamment vers le subiculum qui contacte en retour le cortex entorhinal (Amaral et al., 2007).

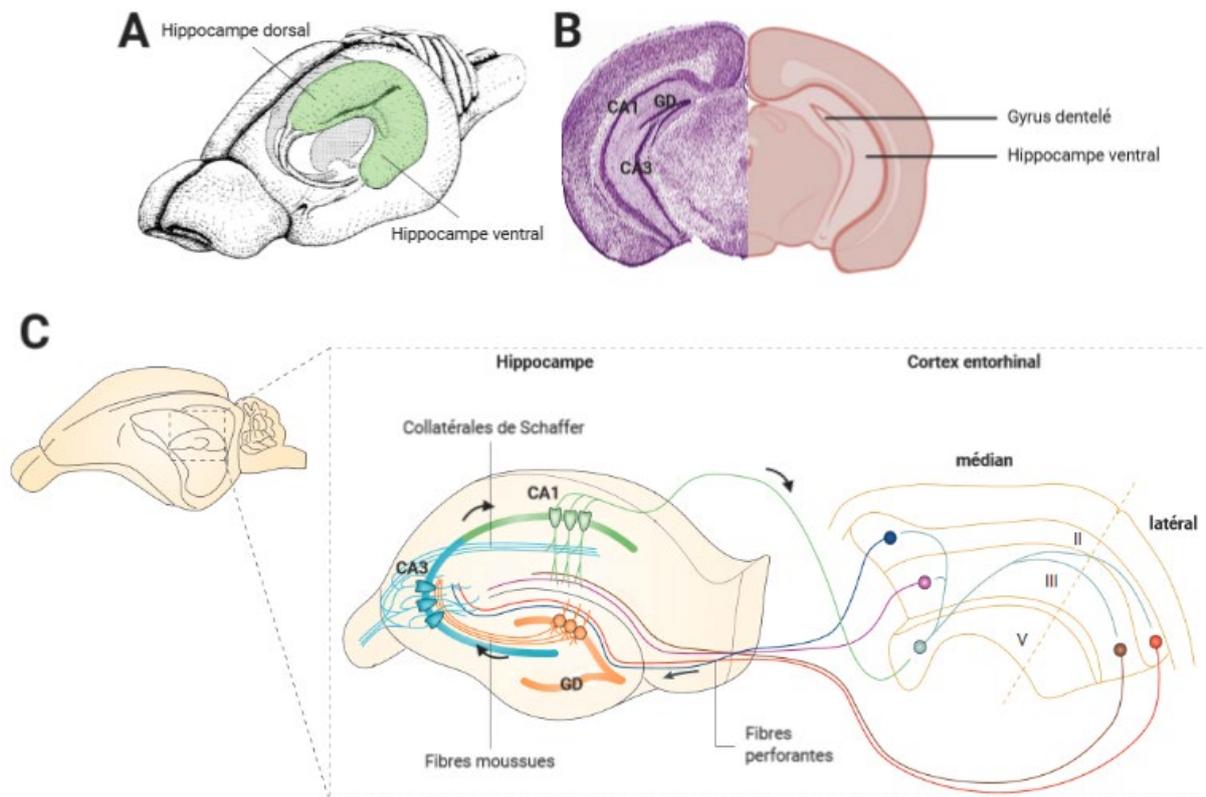


Figure 5 - Organisation de l'hippocampe. A. Localisation de l'hippocampe dorsal et de l'hippocampe ventral chez le rongeur. B. Coupe frontale de la partie postérieure de l'hippocampe. C. L'hippocampe est caractérisé par un circuit neuronal trisynaptique : les fibres perforantes projettent sur les cellules granulaires contenues dans le GD, qui à leur tour envoient massivement leurs axones (fibres moussues) vers les cellules pyramidales de l'aire CA3. Puis ces cellules de l'aire CA3 projettent leurs axones vers les cellules pyramidales de l'aire CA1 (collatérales de Schaffer) (Neves et al., 2008 pour revue).

Cette production de jeunes neurones est possible grâce à la niche neurogénique que constitue la zone sous-granulaire du GD. Cette niche neurogénique constitue un environnement particulier favorable pour la neurogenèse hippocampique adulte, en particulier grâce à sa composition en cellules de la microglie, astrocytes ainsi qu'en cellules endothéliales (Aimone et al., 2014). Les différentes étapes de prolifération des progéniteurs, de survie, de différenciation et de maturation des jeunes neurones, nécessitent plusieurs semaines et impliquent la migration des cellules en maturation dans la couche granulaire de l'hippocampe (Figure 6). Chacune de ces étapes est analysée avec la technique d'immunohistochimie grâce à des marqueurs spécifiques. Ainsi la prolifération peut être approchée par le marqueur Ki67, les neurones immatures sont marqués par la doublecortine (DCX) et les neurones matures expriment le marqueur NeuN.

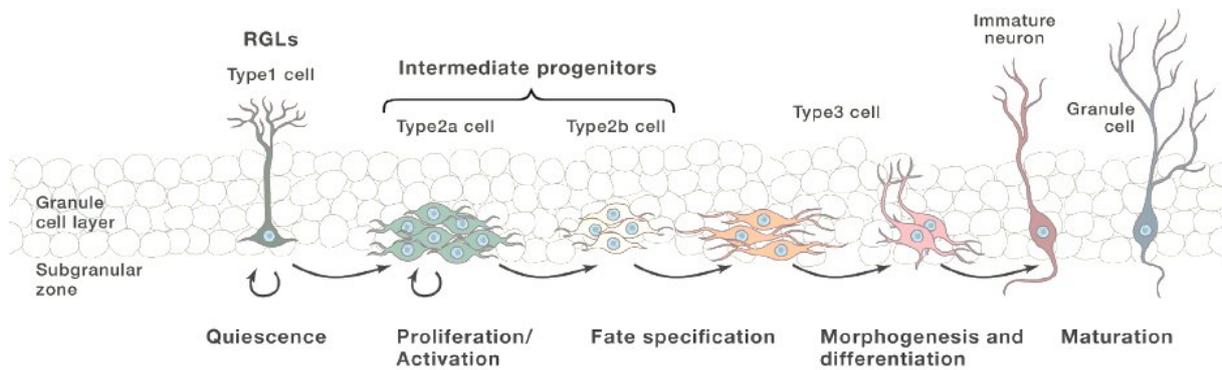


Figure 6 - Représentation schématique des étapes impliquées et types cellulaires de la neurogenèse hippocampique (d'après Goncalves et al., 2016 pour revue). La neurogenèse adulte hippocampique implique plusieurs étapes de prolifération, différenciation, maturation et survie.

Des facteurs environnementaux tels que les stimulations sociales, cognitives, sensorielles, ou encore l'activité physique augmentent les différentes étapes de la neurogenèse adulte (M. J. Chen & Russo-Neustadt, 2009; Farioli-Vecchioli et al., 2014; Moreno-Jimenez et al., 2019). Il en va de même pour des facteurs neurotrophiques tels que le BDNF, le VEGF (*Vascular Endothelial Growth Factor*) ou l'IGF-1 (*Insulin-Like Growth Factor-1*) (Licht et al., 2016; L. Wang et al., 2015). Enfin, des systèmes de neurotransmission stimulent également les différentes étapes de la neurogenèse hippocampique, notamment le système sérotoninergique, via les récepteurs 5-HT_{1A} et 5-HT₄ (G. Lucas et al., 2007; Noto et al., 2016), ou le système GABAergique (Ge et al., 2007 pour revue).

II.2.1 Prolifération

Les cellules souches du GD se divisent majoritairement de manière asymétrique, permettant ainsi la production de progéniteurs neuraux. Les cellules souches du GD sont des cellules souches de morphologie radiale (*Radial glia-like cells*) de type 1, caractérisée par un corps cellulaire dans la zone sous-granulaire avec une longue projection radiale s'infiltrant dans la couche granulaire du GD, et avec des ramifications complexes dans la couche moléculaire. Ces cellules souches de type 1 expriment notamment la protéine fibrillaire acide de la glie (GFAP, *Glial Fibrillary Acidic Protein*), les filaments intermédiaires de nestine et Sox2 (*sex determining region Y-box2*). Le maintien de la quiescence des cellules souches ainsi que du caractère hétérogène des cellules produites sont régulés par de nombreux éléments de la niche neurogénique, telle que la signalisation Notch. Les cellules souches restent majoritairement à un état de quiescence (Encinas et al., 2011), contrairement à lors de la neurogenèse embryonnaire, durant laquelle les cellules souches ont une capacité proliférative plus importante permettant ainsi la production rapide en quelques mois de milliards de neurones (Figure 7).

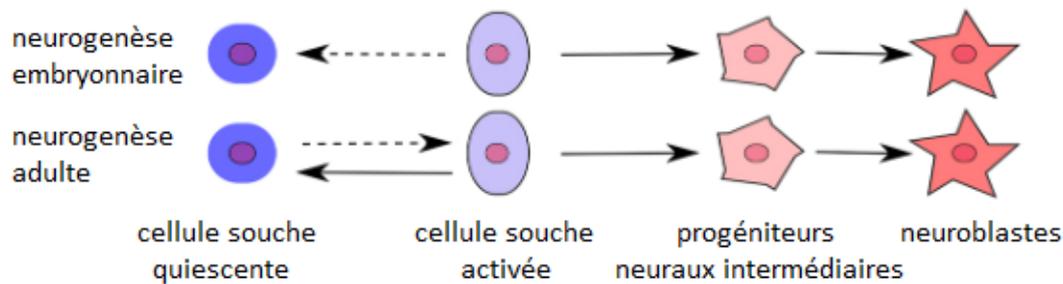


Figure 7 – Prolifération des cellules souches lors de la neurogenèse embryonnaire et de la neurogenèse adulte. Durant la neurogenèse embryonnaire, la majorité des cellules souches est activée, seule une partie entre en phase de quiescence. Lors de la neurogenèse adulte, la majorité des cellules souches est quiescente, seule une partie transite vers un état activé. (Boareto et al., 2017 pour revue)

Les progéniteurs neuraux intermédiaires sont des cellules souches de morphologie horizontale de type 2a et 2b. Les cellules progénitrices de type 2a expriment toujours les filaments intermédiaires de nestine ainsi que Sox2, mais elles n'ont plus du tout la même morphologie que les cellules de type 1, elles possèdent de courtes projections horizontales. Les cellules de type 2b n'expriment plus les filaments de nestine, mais commencent à exprimer les marqueurs de neuroblastes comme NeuroD (*Neurogenic Differentiation*) et Prox1 (Kuwabara et al., 2009; Lavado et al., 2010). Ces progéniteurs neuraux intermédiaires sont capables de produire plusieurs types cellulaires tels que des neurones mais aussi des cellules gliales : astrocytes ou oligodendrocytes (Bonaguidi et al., 2011). La prolifération des cellules souches du GD conduit à l'addition d'environ 700 neurones par jour par hippocampe chez l'Homme (Boldrini et al., 2018; Spalding et al., 2013) et à l'addition de quelques milliers de neurones par jour par hippocampe chez les rongeurs (Bordiuk et al., 2014; Cameron & McKay, 2001).

II.2.2 Survie et différenciation

La phase de différenciation est le moment où les progéniteurs neuraux intermédiaires indifférenciés deviennent des cellules différenciées. Cette différenciation en neurones ou en cellules gliales (il s'agit dans ce cas de gliogenèse) est régulée par les astrocytes composant la niche neurogénique (Song et al., 2002). La majorité des progéniteurs neuraux se différencient en neuroblastes plutôt qu'en cellules gliales (Steiner et al., 2004), mais les facteurs déterminant cette différenciation ne sont pas encore identifiés. Seule la différenciation en neuroblastes sera abordée ici. Les neuroblastes sont des cellules de type 3 qui expriment NeuroD et Prox1 ou encore PSA-NCAM (*Polysialated form of Neural Cell Adhesion Molecule*). Cette étape repose sur les actions antagonistes de plusieurs gènes spécifiques, et notamment Notch. Ces neuroblastes nouvellement formés migrent dans la partie interne de la couche granulaire du GD, et commencent à développer de nouveaux prolongements : ces

cellules sortent du cycle cellulaire et se différencient en jeunes neurones immatures. Ces jeunes neurones immatures seront produits environ une semaine après la division de la cellule souche (Ghosh, 2019 pour revue; Lopez-Rojas & Kreutz, 2016). Cette différenciation suit les mêmes étapes que lors de la neurogenèse embryonnaire (Hochgerner et al., 2018) (Figure 8).

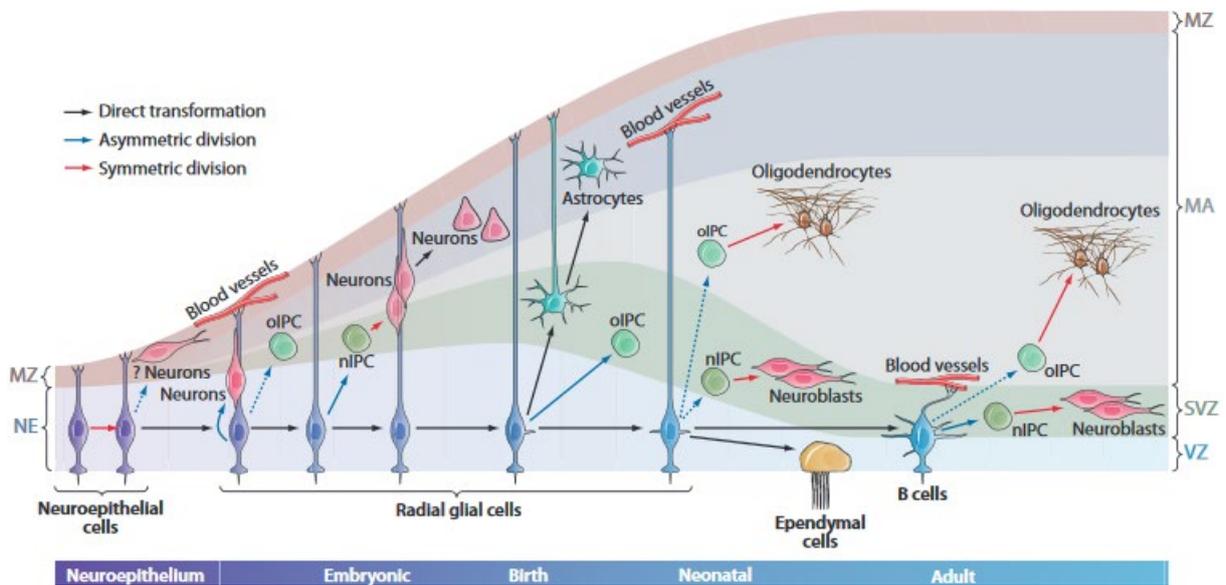


Figure 8 – Les neurogenèses embryonnaire et adulte partagent les mêmes étapes. Lors de la neurogenèse embryonnaire, les cellules souches du neuroépithélium (NE) prolifèrent dans la zone ventriculaire (VZ) du tube neural ; les cellules différenciées migrent ensuite selon leur devenir : les premiers neurones sont positionnés dans la zone marginale (MZ) et les cellules gliales dans la surface corticale (MA). Lors de la neurogenèse adulte, ces étapes de prolifération et de différenciation ont lieu dans la zone sous-granulaire dans le GD de l'hippocampe et la zone sous-ventriculaire (SVZ) située sur les parois des ventricules latéraux (Hochgerner et al., 2018; Kriegstein & Alvarez-Buylla, 2009 pour revue).

Seulement 25% des neuroblastes vont survivre et s'intégrer dans les circuits hippocampiques, les autres subissent l'apoptose principalement dans les 4 premiers jours après la différenciation en neuroblaste (Kempermann et al., 2003; Sierra et al., 2010).

II.2.3 Maturation

Après leur différenciation, les jeunes neurones immatures étendent leurs axones le long des zones de projection des fibres moussues. Ces jeunes neurones développent ensuite leurs prolongements dendritiques apicaux dans la couche moléculaire, et de nombreuses synapses avec les fibres d'axones venant du cortex entorhinal vont être établies sur ces dendrites. Les épines dendritiques sont de plus en plus nombreuses entre la 3^{ème} et la 4^{ème} semaine après la division (Zhao et al., 2006). D'autre part, lors de la maturation, des changements d'expression de 2 co-transporteurs du chlore entraînent une diminution de la concentration intracellulaire de chlore des jeunes neurones. Cette concentration intracellulaire du chlore détermine les effets inhibiteurs ou excitateurs du GABA : l'effet du GABA qui est dépolarisant dès le stade de progéniteurs neuraux de type 2, essentiel à la maturation des jeunes neurones immatures,

est perdu (Esposito et al., 2005). Cette étape de maturation est similaire à celle de la neurogenèse embryonnaire, bien qu'elle semble plus rapide lors de la neurogenèse embryonnaire (Ben-Ari, 2007; Esposito et al., 2005 pour revue; Overstreet-Wadiche et al., 2006). Environ 2 mois après leur division lors de la neurogenèse adulte, ces nouvelles cellules granulaires qui ont survécu et qui se sont intégrés dans le circuit trisynaptique de l'hippocampe deviennent indifférents aux neurones matures déjà existants.

II.3 Neurogenèse et antidépresseurs

La neurogenèse hippocampique adulte fait partie intégrante de l'homéostasie de l'hippocampe et serait un acteur important dans la dépression et sa guérison. Cette hypothèse se base notamment sur la constatation à maintes reprises en post-mortem d'une atrophie hippocampique chez des patients souffrant d'EDC, pouvant refléter une perte neuronale liée à une diminution de la neurogenèse hippocampique (Kempton et al., 2011). Elle se base également sur le lien entre l'augmentation des taux de glucocorticoïdes, pouvant être à l'origine d'EDC (voir chapitre I.2.3 pour l'hypothèse de l'origine inflammatoire de la dépression), et la diminution du BDNF, réduisant ainsi l'étape de prolifération de la neurogenèse hippocampique adulte. En effet, une étude *in vitro* sur cellules humaines indique qu'une faible concentration de cortisol augmente la prolifération des progéniteurs neuronaux, tandis qu'une forte concentration de cortisol la réduit. Cette étude précise que l'utilisation d'un antagoniste des récepteurs aux minéralcorticoïdes, la spironolactone, ainsi que d'un antagoniste des récepteurs aux glucocorticoïdes, le RU486, a montré que ces effets sont dépendants des récepteurs aux minéralcorticoïdes et des glucocorticoïdes, respectivement (Anacker et al., 2013). En revanche, une ablation de la neurogenèse hippocampique adulte seule n'induit pas de comportement de type dépressif chez la souris (Revest et al., 2009; Zou et al., 2015), bien qu'elle induit un phénotype anxieux (Revest et al., 2009). Au contraire, une seconde étude indique que la suppression de la neurogenèse n'induit pas de phénotype anxio-dépressif, mais qu'en revanche, après un stress aigu, cette suppression exacerbe le phénotype anxio-dépressif (Snyder et al., 2011). Cette dernière étude suggère qu'un trouble de la neurogenèse hippocampique rendrait plus sensible aux effets du stress.

L'équipe de Boldrini a montré chez l'Homme que le traitement avec des antidépresseurs induisait une augmentation de la neurogenèse dans le GD (Boldrini et al., 2018; Boldrini et al., 2013). Ces résultats sont confirmés par des études précliniques menées chez des rongeurs. En effet, dans certaines souches d'animaux naïfs et non stressés, des traitements chroniques

par des antidépresseurs induisent une augmentation de la prolifération, de la survie et de la maturation des jeunes neurones (Santarelli et al., 2003; J. W. Wang et al., 2008).

La réponse à un traitement chronique d'antidépresseurs est partiellement affectée par une irradiation du GD par des rayons X, provoquant une ablation de la neurogenèse hippocampique, que ce soit chez des souris naïves (Santarelli et al., 2003), chez des souris soumises à un stress chronique imprédictible (Surget et al., 2008) ou encore dans le modèle CORT (David et al., 2009; Mendez-David et al., 2014). L'ablation de la neurogenèse hippocampique chez des primates non humains affecte également la réponse à la fluoxétine dans un modèle de stress chronique (Perera et al., 2011). Ceci implique donc que la neurogenèse hippocampique adulte est un des éléments nécessaires à la réponse aux antidépresseurs.

Si le traitement avec des antidépresseurs induit des effets neurogéniques, il induit aussi des effets comportementaux qui sont prédictifs d'une activité anxio-dépressive des antidépresseurs utilisés. Ceci est vérifié chez des souris 129 SvPas naïves avec un niveau de neurogenèse faible (Diaz et al., 2012) mais aussi dans les modèles d'anxiété/dépression (Tableau 3). De manière intéressante, après suppression de la neurogenèse par irradiation du GD aux rayons X, la fluoxétine perd son effet dans un test prédictif d'une activité mixte anxiolytique/antidépressive des antidépresseurs : le NSF (Mendez-David et al., 2014). Ceci démontre donc que ce test comportemental évalue l'effet neurogenèse-dépendant de la fluoxétine.

Tableau 3 - Implication des jeunes neurones issus de la neurogenèse dans l'activité de type antidépressif des ISRS (David et al., 2010 pour revue). L'implication des jeunes neurones a été étudiée après irradiation aux rayons X, dans différents tests.

Conditions	Souche	Test comportemental	ISRS	Effets	Références
Pas de stress	129SvEv	NSF	Fluoxétine, imipramine	Neurogenèse-dépendants	(Santarelli et al., 2003)
	BALB/cj	FST, NIH	Fluoxétine	Neurogenèse-indépendants	(Holick et al., 2008)
Stress chronique modéré imprédictible	BALB/cj	CS, ST, NSF, A	Fluoxétine, imipramine	Neurogenèse-dépendants (CS, ST, NSF) / indépendants (A)	(Surget et al., 2008)
CORT	C57BL/6Ntac	NSF, OF, FST	Fluoxétine	Neurogenèse-dépendants (NSF) / indépendants (OF, FST)	(David et al., 2009)

NIH = Novelty Induced Hypophagia; SC = Sucrose Consumption; CS = Coat State; A = Actimeter

D'un point de vue anatomique le GD dorsal et le GD ventral apparaissent comme deux structures fonctionnellement distinctes. Chez l'homme, dans le GD antérieur qui est l'équivalent du GD ventral chez les rongeurs, il a été démontré post-mortem que la densité de cellules granulaires était plus faible chez les patients dépressifs non traités vis-à-vis des patients sains (Boldrini et al., 2014). Ce n'est pas le cas dans le GD postérieur (Boldrini et al., 2014), l'équivalent du GD dorsal chez les rongeurs. De plus, les patients traités avec des antidépresseurs présentent une densité de cellules granulaires supérieure à celle des patients dépressifs non traités. De manière intéressante, ces mêmes paramètres ne sont pas modifiés dans le GD postérieur (Boldrini et al., 2013). Ces données sont corroborées chez le rongeur. Chez des souris soumises à un stress chronique imprédictible, la prolifération des jeunes neurones est diminuée uniquement dans le GD ventral, et non dans le GD dorsal (Tanti et al., 2012). D'autre part, le GD ventral est lié notamment aux comportements anxieux. En effet, la stimulation optogénétique des cellules granulaires du GD ventral induit un effet anxiolytique qui n'est pas observé lorsque la même stimulation est appliquée dans le GD dorsal (Kheirbek et al., 2013). Ainsi, de par son rôle crucial dans la pathologie dépressive et de par sa réponse particulière aux traitements aux antidépresseurs, nous nous sommes intéressés à la subdivision ventrale du GD.

La neurogenèse hippocampique adulte est donc un acteur important dans les EDC et leur guérison. Si les jeunes neurones issus de la neurogenèse adulte hippocampique dans le GD ventral sont impliqués, les mécanismes par lesquels ils interviennent ne sont cependant pas encore complètement élucidés. Les récepteurs NMDA du glutamate de ces jeunes neurones et leur composition, de plus en plus étudiés ces dernières années, pourraient être des acteurs essentiels de ces mécanismes.

III. Importance de la sous-unité GluN2B du récepteur NMDA des jeunes neurones

III.1 Généralités sur le récepteur NMDA du glutamate

Le récepteur NMDA du glutamate est un récepteur ionotropique. Il est couplé à un canal ionique pouvant s'ouvrir et se fermer pour permettre le passage de cations, principalement les ions Ca^{2+} . L'ouverture du récepteur NMDA est bloquée au potentiel de repos par un ion Mg^{2+} , qui peut être libéré en cas de dépolarisation du potentiel membranaire (Nowak et al., 1984). L'ouverture dépend également de la liaison du ligand au récepteur, le glutamate, ainsi que de la liaison d'un co-agoniste sur le site glycine (Wood, 1995). Le glutamate se lie à la sous-

unité GluN2, et la glycine ou la D-sérine sur la sous-unité GluN1 (Yu & Lau, 2018). Dans l'hippocampe, la D-sérine serait le co-agoniste préférentiel des récepteurs NMDA synaptiques, et la glycine celui des récepteurs NMDA extra-synaptiques (Papouin et al., 2012) (Figure 9).

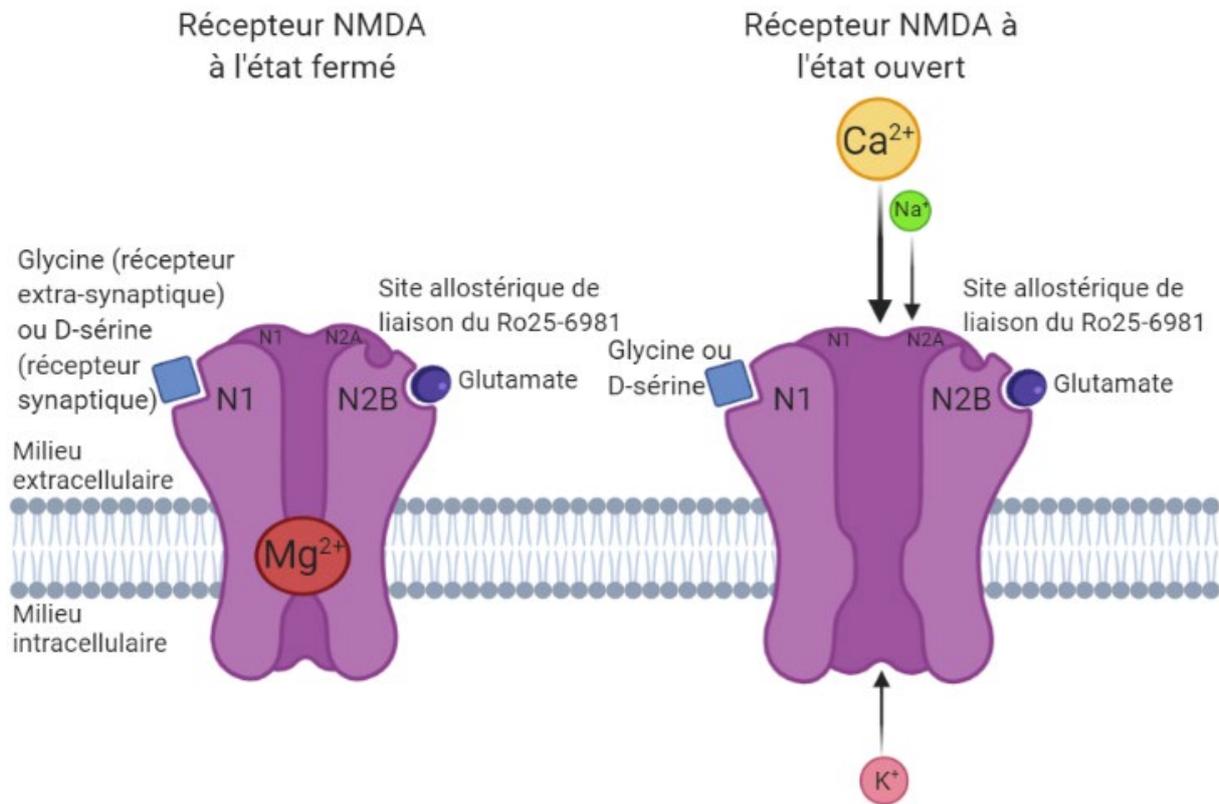


Figure 9 - Le récepteur NMDA du glutamate est un récepteur ionotropique composé de 4 sous-unités. Au potentiel de repos, il est bloqué par un ion Mg^{2+} . De plus, l'ouverture du canal ionique est régulée par la liaison simultanée d'un ligand sur le site NMDA ainsi que de celle sur le site glycine/D-sérine.

Le récepteur NMDA du glutamate est un hétérotétramère, composé de 4 sous-unités. Pour être fonctionnel, ce récepteur doit être composé de 2 sous-unités GluN1. Dans le système nerveux central, les récepteurs NMDA sont des tétramères majoritairement constitués de 2 sous-unités GluN1 et 2 sous-unités GluN2. Cette famille des sous-unités GluN2 est constituée de 4 membres : GluN2A, GluN2B, GluN2C et GluN2D. Les récepteurs NMDA forment des tétramères hétérodimériques (par exemple avec 2 sous-unités GluN1 et 2 sous-unités GluN2B) ou hétérotrimériques (par exemple avec 2 sous-unités GluN1, 1 sous-unité GluN2A et 1 sous-unité GluN2B). Dans les neurones pyramidaux de l'hippocampe, les sous-unités GluN2A et GluN2B sont majoritaires (Rauner & Kohr, 2011). Cela semble également être le cas dans les cellules granulaires de l'hippocampe (Kannangara et al., 2014; Kheirbek et al., 2012). Dans les neurones pyramidaux de la CA1, les sous-unités GluN2A et GluN2B du récepteur NMDA sont localisées respectivement sur les récepteurs synaptiques et extra-

synaptiques (Papouin et al., 2012). La sous-unité GluN2B est majoritairement exprimée dans l'hippocampe dans le cerveau embryonnaire. Quelques semaines après la naissance, l'expression de la sous-unité GluN2A augmente, à l'inverse de l'expression de la sous-unité GluN2B. De la même façon que lors du développement, les récepteurs NMDA des jeunes neurones issus de la neurogenèse adulte hippocampique exprimeraient de façon plus importante cette sous-unité GluN2B (Canales, 2016; Doan et al., 2019 pour revue). La quantification de ce phénomène est complexe du fait de la composition hétérodimérique ou hétérotrimérique des récepteurs NMDA, pouvant ainsi passer par exemple de récepteurs avec 2 sous-unités GluN2B à des récepteurs avec 1 sous-unité GluN2A et 1 sous-unité GluN2B. Une identification par immunohistochimie de ces sous-unités semble donc difficile à quantifier, puisque malgré la diminution de l'expression de la sous-unité GluN2B, la cellule serait tout autant identifiée comme possédant la sous-unité GluN2B ; la quantification de ce phénomène ne semble pas avoir été réalisée à ce jour.

Dans cette thèse, le Ro25-6981, un antagoniste non compétitif sélectif de la sous-unité GluN2B, a été utilisé. Il est 5000 fois plus sélectif pour la sous-unité GluN2B que pour la sous-unité GluN2A. En effet, une étude *in vitro* a montré sur ovocytes de xénope dont des récepteurs NMDA expriment soit la sous-unité GluN2B soit la sous-unité GluN2A que le Ro15-6981 possède une concentration inhibitrice médiane (CI_{50}) de 0,009 $\mu\text{mol/L}$ pour les récepteurs NMDA contenant la sous-unité GluN2B, et une CI_{50} de 52 $\mu\text{mol/L}$ pour les récepteurs NMDA contenant la sous-unité GluN2A (Fischer et al., 1997). Après liaison du glutamate au récepteur NMDA, la liaison sélective du Ro25-6981 sur la sous-unité GluN2B entraîne des modifications conformationnelles au niveau du domaine amino-terminal (au niveau extracellulaire) du récepteur et entraîne la fermeture du canal ionique (Zhu et al., 2016). Le site de liaison allostérique de cet antagoniste sélectif est situé en dehors du canal ionique (Lu et al., 2017) (Figure 9), contrairement à d'autres antagonistes non compétitifs du récepteur NMDA telle que la kétamine, dont le site de liaison, qu'elle partage avec la phencyclidine, se situe à l'intérieur du canal ionique. En outre, ce site phencyclidine recouvre partiellement le site de fixation du Mg^{2+} ce qui implique dans ce cas, que la fixation de l'antagoniste n'est possible qu'après libération de l'ion Mg^{2+} (Lu et al., 2017).

III.2 *Rôle des jeunes neurones dans les fonctions hippocampiques : Lien avec les récepteurs NMDA contenant la sous-unité GluN2B*

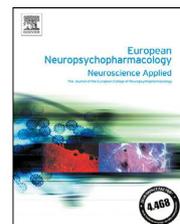
La composition du récepteur NMDA, et notamment l'identité des sous-unités GluN2, influence les propriétés fonctionnelles du récepteur du glutamate. Chez des patients atteints d'EDC, l'expression des sous-unités GluN2A et GluN2B est diminuée dans le cortex préfrontal (Feyissa et al., 2009). La sous-unité GluN2B nous a plus particulièrement intéressés car elle semble jouer un rôle important dans les effets antidépresseurs. L'utilisation d'un modèle de souris génétiquement modifiées chez lesquelles la sous-unité GluN2B est supprimée dans les neurones pyramidaux du néocortex et de l'hippocampe montre l'importance de cette sous-unité dans la physiopathologie des EDC ainsi que dans les traitements antidépresseurs (O. H. Miller et al., 2014). En effet, dans cette étude, en l'absence de la sous-unité GluN2B, l'administration de corticostérone n'induit plus d'augmentation du temps d'immobilité dans le TST. D'autre part, un effet de type antidépresseur est mis en évidence dans le labyrinthe en croix surélevé, chez ces souris génétiquement modifiées par rapport à des souris contrôles. Dans une autre étude, le Ro25-6981, antagoniste sélectif de la sous-unité GluN2B, a été administré localement dans le cortex médian préfrontal chez des souris C57BL/6J. Cette administration locale conduit à un effet de type antidépresseur dans le FST (Kiselycznyk et al., 2015). L'effet d'un autre antagoniste sélectif de la sous-unité GluN2B, l'ifenprodil, a été étudié après une administration unique par voie intrapéritonéale chez des rats soumis à un stress chronique imprédictible. Cet antagoniste de la sous-unité GluN2B conduit aussi à un effet de type antidépresseur dans le FST (Yao et al., 2020). Des modulateurs allostériques négatifs de la sous-unité GluN2B ont également montré un effet de type antidépresseur (Marcin et al., 2018), notamment dans le FST ou bien dans le NSF chez la souris naïve (Bristow et al., 2017). Une étude clinique pilote a également étudié l'efficacité d'un antagoniste sélectif de la sous-unité GluN2B, le MK-0657, chez des patients résistants aux traitements antidépresseurs. Bien que l'essai ne se soit tenu que sur peu de patients, il indique un effet antidépresseur du MK-0657 lors d'une évaluation des symptômes par le soignant avec l'échelle de dépression d'Hamilton, ainsi que lors d'une auto-évaluation dans l'inventaire de dépression de Beck, mais pas lors d'une évaluation avec l'échelle *Montgomery-Åsberg Depression Rating Scale* (Ibrahim et al., 2012). Le rôle précis de cette sous-unité GluN2B n'est cependant pas encore complètement bien compris. Nous avons discuté les propriétés qu'imprime la présence de cette unité GluN2B dans les jeunes neurones du GD de l'hippocampe dans la revue ci-dessous.

Dans cette revue « **Role of adult-born granule cells in the hippocampal functions: focus on the GluN2B-containing NMDA receptors** » (Article 1), je me suis intéressée au rôle important des récepteurs NMDA contenant la sous-unité GluN2B dans les propriétés spécifiques des jeunes neurones, aux niveaux électrophysiologique, comportemental et neurochimique. La présence de cette sous-unité contribuerait en partie aux propriétés spécifiques électrophysiologiques des jeunes neurones durant la période de 4 à 6 semaines après division. La présence du GluN2B dans les jeunes neurones durant cette période contribuerait également à l'effet comportemental neurogenèse-dépendant des ISRS. En effet, après délétion de cette sous-unité dans les jeunes neurones dans un modèle de souris génétiquement modifié, les effets de la fluoxétine sont atténués dans le NSF, tandis que cette délétion n'affecte pas des tests comportementaux neurogenèse-indépendants tel que l'EPM ou le TST (Tannenholz et al., 2016). La même équipe avait montré que l'ablation de la sous-unité GluN2B dans les jeunes neurones dans ce même modèle de souris génétiquement modifiée naïve empêche une bonne discrimination fine de contextes dans le test de conditionnement à la peur (Kheirbek et al., 2012). Ainsi, l'expression importante de cette sous-unité dans cette population spécifique durant une période critique de 4 à 6 semaines après division contribuerait aux effets comportementaux neurogenèse-dépendant. (Doan et al., 2019).



ELSEVIER

www.elsevier.com/locate/euroneuro



REVIEW

Role of adult-born granule cells in the hippocampal functions: Focus on the GluN2B-containing NMDA receptors



Julie Doan, Alain M. Gardier, Laurent Tritschler*

CESP/ UMR-S 1178, Université Paris-Sud, Faculté de Pharmacie, INSERM, Université Paris-Saclay, Chatenay Malabry 92290, France

Received 24 May 2018; received in revised form 19 June 2019; accepted 15 July 2019

KEYWORDS

Adult hippocampal neurogenesis;
GluN2B subunit of NMDA glutamate receptors;
Depression;
Cognition;
Electrophysiology;
Neurotransmission

Abstract

Adult-born granule cells constitute a small subpopulation of the dentate gyrus (DG) in the hippocampus. However, they greatly influence several hippocampus-dependent behaviors, suggesting that adult-born granule cells have specific roles that influence behavior. In order to understand how exactly these adult-born granule cells contribute to behavior, it is critical to understand the underlying electrophysiology and neurochemistry of these cells. Here, this review simultaneously focuses on the specific electrophysiological properties of adult-born granule cells, relying on the GluN2B subunit of NMDA glutamate receptors, and how it influences neurochemistry throughout the brain. Especially in a critical age from 4 to 6 weeks post-division during which they modulate hippocampal functions, adult-born granule cells exhibit a higher intrinsic excitability and an enhanced long-term potentiation. Their stimulation decreases the overall excitation/inhibition balance of the DG via recruitment of local interneurons, and in the CA3 region of the hippocampus. However, the link between neurochemical effects of adult-born granule cells and behavior remain to be further examined.

© 2019 Elsevier B.V. and ECNP. All rights reserved.

1. Introduction

Adult hippocampal neurogenesis (AHN) is a phenomenon that has been recently discovered, as it was first mentioned in the literature in 1965 (Altman and Das, 1965). It

was demonstrated that neurogenesis occurs in the DG under physiological conditions throughout life, and can be enhanced by living in an enriched environment (Kempermann et al., 1998).

AHN is the process by which adult-born granule cells are continuously generated from a residential population of neural precursors (Alvarez-Buylla and Lim, 2004; Gage and Temple, 2013; Ming and Song, 2011), found in the subgranular zone of the dentate gyrus (DG) in the hip-

* Corresponding author.

E-mail address: laurent.tritschler@u-psud.fr (L. Tritschler).

pocampus. The hippocampus is composed of several interconnected subregions, including the DG and the cornu ammonis (CA). Only a small number of adult-born granule cells are added in each DG: about 700 neurons per day in adult humans (Boldrini et al., 2018; Eriksson et al., 1998; Kempermann et al., 2003; Spalding et al., 2013) and a few thousand per day in mouse and rat hippocampus (Bordiuk et al., 2014; Cameron and McKay, 2001; Jacobs et al., 2000), depending on numerous environmental factors such as the gender, diet or exercise. Indeed, many studies have shown sex differences in AHN in numerous mammalian (Koss and Frick, 2017), which are linked to steroid hormones (Duarte-Guterman et al., 2015). However, how neurogenesis differs between sexes is still under debate (Chow et al., 2013; Duarte-Guterman et al., 2015; Hillerer et al., 2013). Diet is also a major influence on AHN (Heberden, 2016). Dietary restriction increases the number of neurons added per day in the DG in mice and in rats (Lee et al., 2000, 2002). Conversely, overnutrition or high-fat diets decrease this number (Lindqvist et al., 2006; van der Borght et al., 2011). Another environmental factor influencing the number of neurons added daily in the DG is voluntary exercise. Voluntary exercise has been shown to double the number of surviving adult-born neurons in the hippocampal circuitry in mice (van Praag et al., 1999). In a trial with elderly humans, aerobic exercise increased selectively anterior hippocampal volume; this increase being associated with greater serum levels of BDNF, a mediator of neurogenesis in the DG (Erickson et al., 2011). Thus, the number of neurons added per day is multifactorial and regulated by many factors, which are important to consider.

Yet, this minor population of the hippocampus is able to influence specific brain functions to ultimately impact behavior. In particular, the role of the hippocampus in memory has been extensively studied for decades (Danielson et al., 2016; Deng et al., 2010; Sheldon and Levine, 2016; Song et al., 2012a). The understanding of memory organization was revolutionized after the myriad discoveries obtained from the classic case report of a patient known as H.M., who was admitted to surgery to cure his epilepsy. The bilateral hippocampal lesions he underwent led to a persistent impairment to form new memories; yet, he retained intact memory for events prior to the surgery (Scoville and Milner, 1957, 2000), or procedural memory (Squire, 2009). Then, studies in monkeys suggested that damage to the hippocampal formation (including perirhinal cortex) delayed retention of object discriminations, concurrent discrimination (Zola-Morgan et al., 1989a, 1989b) and impaired recognition memory, but not associative memory (Zola et al., 2000). Other experiments narrowed the role of the hippocampus as contributing to specific forms of memory (Squire, 1992). Indeed, studies in rodents with hippocampal lesions indicated that the hippocampus is involved in memory retrieval (Fortin et al., 2004), spatial discrimination (Clark et al., 2005) and working memory (Gilbert and Kesner, 2006). As previously mentioned, the integration of adult-born granule cells plays a crucial role in learning and memory. In two studies contributing to this notion, inducible transgenic strategies were used either to increase (Sahay et al., 2011b) or to suppress AHN (Dupret et al., 2008). Mice with increased AHN showed an increased ability to context discrimination in a pattern separation task.

Conversely, suppressing AHN in mice impaired their ability to retain spatial relational memory (Dupret et al., 2008). Likewise, the suppression of AHN due to focal X-irradiation of newborn neurons induced a deficit in pattern separation (Clelland et al., 2009), but it did not affect learning in very different contexts (Clelland et al., 2009; Dupret et al., 2008). Other studies have revealed the inconsistency of the adult-born granule cells' role in learning and memory (Cameron and Glover, 2015; Deng et al., 2010). This inconsistency could be explained by the less complex forms of learning studied. These studies did not use the same specific ablation system of AHN and did not evaluate these complex forms of learning or memory (Cameron and Glover, 2015; Deng et al., 2010). The hippocampus is also a key region in mood regulation (Anacker and Hen, 2017). Patients suffering from depression have a reduced hippocampal volume (Campbell et al., 2004; Frodl et al., 2006; Videbech and Ravnkilde, 2004). Moreover, studies in rodents have demonstrated the functional dissociation along the dorsoventral axis of the DG: ventral hippocampal lesions affect mood regulation, while dorsal hippocampal lesions affect memory function (Bannerman et al., 2003; Fanselow and Dong, 2010; Pothuizen et al., 2004; Wu and Hen, 2014). Chronic antidepressant drug treatments stimulate AHN proliferation, survival and neuronal differentiation (Banasr et al., 2004; Malberg et al., 2000; Santarelli et al., 2003; Wang et al., 2008). In mouse models of anxiety/depression, neurogenesis ablation partially suppresses antidepressant effects and affects several behavioral tasks, including notably the Novelty Suppressed Feeding paradigm (David et al., 2009; Mendez-David et al., 2013; Perera et al., 2011; Santarelli et al., 2003; Surget et al., 2008; Tsai et al., 2015). Thus, stimulation at each step of AHN is considered necessary to achieve a complete response for antidepressant treatment (Anacker and Hen, 2017; Mendez-David et al., 2013). These data demonstrated that AHN affects hippocampal functions.

This review focuses on how adult-born granule cells influence hippocampal functions by their unique characteristics and aims to summarize data on neurochemistry of adult-born granule cells and their functions. In particular, we focus on a specific element of adult-born granule cells: the GluN2B subunit of the *N*-methyl-D-aspartate (NMDA) glutamate receptor. First, we will focus on the electrophysiological properties of the adult-born granule cells. We note that there is a critical window during which adult-born granule cells have enhanced plasticity, especially through the GluN2B subunit expression of their NMDA receptors. Second, we will highlight how adult-born neurons impact brain function during this critical period, as well as the role the GluN2B-containing NMDA glutamate receptors play in these brain functions. Third, we will describe adult-born granule cells' integration into the hippocampal circuitry. Finally, we will discuss neurochemical mechanisms affected by the AHN and that are linked to behavior regulation.

2. Adult-born granule cells possess distinct electrophysiological properties

First of all, adult-born granule cells are neurons with unique properties throughout their developmental stages (Ming and Song, 2011). Once mature, they migrate into the

granular layer of the DG. Within the adult-born granule cell population, there are different subpopulations depending on their age. Beyond 6 weeks post-division, adult-born granule cells become indistinguishable from mature granule cells in terms of physiological and electrophysiological properties (Ge et al., 2007). However, studies have shown that before 6 weeks post-division, adult-born granule cells differ substantially from mature granule cells, especially from an electrophysiological point of view. Two distinguishable populations with distinct electrophysiological properties have been identified: one up to around 3 weeks post-division, and another from 4 to 6 weeks post-division. Up to 3 weeks post-division, granule cells have a depolarizing response to GABA as occurred during the development process (Wang and Kriegstein, 2009). Four to 6-week-old granule cells display higher intrinsic excitability. This seems specifically due to the presence of the GluN2B subtype in their NMDA receptors subunit composition.

2.1. Up to approximately three weeks post-division, adult-born granule cells are depolarized by GABA

As soon as they have divided, adult-born granule cells are exposed to ambient GABA, which can produce a tonic current before any synaptic activation is detected (Ge et al., 2006). Then, from 2 weeks post-division onward, they receive an initial GABAergic spontaneous postsynaptic current inducing low frequency as well as long rise and decay times (Esposito et al., 2005). This GABAergic input comes from local GABAergic interneurons (Liu et al., 1998). The same phenomenon was observed in postnatal development in granule cells (Hollrigel and Soltesz, 1997). These GABAergic spontaneous postsynaptic currents are due to GABA_A receptors, as they were completely blocked by a selective GABA_A receptor antagonist, bicuculline (Esposito et al., 2005). The same results were obtained with another GABA_A receptor antagonist, SR95531 (Overstreet-Wadiche et al., 2006). Adult-born granule cells are akin to neurons during brain development (Ben-Ari, 2002; Chen et al., 1996; LoTurco et al., 1995; Owens and Kriegstein, 2002) in that GABAergic input also enhances depolarizing tonic currents. This GABAergic depolarization is concomitant with DCX expression, which labels adult-born granule cells aged up to about 3 weeks (Heigele et al., 2016), indicating that this phenomenon is restricted to this timing. Perforated-patch recordings confirmed depolarized GABA responses in adult-born granule cells (Overstreet-Wadiche et al., 2005). Tonic currents were highlighted in this study by using a specific GABA transporter inhibitor, NO-711, which exacerbates the depolarization. By contrast, adult-born granule cells tonic currents were abolished by using a selective GABA_A receptor antagonist, bicuculline; this demonstrated that GABA_A receptors, as GABA-activated chloride channels (Olsen and Tobin, 1990), are responsible for the depolarizing effect of GABA (Ge et al., 2006). In order to obtain a depolarizing effect with an opening of chloride channels, chloride ions need to present an efflux from the cells. Contrarily, the opening of such channels in mature granule cells leads to the opposite effect: a chloride influx. Adult-born granule cells possess high cytoplasmic chloride ion contents (Delpire, 2000; Owens

and Kriegstein, 2002; Payne et al., 2003) owing to high levels of NKCC1 (Na-K-Cl cotransporter 1) expression. These GABAergic tonic currents were not demonstrated to induce action potentials. However, they are likely to participate in maintaining a resting membrane potential in a less hyperpolarized state corresponding to levels that enable the generation of action potentials (Ben-Ari, 2007; Chancey et al., 2013). As a consequence, the resting potential of adult-born granule cells is higher than in mature granule cells. The measure revealed a value of approximately -48 mV in the earliest stages and a value of approximately -78 mV in fully differentiated adult-born granule cells (Esposito et al., 2005; Mongiat et al., 2009). This negative shift in the resting potential during development participates in the shift in the reversal potential of the GABA-mediated chloride currents (Chen et al., 1996). These particular GABAergic currents seem to be crucial; they have been demonstrated to be necessary in the normal maturation of adult-born granule cells regarding their dendritic development (Ge et al., 2006).

By the third week post-division, GABA becomes hyperpolarizing through a chloride influx into neurons (Brumback and Staley, 2008; Ge et al., 2006; Payne et al., 2003; Rivera et al., 1999). This change is mainly due to differential neuron expression in the cotransporters KCC2 (K-Cl cotransporter 2) and NKCC1. Immunohistochemical studies revealed that, at this time, adult-born granule cells express higher levels of the chloride exporter KCC2 and lower levels of NKCC1. Even if the selectivity of KCC2 and NKCC1 antibodies could be questioned (Lytle et al., 1995), the mRNA levels and the mRNA silencing of the NKCC1 tend to confirm these immunohistochemical observations (Ge et al., 2006; Rivera et al., 1999). Other elements can participate in the alteration of the effect of GABA in granule cells. Particularly, this timing also corresponds to the onset of glutamatergic input to these cells (Esposito et al., 2005). During the same period, GABAergic spontaneous postsynaptic currents with fast kinetics appear and progressively replace the ones with slow kinetics (Esposito et al., 2005). This increase in the kinetics is also found in postnatal development in granule cells (Hollrigel and Soltesz, 1997). Altogether, for these 3 first weeks post-division, it seems that adult-born granule cells recapitulate the steps observed during the postnatal development.

2.2. From four to six weeks post-division, adult-born granule cells exhibit enhanced plasticity

Excitability, or the ability of a neuron to generate an action potential, is a critical point considering that action potentials are the most common way a neuron propagates information. In one study (Marin-Burgin et al., 2012), hippocampal slices were prepared 4 weeks after the retroviral labeling of adult-born granule cells to express a red fluorescent protein, in order to target 4-week-old neurons in mice. Current pulses ranging from 5 to 150 μ A (duration 100 μ s) were applied on the molecular layer of the DG, where the perforant path axons from the entorhinal cortex connect onto spines and dendrites of granule cells. By using time-lapse calcium imaging, the authors observed that the number of active immature and mature granule cells

increased with stronger electrical stimuli. Each stimulus was able to elicit a higher number of spikes in immature granule cells as compared to mature ones, suggesting that immature neurons require weaker inputs to trigger a spike (Marin-Burgin et al., 2012). In most mature neurons, spikes are generated in response to excitatory postsynaptic currents (EPSCs), activating Na⁺ voltage-dependent channels (Vacher et al., 2008). By contrast, in rat hippocampal slices, current stimulations below the threshold for Na⁺ action potential initiation (pulse duration 200- μ s at a frequency of 0.05 Hz) generated transient low-threshold spikes (Schmidt-Hieber et al., 2004), which are membrane depolarizations generated by the transient Ca²⁺ current (Puil and Carlen, 1984; Wang et al., 1991). These low-threshold spikes have been demonstrated to be Ca²⁺ dependent. Indeed, these low-threshold spikes were insensitive to 1 μ M tetrodotoxin, a Na⁺ channel blocker, but were blocked by 50 μ M Ni²⁺, an inhibitor of calcium channels, showing that they were independent of Na²⁺, but mediated by Ca²⁺ channels (Schmidt-Hieber et al., 2004). Altogether, it seems that 4-week-old neurons require weaker input to trigger a spike than mature granule cells due to Ca²⁺ currents.

Even if excitability of 4-to-6-week-old adult-born granule cells is higher than the excitability of mature granule cells, they still represent only a small subpopulation within the granule cells of the DG. Then, the question becomes whether and how this minor subpopulation is able to modulate the excitability of the whole DG. In order to begin to address this question, one study assessed the effect of AHN ablation on perforant-path responses, since this path from the entorhinal cortex is the major input to the DG. X-ray irradiation, known to suppress AHN, decreased field evoked responses following a perforant path stimulation (Lacefield et al., 2012). Likewise, excitatory postsynaptic potentials and population spike amplitude were analysed in X-ray irradiated mice after a spatial learning behavioral experiment. Irradiated mice also had decreased responses to perforant path stimulation (Park et al., 2015). The opposite approach was also employed: DG excitability was examined in mice with increased adult neurogenesis (Ikkrar et al., 2013). Such an increase was obtained with the ablation of Bax, a proapoptotic gene, in neural progenitors (Sahay et al., 2011a). In view of the previous results (Lacefield et al., 2012; Park et al., 2015), increasing AHN would be expected to increase the excitability of the DG. However, using fast voltage-sensitive dye imaging, a decrease in DG excitability was observed, and the excitation spread was restricted to the granule cell layer (Ikkrar et al., 2013). The results obtained by Ikkrar et al. (2013) seem to be in opposition with the ones obtained by others (Lacefield et al., 2012; Park et al., 2015). The decrease in the excitability of the DG observed in Bax mice corresponds to a decrease in mature granule cell population activation. This decrease in excitability might be explained by the feedback inhibition of highly excitable adult-born granule cells on mature granule cells, through GABAergic hilar interneurons (described in detail below) (Kheirbek et al., 2012a; Lacefield et al., 2012; Sahay et al., 2011b). This hypothesis was further explored by the use of picrotoxin, a GABA_A receptor antagonist, in Bax mice in order to overcome feedback inhibition (Adlaf et al., 2017). In these conditions, perforant path stimulation still decreased EPSCs in mature granule cells and reduced their

excitatory transmission (Adlaf et al., 2017). This indicates that feedback inhibition is not the only element contributing to the counter-intuitive finding that the number of adult-born granule cells is inversely correlated to the excitability of the mature network. Another element that may be contributing to this phenomenon, in addition to AHN increase, is the fact that the Bax model also increases synaptogenesis in adult-born granule cells, which is much higher in these mice than in control mice. A decrease in spine density in mature granule cells was also observed with Bax deletion (Adlaf et al., 2017). This would lead to a competition between adult-born and mature granule cells to receive the inputs in their respective dendritic trees (this phenomenon will be further described below). Following perforant path stimulation in mice with an enhanced AHN, adult-born granule cells may usurp pre-existing synapses from mature granule cells to receive the inputs from the perforant path, resulting in a decrease in EPSCs. It seems that the increase in the spine density of adult-born granule cells does not compensate for the decrease in spine density from mature granule cells. This lack of compensatory effect could be explained by a high fraction of adult-born granule cell synapses being silent in the absence of GABA input (Chancey et al., 2013). This absence of GABA input may explain the decrease in excitability after perforant path stimulation, in presence of picrotoxin (Adlaf et al., 2017). Moreover, the diverging results obtained by Ikkrar et al. (2013) are likely due to their protocol of stimulation. Indeed, contrary to the other studies using perforant path stimulation, Ikkrar et al. (2013) used a direct stimulation of the granular layer, which stimulates adult-born and mature granule cells without considering the competition between adult-born and mature granule cells to receive perforant path inputs that promote adult-born granule-cell-mediated feedback inhibition. Altogether, Bax deletion induces AHN, but dramatically changes dendritic spine distribution in adult-born and mature granule cells. These results highlight the crucial role of competition in the dendritic tree of these two neuronal populations. Overall, the Bax model leads to diverging results regarding granule cell layer excitability: the Bax model increases the AHN and decreases the excitability whereas the X-ray irradiation suppresses the AHN and decreases also the excitability in the DG. Finally, adult-born granule cells from 4 to 6 weeks post-division increases DG excitability through interactions with the mature granule cells. However, they also influence mature granule cells through both of these phenomena: feedback inhibition and competitive processes (Fig. 1).

The AHN-mediated excitability requires the NMDA receptor. This glutamate receptor is a tetramer, which is typically composed of 2 obligatory GluN1 subunits and 2 GluN2 subunits (Laube et al., 1998). Four GluN2 subunits have been described. In particular, *in situ* hybridization of mRNAs encoding NMDA receptor subunits in the developing rat revealed that in the hippocampus, only GluN2A and GluN2B are expressed and able to form complexes with GluN1 (Haberny et al., 2002; Monyer et al., 1994). The GluN2B subunit is the predominant GluN2 subunit in neurons during development and subsequently, the GluN2A subunit becomes the predominant one (Dumas, 2005). Interestingly, the GluN2B-containing NMDA receptors present a lower rate of deactivation than GluN2A-containing NMDA receptors (Erreger et al., 2005). Thus, the presence of GluN2B on

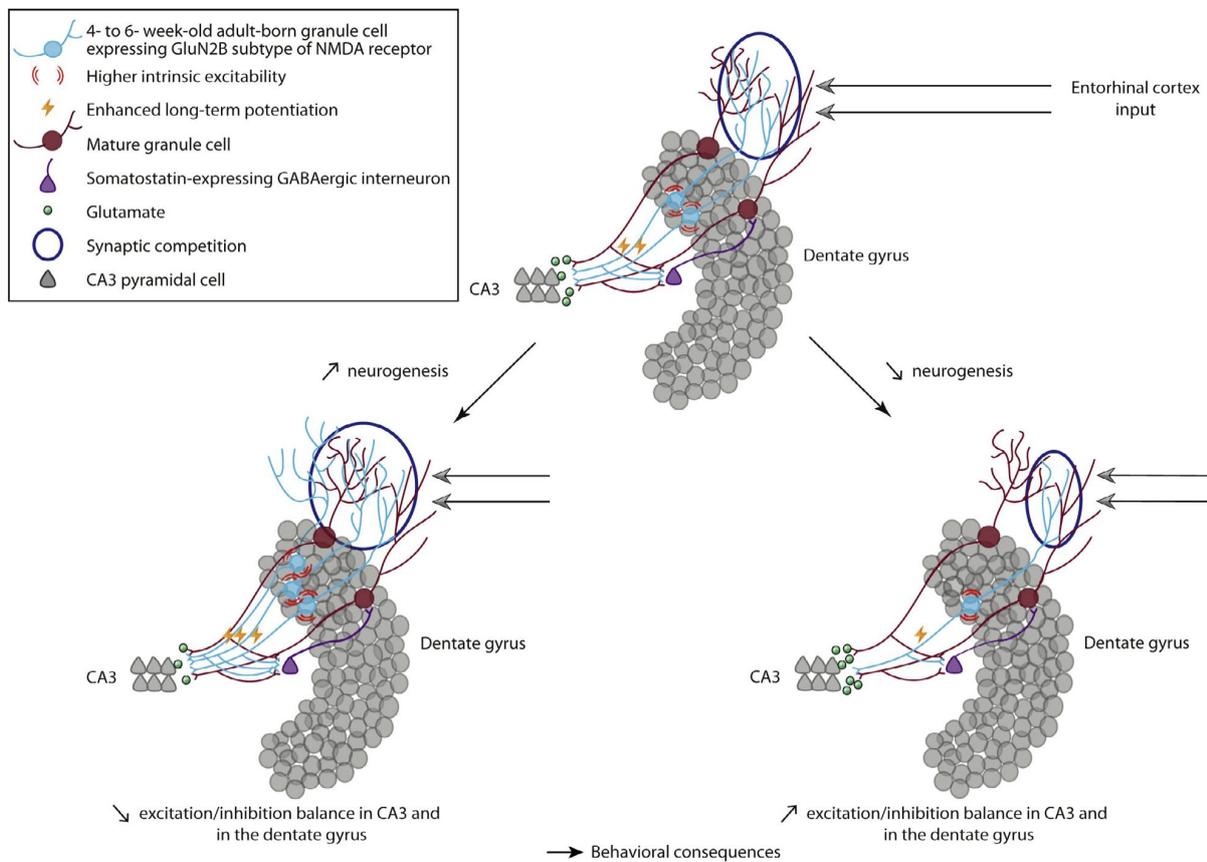


Fig. 1 Adult-born granule cells, at the critical age of 4 to 6 weeks, affect network activity in the DG and in CA3 area of the hippocampus and influence specific hippocampal functions.

In their critical stage of development from 4 to 6 weeks, adult-born granule cells have particular electrophysiological properties; more precisely, they demonstrate higher intrinsic excitability and a lower threshold for long-term potentiation. By their integration in the DG network, they compete with mature granule cells for entorhinal cortex stimulation. Then, they notably stimulate cells in CA3 and SST⁺ hilar interneurons via a glutamate release. These interneurons are responsible for feedback inhibition and provide homeostatic control in the excitation/inhibition balance in CA3. Through their neurochemical implications in the hippocampus, adult-born granule cells that preferentially express GluN2B-containing NMDA receptors influence hippocampus-dependent behavior. With increased adult hippocampal neurogenesis, less mature granule cells receive perforant path stimulation, and SST⁺ interneurons are more stimulated. As a result, glutamate levels are decreased in CA3, and the excitation/inhibition balance in the DG is also decreased. In contrast, a decrease in adult hippocampal neurogenesis leads to more mature granule cells receiving the cortex entorhinal inputs and less SST⁺ interneurons are stimulated. In these conditions, glutamate levels are increased in CA3, and excitatory postsynaptic current amplitude in the DG is increased.

Although the precise mechanisms of how adult-born granule cells influence neurochemistry have not yet been fully elucidated, neurochemical modulation generated by adult-born granule cells lead to the changes in neurogenesis-dependent hippocampal behavior.

these adult-born granule cells could explain the AHN-mediated higher intrinsic excitability. To our knowledge, no study has been performed to assess directly the time-course of expression of GluN2B in adult-born granule cells. However, indirect evidence have shown GluN2B expression in adult-born granule cells (Cull-Candy and Leszkiewicz, 2004; Ge et al., 2007; Kheirbek et al., 2012b; Kim et al., 2005; Snyder et al., 2001; Tang et al., 1999; Tannenholz et al., 2016); notably selective GluN2B suppression in adult-born granule cells affects antidepressant response in the Novelty Suppressed Feeding (Kheirbek et al., 2012b) or impairs the context discrimination (Tannenholz et al., 2016) both

behaviors are AHN-dependant. Concerning the implication of GluN2B in the adult hippocampal higher intrinsic excitability, the expression of c-fos, an immediate-early gene, following the exploration of a novel environment was measured in GluN2B knockdown and control mice using small interfering RNA (siRNA). The expression of c-fos was increased in mice exposed to a novel environment, but a smaller increase was observed in GluN2B knockdown mice, suggesting that there is less excitability with lack of GluN2B in adult-born granule cells. Furthermore, the suppression of GluN2B in adult-born granule cells significantly decreased neural activity of newborn neurons as compared to control

mice (Li et al., 2013). Thus, these studies suggest that adult-born granule cell excitability depends on the GluN2B subunit of NMDA glutamate receptors.

Due to adult-born granule cells' higher intrinsic excitability, there is a potential for synaptic strength modification. One study aimed to test this possibility by applying electrophysiological recordings on hippocampal slices. In particular, they used low-frequency perforant path stimulation ranging from 100 to 400 μ A (20 μ s), and paired 2 Hz afferent stimulation with postsynaptic depolarization to -20 mV. This experiment revealed that adult-born granule cells produced consistent, robust long-term potentiation (LTP), but not mature ones; this suggests that the threshold for LTP induction is raised in mature granule cells (Wang et al., 2000). Thereafter, it was demonstrated that the threshold for LTP induction in adult-born granule cells is lower than in mature neurons. Presynaptic bursts (10 stimuli at 100 Hz) at theta frequency (5 Hz) were applied at the granule cells' border. Unlike what is observed in mature granule cells, this stimulation paradigm was sufficient to induce LTP in adult-born granule cells (Schmidt-Hieber et al., 2004). Adult-born granule cells' threshold for LTP in the DG was also studied by electrophysiological recordings in X-irradiated rats (after a dwell time of three weeks). In this experiment, the adult neurogenesis ablation showed an unequivocal reduction in LTP in DG (Snyder et al., 2001). Two complementary strategies of ablation were used to study the change in electrophysiological responses. X-irradiation was also used for spatial specificity, and a genetic neural progenitor cell ablation targeting the glial fibrillary acidic protein (GFAP) with ganciclovir (GFAP-TK model) for cellular specificity. In each of these ablation procedures, LTP evoked by a 100 Hz perforant path stimulation was completely abolished (Saxe et al., 2006). In rat hippocampal slices, induction of LTP by perforant path stimulation was not affected by an NMDA receptor antagonist, APV, but was completely prevented by ifenprodil, a selective antagonist of GluN2B-containing NMDA receptors (Ge et al., 2007; Snyder et al., 2001). Moreover, slice electrophysiology was conducted in hippocampal slices of mice 6-7 weeks after deletion of the GluN2B subunit selectively in adult-born granule cells (Kheirbek et al., 2012b). Similarly to experiments led on neurogenesis ablation models (Saxe et al., 2006), high frequency stimulation (four trains of 1 s, 100 Hz, trains every 15 s) failed to induce LTP in the adult-born granule cells lacking GluN2B (Kheirbek et al., 2012b). This indicates that the GluN2B subunit is critical to adult-born granule cell synaptic strength. Finally, the amplitude of LTP was studied in adult-born neurons from 2-week-old neurons to 8-week-old neurons in hippocampal slices of mice. A critical window with enhanced LTP between 4 weeks and 6 weeks was identified, whereas between 2 and 4 weeks and after 6 weeks, LTP was not significantly different from mature granule cells' potentiation (Ge et al., 2007). It confirms that the 4-to-6-week-old granule cells are in a critical stage of development that enables them to affect the whole DG function. Moreover, the application of ifenprodil in 4-week-old neurons reduced EPSCs by 72%. In 8-week-old neurons, the same treatment led to only 25% reduction (Ge et al., 2007). After the critical period of 4 to 6 weeks, there is a shift from GluN2B to GluN2A corresponding to the shift of particular properties of adult-born granule cells to

the standard properties of mature granule cells (Cathala et al., 2000; Selemo, 2013). Electrophysiological recordings were obtained in hippocampal slices, transfected with GluN2A/GluN1 in order to test the effects of this replacement of GluN2B by GluN2A. Synaptic currents in transfected cells were similar to those in nontransfected cells, indicating that the switch of GluN2B to GluN2A reduced plasticity (Barria and Malinow, 2005).

Around 4-6 weeks post division, adult-born granule cells have lower thresholds for generating action potentials, leading to higher intrinsic excitability. At that same moment, adult-born granule cells also have a lower threshold for LTP. By these mechanisms, adult-born granule cells exhibit a period of heightened plasticity 4-6 weeks post-division (Table 1). Furthermore, an electrophysiological study showed that the lack of young granule cells increases the magnitude of spontaneous gamma bursts promoted by perforant path input, although this perforant path input was reduced (Lacefield et al., 2012), demonstrating the involvement of AHN in the whole hippocampal functions. Adult-born granule cell plasticity could play a key role in adult-born granule cell involvement in forming new memory (Aimone et al., 2006, 2009; Cahill et al., 2017; Tashiro et al., 2007) and in flexibility using memories (Park et al., 2015). The pathophysiology of depression also involves dysfunction in synaptic plasticity (Perlman et al., 2012; Zeng et al., 2012) and an antidepressant-like effect is associated with an induction of synaptogenesis as well as an increase in AHN in rats (Li et al., 2010, 2011).

As seen with excitability and LTP induction, adult-born granule cells modulate network activity in the DG. This could be linked to a competition between adult-born granule cells and mature granule cells to receive the neuronal input. Spontaneous electric activity in the DG is constituted of gamma bursts, which are normally driven by mature granule cells. Competition with mature neurons for the perforant path connections would then explain why elimination of adult-born granule cells increased gamma bursts (Lacefield et al., 2012). This competition hypothesis is also supported by a cellular compartment analysis of temporal activity using fluorescence *in situ* hybridization in mice. This analysis is based on the localization of *c-fos* transcripts and is used to visualize cellular networks repeatedly activated in the DG. This work demonstrated that the expansion of a cohort of 5-to-8-week-old adult-born granule cells enhances global remapping in the DG (McAvoy et al., 2016). Moreover, in mice, neurogenesis enhancement through an enriched environment (Fabel et al., 2009; Olson et al., 2006) increases the frequency of EPSCs in hippocampal slices compared to mice under standard conditions. As there was no difference between mice under enriched environment and mice under standard conditions in the paired-pulse ratio - a measure of presynaptic release probability - enhanced synaptic transmission is likely to result from a greater number of functional synapses (Adlaf et al., 2017). This hypothesis would be consistent with a synaptic redistribution model wherein adult-born neurons have existing terminals that synapse onto mature granule cells and thus modify synaptic input on mature granule cells. The GluN2B subunit seems to contribute to the synaptic redistribution. Indeed, the deletion of this subunit from NMDA receptors of adult-born granule cells prevented the increase in the number of intersections

Table 1 Distinct electrophysiological properties of adult-born granule cells from 4 to 6 week-old.

Species (Rats or mice) and strains	Sex	Population studied	Stimulation	Neurogenesis (intact i or suppressed s)	Method	Results	References
Wistar rats	♂	1- to 3-week-old granule cells	Perforant path stimulation	i		↘ threshold for spikes induction of immature granule cells than mature ones (due to calcium channel)	Schmidt-Hieber et al. (2004)
C57Bl/6 J mice	♀	4-week-old granule cells		i		Activation of a larger population of immature granule cells than mature ones	Marin-Burgin et al. (2012)
C57Bl/6 J mice	♂			s	Irradiation 3 × 5 Gy - 6 to 10 weeks prior experiments	↘ field evoked responses	Lacefield et al. (2012)
C57Bl/6 J mice	♀♂	dividing granule cells	Open field	i	small interfering RNA-GluN2B-GFP	↘ c-fos/GFP ratio	Li et al. (2013)
129 Sv/Ev mice	♂		Perforant path stimulation	s	Irradiation 3 × 5 Gy - 3 to 4 months prior experiments	↘ field EPSP and population spike responses	Park et al. (2015)

(continued on next page)

Table 1 (continued)

Species (Rats or mice) and strains	Sex	Population studied	Stimulation	Neurogenesis (intact i or suppressed s)	Method	Results	References
Wistar rats	♂	adult-born granule cells expressing TOAD-64 < 12 days	Perforant path stimulation	i		Consistent 77% enhancement of the EPSCs at -80 mV (vs 3% in mature neurons)	Wang et al. (2000)
Wistar rats	♂			s	Irradiation 2 × 5 Gy - 3 weeks prior experiments	LTP blocked	Snyder et al. (2001)
Long-Evans rats	♂			s	Irradiation 2 × 5 Gy - 3 weeks prior experiments	LTP blocked	Snyder et al. (2001)
Wistar rats	♂	1- to 3-week-old granule cells		i		Stimulation lead to LTP only in young granule cells	Schmidt-Hieber et al. (2004)
129 Sv/Ev mice	♂			s	Irradiation 3 × 5 Gy - 3 months prior experiments	↘ field EPSP (abolished LTP)	Saxe et al. (2006)
C57Bl/6J-BALB/c mice	♂			s	Genetic modulation (GFAP-TK transgene - 6 weeks prior experiments)	↘ field EPSP (abolished LTP)	Saxe et al. (2006)
C57Bl/6J mice	♀	4- to 8-week-old granule cells		i	Application of ifenprodil	LTP blocked (4 week-old)	Ge et al. (2007)
C57Bl/6J mice	♀	2- to 8-week-old granule cells		i		↗ LTP amplitude (4- to 6-week-old adult-born granule cells)	Ge et al. (2007)
NestinCreERT2;GluN2B C57Bl/6J mice	♂			i	Tamoxifen injections - 6-7 weeks prior experiment	LTP blocked	Kheirbek et al. (2012a, b)

Adult-born granule cells affect long-term potentiation

of adult-born granule cell dendrites following fluoxetine treatment (Kheirbek et al., 2012b; Tannenholz et al., 2016). This finding supports the hypothesis that the GluN2B subunit is implicated in adult-born granule cell dendritic changes.

Altogether, 4-to-6-week-old adult-born granule cells display a higher excitability regarding the low input they need to trigger a spike as compared to mature granule cells (Schmidt-Hieber et al., 2004). This property implicates the GluN2B subunit of the NMDA receptor (Li et al., 2013) and affects the excitability of the whole DG through feedback inhibition and competitive processes (Adlaf et al., 2017; Lacey et al., 2012; McAvoy et al., 2016). As consequences, the induction of LTP in the DG is facilitated in 4-to-6-week-old granule cells (Schmidt-Hieber et al., 2004; Snyder et al., 2001; Wang et al., 2000).

3. Adult-born granule cells from 4 to 6 weeks post-division are necessary for specific hippocampal functions

After having identified a period during which adult-born granule cells exhibit heightened plasticity, the next step was to determine whether adult-born granule cells during this critical period could contribute to hippocampal function and behavior. As mentioned above, the ablation of adult neurogenesis impaired memory discrimination in active place avoidance training (Park et al., 2015). In order to determine if adult-born granule cell age also affects cognitive behavior, immunohistochemical approaches were coupled with a spatial memory test, the Morris Water Maze. The 5-bromo-2'-deoxyuridine (BrdU) proliferation marker and the neuronal specific nuclear protein (NeuN) were used as a mature neuronal marker to label adult-born granule cells and to evaluate the total number of neurons in the granule cell layer in mice. In addition, the expression of two immediate-early genes, *c-fos* and *arc*, were quantified to identify how granule cells process spatial memory. The incorporation of 1-, 2-, 4-, 6- or 8-week-old adult-born neurons into spatial memory circuits in the DG was examined. Neuronal activation (revealed by early protein expression) of adult-born granule cells did not occur until they were at least 2 weeks. Moreover, the activation of these cells was higher in adult-born granule cells beyond 4 weeks than in mature granule cells. This analysis indicated that adult-born granule cells from 4 to 8 weeks are preferentially recruited into circuits supporting spatial memory, compared to mature neurons (Kee et al., 2007).

In order to further characterize the functional involvement of these adult-born granule cells, they were optogenetically inhibited using a viral construction; selectively at 2-, 4-, or 8-weeks of age during the Morris Water Maze and a classical contextual fear conditioning paradigm. Adult-born neurons formed functional synapses on CA3 pyramidal neurons as early as 2 weeks after birth, and this projection to CA3 became stable by 4 weeks. Silencing 4-week-old adult-born granule cells projecting to CA3 pyramidal neurons caused deficits in spatial memory retrieval and impaired context fear memory. The same inhibition was not effective at 2 or 8 weeks post-infection (Gu et al., 2012). Thus, this study suggests that the preferential recruitment of adult-

born granule cells from 4 weeks impacts cognitive behavior and more precisely spatial memory. This work identified a restricted time window for adult-born neurons essential in hippocampal memory retrieval. However, it would have been interesting if this study evaluated the involvement of 6-week-old granule cells in spatial memory, considering that this age is also critical. Yet, conflicting evidence from another study using X-irradiated mice demonstrated that behavior was unaffected in the Morris Water Maze and in the Y Maze as compared to sham mice (Saxe et al., 2006). Yet, in this study, the X-irradiation was performed 3 months prior to functional analyses, and the 4-week-old granule cell population was not the only one suppressed, which could explain the diverging results. Regarding the mechanisms underlying this memory effect, the role of the GluN2B subunit in memory was also assessed. One group used transgenic mice that over-expressed GluN2B, and placed these mice in the Morris Water Maze. These mice displayed enhanced spatial memory as compared to wild type mice in the time they spent in the target quadrant as well as the time to escape to the platform. This indicates that GluN2B-containing NMDA receptors enhanced spatial learning (Tang et al., 1999). However, in the same test in a separate study, mice treated with a selective antagonist of GluN2B-containing NMDA receptors, Ro25-6981, displayed an improvement of their spatial learning and memory (Hu et al., 2008). Ro25-6981-treated mice notably improved their ability to locate the hidden platform. The subunit blockade of GluN2B-containing NMDA receptors facilitated the formation of spatial memory in the adult mice, demonstrating that the GluN2B subunit affects memory. These two contradictory results (Hu et al., 2008; Tang et al., 1999) could be explained by the fact that GluN2B negatively regulates neurogenesis. Thereby, Ro25-6981 administration may stimulate neurogenesis, which might possibly explain the spatial memory improvement of Ro25-6981-treated mice. Indeed, this hypothesis was confirmed by the use of AZT, a telomerase inhibitor that inhibits neurogenesis, which reverted the enhancement of spatial memory induced by Ro25-6981 (Hu et al., 2008). The facilitated formation of spatial memory by blocking GluN2B would be caused by the up-regulation of neurogenesis (Gruden et al., 2018; Hu et al., 2008). However, it should be noted that the administration of Ro25-6981 is systemic, and not specific to the adult-born neurons, and thus, it cannot be concluded that Ro25-6981 directly modulates these cells specifically and not through an indirect mechanism.

Beyond spatial or fear memory, the ability of the hippocampus to identify novelty was investigated using a variety of different ablation approaches. First, one study examined the alteration of hippocampal-dependent behavior by adult neurogenesis suppression. X-irradiation or genetic ablation of AHN significantly decreased freezing in contextual fear conditioning, while a form of LTP was abolished (Saxe et al., 2006). Then, the contribution of adult-born neurons 2, 4, or 6 weeks following hippocampal X-irradiation was studied by a separate group (Denny et al., 2012). At 4 weeks post-irradiation, mice tended to investigate the novel object more than sham mice (though the difference was not significant). Yet, after 6 weeks, irradiated mice explored the novel object significantly more than sham mice. This result demonstrates that the critical age of 4 to 6 weeks is critical for memory. The

authors subsequently investigated novelty processing and context learning in the GFAP-TK model. Genetic suppression of adult neurogenesis in this model increased novel object recognition and impaired behavior in contextual fear conditioning at 4-6 weeks after the suppression of neurogenesis (Denny et al., 2012). The fact that the ablation of neurogenesis leads to an increase in novel object recognition performance instead of a decrease could be explained by compensatory extra-hippocampal processing resources competing with the hippocampus for dominance (Poldrack and Packard, 2003), such as parahippocampal regions of the temporal lobe. A separate group used mice in which GluN2B subunit was deleted in DG adult-born granule cells, and tested them in a battery of behavioral assays (Kheirbek et al., 2012b). The transgenic mice did not differ from controls in baseline anxiety-like behavior (open field, forced swim test, novelty suppressed feeding, elevated plus maze). However, in a fear discrimination task, transgenic mice required 8 days to significantly discriminate between two highly similar contexts, whereas control mice needed only 4 days (Kheirbek et al., 2012b). Thus, the authors concluded that the GluN2B subunit participates in fine contextual discrimination. Then, the same team assessed mood regulation by adult-born granule cells. In the same mouse model and using the same approach, the behavioral response to fluoxetine was evaluated (Tannenholz et al., 2016). Conditional deletion of the GluN2B subunit in adult-born granule cells 6 weeks prior to the onset of antidepressant administration revealed that GluN2B impacted the effect of fluoxetine in the Novelty Suppressed Feeding paradigm, which is considered a neurogenesis-dependent behavioral task (David et al., 2009; Surget et al., 2008). By contrast, in the same animals, GluN2B deletion in adult-born granule cells did not impact fluoxetine response in neurogenesis-independent tasks, the tail suspension test and the elevated plus maze (Tannenholz et al., 2016). Thus, adult-born granule cells with GluN2B-containing NMDA receptors make a unique contribution to hippocampus-dependent behavior. Thus, immature neurons in the 4-to-6-week-old range modulate information processing. Again, this period corresponds to the one in which adult-born neurons exhibit enhanced excitability and plasticity, with the involvement of the GluN2B subunit.

It is critical to note that discrete regions rather than the whole hippocampus regulate memory and mood in distinct ways. For instance, it was recently demonstrated using calcium imaging and optogenetics in freely moving mice that ventral CA1 is enriched in cells activated by anxiogenic environments (Jimenez et al., 2018). Functional dissociation of adult-born granule cells in the DG was also studied in a chronic stress model after focal X-irradiation directed to the dorsal or ventral DG in mice. Adult-born granule cells in the ventral DG are necessary for anxiolytic/antidepressant-related effects, whereas those in the dorsal DG are required for acquisition of contextual discrimination (Wu and Hen, 2014).

These experiments suggest that newborn neurons are recruited into hippocampal memory circuits, playing an essential role in memory and mood regulation. This essential role during the 4-to-6-week-old range relies on GluN2B-containing receptors of adult-born granule cells (Table 2). Under-expressing or over-expressing this specific receptor

subunit influences hippocampal functions. However, to do so, 4-to-6-week-old adult-born granule cells must integrate into behavioral networks in the hippocampus and then modify neurochemical circuits.

4. Adult-born granule cells integrate into a di-synaptic circuit, and synapse with somatostatin interneurons to regulate neurochemistry

In order to understand neurochemical mechanisms underlying the adult-born neuron involvement in memory and in mood regulation, it is necessary to investigate the circuits in which they integrate, more specifically their targets (Fig. 1).

Like mature granule cells, adult-born granule cells in the hippocampus receive major synaptic inputs from the entorhinal cortex and local GABAergic interneurons (Overstreet-Wadiche et al., 2005; Vivar et al., 2012). As pointed out by anatomical studies using confocal and electron microscopies and live imaging in mouse hippocampal slices, adult-born granule cells seem to compete with mature granule cells for entorhinal cortical inputs (Toni et al., 2007). This competition hypothesis has also been demonstrated in several other studies mentioned above (Adlaf et al., 2017; Lacefield et al., 2012; McAvoy et al., 2016). To further the understanding of how these granule cells compete, it was crucial to determine whether adult-born granule cells connect to the existing network with synapses and whether they follow the same pattern of connection as mature granule cells. Using retrovirus-mediated birth-dating and labeling with electron microscopic reconstruction, it was reported that adult-born granule cells form initial synaptic contacts with CA3 pyramidal cells within 2 weeks post-division, forming a part of the mossy fibers (Faulkner et al., 2008). The reconstruction of axonal and dendritic processes of adult-born granule cells with a serial end-block imaging technique showed that their axons are fully developed 3 weeks post-division (Sun et al., 2013). Optogenetic stimulation was then used by another group to compare responses of axonal and dendritic targets of 4-week-old and mature granule cells. Both generated identical output responses in CA3 networks in terms of glutamatergic EPSCs and GABAergic inhibitory postsynaptic currents (IPSCs), resulting from feedforward recruitment of interneurons (Bergami et al., 2015; Restivo et al., 2015). This result indicates that at 4 weeks post-division, adult-born granule cell axons already make functional synapses onto CA3 interneurons and CA3 pyramidal cells (Temprana et al., 2015; Toni et al., 2008). These results indicate that regarding projections to the CA3, 4-week-old adult-born granule cells already displayed the same functional properties as mature granule cells ones.

Direct or indirect interactions between adult-born granule cells and mature granule cells were then explored. Voltage clamp recordings in mature granule cells showed weaker IPSCs after 4-week-old granule cell stimulation than after mature granule cell stimulation (Temprana et al., 2015). Thus, these data suggest that 4-week-old granule cells activate proximal GABAergic hilar interneurons. The

Table 2 Four to six week-old granule cells affect memory and mood regulation.

Species (Rats or mice) and strains	Sex	Population studied	Behavioral tests	Neurogenesis (intact i or suppressed s)	Method	Results	References
CaMKII β GluN2B C57B/6-B6/CBF1 mice			Water maze	i		↗ time in target quadrant	Tang et al. (1999)
C57Bl/6J-129 Sv/Ev mice	♂	1-, 2-, 4-, 6- or 8-week-old granule cells	Water maze	i		↗ of Fos expression from 4- to 8-week-old	Kee et al. (2007)
129 Sv/Ev mice	♂		Fear conditioning	s	Irradiation 3 × 5 Gy - 3 months prior experiments	↘ context-elicited freezing	Saxe et al. (2006)
C57Bl/6J-BALB/c mice	♂		Fear conditioning	s	Genetic modulation (GFAP-TK transgene - 6 weeks prior experiments)	↘ context-elicited freezing	Saxe et al. (2006)
C57Bl/6 J mice	♂		Water maze	i	Injection of Ro25-6981	↗ time in target quadrant	Hu et al., (2008)
129 Sv/Ev mice	♂	2-, 4- or 6-week-old granule cells	Fear conditioning	s	Irradiation 3 × 5 Gy - 8 weeks prior experiments	↗ time exploring novel object (6 week-old)	Denny et al. (2012)
129 Sv/Ev mice	♂		Novel object recognition paradigm, Fear conditioning	s	Genetic modulation (GFAP-TK transgene - 6 weeks prior experiments)	↗ time exploring novel object, ↘ context-elicited freezing	Denny et al. (2012)
C57Bl/6 J mice	♀	2-, 4- or 8-week-old granule cells	Water maze, Fear conditioning	i	Oncoretrovirus (Archaeorhodopsin) and optogenetic inhibition	↘ % time searching the target quadrant (4 week-old), ↘ context-elicited freezing	Gu et al. (2012)
NestinCreERT2;GluN2B C57Bl/6 J mice	♂		Fear discrimination tasks	i	Tamoxifen injections - 8 weeks prior experiment	↗ time to learn fine discrimination task	Kheirbek et al. (2012a, b)
NestinCreERT2;GluN2B C57Bl/6 J mice	♂		Novelty suppressed feeding	fluoxetine induced	Tamoxifen injections - 10 weeks prior experiment	attenuates the ↘ in latency to feed	Tannenholz et al. (2016)

activation of local inhibitory circuits in the hilus of the DG by adult-born granule cells was also studied by Drew and colleagues (Drew et al., 2016). In their study, optogenetic stimulation of young granule cells was performed at different stages of maturation, ranging in age from 0 to 6-7 weeks post-division in mice kept under standard housing conditions and in mice housed in enriched environments, increasing the number of adult-born granule cells in the DG (Fabel et al., 2009; Olson et al., 2006). Currents in the DG were studied in hippocampal slices. Following enriched environments, the ratio of IPSCs to EPSCs still heavily favored inhibition as observed in slices from control mice, but IPSCs had greater amplitude when the number of adult-born neurons was increased through the enriched environment (Drew et al., 2016). Previous diverging results (Temprana et al., 2015), indicating that stimulating 4-week-old granule cells led to weaker IPSCs, may be due to the selectivity of the adult-born granule cell population that was stimulated. The adult-born granule cells from 4 weeks and up to 6 weeks of age in the granule cell cohort would be responsible for the bulk of synaptic inhibition in mature granule cells. Moreover, light-activated IPSCs were substantially reduced following application of glutamate receptor antagonists (NBQX + APV), suggesting a di-synaptic circuit mediating inhibition. A residual IPSC remained after using the antagonists, denoting a direct release of GABA onto mature granule cells (Drew et al., 2016). A recent study showed a direct connection between adult-born and mature granule cells. Moreover, a weak excitation of immature granule cells inhibited mature granule cells via GIRK potassium channels coupled to group II metabotropic postsynaptic receptors. By contrast, a strong excitation of adult-born granule cells activated mature granule cells via ionotropic NMDA postsynaptic glutamate receptors (Luna et al., 2019). To summarize, it seems that adult-born granule cells over 4 weeks of age establish a glutamatergic synapse on a hilar GABAergic interneuron leading to an IPSC on the mature granule cells.

To explore the pathway leading to the synaptic inhibition after adult-born granule cell stimulation, optogenetic stimulation of adult-born granule cells was combined with patch-clamp recordings in hippocampal slices of parvalbumin (PV)- and somatostatin (SST)-expressing interneurons, the two major subpopulations of hilar GABAergic interneurons (Freund and Buzsaki, 1996; Maccaferri and Lacaille, 2003). GABAergic responses, resulting from stimulation of granule cells, were recorded. Currents from SST⁺ interneurons, and not from PV⁺ interneurons, were similar to those produced after granule cell stimulation. This result suggests that SST⁺ interneurons are likely responsible for feedback inhibition that leads to attenuation of granule cell layer activity (Stefanelli et al., 2016). The increase in IPSCs following the enhancement of neurogenesis may result from SST⁺ interneuron activation (Raza et al., 2017; Yuan et al., 2017). PV⁺ interneurons do not seem to be involved in adult-born granule cell output responses, though they are involved in their input (Bao et al., 2017; Moss and Toni, 2013; Song et al., 2012b).

Furthermore, *in vivo* electrophysiological recordings were performed while conducting optogenetic inhibition of adult-born granule cells to study their projections outside the mossy fibers. Silencing of these cells increased local field potentials in the contralateral CA1 region with no ef-

fect in the contralateral CA3 region, supporting the hypothesis that adult neurogenesis recruits the former CA1 neural network (Zhuo et al., 2016). Finally, the adult-born granule cell incorporation in the circuitry may change in response to experience. Adult-born neurons were exposed to environmental enrichment at different times following their division, and starter cells were transduced with the rabies virus one week prior to sacrifice in order to specifically trace neuronal connections (Ugolini, 2011). There was a significantly higher proportion of local projections in the DG when environmental enrichment was provided between the second and sixth week of the neuron's life. Long-range projections were also selectively increased in number following the exposure to environmental enrichment during the same specific time window (Bergami et al., 2015). Thus, environmental enrichment increases the number of adult-born granule cells and their connectivity, notably with SST⁺ interneurons.

5. Adult-born granule cells influence hippocampal functions through a decrease in the excitation/inhibition balance

Considering adult-born granule cells integrate in the hippocampus connectivity and affect electrical activity of neighboring cells as well as long-range projection, it is likely that they influence neurotransmitter release (Table 3 and Fig. 1).

The identification of a potential neurotransmitter released by adult-born granule cells was first examined. Adult-born granule cell targets and neurotransmitter release were studied in hippocampal slices by recording postsynaptic responses evoked by optogenetic stimulation of adult-born granule cells. EPSCs and IPSCs were obtained with these stimulations; they were reversibly abolished with kynurenic acid, a mixed AMPA/NMDA receptor antagonist. By contrast, the GABA_A receptor antagonist bicuculline elicited no changes in postsynaptic currents. These experiments demonstrate that adult-born granule cells establish synaptic connections with mossy cells, with interneurons in the hilus, and more specifically with SST⁺ interneurons as previously demonstrated (Stefanelli et al., 2016), as well as with pyramidal cells (Toni et al., 2008). They also release glutamate as their main neurotransmitter (Toni et al., 2008). Then, the contributory role of young granule cells in regulating mossy fiber-CA3 excitation via glutamate levels was established in a GFAP-TK mice model, where adult neurogenesis was inducibly suppressed. *In vivo* microdialysis was used to monitor extracellular glutamate levels into CA3. Loss of adult-born neurons resulted in increased glutamate levels in CA3 in response to an acute stress (Schloesser et al., 2014). Loss of adult-born granule cells would be responsible for a decrease in SST⁺ interneuron stimulation leading to a decrease in GABA release. This disinhibition would be consistent with the possibility that innervation of SST⁺ interneurons by adult-born granule cells would provide homeostatic control over mossy fiber-CA3 excitation. Contrariwise, an electrophysiological study showed that 4-week-old granule cells first send mossy fiber projections onto distal CA3 inducing an excitatory effect on the CA3 pyramidal cells. The adult-born granule cells connection with SST⁺ interneurons

Table 3 Adult-born granule cells release glutamate, activating somatostatin GABAergic interneurons, and thus reduce the overall excitability of the dentate gyrus.

Species (Rats or mice) and strains	Sex	Population studied	Stimulation	Neurogenesis (intact i or suppressed s)	Method	Results	References
C57Bl/6 J mice	♀		Optogenetic stimulation Application of kynurenic acid (4-10 mM)	i	Retroviral injection (CAG-Channelrhodopsin) - 3-4 months prior optogenetic stimulation	evoked PSCs reversibly abolished by kynurenic acid	Toni et al. (2008)
C57Bl/6 J mice	♂		Microdialysis	s	Genetic modulation (GFAP-TK transgene - 16 weeks prior experiments)	↗ glutamate levels in CA3	Schloesser et al. (2014)
C57Bl/6 J mice	♂	6-week-old granule cells	Voltage-clamp	Increased	Environmental enrichment	↘ EPSCs frequency	Bergami et al. (2015)
NestinCreERT2;Baxfl/fl C57Bl/6J-129 Sv mice	♂	4- to 6-week-old granule cells	Perforant path stimulation	Increased	Tamoxifen injections - 4-6 weeks prior experiment	↘ EPSCs frequency from mature granule cells	Adlaf et al. (2017)
NestinCreERT2;iDTR C57Bl/6J-129 Sv/Ev mice	♂		Field and whole-cell recordings	s	Tamoxifen injections - 6 weeks prior diphtheria toxin injections	↗ EPSCs amplitude from mature granule cells	Adlaf et al. (2017)
SSTCre;v2fl/fl C57Bl/6J-129 Sv mice	♀♂		Elevated plus maze, Novelty suppressed feeding, Forced swim test, Learned helplessness	i		↗ open arms entries (Elevated plus maze ♀♂), ↘ latency to feed (Novelty suppressed feeding ♀), ↗ time to first immobility ↘ time immobile (Forced swim test ♀♂), ↘ escape failures (Learned helplessness ♂)	Fuchs et al. (2017)

would then appear later (Temprana et al., 2015). These points need to be further explored.

Regarding the DG, an interesting element was pointed out in the study by Bergami et al. (2015); their main goal was not to study electrical recordings of adult-born granule cells in the DG. Yet, the authors used voltage-clamp recordings from hippocampal slices of control and environmental enriched 6-week exposed mice and revealed a reduction in EPSCs frequency (Bergami et al., 2015), which could be related to a decrease in glutamatergic transmission. Likewise, EPSCs from mature granule cells were recorded after

stimulation of the perforant path. Mature granule cells had reduced excitatory transmission in slices where neurogenesis was enhanced with the conditional Bax deletion in Nestin-expressing progenitors. In those slices, frequency of spontaneous EPSCs was also decreased, suggesting a diminution in the number of active synapses, causing the reduction in excitatory transmission. It was confirmed with biocytin spine analysis showing a robust reduction in spine density in mature granule cells in mice with stimulated neurogenesis compared to controls (Adlaf et al., 2017). This suggests that adult-born granule cells integrating

into the DG network lead to a decrease in the number of stimulated mature glutamatergic granule cells (Tashiro et al., 2006), and thus a decrease in glutamate release in the DG. Conversely, using diphtheria toxin-induced ablation in Nestin-expressing progenitors (Buch et al., 2005) to ablate adult-born granule cells increased EPSC amplitude (Adlaf et al., 2017), but whether it resulted from pre- or postsynaptic mechanisms remains to be elucidated. However, knowing the circuits in which adult-born granule cells integrate, it is very likely that adult-born granule cells decrease EPSCs via a di-synaptic circuit, certainly with SST⁺ GABAergic interneurons responsible for feedback inhibition, leading to a decreased excitation/inhibition balance in the DG, and a decrease in glutamate transmission in CA3 (Schloesser et al., 2014). Moreover, increasing excitability of SST⁺ interneurons in genetically modified mice led to an anxiolytic and antidepressant-like behavioral phenotype (Fuchs et al., 2017), supporting the importance of these SST⁺ interneurons in the regulation of hippocampal functions.

Adult-born granule cells release glutamate and stimulate several types of cells, including GABAergic interneurons and glutamatergic pyramidal cells in CA3 or SST⁺ neurons in the hilus of the DG. In CA3, adult-born granule cells decrease the overall glutamate release. In contrast, no data on neurotransmitter release in the DG is available yet. It would then be highly relevant to study in detail neurotransmission changes in the DG related to AHN and neurogenesis-dependent tasks. These observations would enlighten the underlying mechanisms linking AHN and specific tasks associated with this phenomenon.

6. Conclusions

The present review aimed to summarize electrophysiological properties of adult-born granule cells and neurochemical data that would explain underlying mechanisms of the involvement of adult-born granule cells to behavioral outcomes. With their enhanced plasticity during 4-6 weeks post-division, adult-born granule cells exhibit an essential role in hippocampal structural plasticity. At this specific age, they influence memory and mood regulation as well as antidepressant response. The GluN2B subunit of the NMDA receptor in particular seems to play a crucial role in controlling the particular properties of adult-born granule cells. Adult-born granule cells also contribute to a strong inhibitory tone through activation of SST⁺ interneurons. Furthermore, they influence large neural networks, including their proximal mature granule cells, CA3, and also the contralateral hippocampus. In CA3 specifically, glutamate release is decreased by adult-born granule cells. In the DG, the increase in AHN leads to a modification of the excitation/inhibition balance, through an excitation decrease. The consequences at this level remain to be evaluated, especially *in vivo*. Elucidating the role of adult-born granule cells by deepening their neurotransmission modulation in the DG should bring a better understanding of their importance in hippocampal functions. The role of the GluN2B-containing NMDA receptors in hippocampal neurotransmission modulation should also be explored in future studies. Only a few studies so far have explored selectively GluN2B's role in the adult-born granule cells. It is

possible that targeting 4-to-6-week-old GluN2B-containing adult-born granule cells may represent a novel antidepressive strategy. Overall, uncovering how adult-born granule cells function and how they contribute to behavior will lead to new therapeutic strategies to treat neuropsychiatric diseases such as depression.

Role of the funding source

Funding for this work was provided by the Ministère de l'Éducation Nationale, de l'Enseignement Supérieur et de la Recherche (MENESR, Paris, France) Fellowship (F.D.) contrat doctoral #2017-109.

Contributors

All authors have equally contributed to the manuscript. All authors revised critically the manuscript and they gave final approval.

Declaration of Competing Interest

None regarding this work.

Acknowledgments

The authors belong to the Working Group of Neuropsychopharmacology of the French Society of Pharmacology and Therapeutics (SFPT). The authors would like to thank Dr. Céline Defaix, Dr. Denis J. David and Dr. Jean-Philippe Guilloux for their scientific advice. They would also like to thank Catherine Jeannot and Barbara Trimbach for their English revision. In particular, the authors would like to thank Dr. Josephine C. McGowan for her precious scientific advice as well as her effective help in the editing of this review.

References

- Adlaf, E.W., Vaden, R.J., Niver, A.J., Manuel, A.F., Onyilo, V.C., Araujo, M.T., Dieni, C.V., Vo, H.T., King, G.D., Wadiche, J.L., Overstreet-Wadiche, L., 2017. Adult-born neurons modify excitatory synaptic transmission to existing neurons. *eLife* 6 e19886.
- Aimone, J.B., Wiles, J., Gage, F.H., 2006. Potential role for adult neurogenesis in the encoding of time in new memories. *Nat. Neurosci.* 9, 723-727.
- Aimone, J.B., Wiles, J., Gage, F.H., 2009. Computational influence of adult neurogenesis on memory encoding. *Neuron* 61, 187-202.
- Altman, J., Das, G.D., 1965. Autoradiographic and histological evidence of postnatal hippocampal neurogenesis in rats. *J. Comp. Neurol.* 124, 319-335.
- Alvarez-Buylla, A., Lim, D.A., 2004. For the long run: maintaining germinal niches in the adult brain. *Neuron* 41, 683-686.
- Anacker, C., Hen, R., 2017. Adult hippocampal neurogenesis and cognitive flexibility - linking memory and mood. *Nat. Rev.: Neurosci.* 18, 335-346.
- Banasr, M., Hery, M., Printemps, R., Daszuta, A., 2004. Serotonin-induced increases in adult cell proliferation and neurogenesis are mediated through different and common 5-HT receptor subtypes in the dentate gyrus and the subventricular zone. *Neuropsychopharmacol.: Off. Publ. Am. Coll. Neuropsychopharmacol.* 29, 450-460.

- 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.
- Bao, H., Asrican, B., Li, W., Gu, B., Wen, Z., Lim, S.A., Haniff, I., Ramakrishnan, C., Deisseroth, K., Philpot, B., Song, J., 2017. Long-Range GABAergic inputs regulate neural stem cell quiescence and control adult hippocampal neurogenesis. *Cell Stem Cell* 21, 604-617 e605.
- Barria, A., Malinow, R., 2005. NMDA receptor subunit composition controls synaptic plasticity by regulating binding to CaMKII. *Neuron* 48, 289-301.
- Ben-Ari, Y., 2002. Excitatory actions of gaba during development: the nature of the nurture. *Nat. rev.: Neurosci.* 3, 728-739.
- Ben-Ari, Y., 2007. GABA excites and sculpts immature neurons well before delivery: modulation by GABA of the development of ventricular progenitor cells. *Epilepsy Curr.* 7, 167-169.
- Bergami, M., Masserdotti, G., Temprana, S.G., Motori, E., Eriksson, T.M., Gobel, J., Yang, S.M., Conzelmann, K.K., Schinder, A.F., Gotz, M., Berninger, B., 2015. A critical period for experience-dependent remodeling of adult-born neuron connectivity. *Neuron* 85, 710-717.
- Boldrini, M., Fulmore, C.A., Tartt, A.N., Simeon, L.R., Pavlova, I., Poposka, V., Rosoklija, G.B., Stankov, A., Arango, V., Dwork, A.J., Hen, R., Mann, J.J., 2018. Human hippocampal neurogenesis persists throughout aging. *Cell Stem Cell* 22, 589-599 e585.
- Bordiuk, O.L., Smith, K., Morin, P.J., Semenov, M.V., 2014. Cell proliferation and neurogenesis in adult mouse brain. *PLoS One* 9, e111453.
- Brumback, A.C., Staley, K.J., 2008. Thermodynamic regulation of NKCC1-mediated Cl⁻ cotransport underlies plasticity of GABA(A) signaling in neonatal neurons. *J. Neurosci.: Off. J. Soc. Neurosci.* 28, 1301-1312.
- Buch, T., Heppner, F.L., Tertilt, C., Heinen, T.J., Kremer, M., Wunderlich, F.T., Jung, S., Waisman, A., 2005. A Cre-inducible diphtheria toxin receptor mediates cell lineage ablation after toxin administration. *Nat. Methods* 2, 419-426.
- Cahill, S.P., Yu, R.Q., Green, D., Todorova, E.V., Snyder, J.S., 2017. Early survival and delayed death of developmentally-born dentate gyrus neurons. *Hippocampus* 27, 1155-1167.
- Cameron, H.A., Glover, L.R., 2015. Adult neurogenesis: beyond learning and memory. *Annu. Rev. Psychol.* 66, 53-81.
- Cameron, H.A., McKay, R.D., 2001. Adult neurogenesis produces a large pool of new granule cells in the dentate gyrus. *J. Comp. Neurol.* 435, 406-417.
- Campbell, S., Marriott, M., Nahmias, C., MacQueen, G.M., 2004. Lower hippocampal volume in patients suffering from depression: a meta-analysis. *Am. J. Psychiatry* 161, 598-607.
- Cathala, L., Misra, C., Cull-Candy, S., 2000. Developmental profile of the changing properties of NMDA receptors at cerebellar mossy fiber-granule cell synapses. *J. Neurosci.: Off. J. Soc. Neurosci.* 20, 5899-5905.
- Chancey, J.H., Adlaf, E.W., Sapp, M.C., Pugh, P.C., Wadiche, J.I., Overstreet-Wadiche, L.S., 2013. GABA depolarization is required for experience-dependent synapse unsilencing in adult-born neurons. *J. Neurosci.: Off. J. Soc. Neurosci.* 33, 6614-6622.
- Chen, G., Trombley, P.Q., van den Pol, A.N., 1996. Excitatory actions of GABA in developing rat hypothalamic neurones. *J. Physiol.* 494 (Pt 2), 451-464.
- Chow, C., Epp, J.R., Lieblich, S.E., Barha, C.K., Galea, L.A., 2013. Sex differences in neurogenesis and activation of new neurons in response to spatial learning and memory. *Psychoneuroendocrinology* 38, 1236-1250.
- Clark, R.E., Broadbent, N.J., Squire, L.R., 2005. Impaired remote spatial memory after hippocampal lesions despite extensive training beginning early in life. *Hippocampus* 15, 340-346.
- Clelland, C.D., Choi, M., Romberg, C., Clemenson Jr., G.D., Fagniere, A., Tyers, P., Jessberger, S., Saksida, L.M., Barker, R.A., Gage, F.H., Bussey, T.J., 2009. A functional role for adult hippocampal neurogenesis in spatial pattern separation. *Science* 325, 210-213.
- Cull-Candy, S.G., Leszkiewicz, D.N., 2004. Role of distinct NMDA receptor subtypes at central synapses. *Science's STKE* 2004, re16.
- Danielson, N.B., Kaifosh, P., Zaremba, J.D., Lovett-Barron, M., Tsai, J., Denny, C.A., Balough, E.M., Goldberg, A.R., Drew, L.J., Hen, R., Losonczy, A., Kheirbek, M.A., 2016. Distinct contribution of adult-born hippocampal granule cells to context encoding. *Neuron* 90, 101-112.
- 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.
- Delpire, E., 2000. Cation-chloride cotransporters in neuronal communication. *News Physiol. Sci.: Int. J. Physiol. Prod Jointly Int. Union of Physiol. Sci. Am. Physiol. Soc.* 15, 309-312.
- Deng, W., Aimone, J.B., Gage, F.H., 2010. New neurons and new memories: how does adult hippocampal neurogenesis affect learning and memory? *Nat. Rev.: Neurosci.* 11, 339-350.
- Denny, C.A., Burghardt, N.S., Schachter, D.M., Hen, R., Drew, M.R., 2012. 4- to 6-week-old adult-born hippocampal neurons influence novelty-evoked exploration and contextual fear conditioning. *Hippocampus* 22, 1188-1201.
- Drew, L.J., Kheirbek, M.A., Luna, V.M., Denny, C.A., Cloidt, M.A., Wu, M.V., Jain, S., Scharfman, H.E., Hen, R., 2016. Activation of local inhibitory circuits in the dentate gyrus by adult-born neurons. *Hippocampus* 26, 763-778.
- Duarte-Guterman, P., Yagi, S., Chow, C., Galea, L.A., 2015. Hippocampal learning, memory, and neurogenesis: effects of sex and estrogens across the lifespan in adults. *Horm. Behav.* 74, 37-52.
- Dumas, T.C., 2005. Developmental regulation of cognitive abilities: modified composition of a molecular switch turns on associative learning. *Prog. Neurobiol.* 76, 189-211.
- Dupret, D., Revest, J.M., Koehl, M., Ichas, F., De Giorgi, F., Costet, P., Abrous, D.N., Piazza, P.V., 2008. Spatial relational memory requires hippocampal adult neurogenesis. *PLoS One* 3, e1959.
- Erickson, K.I., Voss, M.W., Prakash, R.S., Basak, C., Szabo, A., Chaddock, L., Kim, J.S., Heo, S., Alves, H., White, S.M., Wojcicki, T.R., Mailey, E., Vieira, V.J., Martin, S.A., Pence, B.D., Woods, J.A., McAuley, E., Kramer, A.F., 2011. Exercise training increases size of hippocampus and improves memory. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 108, 3017-3022.
- Eriksson, P.S., Perfilieva, E., Bjork-Eriksson, T., Alborn, A.M., Nordborg, C., Peterson, D.A., Gage, F.H., 1998. Neurogenesis in the adult human hippocampus. *Nat. Med.* 4, 1313-1317.
- Erreger, K., Dravid, S.M., Banke, T.G., Wyllie, D.J., Traynelis, S.F., 2005. Subunit-specific gating controls rat NR1/NR2A and NR1/NR2B NMDA channel kinetics and synaptic signalling profiles. *J. Physiol.* 563, 345-358.
- Esposito, M.S., Piatti, V.C., Laplagne, D.A., Morgenstern, N.A., Ferrari, C.C., Pitossi, F.J., Schinder, A.F., 2005. Neuronal differentiation in the adult hippocampus recapitulates embryonic development. *J. Neurosci.: Off. J. Soc. Neurosci.* 25, 10074-10086.
- Fabel, K., Wolf, S.A., Ehninger, D., Babu, H., Leal-Galicia, P., Kempermann, G., 2009. Additive effects of physical exercise and environmental enrichment on adult hippocampal neurogenesis in mice. *Front. Neurosci.* 3, 50.

- Fanselow, M.S., Dong, H.W., 2010. Are the dorsal and ventral hippocampus functionally distinct structures? *Neuron* 65, 7-19.
- Faulkner, R.L., Jang, M.H., Liu, X.B., Duan, X., Sailor, K.A., Kim, J.Y., Ge, S., Jones, E.G., Ming, G.L., Song, H., Cheng, H.J., 2008. Development of hippocampal mossy fiber synaptic outputs by new neurons in the adult brain. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 105, 14157-14162.
- Fortin, N.J., Wright, S.P., Eichenbaum, H., 2004. Recollection-like memory retrieval in rats is dependent on the hippocampus. *Nature* 431, 188-191.
- Freund, T.F., Buzsaki, G., 1996. Interneurons of the hippocampus. *Hippocampus* 6, 347-470.
- Frodl, T., Schaub, A., Banac, S., Charypar, M., Jager, M., Kummer, P., Bottlender, R., Zetzsche, T., Born, C., Leinsinger, G., Reiser, M., Moller, H.J., Meisenzahl, E.M., 2006. Reduced hippocampal volume correlates with executive dysfunctioning in major depression. *J. Psychiatry Neurosci.* 31, 316-323.
- Fuchs, T., Jefferson, S.J., Hooper, A., Yee, P.H., Maguire, J., Luscher, B., 2017. Disinhibition of somatostatin-positive GABAergic interneurons results in an anxiolytic and antidepressant-like brain state. *Mol. Psychiatry* 22, 920-930.
- Gage, F.H., Temple, S., 2013. Neural stem cells: generating and regenerating the brain. *Neuron* 80, 588-601.
- Ge, S., Goh, E.L., Sailor, K.A., Kitabatake, Y., Ming, G.L., Song, H., 2006. GABA regulates synaptic integration of newly generated neurons in the adult brain. *Nature* 439, 589-593.
- Ge, S., Yang, C.H., Hsu, K.S., Ming, G.L., Song, H., 2007. A critical period for enhanced synaptic plasticity in newly generated neurons of the adult brain. *Neuron* 54, 559-566.
- Gilbert, P.E., Kesner, R.P., 2006. The role of the dorsal CA3 hippocampal subregion in spatial working memory and pattern separation. *Behav. Brain Res.* 169, 142-149.
- Gruden, M.A., Ratmirov, A.M., Storozeva, Z.I., Solovieva, O.A., Sherstnev, V.V., Sewell, R.D.E., 2018. The neurogenesis actuator and NR2B/NMDA receptor antagonist Ro25-6981 consistently improves spatial memory retraining via brain region-specific gene expression. *J. Mol. Neurosci.* 65, 167-178.
- Gu, Y., Arruda-Carvalho, M., Wang, J., Janoschka, S.R., Josselyn, S.A., Frankland, P.W., Ge, S., 2012. Optical controlling reveals time-dependent roles for adult-born dentate granule cells. *Nat. Neurosci.* 15, 1700-1706.
- Haberny, K.A., Paule, M.G., Scallet, A.C., Sistare, F.D., Lester, D.S., Hanig, J.P., Slikker Jr., W., 2002. Ontogeny of the N-methyl-D-aspartate (NMDA) receptor system and susceptibility to neurotoxicity. *Toxicol. Sci.: Off. J. Soc. Toxicol.* 68, 9-17.
- Heberden, C., 2016. Modulating adult neurogenesis through dietary interventions. *Nutr. Res. Rev.* 29, 163-171.
- Heigele, S., Sultan, S., Toni, N., Bischofberger, J., 2016. Bidirectional GABAergic control of action potential firing in newborn hippocampal granule cells. *Nat. Neurosci.* 19, 263-270.
- Hillerer, K.M., Neumann, I.D., Couillard-Despres, S., Aigner, L., Slattery, D.A., 2013. Sex-dependent regulation of hippocampal neurogenesis under basal and chronic stress conditions in rats. *Hippocampus* 23, 476-487.
- Hollrigel, G.S., Soltesz, I., 1997. Slow kinetics of miniature IPSCs during early postnatal development in granule cells of the dentate gyrus. *J. Neurosci.: Off. J. Soc. Neurosci.* 17, 5119-5128.
- Hu, M., Sun, Y.J., Zhou, Q.G., Chen, L., Hu, Y., Luo, C.X., Wu, J.Y., Xu, J.S., Li, L.X., Zhu, D.Y., 2008. Negative regulation of neurogenesis and spatial memory by NR2B-containing NMDA receptors. *J. Neurochem.* 106, 1900-1913.
- Ikrar, T., Guo, N., He, K., Besnard, A., Levinson, S., Hill, A., Lee, H.K., Hen, R., Xu, X., Sahay, A., 2013. Adult neurogenesis modifies excitability of the dentate gyrus. *Front. Neural Circuits* 7, 204.
- Jacobs, B.L., van Praag, H., Gage, F.H., 2000. Adult brain neurogenesis and psychiatry: a novel theory of depression. *Mol. Psychiatry* 5, 262-269.
- Jimenez, J.C., Su, K., Goldberg, A.R., Luna, V.M., Biane, J.S., Ordek, G., Zhou, P., Ong, S.K., Wright, M.A., Zweifel, L., Paninski, L., Hen, R., Kheirbek, M.A., 2018. Anxiety cells in a hippocampal-hypothalamic circuit. *Neuron* 97, 670-683.
- Kee, N., Teixeira, C.M., Wang, A.H., Frankland, P.W., 2007. Preferential incorporation of adult-generated granule cells into spatial memory networks in the dentate gyrus. *Nat. Neurosci.* 10, 355-362.
- Kempermann, G., Gast, D., Kronenberg, G., Yamaguchi, M., Gage, F.H., 2003. Early determination and long-term persistence of adult-generated new neurons in the hippocampus of mice. *Development* 130, 391-399.
- Kempermann, G., Kuhn, H.G., Gage, F.H., 1998. Experience-induced neurogenesis in the senescent dentate gyrus. *J. Neurosci.: Off. J. Soc. Neurosci.* 18, 3206-3212.
- Kheirbek, M.A., Klemenhagen, K.C., Sahay, A., Hen, R., 2012a. Neurogenesis and generalization: a new approach to stratify and treat anxiety disorders. *Nat. Neurosci.* 15, 1613-1620.
- Kheirbek, M.A., Tannenholz, L., Hen, R., 2012b. NR2B-dependent plasticity of adult-born granule cells is necessary for context discrimination. *J. Neurosci.: Off. J. Soc. Neurosci.* 32, 8696-8702.
- Kim, M.J., Dunah, A.W., Wang, Y.T., Sheng, M., 2005. Differential roles of NR2A- and NR2B-containing NMDA receptors in Ras-ERK signaling and AMPA receptor trafficking. *Neuron* 46, 745-760.
- Koss, W.A., Frick, K.M., 2017. Sex differences in hippocampal function. *J. Neurosci. Res.* 95, 539-562.
- Lacefield, C.O., Itskov, V., Reardon, T., Hen, R., Gordon, J.A., 2012. Effects of adult-generated granule cells on coordinated network activity in the dentate gyrus. *Hippocampus* 22, 106-116.
- Laube, B., Kuhse, J., Betz, H., 1998. Evidence for a tetrameric structure of recombinant NMDA receptors. *J. Neurosci.: Off. J. Soc. Neurosci.* 18, 2954-2961.
- Lee, J., Duan, W., Long, J.M., Ingram, D.K., Mattson, M.P., 2000. Dietary restriction increases the number of newly generated neural cells, and induces BDNF expression, in the dentate gyrus of rats. *J. Mol. Neurosci.* 15, 99-108.
- Lee, J., Duan, W., Mattson, M.P., 2002. Evidence that brain-derived neurotrophic factor is required for basal neurogenesis and mediates, in part, the enhancement of neurogenesis by dietary restriction in the hippocampus of adult mice. *J. Neurochem.* 82, 1367-1375.
- Li, N., Lee, B., Liu, R.J., Banasr, M., Dwyer, J.M., Iwata, M., Li, X.Y., Aghajanian, G., Duman, R.S., 2010. mTOR-dependent synapse formation underlies the rapid antidepressant effects of NMDA antagonists. *Science* 329, 959-964.
- Li, N., Liu, R.J., Dwyer, J.M., Banasr, M., Lee, B., Son, H., Li, X.Y., Aghajanian, G., Duman, R.S., 2011. Glutamate N-methyl-D-aspartate receptor antagonists rapidly reverse behavioral and synaptic deficits caused by chronic stress exposure. *Biol. Psychiatry* 69, 754-761.
- Li, Z.J., Zhang, H.W., Tang, N., 2013. Influences of NR2B-containing NMDA receptors knockdown on neural activity in hippocampal newborn neurons. *J. Huazhong Univ. Sci. Technol. Med. Sci.* 33, 457-462.
- Lindqvist, A., Mohapel, P., Bouter, B., Frielingsdorf, H., Pizzo, D., Brundin, P., Erlanson-Albertsson, C., 2006. High-fat diet impairs hippocampal neurogenesis in male rats. *Eur. J. Neurol.* 13, 1385-1388.
- Liu, Y.B., Ye, G.L., Liu, X.S., Pasternak, J.F., Trommer, B.L., 1998. GABAA currents in immature dentate gyrus granule cells. *J. Neurophysiol.* 80, 2255-2267.
- LoTurco, J.J., Owens, D.F., Heath, M.J., Davis, M.B., Kriegstein, A.R., 1995. GABA and glutamate depolarize cortical progenitor cells and inhibit DNA synthesis. *Neuron* 15, 1287-1298.

- Luna, V.M., Anacker, C., Burghardt, N.S., Khandaker, H., Andreu, V., Millette, A., Leary, P., Ravenelle, R., Jimenez, J.C., Mastrodonato, A., Denny, C.A., Fenton, A.A., Scharfman, H.E., Hen, R., 2019. Adult-born hippocampal neurons bidirectionally modulate entorhinal inputs into the dentate gyrus. *Science* 364, 578-583.
- Lytle, C., Xu, J.C., Biemesderfer, D., Forbush 3rd, B., 1995. Distribution and diversity of Na-K-Cl cotransport proteins: a study with monoclonal antibodies. *Am. J. Physiol.* 269, C1496-C1505.
- Maccaferri, G., Lacaille, J.C., 2003. Interneuron diversity series: hippocampal interneuron classifications-making things as simple as possible, not simpler. *Trends Neurosci.* 26, 564-571.
- Malberg, J.E., Eisch, A.J., Nestler, E.J., Duman, R.S., 2000. Chronic antidepressant treatment increases neurogenesis in adult rat hippocampus. *J. Neurosci.: Off. J. Soc. Neurosci.* 20, 9104-9110.
- Marin-Burgin, A., Mongiat, L.A., Pardi, M.B., Schinder, A.F., 2012. Unique processing during a period of high excitation/inhibition balance in adult-born neurons. *Science* 335, 1238-1242.
- McAvoy, K.M., Scobie, K.N., Berger, S., Russo, C., Guo, N., Decharatanachart, P., Vega-Ramirez, H., Miake-Lye, S., Whalen, M., Nelson, M., Bergami, M., Bartsch, D., Hen, R., Berninger, B., Sahay, A., 2016. Modulating neuronal competition dynamics in the dentate gyrus to rejuvenate aging memory circuits. *Neuron* 91, 1356-1373.
- Mendez-David, I., Hen, R., Gardier, A.M., David, D.J., 2013. Adult hippocampal neurogenesis: an actor in the antidepressant-like action. *Ann. Pharm. Fr.* 71, 143-149.
- Ming, G.L., Song, H., 2011. Adult neurogenesis in the mammalian brain: significant answers and significant questions. *Neuron* 70, 687-702.
- Mongiat, L.A., Esposito, M.S., Lombardi, G., Schinder, A.F., 2009. Reliable activation of immature neurons in the adult hippocampus. *PLoS One* 4, e5320.
- Monyer, H., Burnashev, N., Laurie, D.J., Sakmann, B., Seeburg, P.H., 1994. Developmental and regional expression in the rat brain and functional properties of four NMDA receptors. *Neuron* 12, 529-540.
- Moss, J., Toni, N., 2013. A circuit-based gatekeeper for adult neural stem cell proliferation: parvalbumin-expressing interneurons of the dentate gyrus control the activation and proliferation of quiescent adult neural stem cells. *BioEssays: News Rev. Mol. Cell. Dev. Biol.* 35, 28-33.
- Olsen, R.W., Tobin, A.J., 1990. Molecular biology of GABAA receptors. *FASEB J.: Off. Publ. Fed. Am. Soc. Exp. Biol.* 4, 1469-1480.
- Olson, A.K., Eadie, B.D., Ernst, C., Christie, B.R., 2006. Environmental enrichment and voluntary exercise massively increase neurogenesis in the adult hippocampus via dissociable pathways. *Hippocampus* 16, 250-260.
- Overstreet-Wadiche, L., Bromberg, D.A., Bensen, A.L., Westbrook, G.L., 2005. GABAergic signaling to newborn neurons in dentate gyrus. *J. Neurophysiol.* 94, 4528-4532.
- Overstreet-Wadiche, L.S., Bensen, A.L., Westbrook, G.L., 2006. Delayed development of adult-generated granule cells in dentate gyrus. *J. Neurosci.: Off. J. Soc. Neurosci.* 26, 2326-2334.
- Owens, D.F., Kriegstein, A.R., 2002. Is there more to GABA than synaptic inhibition? *Nat. Rev.: Neurosci.* 3, 715-727.
- Park, E.H., Burghardt, N.S., Dvorak, D., Hen, R., Fenton, A.A., 2015. Experience-dependent regulation of dentate gyrus excitability by adult-born granule cells. *J. Neurosci.: Off. J. Soc. Neurosci.* 35, 11656-11666.
- Payne, J.A., Rivera, C., Voipio, J., Kaila, K., 2003. Cation-chloride co-transporters in neuronal communication, development and trauma. *Trends Neurosci.* 26, 199-206.
- Perera, T.D., Dwork, A.J., Keegan, K.A., Thirumangalakudi, L., Lipira, C.M., Joyce, N., Lange, C., Higley, J.D., Rosoklija, G., Hen, R., Sackeim, H.A., Coplan, J.D., 2011. Necessity of hippocampal neurogenesis for the therapeutic action of antidepressants in adult nonhuman primates. *PLoS One* 6, e17600.
- Perlman, G., Simmons, A.N., Wu, J., Hahn, K.S., Tapert, S.F., Max, J.E., Paulus, M.P., Brown, G.G., Frank, G.K., Campbell-Sills, L., Yang, T.T., 2012. Amygdala response and functional connectivity during emotion regulation: a study of 14 depressed adolescents. *J. Affect. Disord.* 139, 75-84.
- Poldrack, R.A., Packard, M.G., 2003. Competition among multiple memory systems: converging evidence from animal and human brain studies. *Neuropsychologia* 41, 245-251.
- Pothuizen, H.H., Zhang, W.N., Jongen-Relo, A.L., Feldon, J., Yee, B.K., 2004. Dissociation of function between the dorsal and the ventral hippocampus in spatial learning abilities of the rat: a within-subject, within-task comparison of reference and working spatial memory. *Eur. J. Neurosci.* 19, 705-712.
- Puil, E., Carlen, P.L., 1984. Attenuation of glutamate-action, excitatory postsynaptic potentials, and spikes by intracellular QX 222 in hippocampal neurons. *Neuroscience* 11, 389-398.
- Raza, S.A., Albrecht, A., Caliskan, G., Muller, B., Demiray, Y.E., Ludewig, S., Meis, S., Faber, N., Hartig, R., Schraven, B., Lessmann, V., Schwegler, H., Stork, O., 2017. HIP neurons in the dentate gyrus mediate the cholinergic modulation of background context memory salience. *Nat. Commun.* 8, 189.
- Restivo, L., Niibori, Y., Mercaldo, V., Josselyn, S.A., Frankland, P.W., 2015. Development of adult-generated cell connectivity with excitatory and inhibitory cell populations in the hippocampus. *J. Neurosci.: Off. J. Soc. Neurosci.* 35, 10600-10612.
- Rivera, C., Voipio, J., Payne, J.A., Ruusuvuori, E., Lahtinen, H., Lamsa, K., Pirvola, U., Saarma, M., Kaila, K., 1999. The K⁺/Cl⁻ co-transporter KCC2 renders GABA hyperpolarizing during neuronal maturation. *Nature* 397, 251-255.
- Sahay, A., Scobie, K.N., Hill, A.S., O'Carroll, C.M., Kheirbek, M.A., Burghardt, N.S., Fenton, A.A., Dranovsky, A., Hen, R., 2011a. Increasing adult hippocampal neurogenesis is sufficient to improve pattern separation. *Nature* 472, 466-470.
- Sahay, A., Wilson, D.A., Hen, R., 2011b. Pattern separation: a common function for new neurons in hippocampus and olfactory bulb. *Neuron* 70, 582-588.
- 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.
- Saxe, M.D., Battaglia, F., Wang, J.W., Malleret, G., David, D.J., Monckton, J.E., Garcia, A.D., Sofroniew, M.V., Kandel, E.R., Santarelli, L., Hen, R., Drew, M.R., 2006. Ablation of hippocampal neurogenesis impairs contextual fear conditioning and synaptic plasticity in the dentate gyrus. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 103, 17501-17506.
- Schloesser, R.J., Jimenez, D.V., Hardy, N.F., Paredes, D., Catlow, B.J., Manji, H.K., McKay, R.D., Martinowich, K., 2014. Atrophy of pyramidal neurons and increased stress-induced glutamate levels in CA3 following chronic suppression of adult neurogenesis. *Brain Struct. Funct.* 219, 1139-1148.
- Schmidt-Hieber, C., Jonas, P., Bischofberger, J., 2004. Enhanced synaptic plasticity in newly generated granule cells of the adult hippocampus. *Nature* 429, 184-187.
- Scoville, W.B., Milner, B., 1957. Loss of recent memory after bilateral hippocampal lesions. *J. Neurol. Neurosurg. Psychiatr.* 20, 11-21.
- Scoville, W.B., Milner, B., 2000. Loss of recent memory after bilateral hippocampal lesions. 1957. *J. Neuropsychiatry Clin. Neurosci.* 12, 103-113.
- Selemon, L.D., 2013. A role for synaptic plasticity in the adolescent development of executive function. *Transl. Psychiatry* 3, e238.
- Sheldon, S., Levine, B., 2016. The role of the hippocampus in memory and mental construction. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 1369, 76-92.

- Snyder, J.S., Kee, N., Wojtowicz, J.M., 2001. Effects of adult neurogenesis on synaptic plasticity in the rat dentate gyrus. *J. Neurophysiol.* 85, 2423-2431.
- Song, J., Christian, K.M., Ming, G.L., Song, H., 2012a. Modification of hippocampal circuitry by adult neurogenesis. *Dev. Neurobiol.* 72, 1032-1043.
- Song, J., Zhong, C., Bonaguidi, M.A., Sun, G.J., Hsu, D., Gu, Y., Meletis, K., Huang, Z.J., Ge, S., Enikolopov, G., Deisseroth, K., Luscher, B., Christian, K.M., Ming, G.L., Song, H., 2012b. Neuronal circuitry mechanism regulating adult quiescent neural stem-cell fate decision. *Nature* 489, 150-154.
- Spalding, K.L., Bergmann, O., Alkass, K., Bernard, S., Salehpour, M., Huttner, H.B., Bostrom, E., Westerlund, I., Vial, C., Buchholz, B.A., Possnert, G., Mash, D.C., Druid, H., Frisen, J., 2013. Dynamics of hippocampal neurogenesis in adult humans. *Cell* 153, 1219-1227.
- Squire, L.R., 1992. Memory and the hippocampus: a synthesis from findings with rats, monkeys, and humans. *Psychol. Rev.* 99, 195-231.
- Squire, L.R., 2009. The legacy of patient H.M. for neuroscience. *Neuron* 61, 6-9.
- Stefanelli, T., Bertollini, C., Luscher, C., Muller, D., Mendez, P., 2016. Hippocampal somatostatin interneurons control the size of neuronal memory ensembles. *Neuron* 89, 1074-1085.
- Sun, G.J., Sailor, K.A., Mahmood, Q.A., Chavali, N., Christian, K.M., Song, H., Ming, G.L., 2013. Seamless reconstruction of intact adult-born neurons by serial end-block imaging reveals complex axonal guidance and development in the adult hippocampus. *J. Neurosci.: Off. J. Soc. Neurosci.* 33, 11400-11411.
- 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.
- Tang, Y.P., Shimizu, E., Dube, G.R., Rampon, C., Kerchner, G.A., Zhuo, M., Liu, G., Tsien, J.Z., 1999. Genetic enhancement of learning and memory in mice. *Nature* 401, 63-69.
- Tannenholz, L., Hen, R., Kheirbek, M.A., 2016. GluN2B-Containing NMDA receptors on adult-born granule cells contribute to the antidepressant action of fluoxetine. *Front. Neurosci.* 10, 242.
- Tashiro, A., Makino, H., Gage, F.H., 2007. Experience-specific functional modification of the dentate gyrus through adult neurogenesis: a critical period during an immature stage. *J. Neurosci.: Off. J. Soc. Neurosci.* 27, 3252-3259.
- Tashiro, A., Sandler, V.M., Toni, N., Zhao, C., Gage, F.H., 2006. NMDA-receptor-mediated, cell-specific integration of new neurons in adult dentate gyrus. *Nature* 442, 929-933.
- Temprana, S.G., Mongiat, L.A., Yang, S.M., Trincherio, M.F., Alvarez, D.D., Kropff, E., Giacomini, D., Beltramone, N., Lanuza, G.M., Schinder, A.F., 2015. Delayed coupling to feedback inhibition during a critical period for the integration of adult-born granule cells. *Neuron* 85, 116-130.
- Toni, N., Laplagne, D.A., Zhao, C., Lombardi, G., Ribak, C.E., Gage, F.H., Schinder, A.F., 2008. Neurons born in the adult dentate gyrus form functional synapses with target cells. *Nat. Neurosci.* 11, 901-907.
- Toni, N., Teng, E.M., Bushong, E.A., Aimone, J.B., Zhao, C., Consiglio, A., van Praag, H., Martone, M.E., Ellisman, M.H., Gage, F.H., 2007. Synapse formation on neurons born in the adult hippocampus. *Nat. Neurosci.* 10, 727-734.
- Tsai, C.Y., Tsai, C.Y., Arnold, S.J., Huang, G.J., 2015. Ablation of hippocampal neurogenesis in mice impairs the response to stress during the dark cycle. *Nat. Commun.* 6, 8373.
- Ugolini, G., 2011. Rabies virus as a transneuronal tracer of neuronal connections. *Adv. Virus Res.* 79, 165-202.
- Vacher, H., Mohapatra, D.P., Trimmer, J.S., 2008. Localization and targeting of voltage-dependent ion channels in mammalian central neurons. *Physiol. Rev.* 88, 1407-1447.
- van der Borgh, K., Kohnke, R., Goransson, N., Deierborg, T., Brundin, P., Erlanson-Albertsson, C., Lindqvist, A., 2011. Reduced neurogenesis in the rat hippocampus following high fructose consumption. *Regul. Pept.* 167, 26-30.
- van Praag, H., Kempermann, G., Gage, F.H., 1999. Running increases cell proliferation and neurogenesis in the adult mouse dentate gyrus. *Nat. Neurosci.* 2, 266-270.
- Videbech, P., Ravnkilde, B., 2004. Hippocampal volume and depression: a meta-analysis of MRI studies. *Am. J. Psychiatry* 161, 1957-1966.
- Vivar, C., Potter, M.C., Choi, J., Lee, J.Y., Stringer, T.P., Callaway, E.M., Gage, F.H., Suh, H., van Praag, H., 2012. Monosynaptic inputs to new neurons in the dentate gyrus. *Nat. Commun.* 3, 1107.
- Wang, D.D., Kriegstein, A.R., 2009. Defining the role of GABA in cortical development. *J. Physiol.* 587, 1873-1879.
- Wang, J.W., David, D.J., Monckton, J.E., Battaglia, F., Hen, R., 2008. Chronic fluoxetine stimulates maturation and synaptic plasticity of adult-born hippocampal granule cells. *J. Neurosci.: Off. J. Soc. Neurosci.* 28, 1374-1384.
- Wang, S., Scott, B.W., Wojtowicz, J.M., 2000. Heterogenous properties of dentate granule neurons in the adult rat. *J. Neurobiol.* 42, 248-257.
- Wang, X.J., Rinzler, J., Rogawski, M.A., 1991. A model of the T-type calcium current and the low-threshold spike in thalamic neurons. *J. Neurophysiol.* 66, 839-850.
- Wu, M.V., Hen, R., 2014. Functional dissociation of adult-born neurons along the dorsoventral axis of the dentate gyrus. *Hippocampus* 24, 751-761.
- Yuan, M., Meyer, T., Benkowitz, C., Savanthrapadian, S., Ansel-Bollepalli, L., Foggetti, A., Wulff, P., Alcami, P., Elgueta, C., Bartos, M., 2017. Somatostatin-positive interneurons in the dentate gyrus of mice provide local- and long-range septal synaptic inhibition. *eLife* 6 e21105.
- Zeng, L.L., Shen, H., Liu, L., Wang, L., Li, B., Fang, P., Zhou, Z., Li, Y., Hu, D., 2012. Identifying major depression using whole-brain functional connectivity: a multivariate pattern analysis. *Brain: J. Neurol.* 135, 1498-1507.
- Zhuo, J.M., Tseng, H.A., Desai, M., Bucklin, M.E., Mohammed, A.I., Robinson, N.T., Boyden, E.S., Rangel, L.M., Jasanoff, A.P., Gritton, H.J., Han, X., 2016. Young adult born neurons enhance hippocampal dependent performance via influences on bilateral networks. *eLife* 5 e22429.
- Zola-Morgan, S., Squire, L.R., Amaral, D.G., 1989a. Lesions of the amygdala that spare adjacent cortical regions do not impair memory or exacerbate the impairment following lesions of the hippocampal formation. *J. Neurosci.: Off. J. Soc. Neurosci.* 9, 1922-1936.
- Zola-Morgan, S., Squire, L.R., Amaral, D.G., Suzuki, W.A., 1989b. Lesions of perirhinal and parahippocampal cortex that spare the amygdala and hippocampal formation produce severe memory impairment. *J. Neurosci.: Off. J. Soc. Neurosci.* 9, 4355-4370.
- Zola, S.M., Squire, L.R., Teng, E., Stefanacci, L., Buffalo, E.A., Clark, R.E., 2000. Impaired recognition memory in monkeys after damage limited to the hippocampal region. *J. Neurosci.: Off. J. Soc. Neurosci.* 20, 451-463.

Depuis la publication de revue, de nouveaux éléments dans la littérature permettent de préciser différents points :

Dans un article paru en 2020, l'intégration des jeunes neurones dans les réseaux inhibiteurs locaux a été étudiée par optogénétique (Groisman et al., 2020). Cette étude précise la chronologie de la synaptogenèse GABAergique à l'origine du GABA qui engendre des dépolarisations, après division des cellules souches. Les interneurones à parvalbumine ou les interneurones à somatostatine ont été stimulés (pulses de 447 nm, avec une puissance inférieure à 150 mW, d'une durée de 0,2 ms à une fréquence de 0,07 Hz) durant un enregistrement en cellule entière. Les jeunes neurones recevront des afférences de ces 2 types d'interneurones. La stimulation des interneurones à parvalbumine se traduit par une augmentation des courants inhibiteurs post-synaptiques dans les jeunes neurones, qui est abolie par un antagoniste du récepteur GABA_A, la picrotoxine. Ces courants s'observent déjà faiblement chez les jeunes neurones qui se sont divisés depuis 2 semaines. Ils sont observés plus rapidement et avec une amplitude bien plus importante chez les jeunes neurones qui se sont divisés depuis 4 à 6 semaines. Ils sont similaires aux courants des neurones matures après 6 semaines. Ces courants liés aux interneurones à parvalbumine auraient une origine périsonatque. La stimulation des interneurones à somatostatine se traduit également par des courants inhibiteurs post-synaptiques dans les jeunes neurones, dès 2 à 3 semaines après division, mais ils sont lents et avec une faible amplitude. Plus tardivement seulement, chez les jeunes neurones qui se sont divisés depuis 8 semaines, ils sont similaires aux courants des neurones matures. Les interneurones à somatostatine engendreraient ces courants par des synapses situées au niveau des dendrites des jeunes neurones. Ainsi, dans la revue, la compétition synaptique des jeunes neurones avec les neurones matures pour la voie perforante en provenance du cortex entorhinal est bien décrite. Ces nouvelles données indiquent que les jeunes neurones reçoivent également des afférences d'interneurones à parvalbumine ainsi que d'interneurones à somatostatine. Ces interneurones à parvalbumine se projettent sur les jeunes neurones au niveau de leur soma. Ces synapses commencent à se former chez les jeunes neurones divisés depuis 2 semaines, ce processus est lent, et la connectivité sera mature sur les jeunes neurones divisés depuis 6 semaines. De la même façon, les interneurones à somatostatine se projettent sur les jeunes neurones, au niveau de leurs dendrites. Ces synapses se forment dès 2 à 3 semaines après division mais ne seront matures que après 8 semaines après division des jeunes neurones. Ces données apportent des informations supplémentaires

sur l'intégration des jeunes neurones, dont seule l'afférence du cortex entorhinal avait été décrite.

L'intégration des jeunes neurones en lien avec les neurones matures a été étudiée également dans un article de Luna paru en 2019 (Luna et al., 2019), qui a fait l'objet d'un éditorial (Llorens-Martin, 2019). Ils ont étudié les interactions entre les jeunes neurones et les neurones matures selon l'origine de la stimulation : par le cortex entorhinal latéral et par le cortex entorhinal médian. Lors d'un enregistrement en cellule entière en courant imposé afin de stimuler le cortex entorhinal latéral ou le cortex entorhinal médian, cette étude a mis en évidence que la réponse des jeunes neurones par la voie perforante latérale avait une fréquence réduite de potentiels d'action par rapport à celle par la voie perforante médiane. En réponse à cette dernière voie, les jeunes neurones se dépolarisent plus rapidement, et les jeunes neurones sont plus nombreux à produire des potentiels d'action. Après inhibition des jeunes neurones (par illumination optogénétique avec une longueur d'ondes de 532 nm, avec une puissance de 200 mW), la mesure moyenne des potentiels synaptiques des neurones matures augmente après la stimulation de la voie perforante latérale, tandis qu'elle diminue après la stimulation de la voie perforante médiane. Cela indique qu'après stimulation de la voie perforante latérale, les jeunes neurones semblent inhiber les neurones matures. Après stimulation de la voie perforante médiane, les jeunes neurones semblent stimuler les neurones matures. Cette stimulation serait liée à une libération de glutamate par les jeunes neurones.

Les auteurs ont approfondi les origines de l'inhibition des neurones matures par les jeunes neurones. Ce lien entre les jeunes neurones et les matures a ensuite été étudié par rajout de bicuculline, un antagoniste des récepteurs GABA_A. Aucun effet n'a été constaté sur l'inhibition des neurones matures par les jeunes neurones. Rien n'est constaté non plus sur les potentiels inhibiteurs post-synaptiques des jeunes neurones après rajout d'un antagoniste des récepteurs au glutamate NMDA ou AMPA. Il semblerait donc que le lien entre les jeunes neurones et les neurones matures soit direct, plutôt qu'indirect et impliquant un interneurone, comme nous l'avions conclu dans la revue. En revanche, ces potentiels inhibiteurs post-synaptiques des jeunes neurones sont bloqués par la tertiapine, un antagoniste de canaux K⁺ rectifiant entrant couplé à une protéine G (GIRK), ainsi que par le LY341495, un antagoniste des récepteurs métabotropiques du glutamate du groupe II. Ainsi, les jeunes neurones seraient responsables des potentiels inhibiteurs post-synaptiques par des récepteurs métabotropiques du glutamate mGluR2 couplés à des canaux K⁺ GIRK. Lors d'une faible libération de

glutamate par les jeunes neurones (par stimulation optogénétique avec des pulses de 473 nm, avec une puissance de 100 mW, d'une durée de 1 ms), l'amplitude des potentiels excitateurs post-synaptiques diminue, tandis que celles des potentiels inhibiteurs post-synaptiques augmente de façon importante. Le rajout de LY341495 après stimulation de la voie perforante latérale et inhibition des jeunes neurones empêche bien l'augmentation (vue précédemment) de la mesure moyenne des potentiels synaptiques des neurones matures. Le rajout d'acide amino-5-phosphonoalérique (AP-5), un antagoniste des récepteurs NMDA, n'a pas eu cet effet. A l'inverse, l'utilisation d'AP-5 après stimulation de la voie perforante médiane et inhibition des jeunes neurones empêche bien la diminution (vue précédemment) de la mesure moyenne des potentiels synaptiques des neurones matures ; le rajout de LY341495 n'affecte pas cette mesure. Les auteurs ont donc émis les hypothèses suivantes (Figure 10) :

- Une faible libération de glutamate par les jeunes neurones favorise l'inhibition des neurones matures, via les récepteurs métabotropiques du glutamate mGluR2 couplés à des canaux K^+ GIRK, qui ont une forte affinité pour le glutamate. Cette faible libération de glutamate surviendrait en réponse à la stimulation du cortex entorhinal latéral. Cette inhibition serait donc directement liée aux jeunes neurones, et non pas à un interneurone intermédiaire.
- Une libération importante de glutamate par les jeunes neurones favorise l'excitation des neurones matures, via les récepteurs NMDA. Cette importante augmentation de glutamate surviendrait en réponse à la stimulation du cortex entorhinal médian.

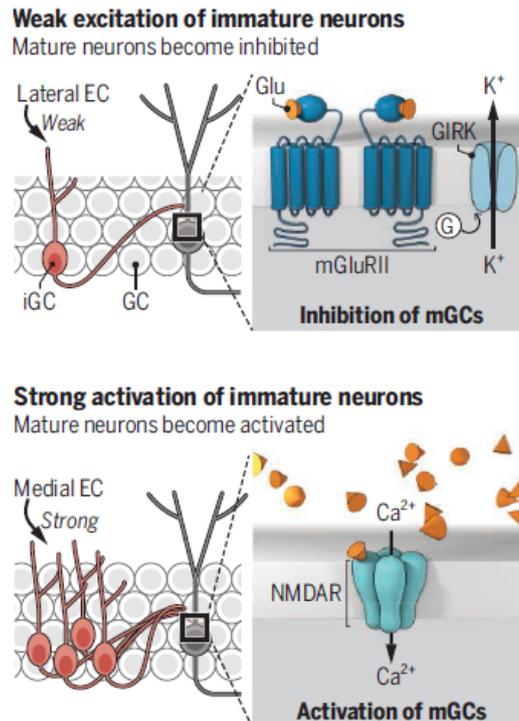


Figure 10 - Contrôle de l'activité électrique des jeunes neurones et des neurones matures dans le GD de l'hippocampe par le cortex entorhinal (d'après Llorens-Martin, 2019). Après stimulation du cortex entorhinal latéral, la faible libération de glutamate par les jeunes neurones favorise l'inhibition des neurones matures, via les récepteurs métabotropiques du glutamate couplés à des canaux K^+ GIRK, qui ont une forte affinité pour le glutamate. Après stimulation du cortex entorhinal médian, la libération importante de glutamate par les jeunes neurones favorise l'excitation des neurones matures, via les récepteurs NMDA.

Cet article précise ainsi les projections des jeunes neurones vers les neurones matures, et notamment les récepteurs impliqués entre les jeunes neurones et les neurones matures, responsables d'une inhibition directe, après libération de glutamate. Il réfute la présence d'un interneurone intermédiaire entre les jeunes neurones et les neurones matures, car les potentiels inhibiteurs post-synaptiques des jeunes neurones n'ont pas été affectés par l'ajout de NBQX, d'AP-5 et de bicuculline. Pourtant, le même groupe d'auteurs avait montré que l'application de NBQX et d'AP-5 réduisait bien ces potentiels inhibiteurs post-synaptiques des jeunes neurones (Drew et al., 2016). Dans ce dernier article, ces potentiels inhibiteurs post-synaptiques ne sont pas totalement réduits : leur amplitude est seulement réduite de 75% environ. Il semble donc y avoir la majorité de l'amplitude des potentiels inhibiteurs post-synaptiques dépendante de récepteurs glutamatergiques, et environ 25% de cette amplitude qui ne dépend pas d'un interneurone. La courbe du courant potentiel de ces courants résiduels rappelle une courbe caractéristique de récepteurs $GABA_A$, lorsque les potentiels de membrane sont dépolarisés (supérieur à -70 mV et jusqu'à $+20$ mV). L'amplitude devient nulle seulement après l'ajout d'un bloqueur des canaux Na^+ ou lorsque la concentration extracellulaire de calcium est mise à 0 mmol/L, en plus de l'ajout de NBQX et d'AP-5. Ainsi,

les auteurs concluent à un lien direct entre les jeunes neurones et les neurones matures, qui serait lié à une libération directe entre ces neurones de GABA. Ces potentiels inhibiteurs post-synaptiques dépendants du GABA s'observeraient une fois les neurones matures dépolarisés.

Ces 2 articles du même groupe d'auteur sont donc en accord sur le fait qu'il existe un lien direct d'inhibition entre les jeunes neurones et les neurones matures. Concernant la nature de ce lien direct, il semblerait donc qu'au potentiel membranaire de repos des cellules granulaires, les jeunes neurones induisent des potentiels post-synaptiques inhibiteurs principalement par les récepteurs métabotropiques du glutamate mGluR2 couplés à des canaux K^+ . Lorsque les neurones matures sont dépolarisés par d'autres stimuli, des potentiels inhibiteurs dépendant du GABA seraient en plus induits. Concernant l'existence d'un lien indirect entre les jeunes neurones et les matures impliquant un interneurone GABAergique montré dans l'article de Drew, elle pourrait dépendre de l'utilisation d'environnement enrichi, qui affecte la connectivité des jeunes neurones (Bergami et al., 2015), ce qui expliquerait donc que dans l'expérience de Luna et collaborateurs sans environnement enrichi, ce lien indirect ne soit pas retrouvé.

IV. Objectifs

Les EDC constituent un des troubles mentaux les plus fréquents. Ils sont désormais la première cause d'incapacité dans le monde, pouvant conduire au suicide. Les ISRS sont la classe d'antidépresseurs la plus prescrite dans la prise en charge des EDC, ils agissent en bloquant sélectivement le transporteur sérotoninergique. Cependant, ils ont un délai d'action retardé lié au délai de désensibilisation fonctionnelle des autorécepteurs 5-HT_{1A/1B}. Des études précliniques ont montré que l'augmentation graduelle de la transmission sérotoninergique est mesurable avant les effets comportementaux complets des ISRS. Ainsi, la transmission sérotoninergique n'explique pas à elle seule le délai d'action retardé des ISRS, et d'autres facteurs doivent également être impliqués. Il a été montré qu'une administration chronique par les ISRS améliore les différentes étapes de la neurogenèse hippocampique adulte ayant lieu dans le GD, et qu'à l'inverse, une perturbation de cette neurogenèse affecte cette réponse des ISRS. Les jeunes neurones issus de cette neurogenèse présentent une période critique au cours de l'étape de maturation, 4 à 6 semaines après division. Durant cette période critique, les jeunes neurones ont notamment une plus grande excitabilité, avec une induction de LTP facilitée et une amplitude de LTP plus grande. De manière coïncidente, les jeunes neurones influencent la réponse des ISRS durant cette période. Nous nous sommes intéressés à cette relation étroite entre jeunes neurones issus de la neurogenèse hippocampique adulte et traitement antidépresseur.

Ces jeunes neurones s'intègrent dans les circuits neuronaux du GD et influencent les effets comportementaux des ISRS. Ainsi, nous nous sommes intéressés à la neurotransmission dans le GD ventral, qui pourrait être responsable de ces effets comportementaux des jeunes neurones : Bien que les éventuelles modifications de neurotransmission dans le GD ventral suite à une administration chronique par un ISRS pourraient ne pas être uniquement en lien avec la neurogenèse adulte hippocampique, il est probable que l'augmentation des différentes étapes de la neurogenèse hippocampique adulte (suite à cette administration chronique par un ISRS) change la neurotransmission dans le GD ventral, afin d'obtenir ces effets sur le comportement. Ainsi, les variations de la neurotransmission dans le GD ventral suite à un traitement chronique avec un ISRS pourraient refléter en partie l'influence des jeunes neurones. **Le premier objectif de ce travail a été d'évaluer les transmissions glutamatergique et GABAergique dans le GD ventral après un traitement chronique avec la fluoxétine.**

Bien que son implication ne soit pas complètement comprise, la sous-unité GluN2B du récepteur NMDA du glutamate semble jouer un rôle important dans les effets antidépresseurs. Plus particulièrement, l'expression importante de cette sous-unité GluN2B dans les jeunes neurones, à un stade de développement critique, est impliquée dans leurs propriétés spécifiques électrophysiologiques et comportementales durant la période critique 4 à 6 semaines après division. Nous avons souhaité explorer le rôle de cette sous-unité GluN2B dans les jeunes neurones sur la neurotransmission dans le GD ventral ainsi que sur le comportement, en utilisant une approche pharmacologique. L'administration locale d'un antagoniste sélectif des récepteurs NMDA contenant la sous-unité GluN2B, le Ro25-6981, dans la région où les jeunes neurones s'intègrent devrait inhiber les récepteurs NMDA contenant la sous-unité GluN2B des jeunes neurones. L'inhibition de leur activité électrique médiée par la sous-unité GluN2B devrait alors nous permettre d'explorer le rôle de cette sous-unité GluN2B. Afin de cibler les jeunes neurones, nous avons administré le Ro25-6981 localement dans le GD ventral. **Le second objectif de ce travail a été d'étudier les modifications des transmissions glutamatergique et GABAergique dans le GD ventral ainsi que les effets comportementaux de l'injection locale du Ro25-6981, après un traitement chronique avec la fluoxétine dans un modèle d'anxiété/dépression (Article 2).**

Les expériences précédentes ont ainsi permis uniquement l'apport d'informations prédictives sur l'implication des jeunes neurones : Dans le premier objectif, les variations neurochimiques observées peuvent aussi refléter d'un effet de la fluoxétine, indépendant de la stimulation des jeunes neurones dans le GD ; dans le second objectif, les variations neurochimiques observées peuvent également refléter l'effet de l'inhibition de l'activité électrique de cellules différentes des jeunes neurones. Nous avons donc voulu explorer l'implication sélective des jeunes neurones dans les variations neurochimiques dans le GD ventral que nous avons mises en évidence. Pour cela, nous avons manipulé l'activité électrique des jeunes neurones durant la période critique en utilisant une approche d'optogénétique. Nous avons réalisé une étude neurochimique en relation avec le comportement neurogène-dépendant suite à la stimulation ou à l'inhibition des jeunes neurones après un traitement chronique avec un ISRS. **Le troisième objectif de ce travail a été d'étudier les modifications des transmissions glutamatergique et GABAergique dans le GD ventral produites sélectivement par les jeunes neurones suite à un traitement par la fluoxétine.**

MATÉRIELS ET MÉTHODES

Durant ma thèse, j'ai principalement utilisé 3 techniques : les tests comportementaux, la technique de microdialyse *in vivo* et l'optogénétique. J'ai tout d'abord maîtrisé chaque technique séparément, puis j'ai utilisé ces techniques en combinaison : la microdialyse *in vivo* avec un test comportemental (le *Novelty Suppressed Feeding*), l'optogénétique avec un test comportemental (l'*Open Field*), et enfin l'ensemble des 3 techniques ensemble durant un NSF.

I. Animaux

I.1 *Fond génétique et conditions d'élevage des souris*

Des souris 129SvPas mâles, âgées de 8 semaines (Janvier Labs, Le Genest-Saint-Isle, France), ont été utilisées pour répondre au premier objectif. Cette souche possède un niveau basal de neurogenèse faible (David et al., 2010 pour revue; Kempermann et al., 1997), pouvant être fortement induite suite au traitement par la fluoxétine dans toutes les étapes de la neurogenèse (Diaz et al., 2012).

Des souris 129SV/BL6 mâles, fond génétique des souris génétiquement modifiées utilisées pour les expériences d'optogénétique, ont été utilisées dans toutes les autres expériences. Cette souche mixte a été utilisée pour répondre au second et au troisième objectif afin d'obtenir des résultats comparables.

Les animaux ont été hébergés au sein de la plateforme AnimEx à la Faculté de Pharmacie de Châtenay-Malabry, et maintenus dans des conditions standards (température de 22 ± 1 °C avec un cycle jour/nuit de 12h /12h non inversé, avec eau de boisson et nourriture accessibles *ad libitum*).

I.2 *Souris tissus-spécifiques Nestine-CreERT2/Chr2-YFP et Nestine-CreERT2/Arch-GFP pour l'étude d'optogénétique*

I.2.1 Génération des lignées

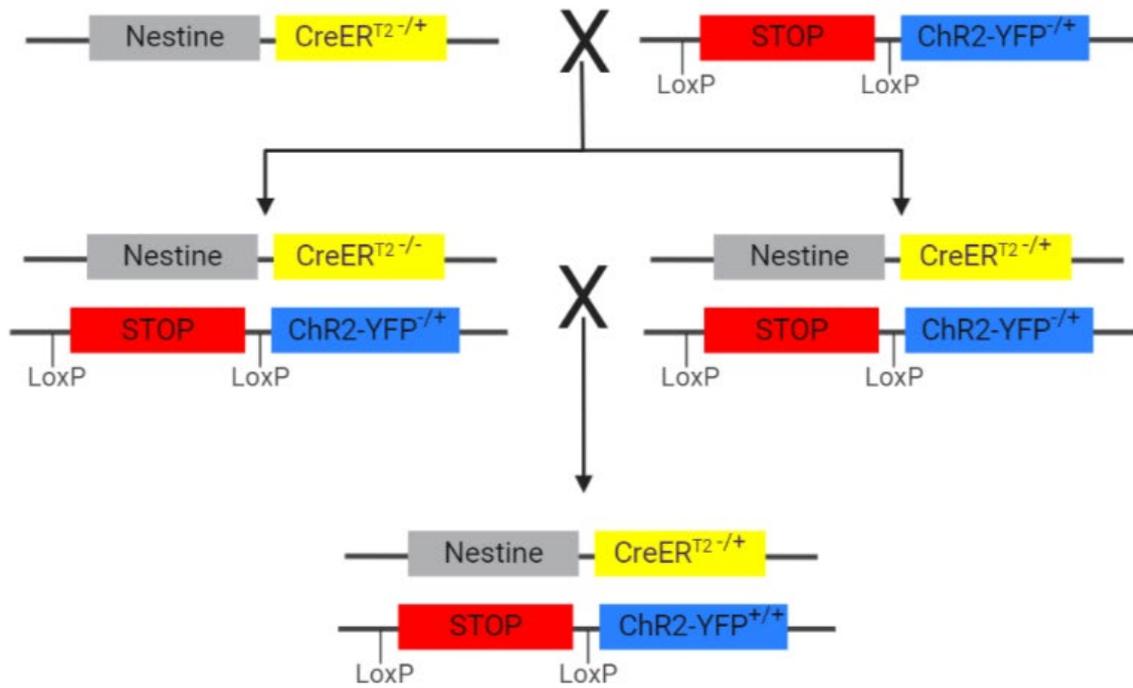
La lignée de **souris Nestine-CreERT²**, créée par l'équipe du Pr René Hen de l'Université de Columbia, New York, USA (Dranovsky & Hen, 2006) a été transférée à l'animalerie AnimEx à la Faculté de Pharmacie. L'enzyme Cre (*cyclization recombination*) est une recombinase permettant de retirer de l'ADN une séquence nucléotidique encadrée de 2 séquences loxP (sites de 34 paires de base). Pour permettre le contrôle spatial de l'expression de Cre, la région promotrice Nestine est insérée dans la construction génétique,

pour l'exprimer spécifiquement dans les cellules souches neurales (Dranovsky & Hen, 2006). L'enzyme a été fusionnée à une forme mutée du récepteur humain aux œstrogènes (ER^{T2}) afin d'obtenir la protéine fusion CreER^{T2}, conférant à ce système l'avantage d'être inductible dans le temps après administration de 2 mg par jour de tamoxifène durant 5 jours (Sahay et al., 2011). Ainsi, la mutation n'est donc pas exprimée à la naissance des animaux, mais est induite durant la période propice à l'étude.

Les lignées de **souris ChR2-YFP** et **Arch-GFP**, fournies par l'équipe du Pr René Hen et créées par l'équipe du Dr Zeng (Madisen et al., 2012), ont été transférées à l'animalerie AnimEx à la Faculté de Pharmacie. Ces animaux portent la construction permettant l'expression de la Channelrhodopsine 2 (ChR2) -YFP ou de l'Archaeorhodopsine (Arch) -GFP, avec un codon stop floxé en amont du gène.

Plusieurs croisements successifs sont nécessaires pour obtenir les souris tissus-spécifiques inductibles. Les souris Nestine-CreER^{T2} ont été croisées avec les souris ChR2-YFP ainsi qu'avec les Arch-GFP. Un second croisement a été effectué entre les animaux obtenus afin d'obtenir des souris Nestine-CreER^{T2-/+}/ChR2-YFP^{+/+} et des souris Nestine-CreER^{T2-/+}/Arch-GFP^{+/+} (Figure 11), qui seront mentionnées par la suite Nestine-ChR2 et Nestine-Arch respectivement. Les souris doivent être hétérozygotes pour le gène de la protéine fusion CreER^{T2} afin d'éviter une hyper expression de la recombinaise Cre qui induirait des délétions ectopiques (Sun et al., 2014); le gène de l'opsine doit être présent à l'état homozygote afin d'assurer l'expression de l'opsine. Les autres souris nées de ce croisement et n'exprimant pas le génotype ci-dessus ont été considérées comme sauvages (WT, *Wild Type*) et utilisées comme contrôles. L'obtention des souris Nestine-ChR2 et Nestine-Arch est donc laborieuse du fait de l'obtention de nombreux animaux contrôles par ces croisements.

Nestine-ChR2-YFP



Nestine-Arch-GFP

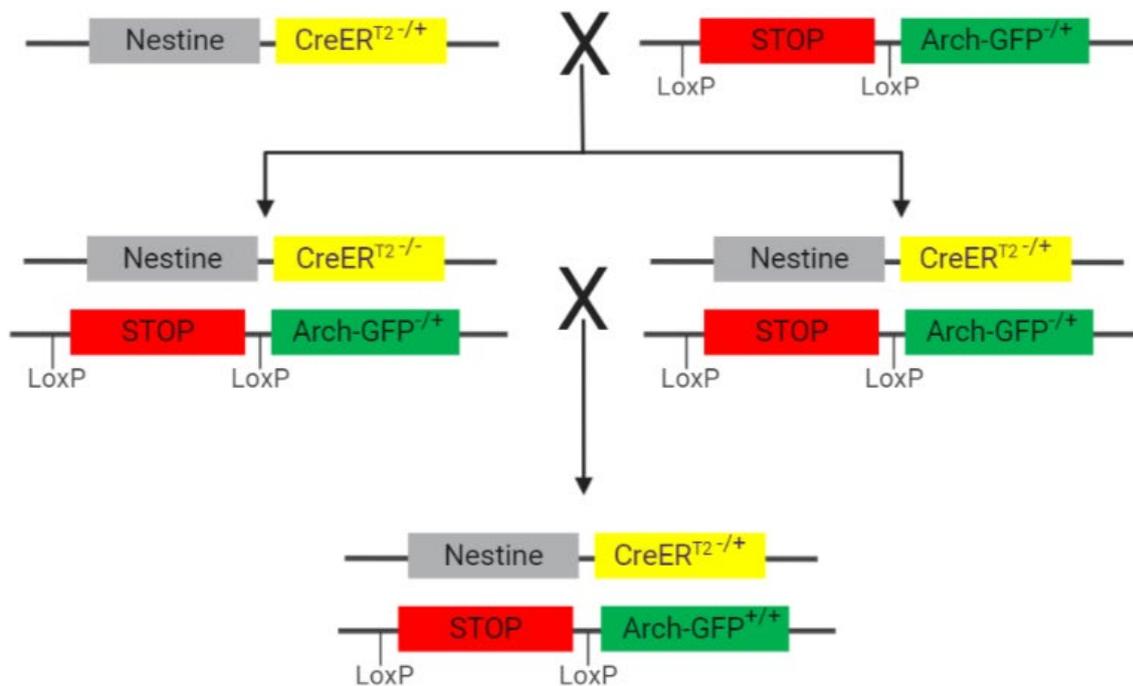


Figure 11 – Croisements nécessaires pour l’obtention des souris Nestine-CreERT2^{+/+}/ChR2-YFP^{+/+} et Nestine-CreERT2^{-/-}/ Arch-GFP^{+/+}. Seules les souris avec un génotype hétérozygote pour CreERT2 et homozygote pour le gène de l’opsine sont utilisées pour stimuler ou inhiber les jeunes neurones par optogénétique. Les souris n’exprimant pas CreERT2 ou seulement hétérozygote pour le gène ou l’opsine ou bien n’exprimant pas le gène de l’opsine sont considérées comme sauvages.

Ainsi, chez les souris générées, l'excision du codon stop chez les souris Nestine-CreER^{T2}/ChR2-GFP permettra l'expression spécifiquement dans les cellules souches neurales de ChR2, canal sodique sensible à la lumière d'une longueur d'onde de 470 nm. L'entrée d'ions sodium après l'ouverture de ce canal ionique par la lumière génère alors une dépolarisation de la cellule et ainsi une stimulation de l'activité électrique de celle-ci. Le couplage avec une protéine fluorescente jaune (*Yellow Fluorescent Protein*, YFP) permettra la mise en évidence histologique de l'expression de l'opsine. L'excision du codon stop chez les souris Nestine-CreER^{T2}/Arch-GFP permettra l'expression spécifiquement dans les cellules souches neurales de Arch, pompe à protons sensible à la lumière à 565 nm. L'activation de cette pompe par la lumière induit la sortie de protons et génère alors une hyperpolarisation de la cellule, conduisant à une inhibition de celle-ci. Le couplage avec une protéine fluorescente verte (*Green Fluorescent Protein*, GFP) permettra la mise en évidence histologique de l'expression de l'opsine. Ces différentes lignées de souris ont été maintenues par nos soins dans des conditions standards à la plateforme AnimEx.

I.2.2 Induction de l'expression de l'opsine

I.2.2.a Préparation du tamoxifène

Le tamoxifène (Sigma-Aldrich) a été administré par voie intrapéritonéale, une fois par jour pendant 5 jours consécutifs. Chaque souris recevra une dose totale de 10 mg (Sahay et al., 2011). Une solution concentrée à 10 mg/mL a été préparée par dilution du tamoxifène dans de l'éthanol 100%, puis dissous dans de l'huile de maïs (en proportion 10%/90% respectivement). La solution obtenue est ensuite agitée pendant 5 minutes, puis laissée à 37 °C durant environ 10 minutes pour faire disparaître les bulles. Cette solution finale est conservée à 4 °C et utilisée pour tous les jours d'injection. Chaque animal reçoit une injection quotidienne de 200 µL indépendamment de son poids (Sahay et al., 2011).

I.2.2.b Mécanisme moléculaire de l'expression spécifique de l'opsine

Les souris Nestine-ChR2 et les souris Nestine-Arch permettent respectivement l'expression de ChR2-YFP et l'expression de Arch-GFP de manière tissu-spécifique dans les jeunes neurones issus de la neurogenèse, au temps voulu. La protéine de fusion CreER^{T2} est exprimée dans le cytoplasme des cellules qui expriment Nestine, et elle ne peut pas rentrer dans le noyau. Ce n'est qu'après administration du tamoxifène (antagoniste des récepteurs aux œstrogènes) et après sa liaison à la forme mutée du récepteur à l'œstrogène que le complexe

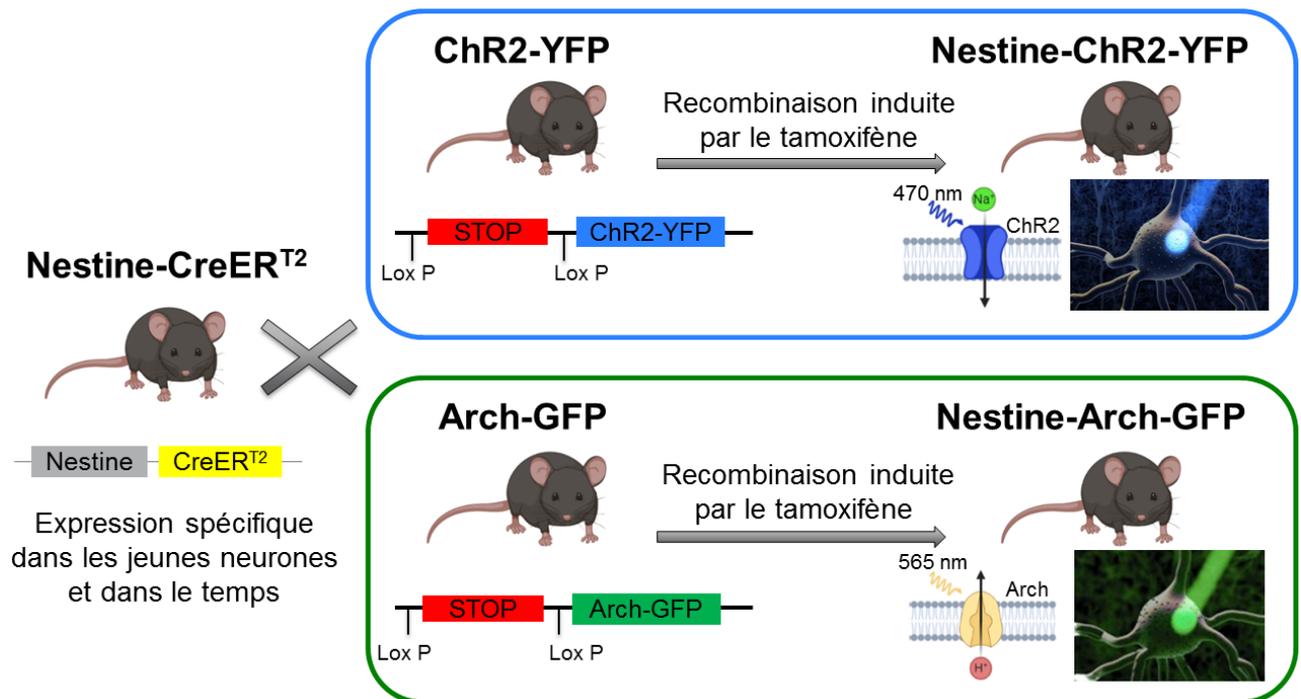


Figure 13 – Schéma récapitulatif de l'obtention des souris tissus-spécifiques pour les expériences de stimulation (Nestine-CreERT2/ChR2-YFP) ou d'inhibition (Nestine-CreERT2/Arch-GFP) optogénétique.

1.2.3 Génotypage des animaux

Le génotypage des souris mutées a été réalisé grâce à la technique d'amplification en chaîne par polymérase (*Polymerase Chain Reaction*, PCR), après extraction de l'ADN des animaux.

Des fragments de queues des souris ont été prélevés et ont été digérés toute une nuit à 55 °C dans un tampon de lyse (Viagen), auquel de la protéinase K à 20 mg/mL a été ajoutée. Le lendemain, les échantillons de queues ont été placés à 90 °C afin d'arrêter la digestion. Ils ont ensuite été centrifugés pendant 5 minutes à 5000 tours/min afin de séparer les digestats de l'ADN.

Les gènes d'intérêt ont été amplifiés *in vitro* à partir de l'ADN extrait des souris par PCR, afin d'en produire une quantité détectable. Pour cela, 2 µL d'ADN et 24 µL d'amorces du gène souhaité ont été ajoutés dans des tubes à billes « Ready-to-Go PCR beads » (General Electric Healthcare) contenant le mélange de désoxyribonucléotides et d'ADN polymérase Taq recombinante. Les amorces utilisées pour l'amplification de ChR2, Arch et de Cre sont précisées dans le tableau 4 :

Tableau 4 – Descriptif des amorces utilisées en PCR pour le géotypage des souris Nestine-CreER^{T2}/Arch-GFP

Nom	Séquence	Taille	PM (g/mol)	Tm (°C)
Cre up	AAT GCT TCT GTC CGT TTG C	19	5761	53,8
Cre down	TAG CGC CGT AAA TCA ATC G	19	5797	52,8
ChR2/Arch RR711 WT-F	GCA CTT GCT CTC CCA AA	17	6013	56,3
ChR2/Arch RR712 CAG-R	GGG CGT ACT TGG CAT A	16	6188	55,0
ChR2/Arch RR713 WT-R	CTT TAA GCC TGC CCA GA	17	6086	54,8

La réaction débute par une étape de dénaturation de l'ADN et se poursuit plusieurs cycles d'amplification. Une extension finale a ensuite lieu. Les caractéristiques des différentes étapes sont présentées dans le tableau 5 :

Tableau 5 – Programmes PCR des gènes à amplifier

Gène	ChR2/Arch		Cre	
	Durée (s)	Température (°C)	Durée (s)	Température (°C)
Dénaturation	120	95	60	95
Hybridation	30*(30, 30, 60)	95, 60, 72	3*(15, 15, 45)	95, 64, 72
Elongation	300	72	3*15	95

Après la PCR, les échantillons ont été séparés par migration électrophorétique en gel d'agarose à 2 % immergé dans un tampon de Tris Borate + Bromure d'éthidium (BET). Trois µL de tampon de charge ont été ajoutés dans chaque tube, et après vortex et centrifugation, 15 µL de chaque échantillon ont été déposés dans les puits du gel. Le gel a ensuite été soumis à un champ électrique (90 V pendant environ 1 heure), permettant la migration des fragments d'ADN chargés négativement et leur séparation selon leur poids moléculaire. Leur coloration par le bromure d'éthidium permet de mettre en évidence leur migration à la lumière ultra-violette, et ainsi de révéler le génotype de l'animal (Figure 14).

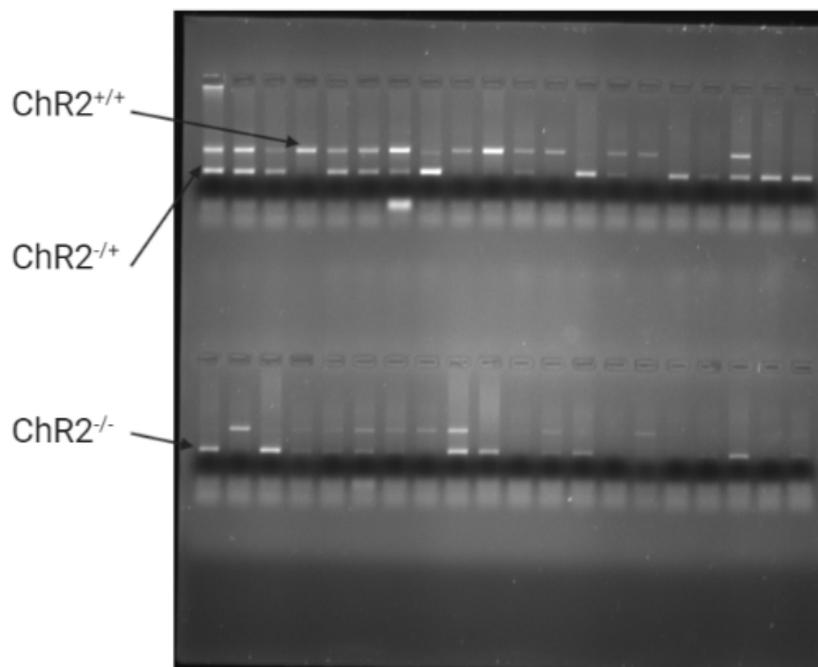


Figure 14 – Illustration d’une migration électrophorétique d’échantillons après l’amplification du gène ChR2 par PCR. Les animaux hétérozygotes pour le gène de l’opsine (ChR2^{+/-}) présentent 2 bandes. Les échantillons des animaux avec le gène de l’opsine à l’état homozygote (ChR2^{+/+}) présentent seulement 1 bande, plus proche du puit d’inclusion, du fait de la migration plus lente du fragment d’ADN de taille plus élevée (495 pb). Les animaux ne possédant pas le gène de l’opsine présentent uniquement 1 bande, à une distance plus importante du puit d’inclusion, du fait de la plus petite taille du fragment d’ADN (252 pb).

II. Traitements pharmacologiques

La fluoxétine (Biotrend) a été administrée aux animaux après solubilisation dans l’eau de boisson, à la concentration de 160 mg/L, afin de traiter les animaux à 18 mg/kg par jour. Cette dose a été choisie d’après l’étude de Dulawa qui indique qu’il s’agit d’une dose efficace qui correspond à une exposition comprise dans la marge thérapeutique chez l’homme (Dulawa et al., 2004).

La corticostérone (Sigma-Aldrich) a été administrée aux animaux dans l’eau de boisson, à la concentration de 35 mg/L, afin de traiter les animaux à 5 mg/kg par jour. Cette dose correspond à la dose efficace utilisée au laboratoire afin d’induire un modèle d’anxiété/dépression (David et al., 2009; Mendez-David et al., 2014). La corticostérone est tout d’abord dissoute dans une solution d’hydroxypropyl- β -cyclodextrine 20% (Roquette), à un volume de 2,25% du volume total désiré. Une fois la corticostérone bien dissoute, cette solution est mélangée avec de l’eau de boisson qui constituera 97,65% du volume total. La corticostérone, se dégradant rapidement, a été donnée dans des biberons opaques changés 2 fois par semaine. Lorsque la fluoxétine est administrée de façon concomitante, la fluoxétine est ajoutée dans cette solution de corticostérone.

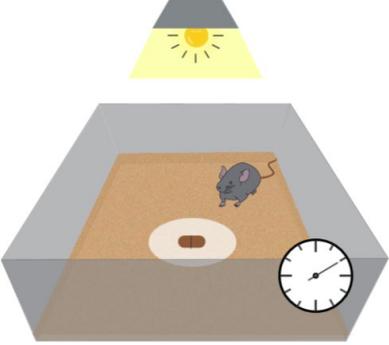
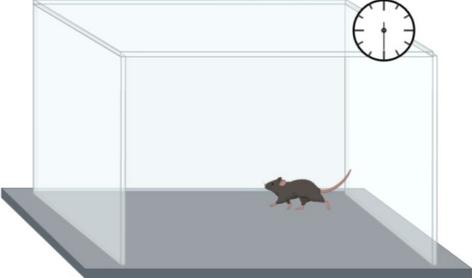
Le Ro25-6981 (Sigma-Aldrich) a été administré localement et bilatéralement dans les GD ventraux aux animaux à une dose de 2 µg/GD ventral. Cette dose a été choisie d’après l’étude de Davies (Davies et al., 2017). Le Ro25-6981 est dissous afin d’obtenir une solution concentrée à 5 µg/µL. Il est tout d’abord dissous dans du diméthylsulfoxyde (DMSO), à un volume de 12% du volume total désiré. La solution est longuement agitée jusqu’à dissolution du Ro25-6981, puis elle est mélangée dans une solution de tampon phosphate salin (*Phosphate Buffer Saline*, PBS) 1X à un volume de 88% du volume total désiré.

Une solution d’hydrate de chloral (80 mg/mL, Sigma-Aldrich) a été utilisée comme anesthésique ; et administrée par voie intrapéritonéale à un volume de 5 mL/kg ce qui correspond à une dose de 400 mg/kg.

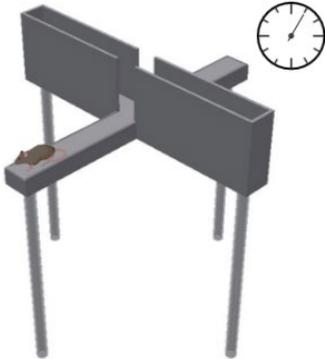
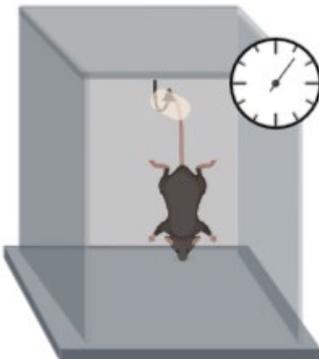
III. Tests comportementaux

Les principaux tests comportementaux prédictifs d’une activité de type antidépresseur ou anxiolytique chez la souris sont présentés dans la box suivante (Box 1).

Box 1 – Principaux tests comportementaux prédictifs d’une activité de type dépressive ou anxiolytique chez la souris

<i>Novelty Suppressed Feeding (NSF) ou test d’alimentation supprimée par la nouveauté (Bodnoff et al., 1988)</i>	<i>Open Field (OF) ou test en champ ouvert (Gentsch et al., 1981)</i>
 <p><u>Principe</u> : évaluer le comportement dépressif et anxieux induit par un stress de sevrage alimentaire en mesurant l’aversion des animaux pour se nourrir dans un nouvel environnement lumineux.</p> <p><u>Durée</u> : 10 minutes.</p> <p><u>Paramètres mesurés</u> : latences pour se nourrir dans le nouvel environnement et dans l’environnement familier, quantité de nourriture consommée dans l’environnement familier.</p> <p><u>Interprétation</u> : une augmentation de la latence à se nourrir dans l’environnement aversif, sans modification de la consommation de nourriture, traduit un phénotype anxio-dépressif.</p>	 <p><u>Principe</u> : évaluer le comportement exploratoire et l’activité locomotrice générale des animaux dans un nouvel environnement.</p> <p><u>Durée</u> : 10 ou 30 minutes.</p> <p><u>Paramètres mesurés</u> : temps passé et nombre d’entrées dans le centre du champ, distance ambulatoire.</p> <p><u>Interprétation</u> : une diminution du temps passé dans le centre de l’arène sans modification de la locomotion traduit un phénotype anxieux.</p>

Box 1 – Principaux tests comportementaux prédictifs d’une activité de type dépressive ou anxiolytique chez la souris (suite)

<i>Elevated Plus Maze (EPM) ou labyrinthe en croix surélevé (Pellow et al., 1985)</i>	<i>Tail Suspension Test (TST) ou test de suspension caudale (Porsolt et al., 1987)</i>
 <p><u>Principe</u> : évaluer le comportement exploratoire des animaux dans un nouvel environnement aversif en hauteur et lumineux.</p> <p><u>Durée</u> : 5 minutes.</p> <p><u>Paramètres mesurés</u> : temps passé et nombre d’entrées dans les bras ouverts, distance ambulatoire.</p> <p><u>Interprétation</u> : une diminution du temps passé dans les bras ouverts sans modification de la locomotion traduit un phénotype anxieux.</p>	 <p><u>Principe</u> : évaluer le comportement dépressif des animaux essayant de se soustraire à une situation inconfortable de suspension par la queue.</p> <p><u>Durée</u> : 6 minutes.</p> <p><u>Paramètres mesurés</u> : durée d’immobilité, puissance des mouvements.</p> <p><u>Interprétation</u> : une augmentation de la durée d’immobilité traduit un phénotype dépressif.</p>
<i>Splash Test (David et al., 2009)</i>	<i>Forced Swim Test (FST) ou test de la nage forcée (Porsolt et al., 1977)</i>
 <p><u>Principe</u> : évaluer le comportement dépressif des animaux se toilettant dans un environnement familier après pulvérisation d’une solution de sucrose à 10%.</p> <p><u>Durée</u> : 5 minutes.</p> <p><u>Paramètres mesurés</u> : latence pour initier le toilettage, durée totale et fréquence des toilettages.</p> <p><u>Interprétation</u> : une diminution de la durée de toilettage traduit un phénotype dépressif.</p>	 <p><u>Principe</u> : évaluer le comportement dépressif des animaux placés dans un récipient rempli avec de l’eau.</p> <p><u>Durée</u> : 6 minutes.</p> <p><u>Paramètre mesuré</u> : durée d’immobilité.</p> <p><u>Interprétation</u> : une augmentation de la durée d’immobilité traduit un phénotype dépressif.</p>

Seuls les tests utilisés durant cette thèse sont décrits en détail ci-dessous.

III.1 *Novelty Suppressed Feeding (NSF)*

Le NSF est un test prédictif d'une activité mixte anxiolytique/antidépresseive des antidépresseurs. Ce test induit une situation de motivation conflictuelle entre l'envie d'aller se nourrir et la peur de s'aventurer au centre de l'enceinte, qui est fortement éclairée (Figure 15). L'animal à jeun depuis 24 heures est placé dans un coin d'une enceinte (55 x 40 x 18 cm), où en son centre fortement éclairé une croquette de nourriture a été posée sur un cercle de papier blanc. Le temps de latence que la souris met pour mordre manifestement la croquette est mesuré. L'animal est ensuite replacé dans sa cage d'origine avec une croquette : on mesure alors le temps de latence et la consommation de nourriture pendant 5 minutes, afin de vérifier que l'appétence des souris n'est pas affectée par le traitement à la fluoxétine. **Le NSF est un test neurogenèse-dépendant, donc hippocampe-dépendant** (David et al., 2009; Surget et al., 2008).

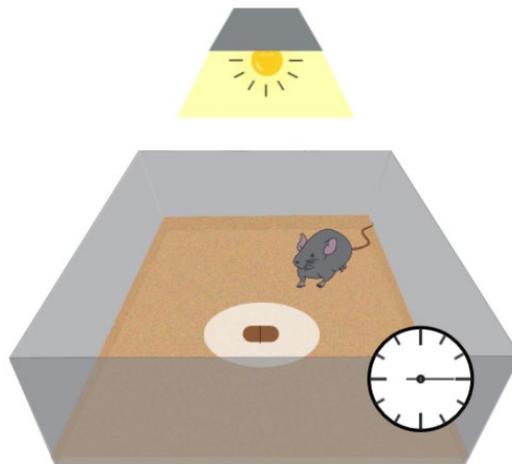


Figure 15 - Novelty Suppressed Feeding. Le NSF est un test prédictif d'une activité mixte anxiolytique/antidépresseive des antidépresseurs, durant lequel la latence pour se nourrir dans ce nouvel environnement est mesuré. Il s'agit d'un test neurogenèse-dépendant.

III.2 *Open Field (OF)*

L'OF est un test prédictif de l'activité anxiolytique des antidépresseurs. L'animal est placé dans une enceinte étrangère en plexiglas (43 x 43 cm). Le nombre d'entrées ainsi que le temps passé dans le centre (32 x 32 cm) sont les paramètres évalués pendant 30 minutes, grâce à un système par infrarouge (Ugo Basile, Stoelting Co) (Figure 16). En général, les animaux présentent un haut degré d'évitement de l'aire centrale, par rapport à la périphérie. L'administration aigue d'un anxiolytique, tel qu'une benzodiazépine, ou l'administration chronique d'un antidépresseur augmentent le nombre d'entrées et le temps passé dans le

centre de l'enceinte. Ce test peut également être utilisé pour une mesure simple de l'activité locomotrice en évaluant les mêmes paramètres pendant les 10 premières minutes.

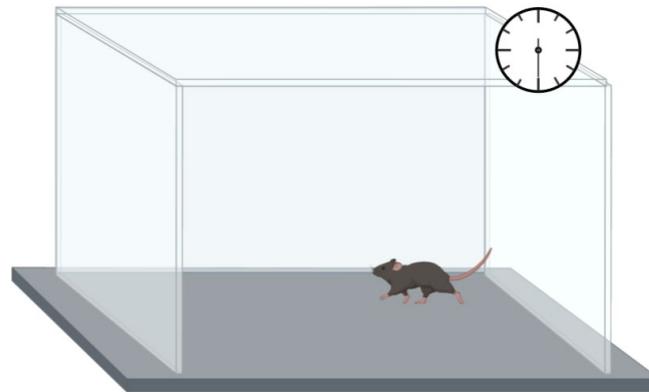


Figure 16 – Open Field. L'OF est un test prédictif de l'activité anxiolytique des antidépresseurs, durant lequel le temps passé et nombre d'entrées dans le centre du champ, ainsi que la distance ambulatoire sont mesurés.

IV. Microdialyse

IV.1 Principe de la technique de microdialyse

Les changements de concentrations de neurotransmetteurs ont été étudiés à l'aide de la technique de microdialyse intracérébrale. La microdialyse est une technique *in vivo* qui repose sur la diffusion passive, permettant chez l'animal éveillé la collecte de molécules endogènes ou exogènes présents dans le milieu extracellulaire du parenchyme de régions cérébrales d'intérêt chez une souris, dans notre cas (Figure 17). La concentration du dialysat collecté représente une fraction de la concentration du milieu extracellulaire, dépendante du rendement de la membrane (Geeraerts et al., 2008 pour revue). Une sonde est implantée par stéréotaxie dans le GD ventral de l'hippocampe chez l'animal anesthésié. Après une journée de récupération de la chirurgie, la sonde est perfusée avec du liquide céphalo-rachidien (LCR) artificiel (NaCl 147 mmol/L ; KCl 3,5 mmol/L ; CaCl₂ 1,26 mmol/L ; MgCl₂ 1 mmol/L ; NaH₂PO₄ 1 mmol/L ; NaHCO₃ 1 mmol/L ; pH 7,4 ± 0,02) qui est en contact avec la membrane semi-perméable. Celle-ci est constituée de cuprophane avec un *cutoff* de 6 kDa, c'est à dire qu'elle permet la libre diffusion de molécules de poids moléculaire inférieur à 6 kDa (Geeraerts et al., 2008 pour revue). Dans nos expériences, 2 mm de membrane seront directement au contact du parenchyme cérébral. Les neurotransmetteurs présents dans le milieu extracellulaire vont diffuser à travers la membrane de dialyse suivant un gradient de concentration et sont collectées à la sortie de la sonde. Cet échange de molécules s'effectue sans mouvement de liquide à travers la membrane, le LCR étant iso-osmotique avec le milieu extracellulaire, ce qui permet au parenchyme de conserver son homéostasie.

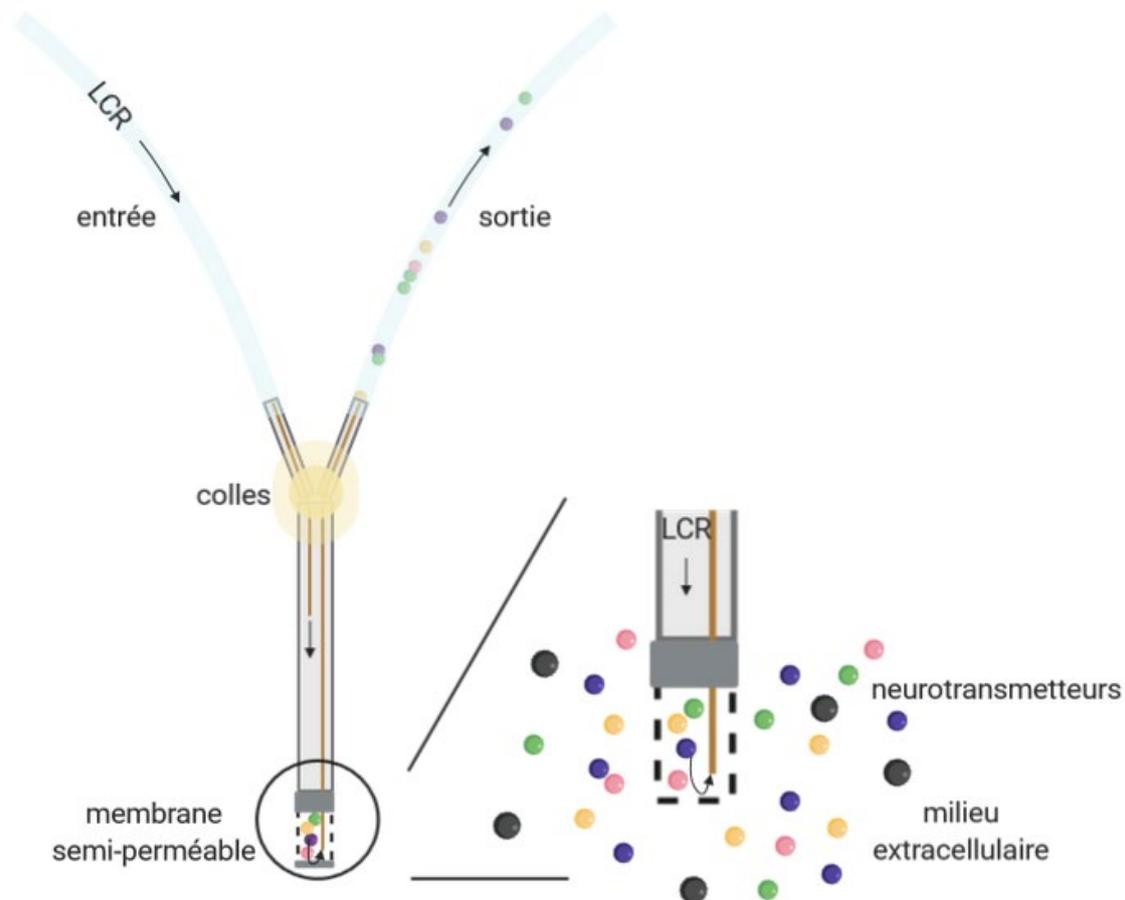
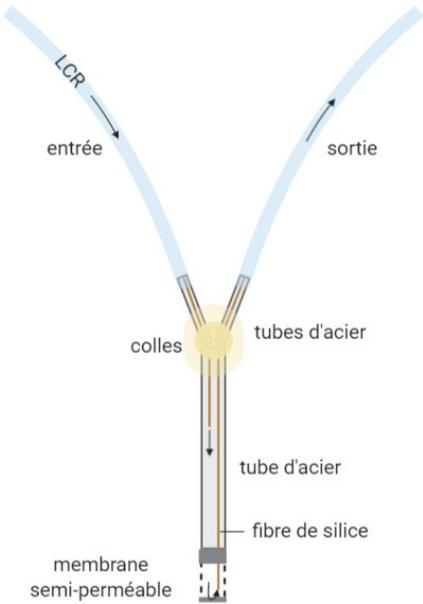


Figure 17 - Illustration d'une sonde de microdialyse. La sonde est perfusée avec du LCR. Au niveau de la membrane semi-perméable, les divers neurotransmetteurs de moins de 6 kDa (représentés en couleur) peuvent traverser, tandis que les autres molécules supérieures à 6 kDa (représentées en noir) ne passent pas. Ainsi, les neurotransmetteurs de moins de 6 kDa présents dans le milieu extracellulaire diffusent passivement à travers la membrane de dialyse suivant un gradient de concentration. Le LCR perfusé étant iso-osmotique avec le milieu extracellulaire, l'échange s'effectue sans mouvement de liquide à travers la membrane. Ces neurotransmetteurs sont ensuite collectés à la sortie de la sonde.

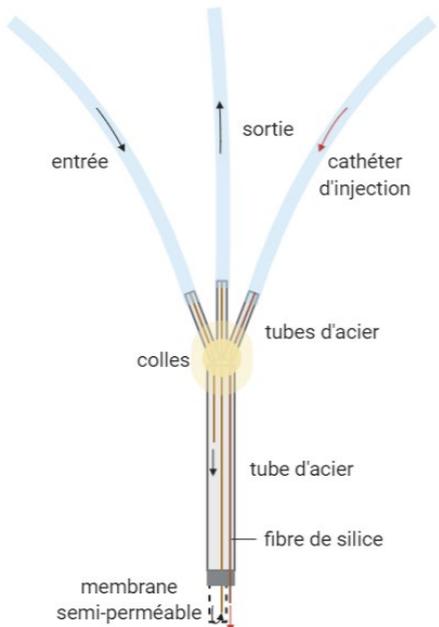
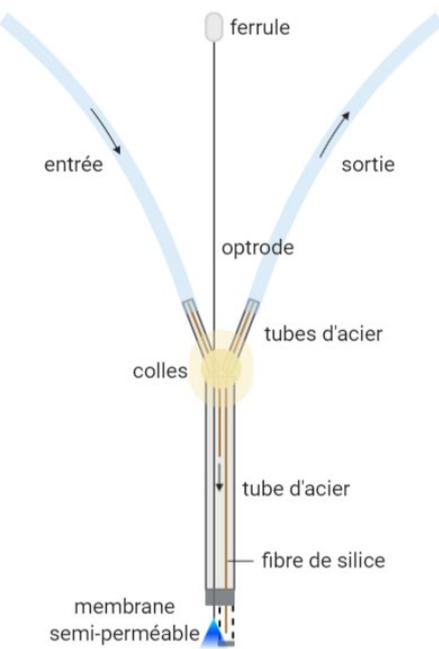
IV.2 Fabrication des sondes de microdialyse

Les sondes de microdialyse ont toutes été fabriquées au laboratoire. Elles sont présentées ci-dessous (Box 2). Toutes ces constructions sont basées sur des sections de tubes d'acier inoxydable qui servent de support à des fibres de silice. Les fibres de silice servent quant à elles soit de support à la membrane de microdialyse soit à l'administration locale de molécules. Ces systèmes peuvent aussi être couplés (Box 2 ligne 3). Enfin ces sondes de microdialyse peuvent être couplées à une optrode dédiée à l'optogénétique.

Box 2 - Les différentes sondes de microdialyse et de fibres d'injection

Type de sonde	Principe/Intérêt
 <p style="text-align: center;">Sonde de microdialyse</p>	<p>Cette technique <i>in vivo</i> repose sur la diffusion passive, permettant chez l'animal éveillé la collecte de molécules présentes dans le milieu extracellulaire du parenchyme de régions cérébrales d'intérêt. Ainsi, les composés de faible poids moléculaires diffusent du compartiment le plus concentré (milieu extracellulaire) vers le compartiment le moins concentré (LCR artificiel de la sonde de microdialyse, étant iso-osmotique au milieu extracellulaire).</p>
 <p style="text-align: center;">Fibre d'injection</p>	<p>L'effet des molécules d'intérêts au niveau d'une région cérébrale précise peut être étudié. L'injection des molécules se fait avec un rendement de 100%.</p>

Box 2 - Les différentes sondes de microdialyse et de fibres d'injection (suite)

Type de sonde	Principe/Intérêt
 <p>Sonde de microdialyse couplée avec une fibre d'injection</p>	<p>Les modifications de neurotransmetteurs peuvent être étudiées simultanément à l'injection des molécules d'intérêts au niveau d'une région cérébrale précise. La diffusion des molécules est indépendante du rendement de la membrane de dialyse.</p>
 <p>Sonde de microdialyse couplée avec une optrode</p>	<p>Les modifications de neurotransmetteurs peuvent être étudiées simultanément à la stimulation ou à l'inhibition d'une population cellulaire spécifique au niveau d'une région cérébrale précise.</p>

IV.3 *Implantation des sondes de microdialyse*

Dans l'étude des changements de neurotransmission induits par la fluoxétine, la zone d'intérêt a été le GD ventral. Les coordonnées stéréotaxiques d'implantation ont été déterminées à partir de l'atlas stéréotaxique du cerveau de souris de Franklin et Paxinos (2007) exprimées en mm, à partir du Bregma : AP - 3,7 ; ML \pm 2,75 ; DV - 4,2 (Figure 18). Les souris ont été anesthésiées à l'aide d'hydrate de chloral (400 mg/kg), puis placées sur un cadre stéréotaxique. Après incision longitudinale de la peau du crâne de façon à bien mettre en évidence le bregma, l'os crânien a été nettoyé avec de l'eau oxygénée (10 volumes). La position de la tête de l'animal doit être dans un plan horizontal, avec une différence des coordonnées dorso-ventrale entre le bregma et le lambda n'excédant pas 0,5 mm. Ensuite, des trépanations ont été effectuées au niveau des zones d'implantation souhaitées pour les 2 sondes, à l'aide d'une fraise dentaire (Dremel). Les sondes, préalablement testées avec de l'eau distillée afin de vérifier leur bon fonctionnement sans résistance, ni fuites ; ont été implantées bilatéralement dans le GD ventral droit et le GD ventral gauche, elles ont été descendues individuellement dans le cerveau de manière lente de façon à laisser le temps au parenchyme de s'adapter à la pression effectuée par la descente de la sonde. Après vérification de l'absence de fuite, elles ont été fixées au crâne avec du ciment dentaire Dentalon plus (Heraeus Kulzer GmbH). Après la chirurgie, les souris ont été placées en cages individuelles.

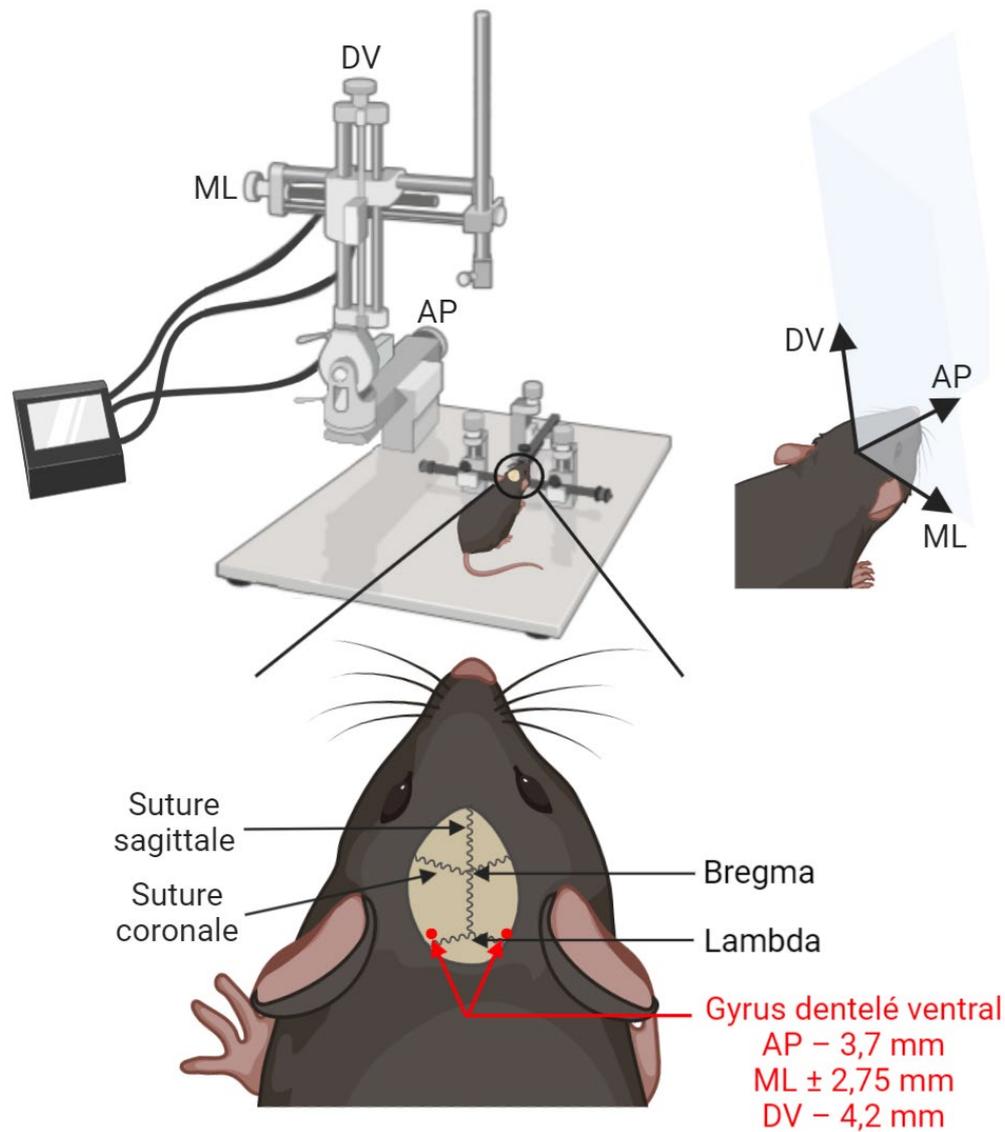


Figure 18 – Implantation des sondes de microdialyse dans le GD ventral

IV.4 Sessions de microdialyse

Les expériences de microdialyse ont débuté le lendemain de la chirurgie. L'entrée des sondes a été reliée à un perfuseur automatique (PHD ULTRA 10 MultiRack, Harvard Apparatus) délivrant le LCR en continu à un débit de $1 \mu\text{L}/\text{min}$. Après 1 heure de stabilisation, la collecte des dialysats peut commencer avec le même débit de LCR de $1 \mu\text{L}/\text{min}$ (Figure 19).

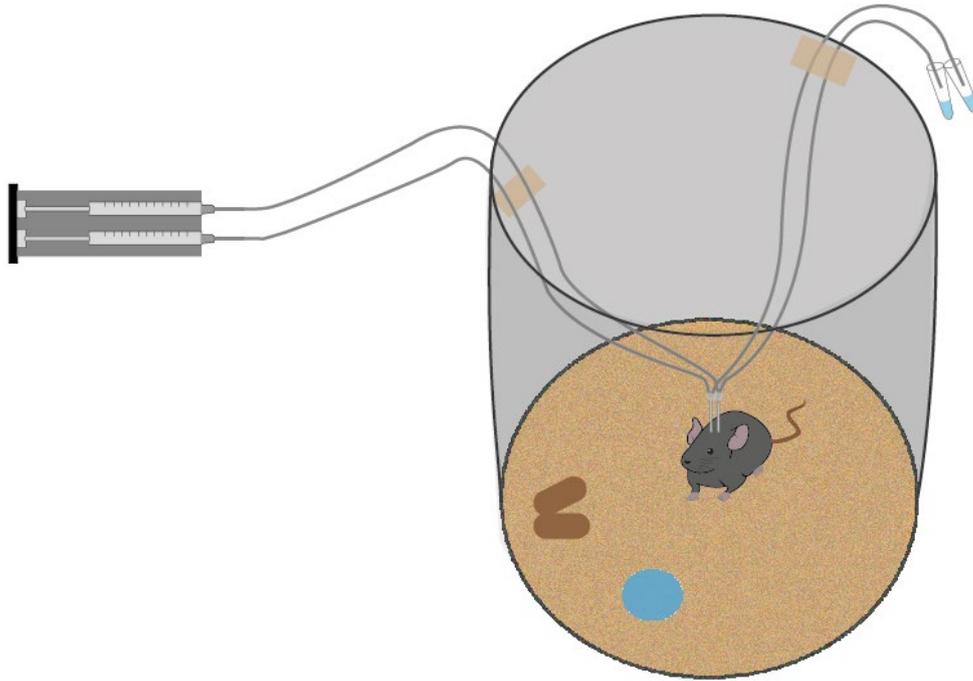


Figure 19 – Collecte de dialysats contenant des neurotransmetteurs par microdialyse *in vivo* chez la souris éveillée

IV.5 Vérification de l'implantation des sondes

L'implantation des sondes a été vérifiée : les cerveaux ont été prélevés, puis des coupes au cryostat de 20 μm d'épaisseur ont été réalisées. Les coupes ont ensuite été colorées au crésyl violet. La coloration a été réalisée par plusieurs bains successifs des coupes : Après une première étape de fixation des tissus dans une solution de paraformaldéhyde à 4 % durant 1 heure, les coupes ont été rincées puis hydratées dans 2 bains d'eau distillée (2X2 minutes), puis elles ont été colorées dans la solution de crésyl violet 0,5% durant 1 minute. Le crésyl violet a été rincé par 3 bains de 10 secondes dans de l'eau distillée, puis les coupes ont été déshydratées avec 5 bains d'éthanol de 70 à 100% durant 30 secondes à 2 minutes. Finalement, les coupes ont été placées dans 2 bains de xylène durant 2 minutes. Les coupes ont ensuite été recouvertes d'une lamelle, montée à l'aide d'Eukitt, dont le xylène constitue le solvant.

IV.6 Dosage de neurotransmetteurs

La sérotonine a été dosée dans 15 μL de dialysat, par HPLC (Chromatographie en phase liquide à haute performance, *High Performance Liquid Chromatography*) avec une colonne *nucléodur* C18 de 4,6 x 75 mm (taille des particules de 3 μm ; Macherey et Nagel) couplée à un détecteur ampérométrique (VT03; Antec Leyden, The Netherlands) [limite de sensibilité pour 5-HT \approx 0,5 fmol/échantillon (signal-to-noise ratio = 2)]. La phase mobile est composée

de : NaH₂PO₄.2H₂O (107 mM) ; EDTA (0,14 mM) ; acide octanosulfonique (C₈H₁₇NaO₃S 0,77 mM) ; méthanol 350 mL ; eau ultrapure 2000 mL ; avec un pH ajusté à 4,1. La quantité de 5-HT dans chaque échantillon a été calculée en mesurant les hauteurs de pic par rapport à une gamme standard.

Le GABA et le glutamate ont été dosés dans 5 µL de dialysat par la technique d'HPLC couplée à la spectrométrie de masse (SM) en tandem. La séparation des composés est effectuée grâce à une colonne de type Nucleoshell HILIC, EC 100/2 (taille des particules de 2,7 µm ; Macherey-Nagel), en utilisant un gradient d'élution avec une phase mobile composée d'une phase aqueuse (formate d'ammonium 25 mM, pH 3,5) et d'une phase organique (acétonitrile). La détection et la quantification simultanées du GABA et du glutamate sont réalisées par un SM triple quadrupole (Quattro Ultima, Waters, France). Au préalable, une gamme étalon a été réalisée, dans laquelle des standards internes Glu-d5 et GABA-d6 dont les concentrations sont connues ont été ajoutés. Les limites de quantification pour le glutamate sont ≈ 42 fmol/échantillon et pour GABA ≈ 30 fmol/échantillon (signal-to-noise ratio = 10)] (Defaix et al., 2018). Cette étape a été réalisée au sein de la plateforme SAMM de l'IPSIT.

V. Administration locale de Ro25-6981

V.1 *Fabrication des fibres d'injection et des sondes de microdialyse couplées avec une fibre d'injection*

Les cathéters d'injections sont seulement constitués d'une fibre de silice emboîtée dans un tube en acier inoxydable. Des sondes de microdialyse couplées avec une fibre d'injection ont été réalisées. Les sondes ont été testées afin de vérifier leur bon fonctionnement sans résistance ni fuites ; les fibres d'injection ont également été testées puis elles ont été vidées, préalablement avant l'implantation de ces sondes.

V.2 *Injection locale de Ro25-6981 dans le gyrus dentelé ventral*

Le Ro25-6981, antagoniste sélectif de la sous-unité GluN2B du récepteur NMDA, a été administré de façon bilatérale à la dose 5 µg/µL dans le GD ventral à l'aide d'une fibre d'injection couplée ou non à une sonde de microdialyse suivant les expériences. L'injection de 2 µg est réalisée en 2 minutes dans 0,4 µL, en bilatéral, avec un débit d'injection de 0,2 µL/min à l'aide d'un perfuseur automatique (Dual Syringe Pump 11 Pico Plus Elite, Harvard Apparatus).

V.3 *Implantation des fibres d'injection*

Les coordonnées stéréotaxiques d'implantation ont été déterminées à partir de l'atlas stéréotaxique du cerveau de souris de Franklin et Paxinos (2007) exprimées en mm, à partir du Bregma : AP - 3,7 ; ML \pm 2,75 ; DV - 3,2. Seule la coordonnée en DV diffère par rapport à l'implantation de sondes de microdialyse, de façon à s'assurer de la diffusion de Ro25-6981 dans les parties sous-jacentes à l'extrémité de la fibre de silice. Les souris ont été anesthésiées à l'aide d'hydrate de chloral (400 mg/kg), puis placées sur un cadre stéréotaxique comme décrit au paragraphe IV.3. Les fibres ont été implantées bilatéralement dans le GD ventral droit et le GD ventral gauche, ils ont été descendus individuellement dans le cerveau de manière lente. Ils ont été fixés au crâne avec du ciment dentaire Dentalon plus (Heraeus Kulzer GmbH). Après la chirurgie, les souris ont été replacées dans leur cage d'origine avec les autres souris. Les souris ont eu 4 à 7 jours de récupération avant le test du NSF et l'administration locale.

V.4 *Injection locale de Ro25-6981 et NSF chez le même animal*

Au moins 3 jours après la chirurgie, les animaux ont été mis à jeûn. Le lendemain, les cathéters d'injection ont été connectés à un perfuseur automatique (Dual Syringe Pump 11 Pico Plus Elite, Harvard Apparatus). L'injection de Ro25-6981 a été effectuée, et 30 minutes plus tard, les animaux ont été placés dans l'enceinte du NSF (Figure 20). Le NSF a été réalisé comme décrit précédemment (voir paragraphe III.1)

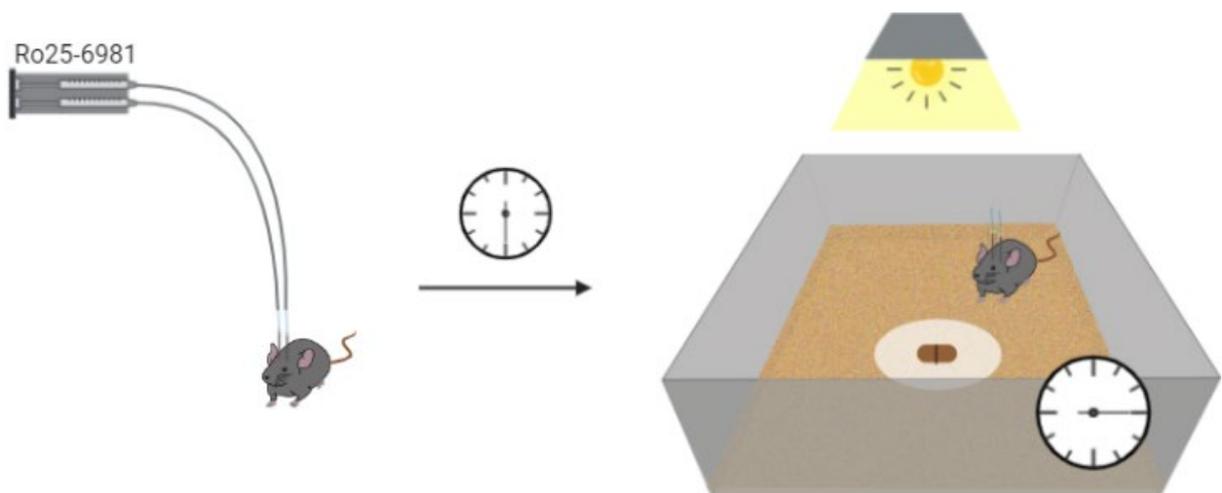


Figure 20 - Réalisation du NSF à la suite de l'injection locale de Ro25-6981

V.5 *Implantation des sondes de microdialyse couplée avec une fibre d'injection*

Les sondes de microdialyse couplées avec une fibre d'injection ont été implantées dans le GD, de la même manière que précédemment (voir paragraphe IV.3). A la fin de l'expérience, les souris ont été placées en cages individuelles.

V.6 *Sessions de microdialyse couplée à l'injection locale de Ro25-6981*

Les expériences de microdialyse ont débuté le lendemain de la chirurgie. L'entrée des sondes a été reliée à un perfuseur automatique (PHD ULTRA 10 MultiRack, Harvard Apparatus) délivrant le LCR en continu. Après 1 heure de stabilisation à un débit de 1 $\mu\text{L}/\text{min}$, la perfusion de LCR, au même débit a permis de recueillir des dialysats toutes les 15 minutes. Lorsque 8 dialysats basaux ont été prélevés, les cathéters d'injection ont été connectés à un second perfuseur automatique (Dual Syringe Pump 11 Pico Plus Elite, Harvard Apparatus). Une fois l'injection locale de Ro25-6981 réalisée (Figure 21), les cathéters d'injection ont été déconnectés, et le recueil des dialysats toutes les 15 minutes a ensuite été poursuivi.

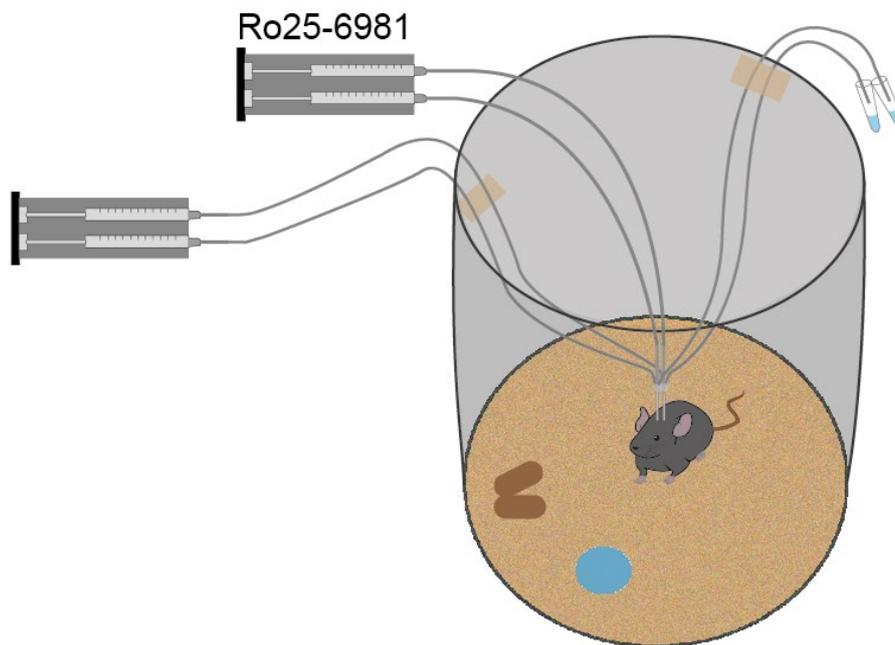


Figure 21 – Réalisation de l'injection locale de Ro25-6981 à l'aide des sondes de microdialyse couplées avec une fibre d'injection

VI. Mise en évidence du niveau d'expression de GluN2B dans le gyrus dentelé

La mise en évidence du niveau d'expression dans le GD de GRIN2B, gène de GluN2B, a été réalisée par RT-PCR quantitative. L'ARNm a tout d'abord été extrait à partir des GD. Plus GRIN2B a été exprimé, plus le nombre de molécules d'ARN synthétisées sera important. La quantité et la qualité de l'ARN extrait ont été vérifiées. L'ARN a ensuite été rétrotranscrit (RT) en ADN complémentaire (ADNc). Enfin, une PCR quantitative a été réalisée.

VI.1 *Extraction de l'ARNm à partir de tissus cérébraux*

Les ARNm ont été extraits à partir des 2 GD des souris conservés à -80°C . Ils ont été mis avec $250\ \mu\text{L}$ de réactif d'extraction d'ARN RiboZol (VWR), afin de dénaturer les protéines, et lyser les membranes, tout en protégeant l'ARN. Les tissus ont tout d'abord été homogénéisés mécaniquement par pipetages dans un cône de $1000\ \mu\text{L}$ (Figure 22).

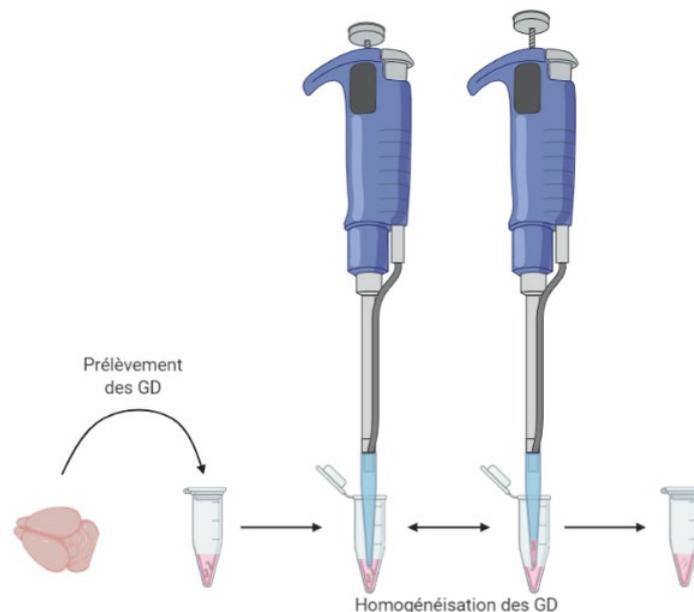


Figure 22 – Homogénéisation mécanique des GD par pipetage

Puis, la séparation de l'ADN et de l'ARN a été réalisée en phase liquide, par ajout de $70\ \mu\text{L}$ de chloroforme. Les échantillons ont ensuite été agités vigoureusement pendant 15 secondes, puis après 3 minutes d'incubation, les échantillons ont ensuite été centrifugés pendant 15 minutes à $10000\ \text{g}$ et à 4°C . Suite à cette centrifugation, la phase aqueuse supérieure contenant l'ARN a été prélevée et mise dans un nouveau tube, auquel $0,5\ \mu\text{L}$ de glycogène à $20\ \mu\text{g}/\mu\text{L}$ a été ajouté. Ce glycogène constitue un véhicule inerte afin d'accroître

le rendement de la précipitation qui a été réalisée par ajout de 125 μL d'isopropanol. Les échantillons ont été agités très fort à la main pendant 15 secondes, puis sont placés toute une nuit à $-20\text{ }^\circ\text{C}$ pour améliorer le rendement. Le lendemain, les échantillons ont été centrifugés pendant 15 minutes à 12000 g à $4\text{ }^\circ\text{C}$. L'ARN adhère alors dans le fond du tube, visible en un culot. Le surnageant d'isopropanol est aspiré, puis le culot a été lavé par 2 lavages avec 200 μL d'éthanol 75% et une centrifugation de 5 minutes à 12000 g à $4\text{ }^\circ\text{C}$. Finalement, l'éthanol a été complètement aspiré, et les culots ont séchés durant 15-20 minutes à température ambiante. Les culots ont alors été dissous par l'ajout de 10 μL d'eau ultrapure sans ARN, et laissés sur la glace durant 1 heure afin de favoriser la réhydratation de l'ARN. Ces échantillons d'ARN ont été conservés à $-80\text{ }^\circ\text{C}$.

VI.2 *Contrôle qualité de l'ARNm*

Le dosage de la quantité d'ARN extraite a été réalisé par spectrophotométrie par le NanoDrop 2000 (ThermoFisher Scientific) en déposant 1 μL d'ARN. Par la suite, l'intégrité des ARN a été évaluée à l'aide du kit *RNA 6000 Nano LabChip* sur Bioanalyser 2100 (Agilent), par électrophorèse capillaire sur puce. Les électrodes du Bioanalyser 2100 ont tout d'abord été nettoyées à l'aide de RNaseZAP durant 1 minute, suivi par un rinçage à l'eau exempte d'ARN durant 10 secondes, et enfin elles ont séché à l'air libre durant 10 secondes. Les réactifs du kit de contrôle qualité doivent être, au préalable, équilibrés à température ambiante pendant 30 minutes. La matrice du gel fournie avec le kit est préparée par centrifugation pendant 10 minutes à 1500 g à travers un filtre rotatif. Pour la préparation du gel pour la puce à 16 puits (Figure 23), 65 μL de cette matrice du gel sont mélangés à 1 μL du concentré de teinture bleu fourni dans le kit, après agitation au préalable de cette teinture durant 10 secondes. Ce mélange a été bien agité puis centrifugé pendant 10 minutes à 13000 g. L'échelle de poids moléculaire a été dénaturée par un chauffage à $70\text{ }^\circ\text{C}$ durant 2 minutes. Les échantillons d'ARN n'ont pas été dénaturés, du fait du faible volume disponible et du phénomène d'évaporation qui se produit lors du chauffage. L'échelle et les échantillons ont ensuite été réfrigérés sur glace. La puce a ensuite été préparée à l'aide d'une station d'amorçage. Après centrifugation, 9 μL du gel contenant la teinture ont été déposés dans le puit prévu, puis le gel est réparti sur l'ensemble de la puce grâce à l'application d'une pression reproductible à l'aide d'une seringue maintenue par un clip durant 30 secondes. Ensuite, 9 μL du gel ont à nouveau été déposés dans 2 autres puits prévus pour le gel, qui ont constitués des réserves de gel pour l'analyse par le Bioanalyser 2100. Le marqueur du kit a ensuite été déposé (5 μL) dans chacun des 12 puits prévus pour les échantillons, ainsi que

dans le puit prévu pour l'échelle. Finalement, l'échelle et les échantillons ont été déposés (1 μ L/puit). La puce a été vortexée durant 1 minute, pendant laquelle les électrodes du Bioanalyser 2100 ont été à nouveau rincées avec de l'eau exempte d'ARN. Après séchage des électrodes durant 10 secondes, la puce a été placée dans le Bioanalyser 2100. Le Bioanalyser 2100 a alors réalisé les séparations de l'ARNm par électrophorèse capillaire, permettant la visualisation des fragments d'ARN 18S et 28S, puis un facteur d'intégrité de l'ARN (RIN, *RNA Integrity Number*) a été obtenu pour chaque échantillon. Un RIN supérieur à 7 indique que l'ARN est de qualité satisfaisante afin d'obtenir des résultats exploitables pour la suite.

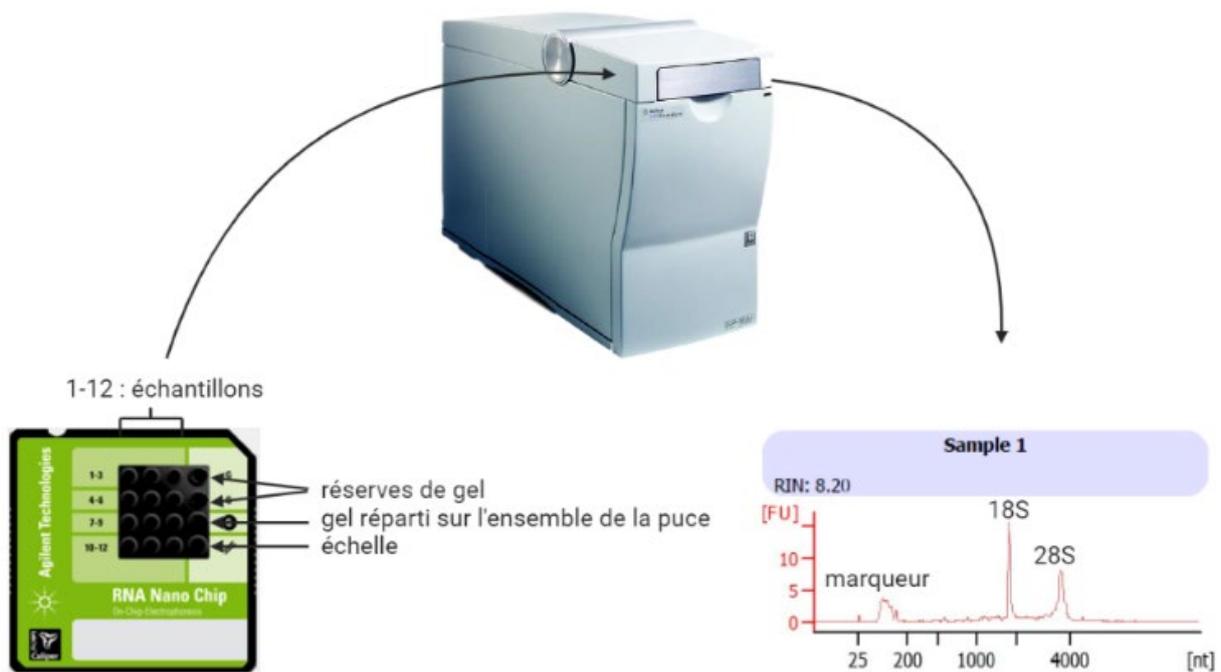


Figure 23 – Contrôle qualité de l'ARNm extrait par électrophorèse capillaire sur puce RNA Nano Chip : Mesure du RIN

VI.3 *Transcription inverse des ARNm*

La transcription inverse de l'ARN en ADNc a été réalisée avec le kit pour RT-PCR quantitative *Maxima First Strand cDNA Synthesis* (ThermoFisher Scientific). Cette étape a été réalisée sur glace. Le mélange de réaction et la transcriptase inverse (*Maxima Reverse Transcriptase*) fournis avec le kit ont été mélangés, puis 500 ng d'ARN ont été ajoutés. Après une agitation délicate et une centrifugation des échantillons, ils ont été incubés suivant le programme Maxima RT (10 minutes à 25 °C, suivi par 15 minutes à 50 °C et enfin 5 minutes à 85 °C). Les échantillons d'ADNc obtenus ont été dilués au 1/10, puis ils ont été conservés à -20 °C.

VI.4 Amplification de l'ADN par PCR quantitative

L'amplification de l'ADN par PCR quantitative en temps réel a été réalisée par le CFX Connect Real-Time PCR Detection System (Bio-Rad), mesurant la fluorescence émise à chaque cycle par le SYBR Green au niveau des 96 puits de la plaque. Le mélange réactionnel nécessaire pour l'amplification, la Taq polymérase ainsi que l'intercalant SYBR Green (Invitrogen) sont déposés dans chaque puit. Les amorces des gènes d'intérêt sont ajoutées, puis l'ADNc est ajouté. Pour chaque échantillon, l'expression de 2 gènes de référence, de l'actine et de la glycéraldéhyde-3-phosphate déshydrogénase (GAPDH), ainsi que celle de GRIN2B ont été évaluées. L'évaluation de l'expression d'un gène a été réalisée de façon quadruple, avec 4 puits par gène, pour chaque échantillon. Les plaques placées dans le CFX ont été soumises à 40 cycles de PCR (dont les paramètres sont basés sur les recommandations du fournisseur). A chaque fin de cycle d'amplification, la quantité d'ADN est mesurée grâce au niveau de fluorescence correspondant à l'incorporation de l'intercalant SYBR Green. Le suivi de cette fluorescence a permis l'obtention d'une valeur d'un cycle de quantification (Cq) durant lequel la quantité d'ADN amplifiée double à chaque cycle : En coordonnées logarithmiques, cette phase est représentée par une droite (Figure 24). Plus le Cq est faible, plus le gène est fortement exprimé, ce qui indique que la quantité initiale d'ADNc présente était plus importante.

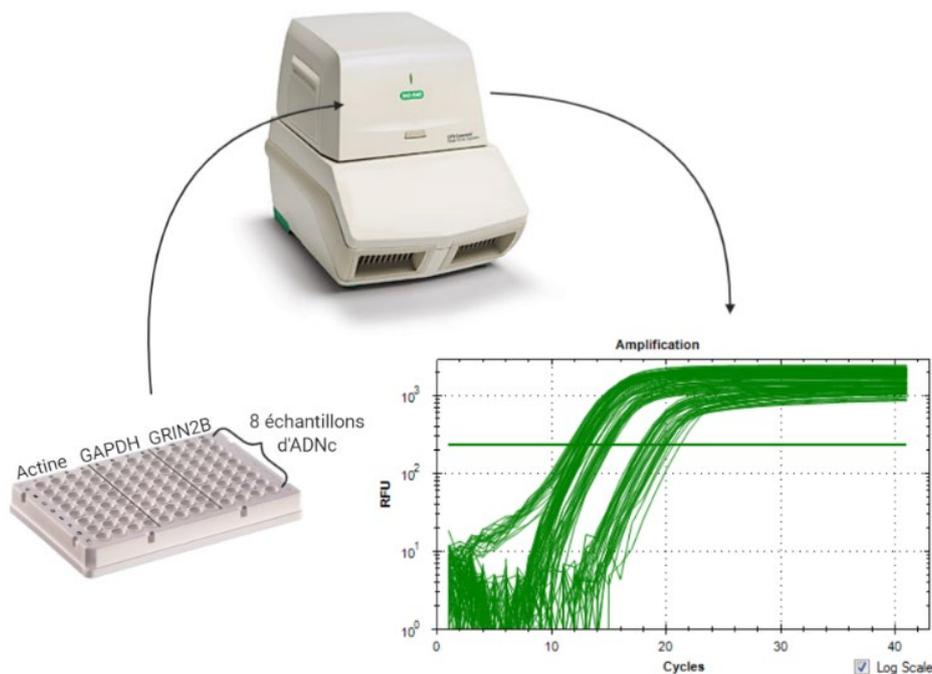


Figure 24 – Amplification de l'ADNc par PCR quantitative sur une plaque 96 puits : mesure du Cq

Le niveau d'expression de GRIN2B a été normalisé par différence du Cq moyen obtenu pour GRIN2B avec le Cq moyen obtenu avec les gènes de référence. Cette différence a été calculée entre GRIN2B et actine, et entre GRIN2B et GAPDH. La moyenne des différences a été considérée comme le $\Delta\Delta Cq$ de GRIN2B. Le niveau d'expression relative de GRIN2B a finalement été déterminé (niveau d'expression relative = $2^{-\Delta\Delta Cq}$) (Schmittgen & Livak, 2008). Plus le niveau d'expression relative est important, plus la quantité initiale d'ADNc présente était plus importante.

VII. Etude de la prolifération des nouveaux neurones

VII.1 *Perfusion intracardiaque de paraformaldéhyde*

Afin de fixer les protéines des tissus cérébraux lors du prélèvement, les souris ont été perfusées avec du paraformaldéhyde 4%. Pour cela, les souris ont été profondément anesthésiées par une injection intrapéritonéale d'hydrate de chloral (environ 40 mg). Les animaux ont ensuite été perfusés par voie intracardiaque avec une solution de rinçage de NaCl 0,9% (la décoloration de certaines zones du corps des animaux a été observée, notamment le foie), puis avec une solution de paraformaldéhyde 4%. Les cerveaux ont été prélevés et placés dans la même solution de paraformaldéhyde 4% durant 24h à 4 °C. Les 3 jours suivants, les cerveaux sont toujours conservés à 4 °C, mais la solution de paraformaldéhyde 4% est remplacée par une solution de PBS 0,1 M contenant 30% de saccharose et 0,1% d'azide de sodium, changée quotidiennement. Une fois les cerveaux imprégnés de saccharose et cryoprotégés, les cerveaux sont tombés au fond de leur puit, et ils ont alors pu être congelés sans changement de volume de l'eau résiduelle qui endommagerait le tissu. Pour ce faire, les cerveaux ont été plongés dans un tube contenant de l'isopentane liquide dont la température est stabilisée entre - 25 °C et - 30 °C. Les cerveaux peuvent ensuite être conservés à - 80 °C.

VII.2 *Détection de Ki67 par immunohistochimie*

Les cerveaux congelés ont été entièrement coupés en tranche de 35 μ m d'épaisseur à l'aide d'un cryostat, maintenant la température à - 20 °C. Les coupes de cerveaux ont été stockées dans une plaque de 24 puits, chacun rempli de PBS 1X + 0,1% azide de sodium ; 1 ligne de 6 puits correspondant à 1 cerveau. L'hippocampe a été subdivisé dans des coupes frontales par 13 séries de 6 coupes. Ainsi, chaque cerveau a été placé dans 6 puits, de manière à obtenir l'équivalent de 6 copies d'un cerveau par souris : dans chaque puit, 1/6 de l'hippocampe a été

conservé, avec chaque coupe espacée de la suivante par 210 μm . Les plaques de 24 puits avec les coupes ont été conservées à 4 °C jusqu'à la réalisation de l'immunohistochimie.

Les coupes ont tout d'abord été rincées 30 minutes dans une solution de PBST, puis elles ont été incubées 2 heures dans un tampon de blocage de PBST contenant 10% de sérum d'âne (Normal Donkey Serum, Jackson ImmunoResearch), l'âne étant l'espèce servant à fabriquer l'anticorps secondaire. Cette solution vise à bloquer les sites antigéniques aspécifiques et donc à diminuer le bruit de fond au moment de la révélation. Les coupes ont ensuite été incubées à 4 °C toute la nuit dans une solution d'anticorps monoclonaux de lapin anti-Ki67 dilués (1/100, Abcam) dans la solution bloquante. Le lendemain, les coupes ont à nouveau été rincées 30 minutes dans une solution de PBS, puis elles ont été placées dans le noir pendant 2 heures dans une solution d'anticorps secondaire Cy3 d'âne dirigé contre les immunoglobulines G de lapin, dilués (1/250, #711-165-152, Jackson ImmunoResearch) dans une solution de PBS contenant 10% de sérum d'âne. Finalement, après rinçage des coupes dans du PBS pendant 30 minutes dans le noir, elles ont été montées sur lames et recouvertes d'une lamelle à l'aide d'un milieu de montage Fluoromount (Sigma-Aldrich). Les neurones exprimant Ki67 ont été quantifiés sur 1/6 de l'hippocampe par visualisation au microscope multiphoton en épifluorescence (Leica TCS SP8) en utilisant le filtre approprié.

VIII. Optogénétique

VIII.1 Principe

L'étude de l'effet de la stimulation et celle de l'effet de l'inhibition des jeunes neurones sur les changements de neurotransmission induits par la fluoxétine a été réalisée chez les souris Nestine-CreER^{T2}/ChR2-YFP et Nestine-CreER^{T2}/Arch-GFP à l'aide de la technique d'optogénétique. Au cours des dernières années, l'optogénétique est devenue l'une des technologies clés dans la compréhension et la cartographie des circuits neuronaux. Il s'agit d'une méthode innovante permettant de stimuler ou d'inhiber transitoirement et avec précision l'activité d'une population neuronale spécifique sans affecter les cellules alentours et sans utiliser de produits chimiques, en combinant le génie génétique et l'optique. Cette technique peut s'effectuer chez l'animal éveillé et libre de ses mouvements. Elle a été mise au point en 2006 (Deisseroth et al., 2006), et élue technique de l'année 2010 par le journal *Nature Methods* ("Method of the Year 2010" 2011). Elle repose sur l'expression de gènes codant pour une protéine « photo-activable » dans une région cérébrale d'intérêt. Dans notre cas, elle permet de stimuler ou d'inhiber spécifiquement l'activité des jeunes neurones

exprimant la Nestine (Figure 25), sans avoir d'effet sur les cellules voisines n'exprimant ni la Nestine ni la protéine photo-activable (Fan & Lin, 2015).

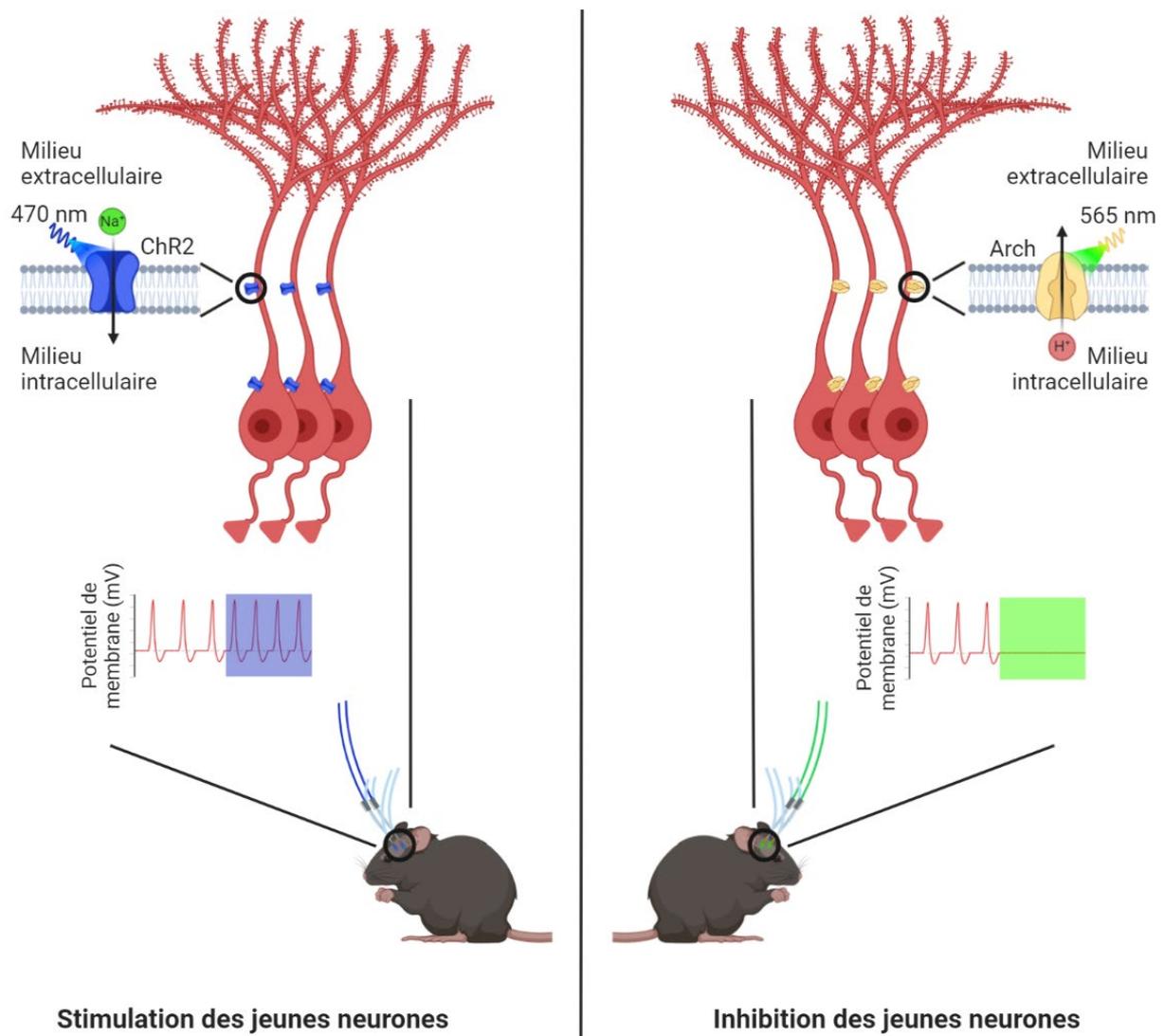


Figure 25 – Simulation et inhibition des jeunes neurones chez des souris Nestine-CreERT2/ChR2-YFP et Nestine-CreERT2/Arch-GFP respectivement par optogénétique. Chez les souris Nestine-CreERT2/ChR2-YFP, l'illumination par une lumière bleue à travers une optrode implantée dans le GD permet l'activation de ChR2, un canal sodique sensible à la lumière d'une longueur d'onde de 470 nm, dépolarisant ainsi les jeunes neurones. Chez les souris Nestine-CreERT2/Arch-GFP, l'illumination par une lumière verte à travers une optrode implantée dans le GD permet l'activation de Arch, une pompe à protons sensible à la lumière d'une longueur d'onde de 565 nm, conduisant ainsi à l'hyperpolarisation des jeunes neurones.

VIII.2 Fabrication des optrodes et des sondes de microdialyse couplées avec une optrode

Les optrodes (fibre optique utilisée pour l'optogénétique pour délivrer la lumière au niveau des cellules dans le cerveau) ont été fabriquées au laboratoire (Sparta et al., 2011). Elles ont été coupées à partir d'une bobine de fibre optique d'un diamètre de 200 μm (fibre multimode d'ouverture numérique 0,39, Thorlabs). Pour cela, la fibre optique a tout d'abord été dénudée

de sa gaine de protection, puis des sections de fibre d'environ 6 cm ont été coupées. Une sélection de ces sections de fibre a ensuite été effectuée, afin de vérifier que chacune avait au moins une extrémité parfaitement circulaire, dépourvue de rayures et d'irrégularités. La qualité de cette coupure est le gage d'obtention d'un rendement optique correct. Cette extrémité régulière est destinée à être implantée dans le cerveau. L'autre extrémité a été insérée et collée avec de la résine époxy dans une ferrule de céramique d'un diamètre interne de 230 μm (Thorlabs). Cette extrémité qui a été insérée dans la ferrule a ensuite été polie sur une succession de 4 feuilles de papier abrasif, avec des grains de plus en plus fin (5 μm de carbure de silicium, 3 μm et 1 μm d'oxyde d'aluminium et 0,3 μm d'alumine calcinée grès, Thorlabs). Suite au polissage, cette extrémité doit être parfaitement lisse, sans rayures ni irrégularités. L'optrode a finalement été connectée au laser, afin de mesurer le rendement de la puissance émise par l'optrode, par rapport à la puissance délivrée par le laser. Les puissances lumineuses ont été mesurées à l'aide d'un photomètre (PM20, Thorlabs). Seules les sondes avec un rendement supérieur à 80% ont été utilisées.

Les optrodes ont ensuite été utilisées pour fabriquer les sondes de microdialyse couplées avec une optrode (Figure 26). Les sondes ont été testées afin de vérifier leur bon fonctionnement sans résistance ni fuites ; et elles ont été implantées.

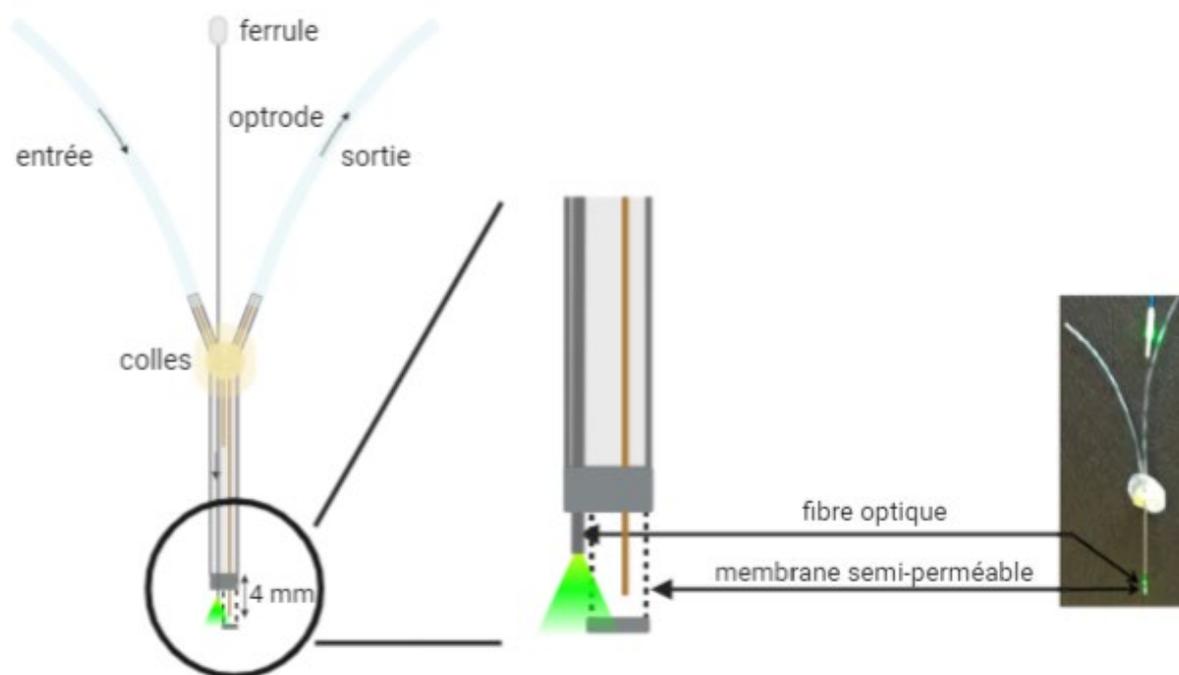


Figure 26 - Illustration du couplage d'une optrode avec sonde de microdialyse

VIII.3 Implantation des sondes de microdialyse couplées avec une optrode

Les sondes de microdialyse couplées avec une optrode ont été implantées dans le GD, de la même manière que précédemment dans le paragraphe IV.3. A la fin de l'expérience, les souris ont été placées en cages individuelles.

VIII.4 Stimulation optique in vivo

L'illumination a été réalisée avec un laser émettant avec une longueur d'ondes de 473 nm, avec des créneaux de 20 ms, à une fréquence de 10 Hz et puissance de 20 mW. Ces paramètres sont destinés à reproduire la fréquence de décharge électrique des cellules granulaires en conditions physiologiques (Drew et al., 2016). La fréquence et la durée des pulses ont été contrôlés par un stimulateur (Master-8 pulse stimulator, A.M.P. Instruments) (Kheirbek et al., 2013)

VIII.5 Inhibition optique in vivo

L'illumination a été réalisée avec un laser émettant avec une longueur d'ondes de 532 nm, permettant l'inhibition de l'activité électrique des cellules qui expriment Arch (B. Li et al., 2015), allumée en continue, avec une puissance de 10 mW (Danielson et al., 2016).

VIII.6 Sessions de microdialyse couplée à l'optogénétique durant le NSF chez le même animal

Les animaux ont été mis à jeûn le matin de la journée où les sondes ont été implantées. Les expériences de microdialyse ont débuté le lendemain, après 24 heures de mise à jeûn, comme décrit pour l'utilisation du NSF à des fins de détermination de l'état anxio-dépressif des souris (Santarelli et al., 2003; J. W. Wang et al., 2008). L'entrée des sondes a été reliée à un perfuseur automatique (PHD ULTRA 10 MultiRack, Harvard Apparatus) délivrant le LCR en continu à un débit de 1 μ L/min. Les sorties des sondes ont été allongées, de façon à pouvoir réaliser le test plus simplement, et de façon à ce qu'il y ait 15 μ L de volume mort (donc 15 minutes de décalage) entre la membrane semi-perméable et le dialysat recueilli. Après 1 heure de stabilisation, des dialysats ont été recueillis toutes les 15 minutes. Lorsque 2 dialysats basaux ont été prélevés, les optrodes ont été connectées. Les tubes de collecte de microdialyse ont ensuite été changés, et les souris ont ensuite été placées dans l'enceinte du NSF (Figure 27). Au même moment que le commencement du NSF, l'illumination optogénétique a été débutée pour 15 minutes. Les souris restent dans l'enceinte du NSF toute la durée de

l'illumination. Lorsque les souris ont manifestement mordu leur croquette, celle-ci a été retirée, et les souris ont été maintenues dans l'enceinte. A la fin des 15 minutes d'illumination, le tube de collecte a été changé (le 3^e dialysat basal est prélevé à ce moment, et le 4^e tube de collecte est placé), et les optrodes ont été déconnectées. Ce 4^e dialysat, une fois collecté, a constitué le dialysat correspondant aux mesures durant l'illumination, du fait du décalage crée avec la longue sortie. Les souris ont ensuite pu être replacées dans leur cage d'origine (celles où elles ont été placées individuellement après la chirurgie). Le temps de latence et la consommation de nourriture pendant 5 minutes dans leur cage d'origine ont été mesurés, et le recueil des dialysats toutes les 15 minutes a ensuite été poursuivi.

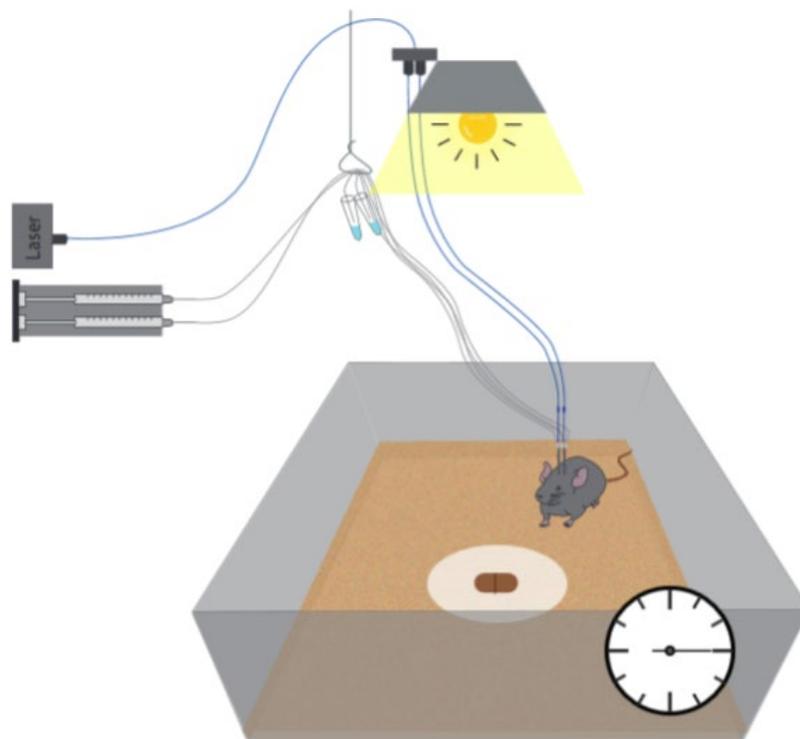


Figure 27 – Couplage de la microdialyse avec l'optogénétique durant le NSF

VIII.7 *Optogénétique durant l'OF chez le même animal*

Le lendemain de la réalisation du NSF, les animaux ont été amenés à proximité des enceintes d'OF. Leurs optrodes ont été connectés au laser (Figure 28). L'OF de 30 minutes a été réalisé avec une alternance de périodes de 5 minutes durant lesquels le laser a été alternativement allumé ou éteint. Pour s'affranchir de l'effet séquence, le lendemain du NSF, l'OF a été démarré avec 5 minutes d'illumination ; le surlendemain du NSF, l'OF a été démarré avec 5 minutes sans illumination. Les paramètres de ces illuminations sont ceux décrite dans les paragraphes VIII.4 et VIII.5.

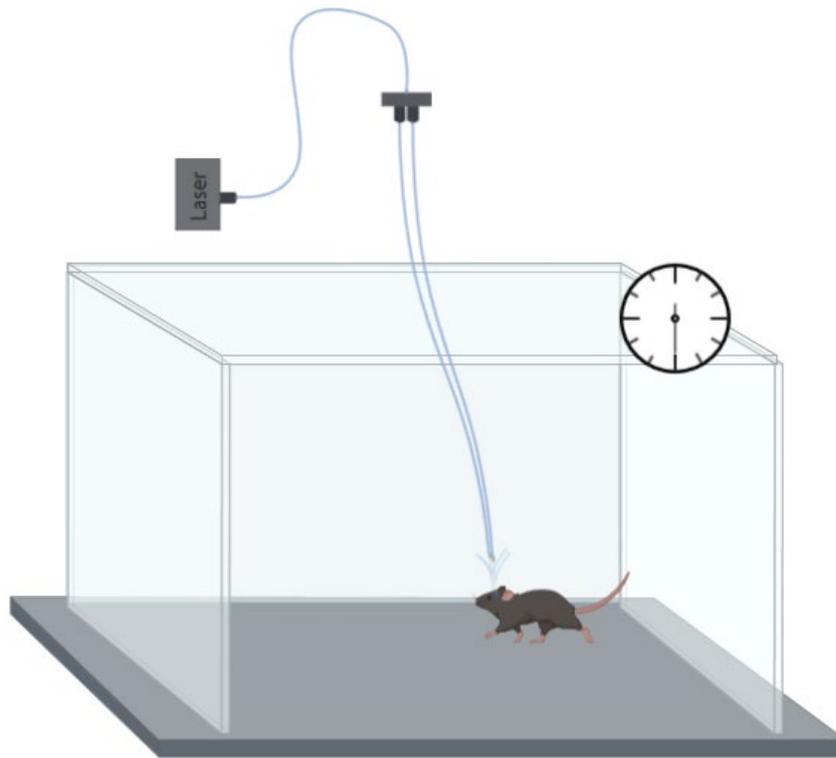


Figure 28 – Couplage de l'optogénétique avec l'OF

VIII.8 *Vérification de l'expression de l'opsine au niveau des jeunes neurones par immunohistochimie*

VIII.8.1 *Perfusion intracardiaque de paraformaldéhyde*

Afin de fixer les protéines des tissus cérébraux lors du prélèvement, 90 minutes après l'illumination des jeunes neurones (Drew et al., 2016), les souris ont été perfusées avec du paraformaldéhyde 4%, de la même manière que précédemment (voir paragraphe VII.1). Les cerveaux congelés ont été conservés à $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$.

VIII.8.2 *Détection de GFP par immunohistochimie*

Les cerveaux congelés ont été entièrement coupés en tranche de $35\text{ }\mu\text{m}$ d'épaisseur, de la même manière que précédemment (voir paragraphe VII.2). Les plaques de 24 puits avec les coupes ont été conservées à $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ jusqu'à la réalisation de l'immunohistochimie.

Les coupes ont tout d'abord été rincées 30 minutes dans une solution de PBST, puis elles ont été incubées 2 heures dans un tampon de blocage de PBST contenant 5% de sérum d'âne (Normal Donkey Serum, Jackson ImmunoResearch), l'âne étant l'espèce servant à fabriquer l'anticorps secondaire. Cette solution vise à bloquer les sites antigéniques aspécifiques et donc à diminuer le bruit de fond au moment de la révélation. Les coupes ont ensuite été incubées à $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ toute la nuit dans une solution d'anticorps monoclonaux de lapin anti-GFP dilués (1/500,

Santa Cruz Biotechnology) dans la solution bloquante. Le lendemain, les coupes ont à nouveau été rincées 30 minutes dans une solution de PBS, puis elles ont été placées dans le noir pendant 2 heures dans une solution d'anticorps secondaire Cy3 d'âne dirigé contre les immunoglobulines G de lapin, dilués (1/250, #711-165-152, Jackson ImmunoResearch) dans une solution de PBS contenant 10% de sérum d'âne. Finalement, après rinçage des coupes dans du PBS pendant 30 minutes dans le noir, elles ont été montées sur lames et recouvertes d'une lamelle à l'aide d'un milieu de montage Fluoromount (Sigma-Aldrich). Elles ont été visualisées au microscope multiphoton en épifluorescence (Leica TCS SP8) en utilisant les filtres appropriés.

IX. Analyse statistique

Les résultats des études comportementales et biochimiques sont présentés sous la forme de moyenne \pm erreur standard de la moyenne (SEM). Pour la microdialyse lors de l'administration locale et lors de l'optogénétique, les résultats sont exprimés en pourcentage du niveau basal pour chaque groupe. Les données ont été analysées à l'aide de GraphPad Prism 6. Différents tests statistiques ont été utilisés. Un test t de Student ou une ANOVA à 1 ou 2 facteurs ont été appliqués. Lorsque l'ANOVA a révélé un effet significatif et/ou une interaction, le test de Tukey a été conduit *a posteriori*, comparant les moyennes entre chaque groupe. 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 log-rank 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

I. Objectif 1 : Effet neurochimique d'un traitement à la fluoxétine dans le GD ventral

Les EDC constituent un problème de santé publique grave et un des troubles mentaux les plus courants. Les ISRS sont recommandés en première ligne de traitement pharmacologique. Dans des modèles murins traités à la fluoxétine, l'augmentation de la transmission sérotoninergique se produit bien avant l'obtention d'effets comportementaux (Mendez-David et al., 2014; Popa et al., 2010). Ainsi, la transmission sérotoninergique n'explique pas à elle seule le délai d'action retardé des ISRS, et d'autres facteurs doivent également être impliqués. Les jeunes neurones issus de la neurogenèse adulte hippocampique présentent une période critique au cours de l'étape de maturation, 4 à 6 semaines après division, durant laquelle ils ont notamment une plus grande excitabilité, avec une induction de LTP facilitée et une amplitude de LTP plus grande. Ces jeunes neurones influencent également la réponse des ISRS durant cette période (Doan et al., 2019 pour revue). Ces jeunes neurones sont localisés dans le GD ventral. Ainsi, les modifications de neurotransmissions dans cette région cérébrale par ces jeunes neurones pourraient expliquer leur rôle comportemental. Les cellules granulaires du GD étant glutamatergiques, nous nous sommes en particulier intéressés à la transmission glutamatergique. D'autre part, lors du début de cette thèse, un consensus dans la littérature admettait l'existence d'un lien étroit entre les jeunes neurones et les neurones matures via des interneurons GABAergiques (Anacker & Hen, 2017 pour revue). Cette transmission GABAergique nous a donc également intéressée, d'autant plus que le glutamate et le GABA sont en lien étroit (voir paragraphe I.2.4 de l'introduction, Figure 1).

Dans ce premier objectif, nous avons donc évalué les modifications des transmissions glutamatergique et GABAergique dans le GD ventral après un traitement par la fluoxétine.

1.1 Absence d'effet neurochimique d'un traitement aigu à la fluoxétine dans le GD ventral

Cette étude de microdialyse chez des souris 129SvPas indique qu'après un traitement aigu à la fluoxétine (FLX, 18 mg/kg/jour) (protocole Figure 29A), les concentrations extracellulaires de neurotransmetteurs dans la région du GD ventral des animaux traités à la fluoxétine en aigu ne sont pas significativement différentes de celles des animaux contrôles (VEH) [Test de Student : 5-HT ($p = 0,95$; Figure 29B), Glu ($p = 0,99$; Figure 29C) et GABA ($p = 0,31$; Figure 29D)].

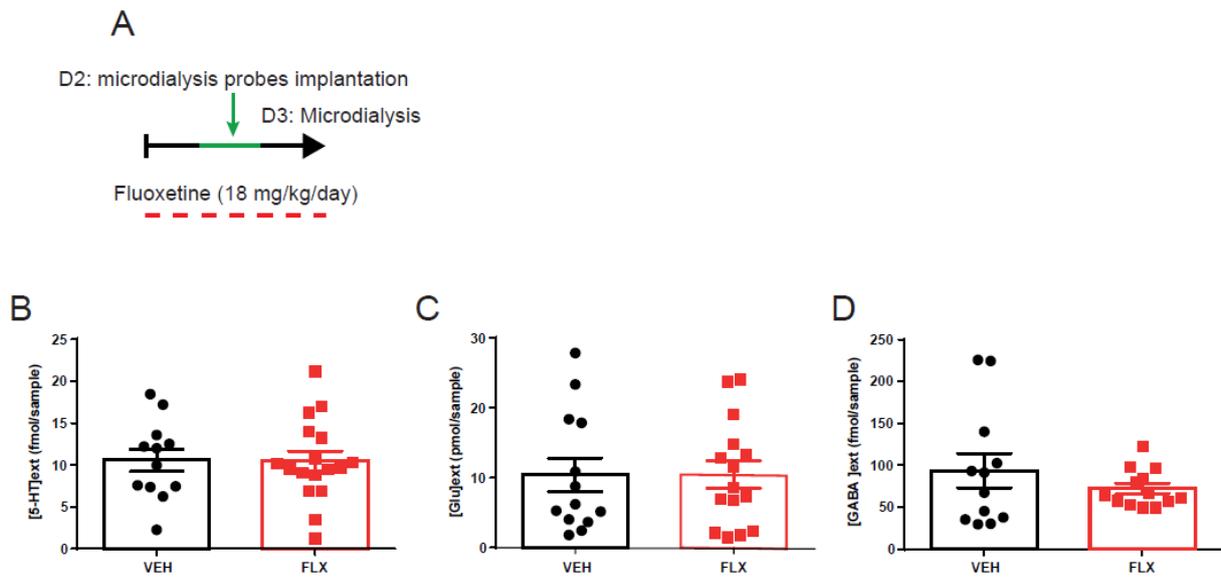


Figure 29 – Effets neurochimiques d'un traitement aigu de 2 jours à la fluoxétine (18 mg/kg/jour) dans le GD ventral chez des souris 129SvPas. (A) Protocole de l'expérience de microdialyse après un traitement aigu à la fluoxétine. Début du traitement avec la fluoxétine à D1. Concentrations extracellulaires basales de 5-HT (B), de Glu (C) et de GABA (D) exprimées en moyenne \pm SEM ($n = 9$ /groupe).

1.2 Le traitement chronique à la fluoxétine diminue la transmission glutamatergique dans le GD ventral

Le traitement chronique de 7 semaines à la fluoxétine (18 mg/kg/jour) (protocole Figure 30A) augmente significativement la concentration extracellulaire basale de sérotonine (Test de Student, $p = 0,03$; Figure 30B). D'autre part, le traitement chronique avec la fluoxétine diminue significativement la transmission glutamatergique dans le GD ventral (Test de Student, $p = 0,04$; Figure 30C), sans effet sur la transmission GABAergique (Test de Student, $p = 0,44$; Figure 30D).

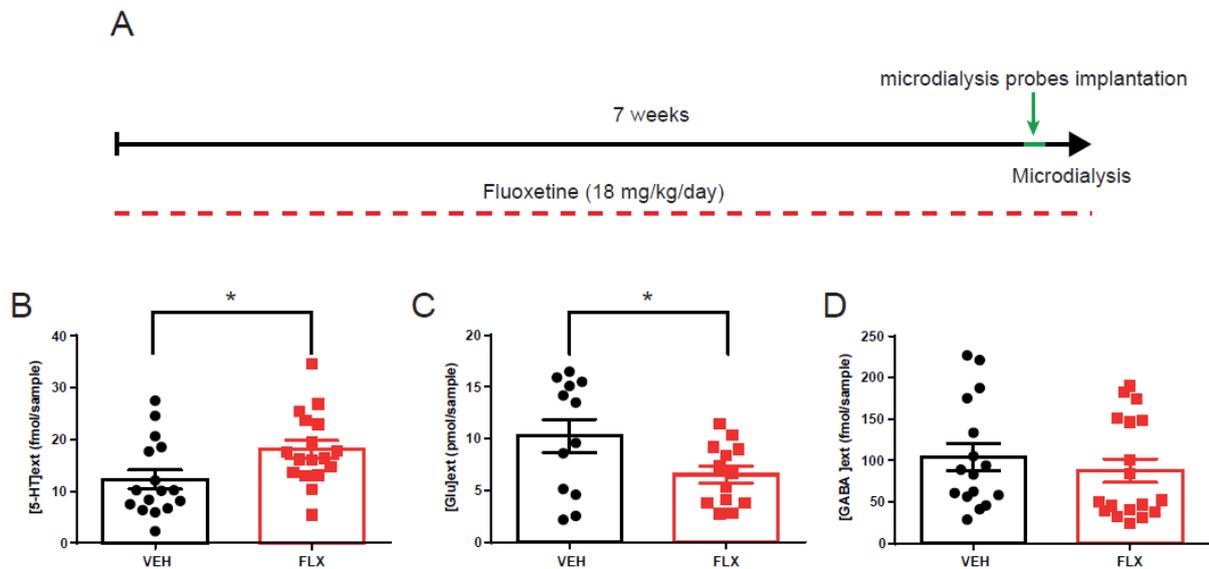


Figure 30 - Effets neurochimiques d'un traitement chronique à la fluoxétine (18 mg/kg/jour) dans le GD ventral chez des souris 129SvPas. (A) Protocole de l'expérience de microdialyse après un traitement chronique à la fluoxétine. Concentrations extracellulaires basales de 5-HT (B), de Glu (C) et de GABA (D) exprimées en moyenne \pm SEM (n = 9/groupe). Test de Student : * p < 0,05.

La balance excitation/inhibition n'est pas significativement différente après un traitement chronique avec la fluoxétine (Test de Student, p = 0,21 ; Figure 31). La tendance va même dans le sens opposé de la diminution de glutamate observée. Ceci est certainement dû à un effet d'unité puisque le GABA est bien moins concentré que le glutamate ; ainsi une diminution mineure des concentrations de GABA exacerbe le ratio glutamate/GABA.

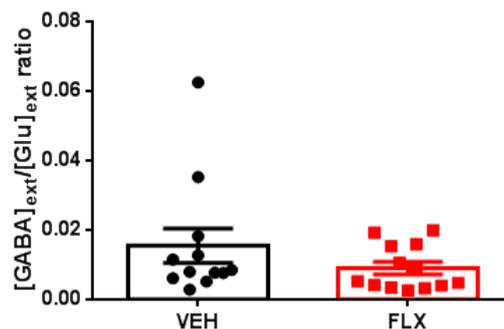


Figure 31 - Effets d'un traitement chronique à la fluoxétine (18 mg/kg/jour) chez des souris 129SvPas sur la balance GABA/glutamate dans le GD ventral. Les valeurs sont exprimées en moyenne \pm SEM.

1.3 Vérification de l'implantation des sondes

À la fin des expériences de microdialyse, les animaux ont été sacrifiés et leurs cerveaux ont été prélevés, puis coupés en sections de 20 μ m d'épaisseur, et les coupes de la zone d'intérêt

ont été colorées au crésyl violet (Figure 32A). Les différentes implantations sont correctes dans la mesure où les marques laissées par la sonde de dialyse ont été retrouvées dans la région du GD ventral. Ces localisations ont été reportées sur les niveaux de coupes schématiques de l'atlas stéréotaxique (Figure 32B).

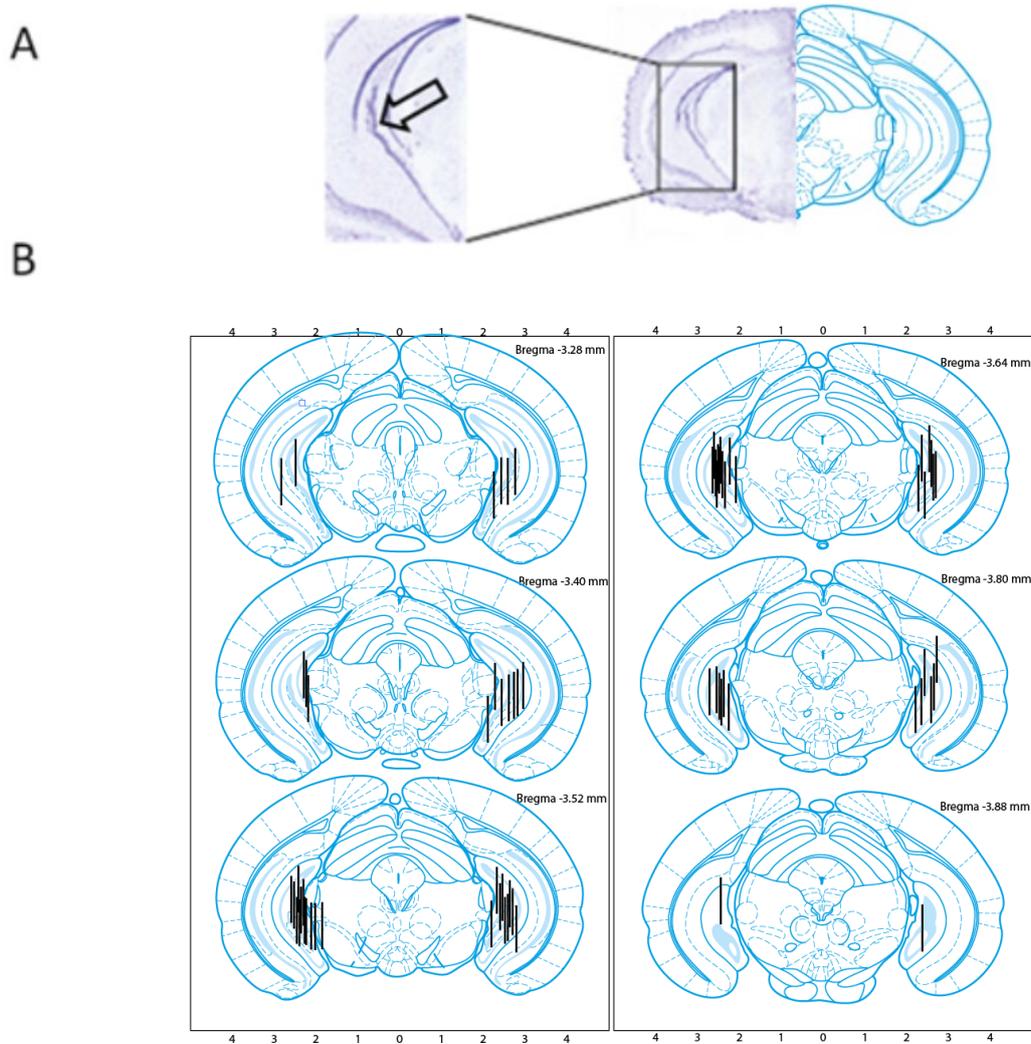


Figure 32 - Vérification de l'implantation des sondes. A – Coupe de la zone d'intérêt avec trace de la sonde implantée. B- Représentations des implantations de sondes sur les coupes provenant de l'atlas du cerveau de souris de Franklin et Paxinos (2007)

En conclusion, ce travail a démontré une diminution de la transmission glutamatergique dans le GD ventral après un traitement chronique avec la fluoxétine. Cette diminution pourrait constituer une conséquence de la stimulation de la neurogenèse adulte hippocampique par le traitement chronique avec la fluoxétine.

II. Objectif 2 : Effets comportemental et neurochimique de l'injection de Ro25-6981 dans le GD après un traitement chronique avec la fluoxétine

Dans le second objectif, nous avons souhaité cibler les jeunes neurones par une approche pharmacologique afin d'évaluer les modifications de neurotransmissions dans le GD ventral par ces jeunes neurones. La sous-unité GluN2B du récepteur NMDA du glutamate étant impliquée dans les propriétés spécifiques électrophysiologiques et comportementales durant la période critique 4 à 6 semaines après division (Doan et al., 2019 pour revue), nous avons donc décidé d'évaluer les effets comportemental et neurochimique de l'administration locale intra-hippocampique d'un antagoniste sélectif de la sous-unité GluN2B, le Ro25-6981, après un traitement chronique avec la fluoxétine.

L'effet comportemental de l'administration intra-hippocampique de Ro25-6981 a été évalué chez la souris au fond mixte 129SV/BL6 dans le modèle CORT d'anxiété/dépression, après un traitement chronique avec la fluoxétine. Cette administration locale bilatérale a produit un effet de type antidépresseur. Par ailleurs, nous avons évalué l'effet neurochimique du Ro25-6981 dans les mêmes conditions. Nous avons mis en évidence une augmentation de la transmission glutamatergique indépendante du traitement à la fluoxétine, ainsi qu'une augmentation de la transmission GABAergique uniquement chez les animaux traités à la fluoxétine. Cette augmentation des concentrations extracellulaires de GABA pourrait être en lien avec l'augmentation de la prolifération des jeunes neurones par le traitement par la fluoxétine, et de l'augmentation de l'expression de la sous-unité GluN2B qui pourrait en résulter.

Ces résultats sont présentés ci-dessous sous la forme d'un article, en préparation, dans l'attente de pouvoir réaliser les derniers dosages des échantillons issus de la microdialyse.

Article 2 en préparation

TITLE PAGE

Type of paper: Original research article

Antidepressant-like effect of intrahippocampal Ro25-6981 administration in a neurogenesis-dependent task and induction of GABA and glutamate neurotransmissions

Julie Doan¹, Céline Defaix¹, Indira Mendez-David¹, Alain M. Gardier¹, Denis J. David¹, Jean-Philippe Guilloux¹, Laurent Tritschler^{1§}

¹ Université Paris-Saclay, Faculté de Pharmacie, CESP-Inserm, Chatenay-Malabry, 92290, France.

§ Corresponding author:

Dr. Laurent Tritschler

Laboratoire de Neuropharmacologie

Université Paris-Saclay, CESP-Inserm, Faculté de Pharmacie, 5 Rue J-B Clement, Tour D1, 2e étage, F-92296 Chatenay Malabry cedex. France

Tel: (33) 1 46 83 54 68

E-mail: laurent.tritschler@u-psud.fr

ABSTRACT

Major Depressive Disorder is a serious public health problem, the most common psychiatric disorder worldwide. Antidepressants increase adult hippocampal neurogenesis, and adult hippocampal neurogenesis is required for some behavioral effects of antidepressants. Adult-born granule cells in the dentate gyrus (DG) have been shown to have an important role in these effects, and the GluN2B subunit of NMDA receptors seems to be involved. However, the precise neurochemical role of the GluN2B subunit in the requirement of adult-born GCs for the antidepressant-like effects has yet to be elucidated. To assess the specific role of this GluN2B subunit, Ro25-6981 (intra-DG), a selective antagonist of the GluN2B subunit of the NMDA glutamate receptor, was administered following a chronic fluoxetine treatment in a model of anxiety/depression. Responses in the novelty suppressed feeding (NSF) and neurochemical consequences on extracellular glutamate and GABA in the ventral DG were measured. Here we show an antidepressant-like effect of local Ro25-6981 in the NSF following GluN2B antagonism in the ventral dentate gyrus independently of the fluoxetine treatment. Furthermore, we revealed a fluoxetine-independent increase of the glutamatergic transmission, and a fluoxetine-dependent increase of GABA transmission in the ventral dentate gyrus. Our results suggest that the increase adult hippocampal neurogenesis following the chronic fluoxetine treatment would increase GluN2B expression, and the antagonism of these increased GluN2B-containing NMDA receptors would be responsible for the transient increase of the GABAergic transmission.

INTRODUCTION

Major Depressive Disorder is a serious public health problem, the most common psychiatric disorder worldwide. This disease greatly reduces quality of life and can be very debilitating. Classical monoaminergic antidepressants have a delayed onset of action of several weeks, with low response rates and with numerous side effects (Rush et al., 2004; Wisniewski et al., 2006). The continuous generation of new neurons in the adult brain in the hippocampus, or adult hippocampal neurogenesis, is required for some behavioral effects of antidepressants, notably in the novelty suppressed feeding test (NSF), a neurogenesis-dependent behavioral assay (David et al., 2009; Santarelli et al., 2003).

Adult-born granule cells (GCs) are immature neurons with unique properties during a transient period. In particular, from 4 to 6 weeks post-division, adult-born GCs are more excitable than mature GCs (Marin-Burgin et al., 2012), and they have a lower threshold for long-term potentiation (Saxe et al., 2006; Schmidt-Hieber et al., 2004; Snyder et al., 2001; Wang et al., 2000). These particular properties are largely mediated by GluN2B-containing N-methyl-D-aspartate (NMDA) receptors located on adult-born GCs (Doan et al., 2019 for review). These NMDA ionotropic glutamate receptors are tetramers typically composed of 2 mandatory GluN1 and 2 GluN2 subunits (Laube et al., 1998). In the fetal brain, there is a shift from GluN2B expression to GluN2A expression: GluN2B subunits are predominantly expressed in the fetal brain. This shift also seems to occur during adult hippocampal neurogenesis (Canales, 2016; Doan et al., 2019 for review).

In recent years, the fast antidepressant activity of ketamine, a non-competitive antagonist of NMDA receptor, has been intensely studied (Duman, 2018; Pham & Gardier, 2019). This discovery highlights the important role of NMDA receptors containing GluN2B subunits in antidepressant drug treatment. The glutamate and NMDA binding sites are located on GluN2B subunits (Anson et al., 1998; Laube et al., 1997). This subunit also possesses a ketamine binding site and an allosteric binding site for Ro25-6981, a noncompetitive polyamine antagonist with good affinity and selectivity for the GluN2B subunit (see Pham & Gardier, 2019 for a review). In addition, GluN2B subunits are involved in the control of glutamate release in subregions of the hippocampus and frontal cortex (Stan et al., 2014).

Adult-born GCs bearing the GluN2B subunit of NMDA receptors exhibit unique properties by influencing behavioral responses to antidepressant drugs (Tannenholz et al., 2016). The systemic administration of Ro25-6981, also exhibits a fast antidepressant response

(24, 48 or 72 hours later) in the NSF (thus activates neurogenesis: (Gruden et al., 2018)), but also in neurogenesis-independent behavioral assays, the forced swim test and the sucrose preference test (Lang et al., 2018 for review; Li et al., 2010; Li et al., 2011; Talbot et al., 2016). Therefore, adult hippocampal neurogenesis does not seem to be necessary for Ro25-6981 antidepressant-like activity. Moreover, conditional deletion of the GluN2B subunit specifically in adult-born GCs attenuated the effect of fluoxetine in the neurogenesis-dependent NSF test, while the effect of fluoxetine in the tail suspension test was unaffected (Tannenholz et al., 2016). These data suggest that the GluN2B subunit plays a role in the requirement of adult-born GCs for the neurogenesis-dependent effects of antidepressant drugs.

The purpose of the present study is to explore the contribution of the GluN2B-containing NMDA receptors in the ventral dentate gyrus (vDG) to the antidepressant drug treatment using a pharmacological approach. In a mouse model of anxiety/depression based on the elevation of glucocorticoids levels (CORT model) (David et al., 2009), mice were chronically treated with fluoxetine, a SSRI, then locally administered with Ro25-6981 into the vDG, where the adult-born GCs are necessary for anxiolytic/antidepressant-related effects (Wu & Hen, 2014). The Ro25-6981 antidepressant-like behavior was evaluated in the NSF test. Then, under the same experimental conditions, the effects of Ro25-6981 on glutamate and GABA transmissions were determined using *in vivo* microdialysis in the vDG in adult mice.

We found an antidepressant-like effect in the NSF following antagonism of GluN2B subunits of NMDA receptors in the vDG independently of the chronic fluoxetine treatment. Furthermore, we revealed a fluoxetine-independent increase in the glutamatergic neurotransmission, and a fluoxetine-dependent increase in GABA neurotransmission in the vDG following bilateral Ro25-6981 injection.

MATERIALS AND METHODS

Animals

Adult male 129SV/BL6 mice (a mixed background) at 12-20 weeks of age were generated by crossing mice of two different strains, which are C57/BL6 mice and 129/Sv mice. This mixed C57/BL6 x 129/Sv background allows an appropriate responsiveness in the CORT

model (David et al., 2009; Gourley & Taylor, 2009) because we benefit from a high adult hippocampal neurogenesis induction by a chronic antidepressant drug treatment as described in 129/Sv mice (Diaz et al., 2012). They were housed in groups of four in temperature (21 ± 1 °C) controlled room with a 12 h light: 12 h dark cycle (lights on at 06:00 a.m.). Food and water were provided *ad libitum* except during behavioral observations. Particular efforts were made to minimize the number of mice used in the experiments. Protocols were approved by the Institutional Animal Care and Use Committee in France (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, protocol APAFIS #5489, permissions # 92-196*” to A.M.G.) as well as with the European directive 2010/63/EU.

Drug treatment

Corticosterone (35 µg/mL, equivalent to 5 mg/kg/day, from Sigma-Aldrich) was dissolved in vehicle (0.45% hydroxypropyl-β-cyclodextrin; from Roquette). Fluoxetine hydrochloride (160 µg/mL, equivalent to 18 mg/kg per day, from Biotrend) was dissolved in 0.45% hydroxypropyl-β-cyclodextrin/corticosterone solution. Corticosterone treatment was applied for the entire duration of the experiments. Ro25-6981 hydrochloride hydrate (5 µg/µL, from Sigma-Aldrich) (Davies et al., 2017; Zhang, Wu, et al., 2008) was dissolved in vehicle (12% DMSO; 88% PBS). Either Ro25-6981 or vehicle were perfused locally at 0.2 µL/min into the vDG (bilateral) for 2 min using a Dual Syringe Pump 11 Pico Plus Elite (Harvard Apparatus), 30 min prior to the behavioral tests.

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. Twenty-four hours prior to the behavioral testing, all food was removed from the home cage. At time of testing, each fasted animal was placed in a corner of a new environment: a plastic box (55 cm x 40 cm x 18 cm) covered with wooden bedding, in which a single pellet of food was placed on a white paper platform positioned in the center of the box. The latency to eat was measured and used as an index of anxiety/depression-like behavior, because classical anxiolytic drugs as well as chronic antidepressants decrease this measure. Immediately after, the food pellet was removed from the arena. The animal was then transferred in 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. The animals were observed in the novel

environment for 15 min as previously described (Commissaris, 1993). We have indeed noticed that when the animals underwent surgery, they could take more than 10 min before eating.

Local administration probes implantation

Mice were anesthetized with chloral hydrate (400 mg/kg, ip) and secured in a stereotaxic frame. Two injection capillaries were implanted through burr holes in the skull, using the following coordinates (mm from bregma, determined with the mouse brain atlas by Paxinos and Franklin (2001)), for the vDG: Anteroposterior = -3.7, Lateral = ± 2.75 , Ventral = -3.2. The injection capillaries were anchored to the skull with dental cement.

Intracerebral in vivo microdialysis

Mice were anesthetized with chloral hydrate (400 mg/kg, ip) and secured in a stereotaxic frame. Microdialysis probes coupled with a silica fiber were implanted bilaterally for the vDG using the following coordinates (mm from bregma, according to Paxinos and Franklin (2001)): Anteroposterior = -3.7, Lateral = ± 2.75 , Ventral = -4.2. On the next day, the probes were continuously perfused with an artificial cerebrospinal fluid (aCSF composition in mmol/L: NaCl 147; KCl 3.5; CaCl₂ 1.26; MgCl₂ 1.0; NaH₂PO₄ 1.0; NaHCO₃ 1.0; pH 7.4 \pm 0.02) at a flow rate of 1.0 μ L/min using PHD ULTRA 10 MultiRack pump (Harvard Apparatus), while animals were awake and freely moving in their cage. One hour after the start of aCSF perfusion stabilization period, dialysates were collected (one every 15 min) to obtain basal values of neurotransmitters. Local administration of Ro25-6981 or vehicle at a flow rate of 0.2 μ L/min for 2 min was then realized, before collecting four more dialysate samples. Extracellular glutamate and GABA levels were measured in the vDG by using a high-performance liquid chromatography (HPLC) system (Dionex Ultimate-3000 HPLC (DGP-3600 M) as previously described (Defaix et al., 2018). The lower limits of quantification were \approx 42 fmol/sample for glutamate and \approx 30 fmol/sample for GABA.

RNA isolation and GRIN2B gene expression

Animals were sacrificed by cervical dissociation. Brains were removed, and the DG was then separated from the rest of the brain under the microscope. All DG samples were directly put in RiboZol (VWR) and stored at -80 °C until RNA extraction. Total RNA from DG was extracted using RiboZol (VWR) and assessed by spectrophotometry (NanoDrop 2000, ThermoFisher Scientific). RNA quality was assessed using gel electrophoresis with the RNA

LabChip 6000 Nano kit (Bioanalyzer 2000, Agilent Technologies). Samples with an expert scoring number (RIN) above 7 were considered of good quality. 500 ng of total RNA was then reverse-transcribed and converted into double-stranded cDNA using the Maxima First Strand cDNA synthesis kit (ThermoFisher Scientific). Small PCR products were amplified in quadruplets on an BioRad real-time PCR machine (CFX-96), using universal PCR conditions (65-59 °C touch-down, followed by 40 cycles (15 s at 95 °C, 10 s at 59 °C and 10 s at 72 °C)) and SYBR Green PCR Master Mix Reagent (Invitrogen). Primer-dimers were assessed by amplifying primers without cDNA. Primers were retained if they produced no primer-dimers or non-specific signal after 35 cycles. Results were calculated as relative intensities compared to two internal controls (ACTIN and GAPDH), and the $2^{-\Delta\Delta Cq}$ method was used to calculate the relative expression levels of the transcripts (Schmittgen & Livak, 2008).

Experimental design

Experiment 1 (local administration of Ro25-6981 and fluoxetine effects in the NSF): After 4 weeks of corticosterone, the SSRI fluoxetine was co-administered for an additional 4 weeks. Pre-treatment times were based on previous studies performed in our laboratory for corticosterone and for fluoxetine (David et al., 2009; Mendez-David et al., 2014). During the 3rd week of fluoxetine treatment, the animals were surgically bilaterally implanted an injection probe in the vDG. Mice were allowed to recover for 4 to 7 days before the test. Then, a first NSF(1) was performed at Day 56 following local vDG administration of Ro25-6981 or vehicle. In the same animals the treatment was further maintained for two more weeks, thus the second NSF(2) was performed at Day 70.

Experiment 2 (local administration of Ro25-6981 and fluoxetine effects on glutamatergic and GABAergic transmissions): A 4-week fluoxetine treatment was added to the corticosterone one, after chronic corticosterone. A NSF was performed, without any administration of Ro25-6981 or vehicle. Corticosterone and fluoxetine treatments were continued for two more weeks; then, the animals were surgically bilaterally implanted in the vDG with a microdialysis probe coupled with a silica fiber. Mice were allowed to recover for one night and Ro25-6981 administration or vehicle and the microdialysis procedure started the following day.

Statistical analysis

Results from data analyses, expressed as the mean \pm SEM, were analyzed using Prism 6 software (GraphPad, San Diego, CA, USA). For all experiments, Student's test, one-way or two-way ANOVAs were applied to the data as appropriate. Significant main effects and/or interactions were followed by Tukey's post-hoc analysis. In the NSF test, a Kaplan-Meier survival analysis was applied due to the non-normal distribution of data and Mantel-Cox log-rank test was used to evaluate differences between experimental groups. Statistical significance was set at $p < 0.05$.

RESULTS

GluN2B antagonist Ro25-6981 into the vDG increased antidepressant-like activity in the NSF, independently of fluoxetine

We first tested in a cohort of mice the effects of a 4 weeks-fluoxetine treatment (FLX, 18 mg/kg/day) and of bilateral Ro25-6981 (Ro) administration (2 μ g in each vDG) in the CORT model (5 mg/kg/day) (timeline Figure 1A).

A *t*-test comparison revealed a significant increase in the latency to feed in a novel environment in the NSF(1) in the CORT-treated group compared to the VEH/Veh control group ($p = 0.0335$; data not shown). Thus, this NSF(1) validated the anxiety-depression phenotype in a neurogenesis-dependent test (David et al., 2009).

The treatments with corticosterone and fluoxetine were then maintained for 2 more weeks, and then mice underwent NSF(2) trial (timeline Figure 1A). In the NSF(2), a Kaplan-Meier survival analysis revealed a significant increase in the latency to feed in a novel environment in the CORT/VEH-Veh group compared to all other groups (Mantel-Cox log-rank test, $p = 0.0018$). A one-way ANOVA confirmed this increase ($F_{4,42} = 6.67$, $p = 0.0003$, Tukey test: CORT/VEH-Ro vs CORT/VEH-Veh $p < 0.005$, CORT/FLX-Veh vs CORT/VEH-Veh $p < 0.05$, CORT/FLX-Ro vs CORT/VEH-Veh $p < 0.01$, CORT/FLX-Ro vs CORT/VEH-Ro and CORT/FLX-Ro vs CORT/FLX-Veh $p > 0.05$). A one-way ANOVA indicated that food consumption in the home cage was similar among all groups ($F_{4,42} = 1.58$, $p = 0.1961$) (Supplementary Figure 1). Thus, there was an antidepressant-like effect of chronic fluoxetine

(CORT/FLX-Veh) as well as Ro25-6981 (CORT/VEH-Ro) or the combination of these two treatments (CORT/FLX-Ro).

GluN2B antagonist Ro25-6981 administration into the vDG increased glutamatergic transmissions

Following a similar design, another cohort of mice were exposed to a 4 weeks-fluoxetine treatment (18 mg/kg/day) in the CORT model (5 mg/kg/day) (timeline Figure 2A). The antidepressant effectiveness of fluoxetine was evaluated in the NSF. A *t*-test comparison revealed a significant increase in the latency to feed in a novel environment in the NSF(1) in the CORT-treated group compared to the VEH/Veh control group ($p=0.028$; data not shown). Thus, this NSF(1) validated the anxiety-depression-like behavior in these mice. In the NSF(1), a Kaplan-Meier survival analysis revealed a significant increase in the latency to feed in a novel environment relative to control mice (VEH) and to fluoxetine-treated mice (CORT/FLX) (Mantel-Cox log-rank test, $p=0.0176$; data not shown). A one-way ANOVA confirmed this increase (one-way ANOVA, $F_{2,17}=8.21$, $p=0.0032$, Tukey test: CORT/VEH vs VEH $p<0.01$, CORT/FLX vs CORT/VEH $p<0.01$, CORT/FLX vs VEH $p>0.05$). A one-way ANOVA indicated that food consumption in the home cage was similar among all groups ($F_{2,17}=0.88$, $p=0.4326$; data not shown). Thus, there was an antidepressant-like effect of chronic fluoxetine (CORT/FLX) in these mice.

Extracellular glutamate and GABA levels in the vDG were also investigated after local Ro25-6981 administration. Basal extracellular glutamate levels were 2.4 ± 0.6 pmol/sample for VEH-Veh mice, 4.9 ± 2.4 pmol/sample for CORT/VEH-Veh mice, 2.3 ± 0.8 pmol/sample for CORT/VEH-Ro mice, 4.7 ± 1.7 pmol/sample for CORT/FLX-Veh mice and 1.9 ± 0.3 pmol/sample for CORT/FLX-Ro mice. A two-way ANOVA revealed a significant main effect of treatment factor with Ro25-6981 ($F_{4,20}=3.94$ $p=0.0162$), no effects of the time factor in the vDG ($F_{11,220}=1.32$, $p=0.2131$) nor of the interaction between these two factors ($F_{44,220}=1.37$, $p=0.0749$). Post-hoc analyses indicated that Ro25-6981 transiently increased the glutamatergic transmission as compared to CORT/VEH-Veh mice ($p<0.05$ at 15- and $p<0.01$ 30-min following the bilateral Ro25-6981 injection) (Figure 2B). The peak increases in extracellular glutamate levels in CORT/VEH-Ro and for CORT/FLX-Ro mice relative to control mice (CORT/VEH-Veh) were measured within 30-min of the local administration of Ro25-6981. Regarding AUC values of vDG extracellular levels of Glu, a *t*-test comparison revealed no differences in the CORT-VEH-Veh group compared to the VEH/Veh control

group ($p=0.3300$), and a two-way ANOVA revealed that Ro25-6981 administration increased the glutamatergic transmission ($F_{1,13}=9.78$, $p=0.0080$), and no effects of the fluoxetine treatment ($F_{1,13}=0.33$; $p=0.5756$) nor of the interaction between these two factors ($F_{1,13}=0.03$; $p=0.8725$). Post-hoc analyses indicated that Ro25-6981 increased the glutamatergic transmission in both CORT/VEH-Ro and CORT/FLX-Ro groups as compared to vehicle-treated mice (** $p<0.01$; Figure 2C).

Basal extracellular GABA levels were 70.3 ± 27.0 fmol/sample for VEH-Veh mice, 58.0 ± 21.0 fmol/sample for CORT/VEH-Veh mice, 49.9 ± 13.7 fmol/sample for CORT/VEH-Ro mice, 53.9 ± 8.5 fmol/sample for CORT/FLX-Veh mice and 31.9 ± 7.5 fmol/sample for CORT/FLX-Ro mice. A two-way ANOVA revealed no significant main effect of treatment factor with Ro25-6981 ($F_{4,20}=2.52$, $p=0.0739$), a significant effect of the time factor in the microdialysis experiment ($F_{11,220}=3.12$, $p=0.0006$), and a significant interaction between these factors ($F_{44,220}=1.97$, $p=0.0008$). Post-hoc analyses indicated that extracellular GABA levels transiently increased in the vDG in the CORT/FLX-Ro25-6981-treated mice when compared to all other groups ($p<0.01$ at 15- and $p<0.05$ 30-min following the bilateral Ro25-6981 injection) (Figure 2D). Thus, the combination of both fluoxetine-Ro25-6981 administration transiently increased extracellular GABA levels at 15- and 30-min following the bilateral Ro25-6981 injection in chronically stressed mice. In the AUC of vDG extracellular levels of GABA, a two-way ANOVA revealed no effects of Ro administration (Figure 2H, interaction: $F_{1,13}=3.85$; $p=0.0717$, Ro: $F_{1,13}=1.90$; $p=0.1912$, FLX: $F_{1,13}=1.39$; $p=0.2603$).

DISCUSSION

Chronic fluoxetine, a selective serotonin reuptake inhibitor, demonstrated antidepressant-like activities, notably in the NSF (David et al., 2009). Likewise, an acute administration of several NMDA receptor antagonists, including ketamine or its metabolite (2R,6R)-hydroxynorketamine or Ro25-698, promoted antidepressant-like activities (Gideons et al., 2014; Pham et al., 2018; Talbot et al., 2016), notably in the NSF (Gideons et al., 2014; Zanos et al., 2016). Some studies revealed synergistic antidepressant-like effects of a combination of selective serotonin reuptake inhibitors and NMDA receptor antagonists (Maj et al., 1996; Rogoz et al., 2009; Rogoz et al., 2002). In this study, we investigated the differential effects

of the chronic treatment with fluoxetine and the acute local administration of the GluN2B antagonist Ro25-6981 in the vDG alone or in combination in a mouse model of anxiety/depression in the NSF, as well as their differential neurochemical effects. Ro25-6981 was injected locally into the vDG, where the adult-born GCs with unique properties depending on GluN2B expression are found, after a chronic fluoxetine treatment. We reported that Ro25-6981 decreased the latency to feed in the NSF, in the same way as fluoxetine. Moreover, using microdialysis, we reported that Ro25-6981 increased glutamate extracellular levels, as well as GABA extracellular levels in the vDG. The increase in the glutamatergic transmission was independent of the fluoxetine treatment. Conversely, the increase in the GABAergic transmission was only present after the chronic fluoxetine treatment.

A previous experiment indicated that the conditional deletion of the GluN2B subunit specifically in adult-born GCs, prior to the onset of fluoxetine administration, prevented the decrease in latency to feed of fluoxetine in the neurogenesis-dependent NSF test (Tannenholz et al., 2016). Thus, it could be hypothesized that an injection of Ro25-6981 in the vDG could inhibit GluN2B-mediated activity in adult-born GCs, and then prevent the antidepressant-like effect of fluoxetine in a neurogenesis-dependent test. Actually, in our experiment, Ro25-6981 administration in the vDG did not prevent the fluoxetine antidepressant-like activity. More this administration induced an antidepressant-like effect in CORT treated mice. This Ro25-6981 antidepressant-like effect has already been described in the literature (Li et al., 2010; Li et al., 2011; Talbot et al., 2016) but with systemic administration. This suggests that genetic and pharmacological approaches give different behavioral effects in the NSF, as the results obtained by Tannenholz wherein deleting the GluN2B subunit from adult-born GCs decreased the antidepressant-like effect of fluoxetine (Tannenholz et al., 2016). The attenuation of the effects of fluoxetine in the NSF in their experiment may be explained by fluoxetine's selective antagonism of GluN2B-containing NMDA receptors property, which was demonstrated *in vitro* using whole cell patch-clamp recordings (Kiss et al., 2012). Thus, the deletion of the GluN2B subunit specifically from adult-born GCs would prevent a part of fluoxetine antidepressant-like activity dependent of GluN2B-containing NMDA receptors, which would result in the attenuation of the neurogenesis-dependent effects of fluoxetine. Ro25-6981 was previously found to produce rapid antidepressant-like activities, and to interact with dopamine, norepinephrine and serotonin transporters *in vitro* (Keiser et al., 2009; Talbot et al., 2016). This indicates that there could be a common part in the mechanisms of action of Ro25-6981 and of fluoxetine, independent of adult hippocampal neurogenesis.

Previous studies from the same authors assessed in mice the effect of another GluN2B antagonist, traxoprodil, at an inactive dose, on the activity of several antidepressants acting through diverse mechanisms, including several selective serotonin reuptake inhibitors - paroxetine, escitalopram and fluoxetine- at a sub-therapeutic dose. The GluN2B antagonist injected intraperitoneally in combination with the antidepressants reduced the immobility time in the forced swim test, while they had no effect alone (Poleszak et al., 2016; Stasiuk et al., 2017). These studies confirmed the role of the GluN2B subunit of NMDA receptors for the antidepressant-like effect of antidepressants. In our study, Ro25-6981 antidepressant-like effect was independent of the fluoxetine antidepressant-like effect. The combination of the fluoxetine treatment and the Ro25-6981 local injection added no effect on the antidepressant-like effect of Ro25-6981 or fluoxetine. Although this could be due to the dose of fluoxetine used, already fully effective, this implies that fluoxetine and Ro25-6981 have distinct mechanisms of action, since there is no synergic effect (Jia et al., 2009). In any case, Ro25-6981 and fluoxetine did not prevent or cancel their antidepressant-like effect.

To further explore the distinct mechanisms of action of Ro25-6981 or fluoxetine, we measured extracellular glutamate and GABA levels in the vDG. We found that Ro25-6981 increased extracellular glutamate and GABA levels in the vDG. These increases were independent or dependent of the fluoxetine treatment, respectively.

Concerning the glutamatergic transmission in the vDG, this increase of glutamate extracellular levels following Ro25-6981 administration with or without chronic fluoxetine seems consistent with the fast antidepressant effect of ketamine, which is also a NMDA antagonist. A local administration in the medial prefrontal cortex of ketamine or of its metabolite (2R,6R)-hydroxynorketamine induced an antidepressant-like effect in mice in the forced swim test. In this experiment, the metabolite of ketamine increased glutamate extracellular levels in the medial prefrontal cortex, and ketamine also tended to increase these levels (Pham et al., 2018). Similarly, studies in humans confirmed that ketamine increased glutamate release in the prefrontal cortex (Abdallah et al., 2018), as well as glutamate extracellular levels in the hippocampus (Kraguljac et al., 2017).

Concerning the GABAergic transmission, chronic fluoxetine treatment seemed to impact the effect of Ro25-6981, in opposition to behavior and in the glutamatergic transmission, where there was no interdependence between Ro25-6981 and fluoxetine. The fluoxetine-dependent increase in GABA extracellular levels seems consistent with the effects

of a local administration of ketamine on GABA extracellular levels in the medial prefrontal cortex (Pham et al., 2018). In another study, acute intraperitoneal injection with ketamine or with a high dose of Ro25-6981 (10 mg/kg) induced a GABA upregulation in the medial prefrontal cortex. This GABA upregulation with Ro25-6981 occurred 30 to 38 min after the injection, which confirms the transient increase in the GABAergic transmission we observed (Chowdhury et al., 2017). In this study only with the highest dose (10 mg/kg) of Ro25-6981, induced this GABAergic effect, suggesting that in our experiment, a higher dose of Ro25-6981 could increase the GABAergic transmission, independently of fluoxetine treatment. This increase in the GABAergic transmission seems to be specific to an acute administration of Ro25-6981. Indeed, the chronic Ro25-6981 treatment (17 to 21 days) of rat hippocampal slice cultures would decrease action potential-dependent GABA release. In this experiment, inhibitory postsynaptic current was studied by electrophysiological recordings in dentate GCs and interneurons at the dentate GC layer/hilus border. The spontaneous inhibitory postsynaptic current frequency was decreased in both cells following the chronic Ro25-6981 treatment (He et al., 2012). To impact the effect of Ro25-6981, fluoxetine could influence the expression of GluN2B subunit. The expression of GluN2A and GluN2B were observed in the prefrontal cortex and in the hippocampus using western blot analysis (Stan et al., 2015). This study showed that the expression of GluN2A subunit was decreased in the hippocampus, and both GluN2A and GluN2B subunits levels were decreased in the prefrontal cortex after 4 weeks of fluoxetine treatment (Stan et al., 2015). Furthermore, in a new proposed model based on zinc deficiency, allowing to assess antidepressant-like effects, the GluN2A and GluN2B subunits expression in the hippocampus was increased. In this model, chronic fluoxetine treatment decreased both GluN2A and GluN2B subunits expression in the hippocampus (Doboszewska et al., 2015). Thus, depending on brain regions and on the animal model used, fluoxetine effects on GluN2A and GluN2B expression can be variable. Consequently, fluoxetine has a major influence on the expression of GluN2B in the hippocampus. In our conditions and in the CORT model, fluoxetine increased GluN2B expression (Supplementary Figure 2). This increase of GluN2B subunit levels following chronic fluoxetine treatment could lead to the increase in the GABAergic transmission after the local injection of the GluN2B antagonist in the vDG.

Our study has two limitations, the mode of administration and the doses of Ro25-6981 and of fluoxetine. Concerning the acute local administration, we decided to target the vDG, known to be implicated in the mood regulation and affected by adult hippocampal

neurogenesis. The density of cells in the hilus is relatively low then we cannot exclude that the local injection in the vDG may have spread across the hippocampus and thus target other neurons or interneurons. As GluN2A and GluN2B subunits are the predominant subunits in hippocampal GCs and in hippocampal pyramidal neurons (Kannangara et al., 2014; Kheirbek et al., 2012; Rauner & Kohr, 2011), Ro25-6981 local injection in the vDG may decreased GluN2B-mediated activity in these several cells. Then, the effects of Ro25-6981 would not be mainly the consequence of GluN2B-mediated activity inhibition in adult-born GCs but also of its inhibition in the pyramidal neurons of the trisynaptic circuit. Moreover, the effective dose of fluoxetine used did not allow to investigate a possible additive or synergistic effect between Ro25-6981 and fluoxetine. Likewise, the dose used of 2 µg of Ro25-6981 could limit the selectivity for GluN2B-containing NMDA receptors (Davies et al., 2013; Go et al., 2016; Zhang, Liu, et al., 2008). It would be interesting to explore the effects of a lower dose of fluoxetine and of Ro25-6981 in future studies.

CONCLUSIONS

In conclusion, our pre-clinical study revealed that Ro25-6981 administration in the vDG induced an antidepressant-like effect in the NSF but did not affect the effect of fluoxetine. On the other hand, we revealed a differential effect of Ro25-6981 on glutamate and GABA transmissions in the vDG: Ro25-6981 increased glutamatergic transmission independently of fluoxetine treatment whereas its increases GABAergic transmission selectively in fluoxetine treated mice. This effect on GABAergic transmission could be due to the increase in GluN2B expression in the vDG induced by the chronic fluoxetine treatment, which could be resulting from the increased adult hippocampal neurogenesis. However, this point needs to be further studied.

Acknowledgements

Dr. Julie Doan was supported by a fellowship from the “Ecole Doctorale 569: Innovation Therapeutique”. The authors would like to thank the animal care facility of SFR-UMRS Institut Paris Saclay d’Innovation Thérapeutique of University Paris-Saclay for their technical assistance. A special thanks to Audrey Solgadi and Pierre Chaminade from the platform “Service d’Analyse des Médicaments et Métabolites (SAMM)” of the Faculty of Pharmacie for the mass spectrometry equipment. Our team CESP, Inserm/University Paris-Saclay provided the necessary resources to perform this study.

Conflict of interest

None for this work.

Authors’ contribution

All authors contributed to the conception and design of the study: JD, CD, IMD, DJD, JP and LT contributed to the acquisition of data. JD, AMG and LT wrote the manuscript. All the authors contributed to analysis of data, drafting the article for key intellectual content.

REFERENCES

- Abdallah, C. G., De Feyter, H. M., Averill, L. A., Jiang, L., Averill, C. L., Chowdhury, G. M. I., . . . Mason, G. F. (2018). The effects of ketamine on prefrontal glutamate neurotransmission in healthy and depressed subjects. *Neuropsychopharmacology*, *43*(10), 2154-2160. doi: 10.1038/s41386-018-0136-3
- Anson, L. C., Chen, P. E., Wyllie, D. J., Colquhoun, D., & Schoepfer, R. (1998). Identification of amino acid residues of the NR2A subunit that control glutamate potency in recombinant NR1/NR2A NMDA receptors. *J Neurosci*, *18*(2), 581-589.
- Canales, Juan J. (2016). *Adult Neurogenesis in the Hippocampus: Health, Psychopathology, and Brain Disease*.
- Chowdhury, G. M., Zhang, J., Thomas, M., Banasr, M., Ma, X., Pittman, B., . . . Sanacora, G. (2017). Transiently increased glutamate cycling in rat PFC is associated with rapid onset of antidepressant-like effects. *Mol Psychiatry*, *22*(1), 120-126. doi: 10.1038/mp.2016.34
- Commissaris, Randall L. (1993). Chapter 17 - Conflict behaviors as animal models for the study of anxiety. In F. van Haaren (Ed.), *Techniques in the Behavioral and Neural Sciences* (Vol. 10, pp. 443-474): Elsevier.
- David, D. J., Samuels, B. A., Rainer, Q., Wang, J. W., Marsteller, D., Mendez, I., . . . Hen, R. (2009). Neurogenesis-dependent and -independent effects of fluoxetine in an animal model of anxiety/depression. *Neuron*, *62*(4), 479-493. doi: 10.1016/j.neuron.2009.04.017
- Davies, D. A., Greba, Q., & Howland, J. G. (2013). GluN2B-containing NMDA receptors and AMPA receptors in medial prefrontal cortex are necessary for odor span in rats. *Front Behav Neurosci*, *7*, 183. doi: 10.3389/fnbeh.2013.00183
- Davies, D. A., Greba, Q., Selk, J. C., Catton, J. K., Baillie, L. D., Mulligan, S. J., & Howland, J. G. (2017). Interactions between medial prefrontal cortex and dorsomedial striatum are necessary for odor span capacity in rats: role of GluN2B-containing NMDA receptors. *Learn Mem*, *24*(10), 524-531. doi: 10.1101/lm.045419.117
- Defaix, C., Solgadi, A., Pham, T. H., Gardier, A. M., Chaminade, P., & Tritschler, L. (2018). Rapid analysis of glutamate, glutamine and GABA in mice frontal cortex microdialysis samples using HPLC coupled to electrospray tandem mass spectrometry. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, *152*, 31-38. doi: 10.1016/j.jpba.2018.01.039
- Diaz, S. L., Doly, S., Narboux-Neme, N., Fernandez, S., Mazot, P., Banas, S. M., . . . Maroteaux, L. (2012). 5-HT(2B) receptors are required for serotonin-selective antidepressant actions. *Mol Psychiatry*, *17*(2), 154-163. doi: 10.1038/mp.2011.159
- Doan, J., Gardier, A. M., & Tritschler, L. (2019). Role of adult-born granule cells in the hippocampal functions: Focus on the GluN2B-containing NMDA receptors. *Eur Neuropsychopharmacol*, *29*(10), 1065-1082. doi: 10.1016/j.euroneuro.2019.07.135
- Doboszewska, U., Szewczyk, B., Sowa-Kucma, M., Mlyniec, K., Rafalo, A., Ostachowicz, B., . . . Nowak, G. (2015). Antidepressant activity of fluoxetine in the zinc deficiency model in rats involves the NMDA receptor complex. *Behav Brain Res*, *287*, 323-330. doi: 10.1016/j.bbr.2015.03.064
- Duman, R. S. (2018). Ketamine and rapid-acting antidepressants: a new era in the battle against depression and suicide. *F1000Res*, *7*. doi: 10.12688/f1000research.14344.1
- Gideons, E. S., Kavalali, E. T., & Monteggia, L. M. (2014). Mechanisms underlying differential effectiveness of memantine and ketamine in rapid antidepressant responses. *Proc Natl Acad Sci U S A*, *111*(23), 8649-8654. doi: 10.1073/pnas.1323920111

- Go, B. S., Barry, S. M., & McGinty, J. F. (2016). Glutamatergic neurotransmission in the prefrontal cortex mediates the suppressive effect of intra-prelimbic cortical infusion of BDNF on cocaine-seeking. *Eur Neuropsychopharmacol*, *26*(12), 1989-1999. doi: 10.1016/j.euroneuro.2016.10.002
- Gourley, S. L., & Taylor, J. R. (2009). Recapitulation and reversal of a persistent depression-like syndrome in rodents. *Curr Protoc Neurosci, Chapter 9, Unit 9 32*. doi: 10.1002/0471142301.ns0932s49
- Gruden, M. A., Ratmirov, A. M., Storozheva, Z. I., Solovieva, O. A., Sherstnev, V. V., & Sewell, R. D. E. (2018). The Neurogenesis Actuator and NR2B/NMDA Receptor Antagonist Ro25-6981 Consistently Improves Spatial Memory Retraining Via Brain Region-Specific Gene Expression. *J Mol Neurosci*, *65*(2), 167-178. doi: 10.1007/s12031-018-1083-5
- He, S., Shao, L. R., Rittase, W. B., & Bausch, S. B. (2012). Increased Kv1 channel expression may contribute to decreased sIPSC frequency following chronic inhibition of NR2B-containing NMDAR. *Neuropsychopharmacology*, *37*(6), 1338-1356. doi: 10.1038/npp.2011.320
- Jia, J., Zhu, F., Ma, X., Cao, Z., Cao, Z. W., Li, Y., . . . Chen, Y. Z. (2009). Mechanisms of drug combinations: interaction and network perspectives. *Nat Rev Drug Discov*, *8*(2), 111-128. doi: 10.1038/nrd2683
- Kannagara, T. S., Bostrom, C. A., Ratzlaff, A., Thompson, L., Cater, R. M., Gil-Mohapel, J., & Christie, B. R. (2014). Deletion of the NMDA receptor GluN2A subunit significantly decreases dendritic growth in maturing dentate granule neurons. *PLoS One*, *9*(8), e103155. doi: 10.1371/journal.pone.0103155
- Keiser, M. J., Setola, V., Irwin, J. J., Laggner, C., Abbas, A. I., Hufeisen, S. J., . . . Roth, B. L. (2009). Predicting new molecular targets for known drugs. *Nature*, *462*(7270), 175-181. doi: 10.1038/nature08506
- Kheirbek, M. A., Tannenholz, L., & Hen, R. (2012). NR2B-dependent plasticity of adult-born granule cells is necessary for context discrimination. *J Neurosci*, *32*(25), 8696-8702. doi: 10.1523/JNEUROSCI.1692-12.2012
- Kiss, J. P., Szasz, B. K., Fodor, L., Mike, A., Lenkey, N., Kurko, D., . . . Vizi, E. S. (2012). GluN2B-containing NMDA receptors as possible targets for the neuroprotective and antidepressant effects of fluoxetine. *Neurochem Int*, *60*(2), 170-176. doi: 10.1016/j.neuint.2011.12.005
- Kraguljac, N. V., Frolich, M. A., Tran, S., White, D. M., Nichols, N., Barton-McArdle, A., . . . Lahti, A. C. (2017). Ketamine modulates hippocampal neurochemistry and functional connectivity: a combined magnetic resonance spectroscopy and resting-state fMRI study in healthy volunteers. *Mol Psychiatry*, *22*(4), 562-569. doi: 10.1038/mp.2016.122
- Lang, E., Mallien, A. S., Vasilescu, A. N., Hefter, D., Luoni, A., Riva, M. A., . . . Inta, D. (2018). Molecular and cellular dissection of NMDA receptor subtypes as antidepressant targets. *Neurosci Biobehav Rev*, *84*, 352-358. doi: 10.1016/j.neubiorev.2017.08.012
- Laube, B., Hirai, H., Sturgess, M., Betz, H., & Kuhse, J. (1997). Molecular determinants of agonist discrimination by NMDA receptor subunits: analysis of the glutamate binding site on the NR2B subunit. *Neuron*, *18*(3), 493-503. doi: 10.1016/s0896-6273(00)81249-0
- Laube, B., Kuhse, J., & Betz, H. (1998). Evidence for a tetrameric structure of recombinant NMDA receptors. *J Neurosci*, *18*(8), 2954-2961.

- Li, N., Lee, B., Liu, R. J., Banasr, M., Dwyer, J. M., Iwata, M., . . . Duman, R. S. (2010). mTOR-dependent synapse formation underlies the rapid antidepressant effects of NMDA antagonists. *Science*, *329*(5994), 959-964. doi: 10.1126/science.1190287
- Li, N., Liu, R. J., Dwyer, J. M., Banasr, M., Lee, B., Son, H., . . . Duman, R. S. (2011). Glutamate N-methyl-D-aspartate receptor antagonists rapidly reverse behavioral and synaptic deficits caused by chronic stress exposure. *Biol Psychiatry*, *69*(8), 754-761. doi: 10.1016/j.biopsych.2010.12.015
- Maj, J., Rogoz, Z., Skuza, G., & Wedzony, K. (1996). The synergistic effect of fluoxetine on the locomotor hyperactivity induced by MK-801, a non-competitive NMDA receptor antagonist. *J Neural Transm (Vienna)*, *103*(1-2), 131-146. doi: 10.1007/BF01292622
- Marin-Burgin, A., Mongiat, L. A., Pardi, M. B., & Schinder, A. F. (2012). Unique processing during a period of high excitation/inhibition balance in adult-born neurons. *Science*, *335*(6073), 1238-1242. doi: 10.1126/science.1214956
- Mendez-David, I., David, D. J., Darcet, F., Wu, M. V., Kerdine-Romer, S., Gardier, A. M., & Hen, R. (2014). Rapid anxiolytic effects of a 5-HT(4) receptor agonist are mediated by a neurogenesis-independent mechanism. *Neuropsychopharmacology*, *39*(6), 1366-1378. doi: 10.1038/npp.2013.332
- Pham, T. H., Defaix, C., Xu, X., Deng, S. X., Fabresse, N., Alvarez, J. C., . . . Gardier, A. M. (2018). Common Neurotransmission Recruited in (R,S)-Ketamine and (2R,6R)-Hydroxynorketamine-Induced Sustained Antidepressant-like Effects. *Biol Psychiatry*, *84*(1), e3-e6. doi: 10.1016/j.biopsych.2017.10.020
- Pham, T. H., & Gardier, A. M. (2019). Fast-acting antidepressant activity of ketamine: highlights on brain serotonin, glutamate, and GABA neurotransmission in preclinical studies. *Pharmacol Ther*, *199*, 58-90. doi: 10.1016/j.pharmthera.2019.02.017
- Poleszak, E., Stasiuk, W., Szopa, A., Wyska, E., Serefko, A., Oniszczuk, A., . . . Wlaz, P. (2016). Traxoprodil, a selective antagonist of the NR2B subunit of the NMDA receptor, potentiates the antidepressant-like effects of certain antidepressant drugs in the forced swim test in mice. *Metab Brain Dis*, *31*(4), 803-814. doi: 10.1007/s11011-016-9810-5
- Rauner, C., & Kohr, G. (2011). Triheteromeric NR1/NR2A/NR2B receptors constitute the major N-methyl-D-aspartate receptor population in adult hippocampal synapses. *J Biol Chem*, *286*(9), 7558-7566. doi: 10.1074/jbc.M110.182600
- Rogoz, Z., Kubera, M., Rogoz, K., Basta-Kaim, A., & Budziszewska, B. (2009). Effect of co-administration of fluoxetine and amantadine on immunoendocrine parameters in rats subjected to a forced swimming test. *Pharmacol Rep*, *61*(6), 1050-1060. doi: 10.1016/s1734-1140(09)70167-7
- Rogoz, Z., Skuza, G., Maj, J., & Danysz, W. (2002). Synergistic effect of uncompetitive NMDA receptor antagonists and antidepressant drugs in the forced swimming test in rats. *Neuropharmacology*, *42*(8), 1024-1030. doi: 10.1016/s0028-3908(02)00055-2
- Rush, A. J., Fava, M., Wisniewski, S. R., Lavori, P. W., Trivedi, M. H., Sackeim, H. A., . . . Group, Star D. Investigators. (2004). Sequenced treatment alternatives to relieve depression (STAR*D): rationale and design. *Control Clin Trials*, *25*(1), 119-142. doi: 10.1016/s0197-2456(03)00112-0
- Santarelli, L., Saxe, M., Gross, C., Surget, A., Battaglia, F., Dulawa, S., . . . Hen, R. (2003). Requirement of hippocampal neurogenesis for the behavioral effects of antidepressants. *Science*, *301*(5634), 805-809. doi: 10.1126/science.1083328
- Saxe, M. D., Battaglia, F., Wang, J. W., Malleret, G., David, D. J., Monckton, J. E., . . . Drew, M. R. (2006). Ablation of hippocampal neurogenesis impairs contextual fear conditioning and synaptic plasticity in the dentate gyrus. *Proc Natl Acad Sci U S A*, *103*(46), 17501-17506. doi: 10.1073/pnas.0607207103

- Schmidt-Hieber, C., Jonas, P., & Bischofberger, J. (2004). Enhanced synaptic plasticity in newly generated granule cells of the adult hippocampus. *Nature*, *429*(6988), 184-187. doi: 10.1038/nature02553
- Schmittgen, T. D., & Livak, K. J. (2008). Analyzing real-time PCR data by the comparative C(T) method. *Nat Protoc*, *3*(6), 1101-1108. doi: 10.1038/nprot.2008.73
- Snyder, J. S., Kee, N., & Wojtowicz, J. M. (2001). Effects of adult neurogenesis on synaptic plasticity in the rat dentate gyrus. *J Neurophysiol*, *85*(6), 2423-2431.
- Stan, T. L., Alvarsson, A., Branzell, N., Sousa, V. C., & Svenningsson, P. (2014). NMDA receptor antagonists ketamine and Ro25-6981 inhibit evoked release of glutamate in vivo in the subiculum. *Transl Psychiatry*, *4*, e395. doi: 10.1038/tp.2014.39
- Stan, T. L., Sousa, V. C., Zhang, X., Ono, M., & Svenningsson, P. (2015). Lurasidone and fluoxetine reduce novelty-induced hypophagia and NMDA receptor subunit and PSD-95 expression in mouse brain. *Eur Neuropsychopharmacol*, *25*(10), 1714-1722. doi: 10.1016/j.euroneuro.2015.07.007
- Stasiuk, W., Szopa, A., Serefko, A., Wyska, E., Swiader, K., Dudka, J., . . . Poleszak, E. (2017). Influence of the selective antagonist of the NR2B subunit of the NMDA receptor, traxoprodil, on the antidepressant-like activity of desipramine, paroxetine, milnacipran, and bupropion in mice. *J Neural Transm (Vienna)*, *124*(3), 387-396. doi: 10.1007/s00702-016-1657-8
- Talbot, J. N., Geffert, L. M., Jorvig, J. E., Goldstein, R. I., Nielsen, C. L., Wolters, N. E., . . . Surratt, C. K. (2016). Rapid and sustained antidepressant properties of an NMDA antagonist/monoamine reuptake inhibitor identified via transporter-based virtual screening. *Pharmacol Biochem Behav*, *150-151*, 22-30. doi: 10.1016/j.pbb.2016.08.007
- Tannenholz, L., Hen, R., & Kheirbek, M. A. (2016). GluN2B-Containing NMDA Receptors on Adult-Born Granule Cells Contribute to the Antidepressant Action of Fluoxetine. *Front Neurosci*, *10*, 242. doi: 10.3389/fnins.2016.00242
- Wang, S., Scott, B. W., & Wojtowicz, J. M. (2000). Heterogeneous properties of dentate granule neurons in the adult rat. *J Neurobiol*, *42*(2), 248-257.
- Wisniewski, S. R., Rush, A. J., Balasubramani, G. K., Trivedi, M. H., Nierenberg, A. A., & Investigators, Stard. (2006). Self-rated global measure of the frequency, intensity, and burden of side effects. *J Psychiatr Pract*, *12*(2), 71-79. doi: 10.1097/00131746-200603000-00002
- Wu, M. V., & Hen, R. (2014). Functional dissociation of adult-born neurons along the dorsoventral axis of the dentate gyrus. *Hippocampus*, *24*(7), 751-761. doi: 10.1002/hipo.22265
- Zanos, P., Moaddel, R., Morris, P. J., Georgiou, P., Fischell, J., Elmer, G. I., . . . Gould, T. D. (2016). NMDAR inhibition-independent antidepressant actions of ketamine metabolites. *Nature*, *533*(7604), 481-486. doi: 10.1038/nature17998
- Zhang, X. H., Liu, F., Chen, Q., Zhang, C. L., Zhuo, M., Xiong, Z. Q., & Li, B. M. (2008). Conditioning-strength dependent involvement of NMDA NR2B subtype receptor in the basolateral nucleus of amygdala in acquisition of auditory fear memory. *Neuropharmacology*, *55*(2), 238-246. doi: 10.1016/j.neuropharm.2008.05.030
- Zhang, X. H., Wu, L. J., Gong, B., Ren, M., Li, B. M., & Zhuo, M. (2008). Induction- and conditioning-protocol dependent involvement of NR2B-containing NMDA receptors in synaptic potentiation and contextual fear memory in the hippocampal CA1 region of rats. *Mol Brain*, *1*, 9. doi: 10.1186/1756-6606-1-9

LEGENDS

Figure 1 - Bilateral intra-ventral DG Ro25-6981 administration induced an antidepressive-like response, fluoxetine-independent. (A) Timeline of the experiment. (B and C) Effects of 6 weeks of fluoxetine treatment and of local Ro25-6981 administration on corticosterone-induced depression-related behavior in the NSF over 15 min. Results were represented according to Kaplan-Meier survival analysis (B) and according to mean of latency to feed in seconds (C). Values are mean \pm SEM. * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.005$ versus CORT/VEH-Veh group.

Figure 2 - A bilateral intra-ventral DG Ro25-6981 administration in chronically treated mice with fluoxetine increased vDG glutamatergic and GABAergic transmission. (A) Timeline of the experiment. Time course (B) and AUC (C) of vDG extracellular Glutamate levels following a chronic fluoxetine treatment and local Ro25-6981 administration in an anxiety/depression-like model induced by chronic corticosterone administration. Effects of the treatment on the time course (D) and AUC values (E) of vDG extracellular GABA levels. For time courses, results (in percentage of the basal level, calculated as the amount of neurotransmission outflow for the 120-minute of samples collection before the local administration of Ro25-6981 or vehicle) were calculated as the ratio of the amount of neurotransmission for the 0- to 60-minute period of samples collection to the mean of the samples collected for 120 minutes before the local administration of Ro25-6981 or vehicle. The AUC values were calculated as the amount of neurotransmission outflow for the 60-minute of samples collection following the local administration of Ro25-6981 or vehicle, and expressed as percentage of the basal level. Values are mean \pm SEM. ** $p < 0.01$ versus CORT/VEH group. * $p < 0.05$ versus CORT/VEH-Veh group; # $p < 0.05$, #### $p < 0.005$ versus CORT/FLX-Veh group; \$\$ $p < 0.01$, \$\$\$ $p < 0.005$ versus CORT/VEH-Ro group.

Figure 1

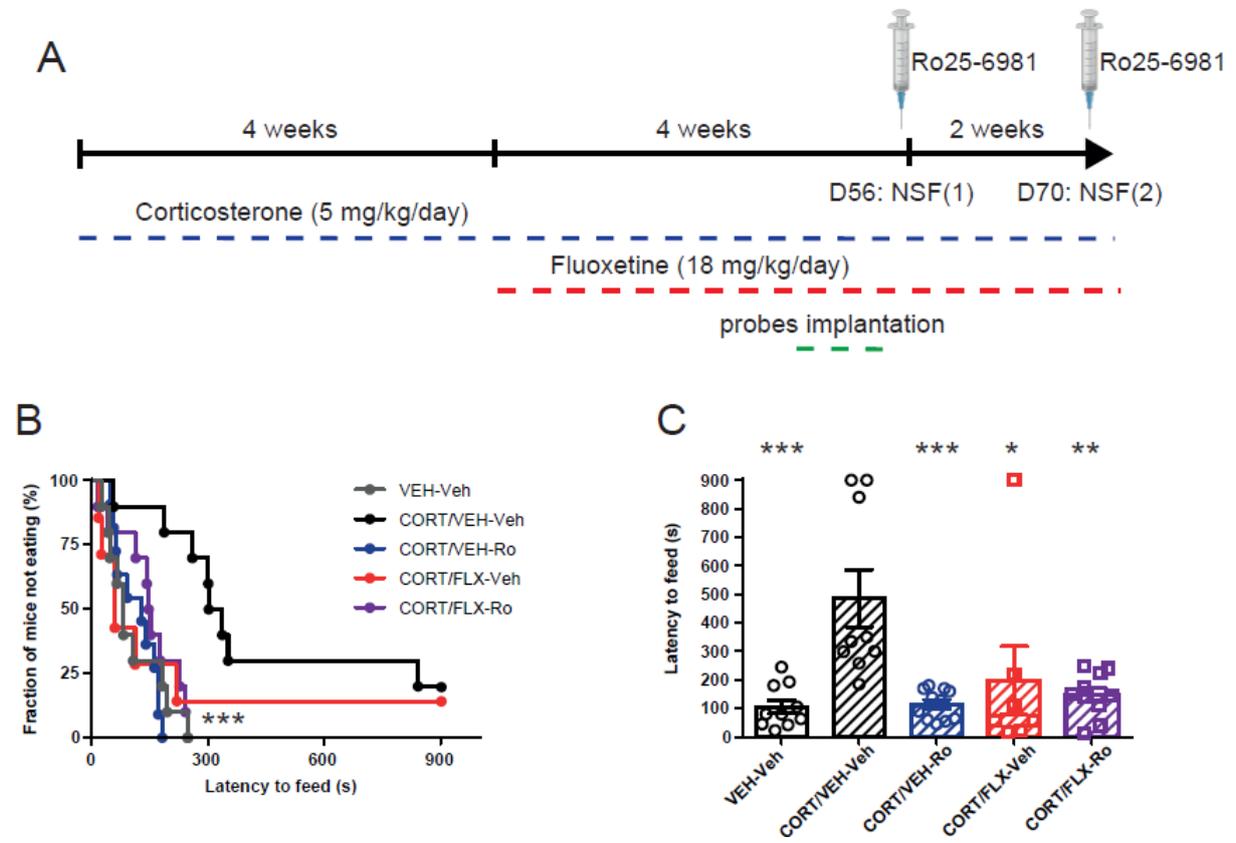
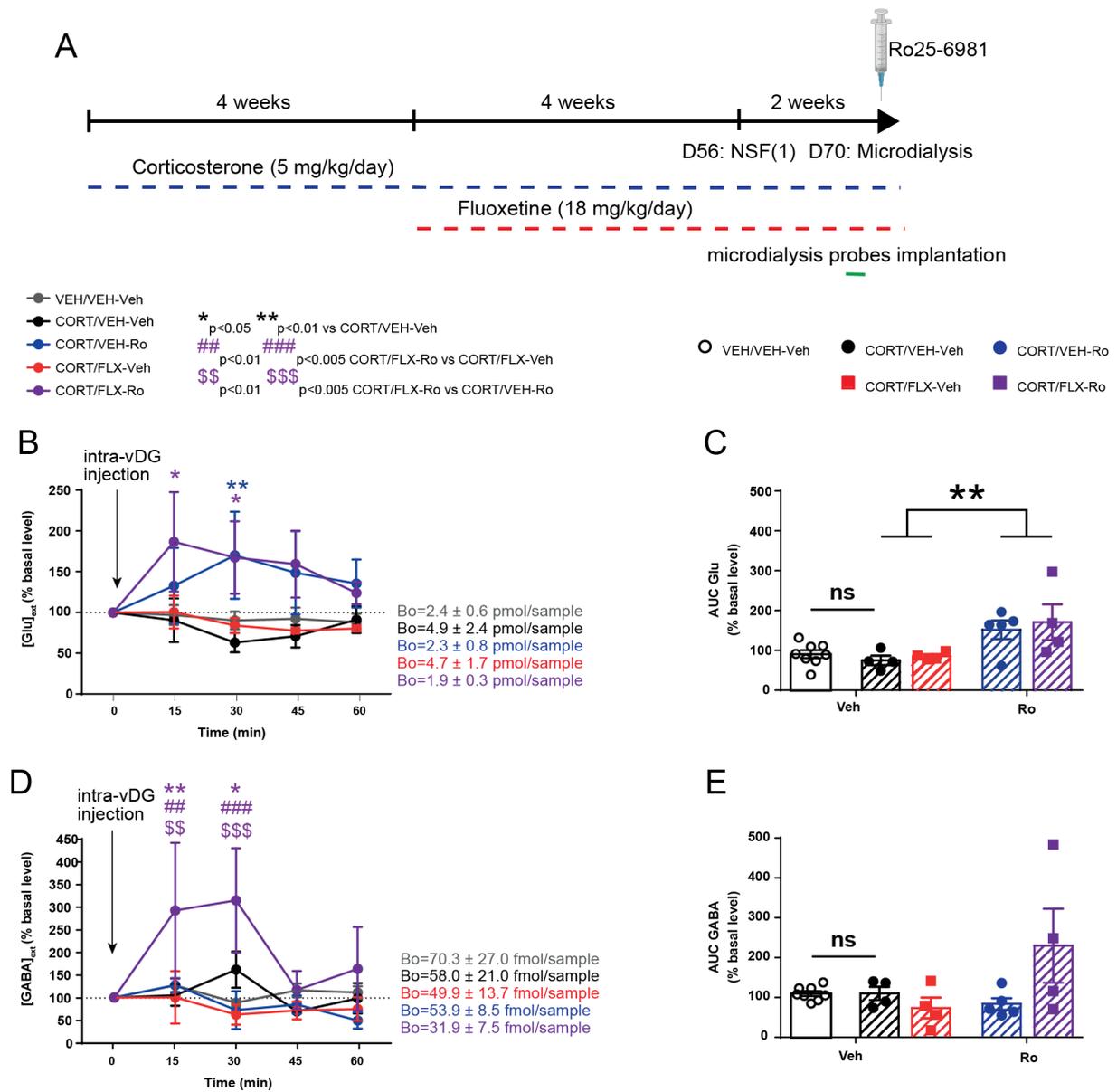


Figure 2

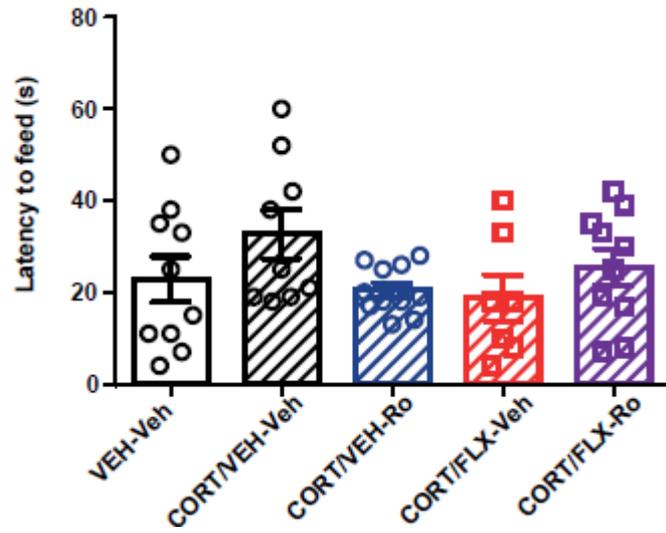


SUPPLEMENTARY FIGURE LEGENDS

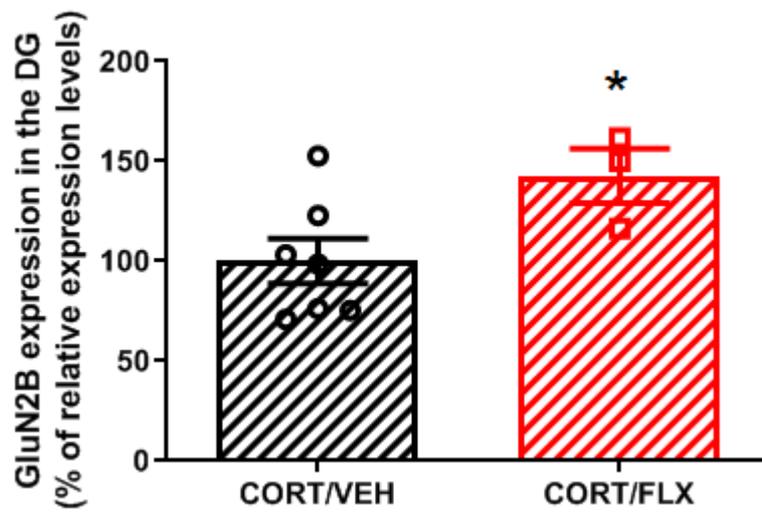
Supplementary Figure 1. NSF home cage latency to feed in the NSF(2) trial. Values are mean \pm SEM.

Supplementary Figure 2. Chronic fluoxetine treatment increased GRIN2B gene expression in the vDG. Data are expressed as mean percentage of relative expression in CORT/VEH mice \pm SEM. * $p < 0.05$ versus CORT/VEH group.

Supplementary Figure 1



Supplementary Figure 2



Résultats complémentaires

Absence d'effet comportemental de l'administration bilatérale intra-hippocampique de Ro25-6981 :

Nous avons tout d'abord voulu évaluer l'effet comportemental dans le NSF(1) de l'administration locale intra-hippocampique de Ro25-6981 (2 µg dans chaque GD ventral) après 4 semaines de traitement avec la fluoxétine (18 mg/kg/jour) dans le modèle CORT (5 mg/kg/jour) (protocole Figure 33A). Les fibres d'injection ont été implantées bilatéralement dans le GD ventral, puis les souris ont été soumises au NSF. Ni l'analyse de survie Kaplan-Meier suivie du test du log-rank de Mantel-Cox ($p = 0,49$; Figure 33B) ni l'ANOVA à 1 facteur ($F_{4,43} = 0,89$, $p = 0,48$; Figure 33C) n'ont révélé de différences dans les latences pour se nourrir dans le nouvel environnement. De façon inattendue, l'administration chronique de corticostérone n'a pas induit de phénotype anxio-dépressif chez la souris au fond mixte 129SV/BL6. Les effets du traitement avec la fluoxétine et de l'administration locale de Ro25-6981 n'ont donc pas été évalués dans ces conditions. Ainsi, l'implantation des fibres d'injection semble interférer avec l'établissement du phénotype anxio-dépressif avec ces durées de traitements de la corticostérone et de la fluoxétine (Figure 34). Par conséquent, ils ont donc été poursuivis pendant 2 semaines supplémentaires, avant de soumettre les souris à un 2^{ème} NSF(2) (protocole Figure 33A).

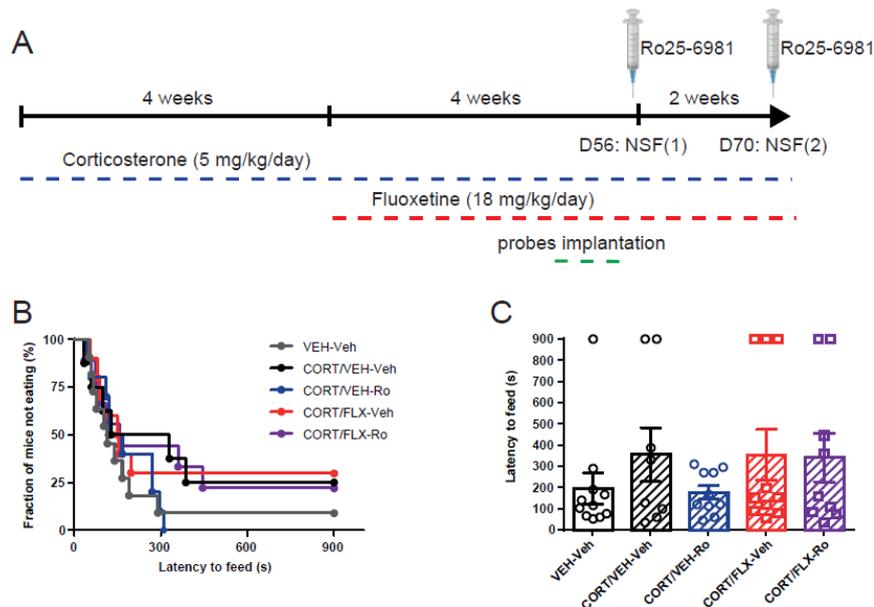


Figure 33 – Effets comportementaux dans le NSF(1) de l'administration intra-hippocampique bilatérale de Ro25-6981 après 4 semaines de traitement à la fluoxétine (18 mg/kg/jour) dans le modèle CORT chez des souris implantées avec les fibres d'injection. (A) Protocole d'étude de l'effet de l'administration locale de Ro25-6981 après 4 semaines de traitement à la fluoxétine. (B et C) Les latences pour se nourrir dans le nouvel environnement sont représentées en analyse de survie (B) et selon la moyenne \pm SEM des latences en secondes (C).

Evaluation de l'effet de type antidépresseur du traitement chronique avec la fluoxétine :

Suivant le même protocole que ci-dessus, nous avons évalué l'effet comportemental dans le NSF(1) de 4 semaines de traitement avec la fluoxétine (18 mg/kg/jour) dans le modèle CORT (5 mg/kg/jour) (protocole Figure 34A). L'analyse de survie Kaplan-Meier suivie du test du log-rank de Mantel-Cox ($p = 0,0176$; Figure 34B) ainsi que l'ANOVA à 1 facteur ($F_{2,17} = 8,21$, $p = 0,0032$) ont révélé une différence significative dans les latences pour se nourrir dans le nouvel environnement. Le test de Tukey conduit *a posteriori* indique une augmentation significative de cette latence chez les souris exposées à la corticostérone par rapport aux souris non exposées (CORT/VEH vs VEH $p < 0,01$) et une diminution significative de la latence pour se nourrir dans le nouvel environnement chez les souris exposées à la fluoxétine par rapport aux souris seulement exposées à la corticostérone (CORT/FLX vs CORT/VEH $p < 0,01$) (Figure 34C). Une ANOVA à 1 facteur n'a pas révélé de différence dans les latences pour se nourrir dans la cage d'origine ($F_{2,17} = 0,88$, $p = 0,4326$). L'appétence des souris n'est pas affectée. Le modèle étant ainsi validé, nous avons pu poursuivre le protocole de microdialyse chez ces mêmes animaux.

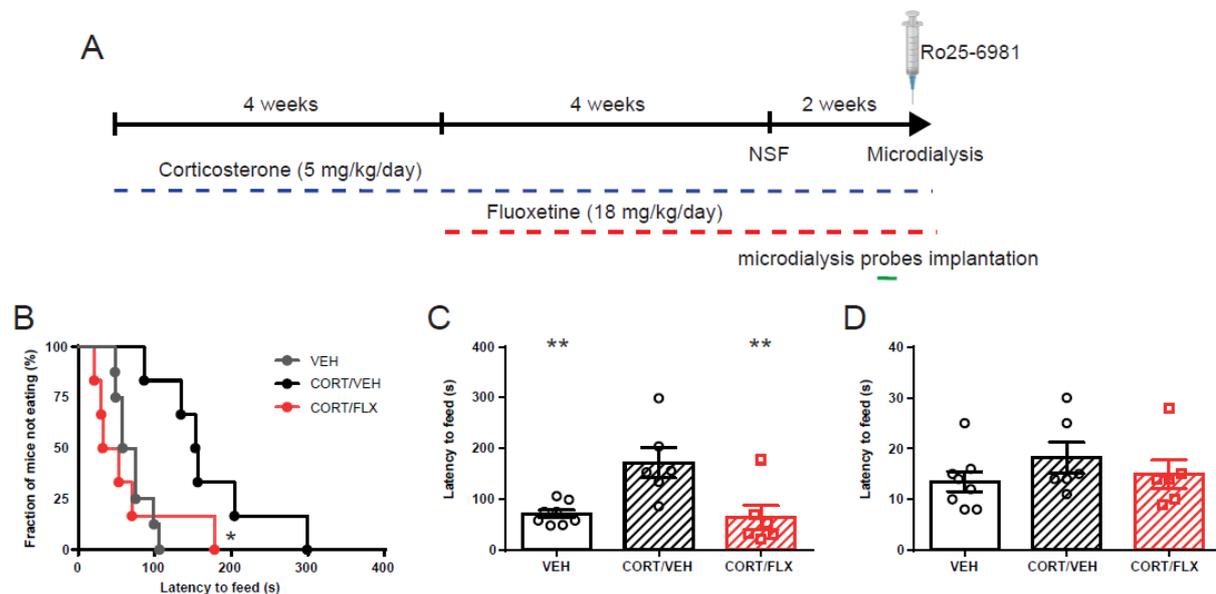


Figure 34 – Effets comportementaux dans le NSF(1) d'un traitement de 4 semaines à la fluoxétine (18 mg/kg/jour) dans le modèle CORT chez des souris sans chirurgie. (A) Protocole d'étude de l'effet de 4 semaines de traitement à la fluoxétine. (B et C) Les latences pour se nourrir dans le nouvel environnement sont représentées en analyse de survie (B) et selon la moyenne \pm SEM des latences en secondes (C). (D) Latences pour se nourrir dans la cage d'origine, exprimées en moyenne \pm SEM. ** $p < 0,01$

Evaluation de l'effet du traitement chronique avec la fluoxétine sur la prolifération des nouveaux neurones :

Dans ce second objectif, nous avons souhaité cibler les jeunes neurones par une approche pharmacologique par l'administration locale bilatérale de Ro25-6981 après un traitement chronique à la fluoxétine. Nous avons supposé que ce traitement chronique avec un ISRS engendrerait une stimulation des étapes de neurogenèse adulte hippocampique, augmentant ainsi le nombre de jeunes neurones exprimant les récepteurs NMDA contenant la sous-unité GluN2B. Cette hypothèse, supportée par la littérature (Santarelli et al., 2003; J. W. Wang et al., 2008), indiquerait que chez les souris exposées au traitement chronique avec la fluoxétine, le Ro25-6981 pourrait cibler un nombre plus important de jeunes neurones.

Pour vérifier l'augmentation de l'activité proliférative après le traitement chronique avec la fluoxétine, nous avons marqué les neurones de l'hippocampe en prolifération par une détection de Ki67 par immunohistochimie (Figure 35A). Une ANOVA à 1 facteur a révélé une différence significative des neurones en division entre les différents groupes ($F_{2,15} = 12,84$, $p = 0,0006$). Le test du Tukey conduit *a posteriori* indique que les animaux traités avec la fluoxétine ont significativement plus de neurones en division dans l'hippocampe vis-à-vis des animaux n'ayant pas reçu de corticostérone ($p < 0,05$) et vis-à-vis des animaux exposés à la corticostérone ($p < 0,005$) (Figure 35B). La fluoxétine stimule bien la prolifération des jeunes neurones dans notre expérience.

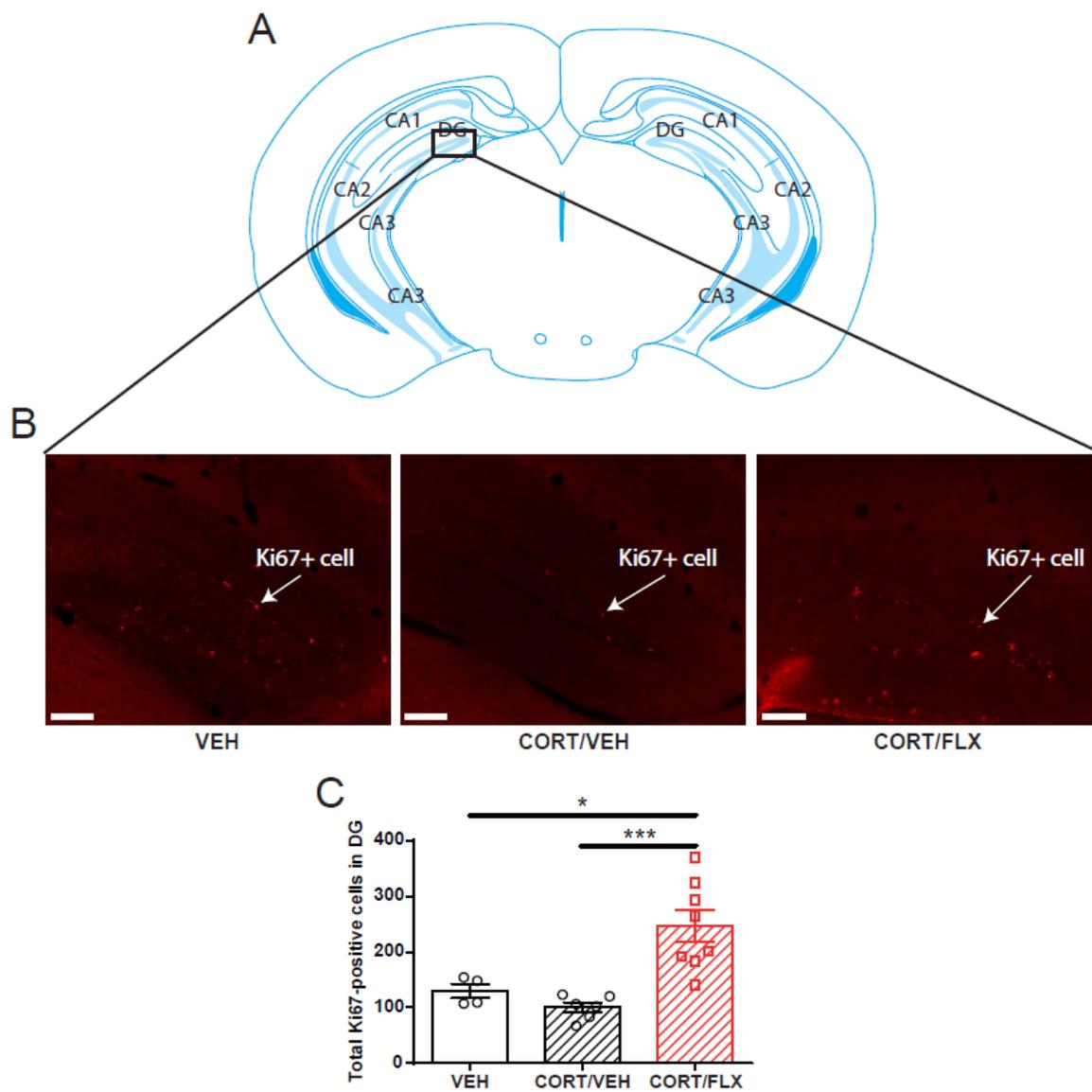


Figure 35 – Augmentation de l'activité proliférative après le traitement chronique avec la fluoxétine. (A) Schéma du DG sur une coupe frontale à approximativement - 3 mm du bregma, provenant de l'atlas du cerveau de souris de Franklin et Paxinos (2007). (B) Images représentatives du marquage Ki67 sur des coupes du GD chez des animaux n'ayant pas reçu de corticostérone, ou en ayant reçu avec la fluoxétine ou non. La barre d'échelle représente 100 μ m. (C) Le comptage des neurones exprimant Ki67 a été réalisé sur 1/6 de l'hippocampe. Les valeurs sont exprimées en moyenne \pm SEM. * $p < 0,05$, *** $p < 0,005$

En conclusion, ce travail a démontré l'effet de type antidépresseur de l'administration locale d'un antagoniste de la sous-unité GluN2B dans un test neurogène-dépendant, ainsi que l'augmentation des transmissions glutamatergiques et GABAergiques, respectivement indépendante et dépendante du traitement par la fluoxétine.

III. Objectif 3 : Effet comportemental et neurochimique de la stimulation ou de l'inhibition des jeunes neurones chez le même animal

Dans ce troisième objectif, nous avons voulu cibler les jeunes neurones par une approche d'optogénétique afin d'évaluer les modifications de neurotransmissions dans le GD ventral par ces jeunes neurones. Cette approche optogénétique complète les résultats obtenus précédemment qui n'ont permis qu'un apport prédictif d'informations sur l'implication des jeunes neurones puisque même si l'expression de GluN2B est importante chez les jeunes neurones, elle n'est pas exclusive (Groc et al., 2006; Tovar & Westbrook, 1999). Nous avons souhaité évaluer l'implication sélective des jeunes neurones et leurs rôles comportemental et neurochimique, par manipulation optogénétique de leur activité électrique durant la période critique de 4 à 6 semaines après division.

III.1 *Vérification de l'expression de la Channelrhodopsine 2 et de Archærhodopsine au niveau des jeunes neurones du GD*

Afin de contrôler sélectivement l'activité électrique des jeunes neurones, nous avons utilisé des souris Nestine-ChR2 et Nestine-Arch. Pour les obtenir, une lignée de souris exprimant la recombinaison Cre dans les cellules souches neurales exprimant Nestine a été croisée avec 2 lignées de souris permettant une expression conditionnelle soit du canal sodique sensible à la lumière bleue ChR2, soit de la pompe à protons sensible à la lumière verte Arch (voir paragraphe I.2.1 des matériels et méthodes, Figure 11). Les souris Nestine-ChR2 et Nestine-Arch ont été comparées aux animaux nés de ce croisement ne possédant pas ce génotype, considérés comme WT.

L'expression des opsines a été induite par administration du tamoxifène (Figure 36A), 6 semaines avant la réalisation des expériences d'optogénétique. Cette induction préalable a ainsi permis l'étude de la stimulation ou de l'inhibition des jeunes neurones alors âgés d'environ 6 semaines, correspondant à la période critique durant laquelle les jeunes neurones contribuent aux effets comportementaux neurogène-dépendant (détaillée dans Doan et al. (2019) pour revue). L'expression de ChR2 et de Arch par les jeunes neurones a été vérifiée par des expériences d'immunohistochimie, chez les souris Nestine-ChR2 et Nestine-Arch respectivement. Ces expériences d'immunohistochimie ont mis en évidence, par le marquage des protéines fluorescentes YFP et GFP, l'expression sélective de ChR2 (Figure 36B) ainsi que de Arch (Figure 36C) par les jeunes neurones situés dans le GD de l'hippocampe.

A l'inverse, les jeunes neurones des souris WT n'expriment pas ces protéines au niveau des jeunes neurones du GD (Figure 36D).

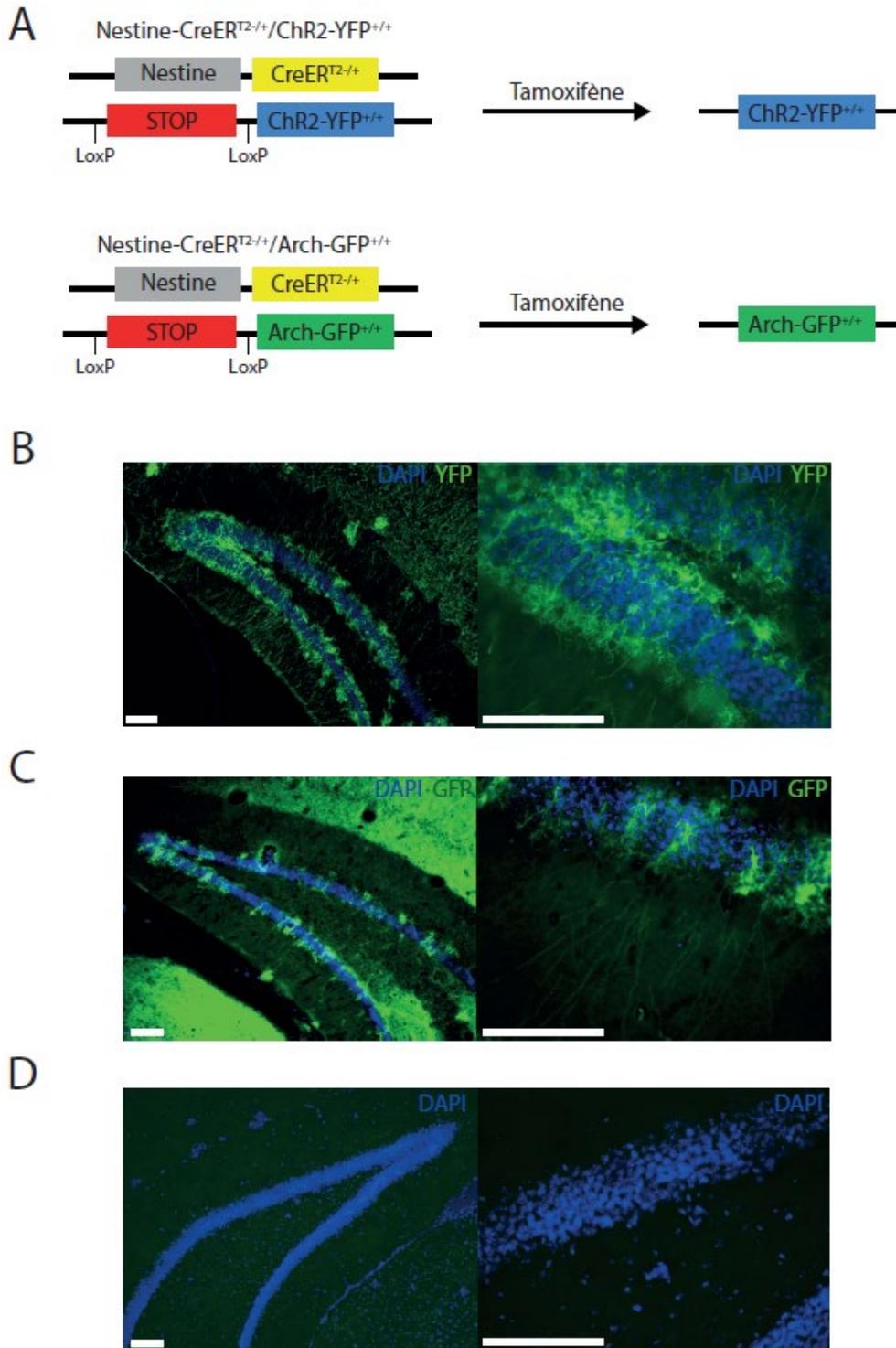


Figure 36 – Marquage des protéines YFP co-exprimées par les cellules qui présentent Channelrhodopsine 2 (ChR2-YFP) et des protéines GFP co-exprimées par les cellules qui présentent l'Archaerhodopsine (Arch-GFP) au niveau des jeunes neurones et coloration des noyaux au DAPI. (A) Induction de l'expression des opsines par administration de tamoxifène, selon les constructions génétiques. (B) Expression de ChR2-YFP au niveau des jeunes neurones du GD ventral d'un animal Nestine-ChR2. (C) Expression de Arch-GFP au niveau des jeunes neurones du GD ventral d'un animal Nestine-Arch. (D) Absence de protéines YFP/GFP au niveau des jeunes neurones du GD ventral d'un animal WT. La barre d'échelle représente 100 μ m.

III.2 *La stimulation des jeunes neurones augmente la transmission GABAergique dans le GD*

Après l'induction préalable de l'expression de ChR2 et après un traitement chronique à la fluoxétine, nous nous sommes intéressés aux modifications de neurotransmissions dans la région du GD ventral après la stimulation des jeunes neurones (protocole Figure 37A). Les résultats sont exprimés en pourcentage par rapport aux valeurs basales. Les valeurs basales moyennes pour la concentration extracellulaire de sérotonine étaient de $4,38 \pm 0,80$ fmol/échantillon pour les animaux du groupe WT VEH, $7,95 \pm 0,10$ fmol/échantillon pour le groupe WT FLX et $6,88 \pm 1,06$ fmol/échantillon pour le groupe ChR2 FLX. Le traitement chronique de 4 semaines à la fluoxétine (18 mg/kg/jour) augmente significativement la concentration basale extracellulaire de sérotonine (ANOVA à 1 facteur, $F_{2,15} = 4,19$, $p = 0,0358$, test de Tukey : WT FLX vs WT VEH $p < 0,05$, ChR2 FLX vs WT VEH $p = 0,08$). Il n'y a pas d'effet significatif sur les concentrations extracellulaires de sérotonine dans l'heure suivant le début de l'illumination (ANOVA à 2 facteurs, stimulation : $F_{6,102} = 0,22$, $p = 0,9871$; traitement : $F_{2,102} = 1,52$, $p = 0,2236$; interaction : $F_{12,102} = 0,40$, $p = 0,9615$; Figure 37B ; ANOVA à 1 facteur, $F_{2,15} = 2,83$, $p = 0,0909$; Figure 37C).

Les valeurs basales moyennes pour la concentration extracellulaire de glutamate étaient de $3,87 \pm 1,54$ pmol/échantillon pour les animaux du groupe WT VEH, $2,18 \pm 0,84$ pmol/échantillon pour le groupe WT FLX et $2,24 \pm 0,57$ pmol/échantillon pour le groupe ChR2 FLX. Aucune différence significative entre ces valeurs basales n'a été mise en évidence (ANOVA à 1 facteur, $F_{2,17} = 0,69$, $p = 0,5168$). Concernant les variations de la transmission glutamatergique après la stimulation optogénétique, aucune différence significative n'est mise en évidence avec le traitement chronique à la fluoxétine. L'illumination n'induit pas de modification significative sur les concentrations extracellulaires de glutamate (ANOVA à 2 facteurs, stimulation : $F_{6,118} = 0,64$, $p = 0,7004$; traitement : $F_{2,118} = 1,48$, $p = 0,2316$; interaction : $F_{12,118} = 0,87$, $p = 0,5791$; Figure 37D ; ANOVA à 1 facteur, $F_{2,17} = 1,05$, $p = 0,3708$; Figure 37E).

Enfin, les valeurs basales moyennes pour la concentration extracellulaire de GABA étaient de $100,7 \pm 38,4$ fmol/échantillon pour les animaux du groupe WT VEH, $65,6 \pm 30,1$ fmol/échantillon pour le groupe WT FLX et $66,8 \pm 21,6$ fmol/échantillon pour le groupe ChR2 FLX. Aucun effet sur les concentrations extracellulaires basales de GABA n'a été mis

en évidence suite au traitement chronique de 4 semaines à la fluoxétine (ANOVA à 1 facteur, $F_{2,17} = 0,39$, $p = 0,6808$). La stimulation des jeunes neurones chez les souris Nestine-ChR2 augmente significativement la transmission GABAergique jusqu'à 30 minutes après la fin de la stimulation (ANOVA à 2 facteurs, stimulation : $F_{6,118} = 3,10$, $p = 0,0074$; traitement : $F_{2,118} = 5,96$, $p = 0,0034$; interaction : $F_{12,118} = 1,35$, $p = 0,1980$; Figure 37F). Une ANOVA à 1 facteur révèle que la stimulation modifie les concentrations extracellulaires de GABA lorsqu'elles sont exprimées en AUC ($F_{2,17} = 4,16$, $p = 0,0337$; Figure 37G).

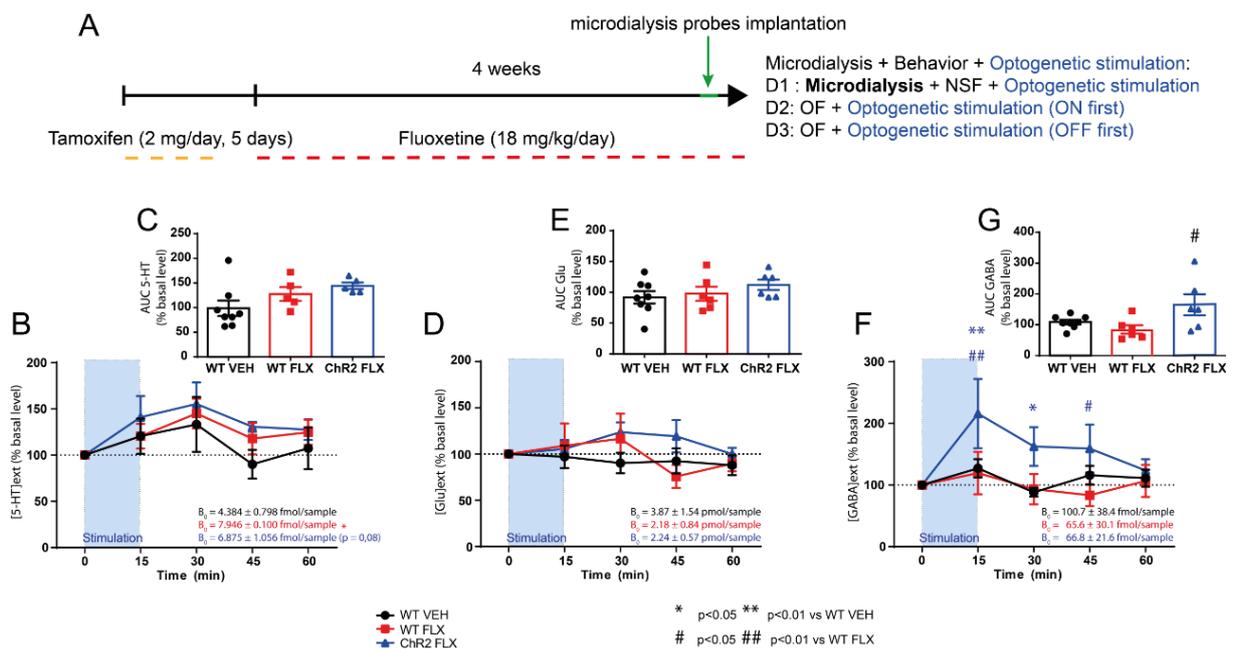


Figure 37 - Effets neurochimiques dans le GD ventral de la stimulation des jeunes neurones après 4 semaines de traitement à la fluoxétine (18 mg/kg/jour) chez des souris WT et chez des souris Nestine-ChR2 (ChR2). (A) Protocole d'étude de l'effet de la stimulation des jeunes neurones. (B – G) Les concentrations extracellulaires basales de 5-HT, de Glu et de GABA sont exprimées en pourcentage par rapport au niveau basal de chaque groupe (calculé à partir de 3 dialysats) en fonction du temps après le commencement de stimulation optogénétique (B, D et F respectivement), ainsi qu'en valeurs d'AUC (% du niveau basal pour chaque groupe, calculé à partir de 3 dialysats) (C, E et G respectivement). ANOVA à 2 facteurs : stimulation : $F_{6,118} = 3,10$, $p = 0,0074$; traitement : $F_{2,118} = 5,96$, $p = 0,0034$; interaction : $F_{12,118} = 1,35$, $p = 0,1980$, test de Tukey : * $p < 0,05$ ** $p < 0,01$ par rapport au groupe WT VEH ; # $p < 0,05$ ## $p < 0,01$ par rapport au groupe WT FLX.

La balance excitation/inhibition n'est pas significativement différente après la stimulation des jeunes neurones après 4 semaines de traitement à la fluoxétine (ANOVA à 1 facteur, $F_{2,17} = 1,01$, $p = 0,3851$; Figure 38).

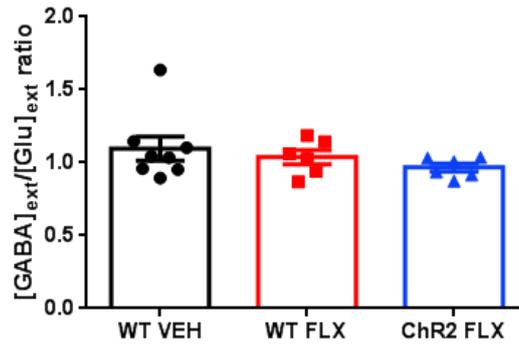


Figure 38 - Effets de la stimulation des jeunes neurones après 4 semaines de traitement à la fluoxétine (18 mg/kg/jour) chez des souris WT et chez des souris Nestine-ChR2 (ChR2) sur la balance GABA/glutamate dans le GD ventral.

III.3 Absence d'effet comportemental après stimulation des jeunes neurones ou après un traitement chronique à la fluoxétine

Le NSF a été réalisé chez les mêmes animaux dont les résultats de microdialyse sont présentés ci-dessus, et simultanément à l'illumination optogénétique (protocole Figure 39A). Ni le traitement chronique de 4 semaines à la fluoxétine, ni la stimulation des jeunes neurones n'ont induit d'effet significatif dans la latence pour aller se nourrir dans le NSF par rapport aux animaux du groupe contrôle (analyse de survie Kaplan-Meier, test du log-rank, $p = 0,8315$; Figure 39B ; ANOVA à 1 facteur, $F_{2,17} = 0,11$, $p = 0,8977$; Figure 39C). De même, il n'y a pas eu de différences dans la latence pour aller se nourrir dans la cage d'origine (ANOVA à 1 facteur, $F_{2,17} = 0,36$, $p = 0,7003$; Figure 39D).

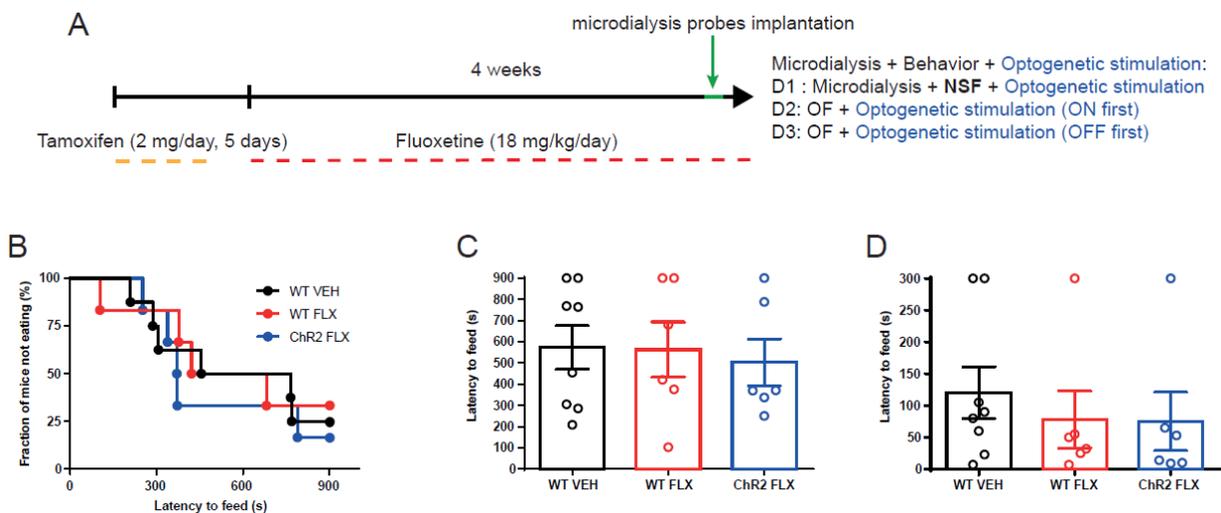


Figure 39 - Effets comportementaux dans le NSF de la stimulation des jeunes neurones après 4 semaines de traitement à la fluoxétine (18 mg/kg/jour) chez des souris WT et chez des souris Nestine-ChR2 (ChR2), obtenus simultanément à la microdialyse. (A) Protocole d'étude de l'effet de la stimulation des jeunes neurones. (B et C) Les latences pour se nourrir dans le nouvel environnement sont représentées en analyse de survie (B) et selon la moyenne \pm SEM des latences en secondes (C). (D) Latences pour se nourrir dans la cage d'origine, exprimées en moyenne \pm SEM.

Le lendemain et le surlendemain de la réalisation du NSF, les mêmes animaux ont été placés dans l'OF (protocole Figure 40A). Ni le traitement chronique de 4 semaines à la fluoxétine, ni la stimulation des jeunes neurones n'ont induit d'effet significatif dans le temps passé (ANOVA à 2 facteurs, stimulation : $F_{1,26} = 0,01$, $p = 0,9144$; traitement : $F_{2,26} = 0,84$, $p = 0,4449$; interaction : $F_{2,26} = 0,70$, $p = 0,5049$; Figure 40B ; ANOVA à 2 facteurs, stimulation : $F_{1,20} = 0,21$, $p = 0,6485$; traitement : $F_{2,20} = 1,60$, $p = 0,2268$; interaction : $F_{2,20} = 0,66$, $p = 0,5287$; Figure 40C) ou le nombre d'entrées dans le centre du champ (ANOVA à 2 facteurs, stimulation : $F_{1,26} = 0,17$, $p = 0,6873$; traitement : $F_{2,26} = 2,17$, $p = 0,1340$; interaction : $F_{2,26} = 0,44$, $p = 0,6509$; Figure 40D ; ANOVA à 2 facteurs, stimulation : $F_{1,20} = 0,31$, $p = 0,5861$; traitement : $F_{2,20} = 1,54$, $p = 0,2397$; interaction : $F_{2,20} = 0,50$, $p = 0,6146$; Figure 40E), ni dans la distance ambulatoire parcourue (ANOVA à 2 facteurs, stimulation : $F_{1,26} = 0,06$, $p = 0,8078$; traitement : $F_{2,26} = 0,26$, $p = 0,7735$; interaction : $F_{2,26} = 0,64$, $p = 0,5341$; Figure 40F ; ANOVA à 2 facteurs, stimulation : $F_{1,20} = 0,55$, $p = 0,4660$; traitement : $F_{2,20} = 0,57$, $p = 0,5763$; interaction : $F_{2,20} = 0,002$, $p = 0,9982$; Figure 40E) dans l'OF par rapport aux animaux du groupe contrôle.

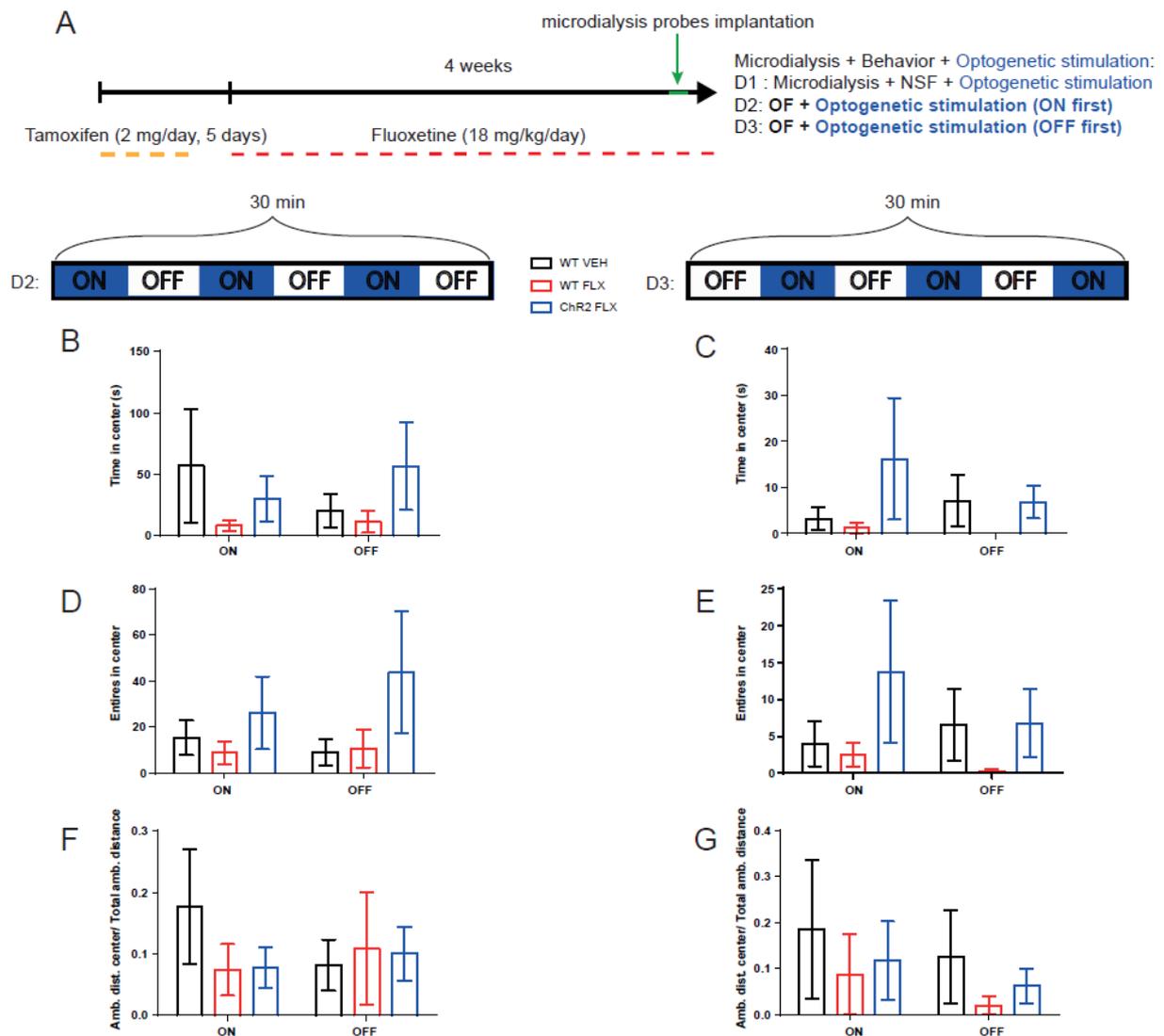


Figure 40 - Effets comportementaux dans l'OF de la stimulation des jeunes neurones après 4 semaines de traitement à la fluoxétine (18 mg/kg/jour) chez des souris WT et chez des souris Nestine-ChR2 (ChR2), en fonction de la séquence à laquelle l'illumination a été réalisée. (A) Protocole d'étude de l'effet de la stimulation des jeunes neurones. (B et C) Temps passé dans le centre du champ lors de l'illumination ou non, en fonction de la journée de test et de la séquence d'illumination. (D et E) Nombre d'entrées dans le centre du champ lors de l'illumination ou non, en fonction de la journée de test et de la séquence d'illumination. (F et G) Distance ambulatoire parcourue lors de l'illumination ou non, en fonction de la journée de test et de la séquence d'illumination. Les données sont représentées en moyenne \pm SEM.

Pour conclure, ce travail a mis en évidence que la stimulation des jeunes neurones augmente la transmission GABAergique dans le GD ventral. Cette étude de l'effet de la stimulation des jeunes neurones n'a pas établi de lien entre la neurochimie et le comportement du fait de l'absence d'un effet de type antidépresseur d'un traitement chronique à la fluoxétine chez les animaux. Nous avons donc décidé de poursuivre les expériences d'optogénétique dans le modèle CORT.

III.4 Résultats complémentaires : Effet comportemental de l'inhibition des jeunes neurones dans un modèle d'anxiété/dépression

Après l'induction préalable d'un état de type anxio-dépressif et de l'expression de Arch, et après un traitement chronique à la fluoxétine, nous nous sommes intéressés à l'effet de l'inhibition des jeunes neurones dans la région du GD ventral. Le NSF et l'OF ont été réalisés chez des animaux pré-traités par la corticostérone, puis chez qui la fluoxétine a été donnée ensuite de façon concomitante à la corticostérone pour 4 semaines (protocole Figure 41A). Sur les 17 animaux traités, seuls 9 ont survécu après la chirurgie (Figures 41 et 42).

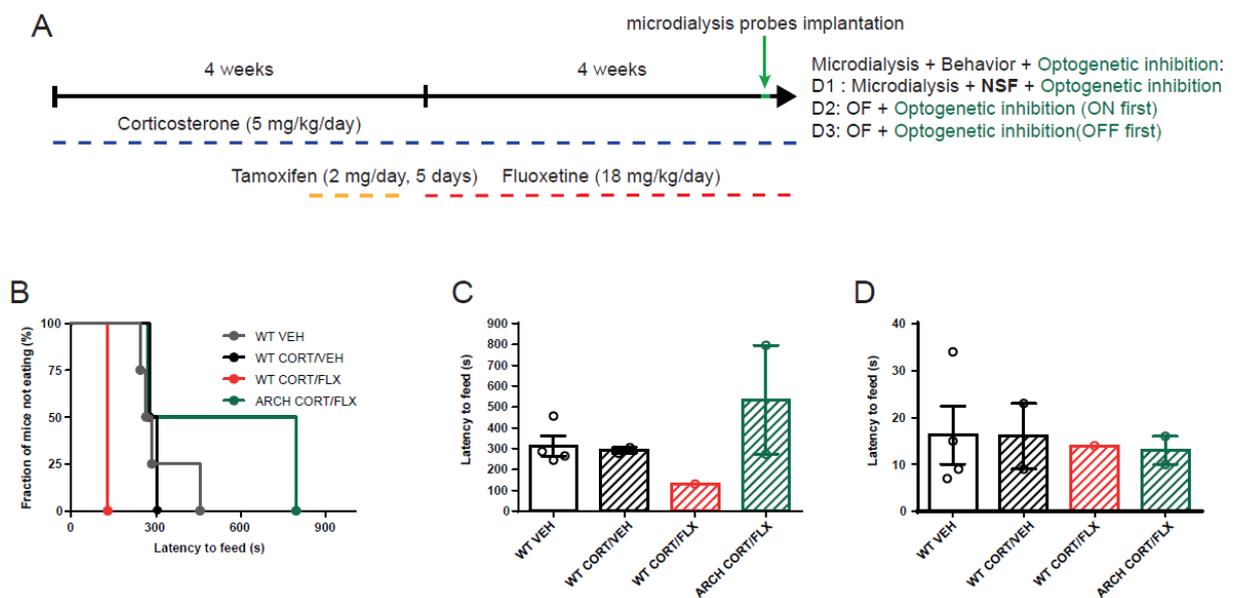


Figure 41 - Effets comportementaux dans le NSF de l'inhibition des jeunes neurones après 4 semaines de traitement à la fluoxétine (18 mg/kg/jour) dans le modèle CORT chez des souris WT et chez des souris Nestine-Arch (Arch). (A) Protocole d'étude de l'effet de l'inhibition des jeunes neurones. (B et C) Les latences pour se nourrir dans le nouvel environnement sont représentées en analyse de survie (B) et selon la moyenne \pm SEM des latences en secondes (C). (D) Latences pour se nourrir dans la cage d'origine, exprimées en moyenne \pm SEM.

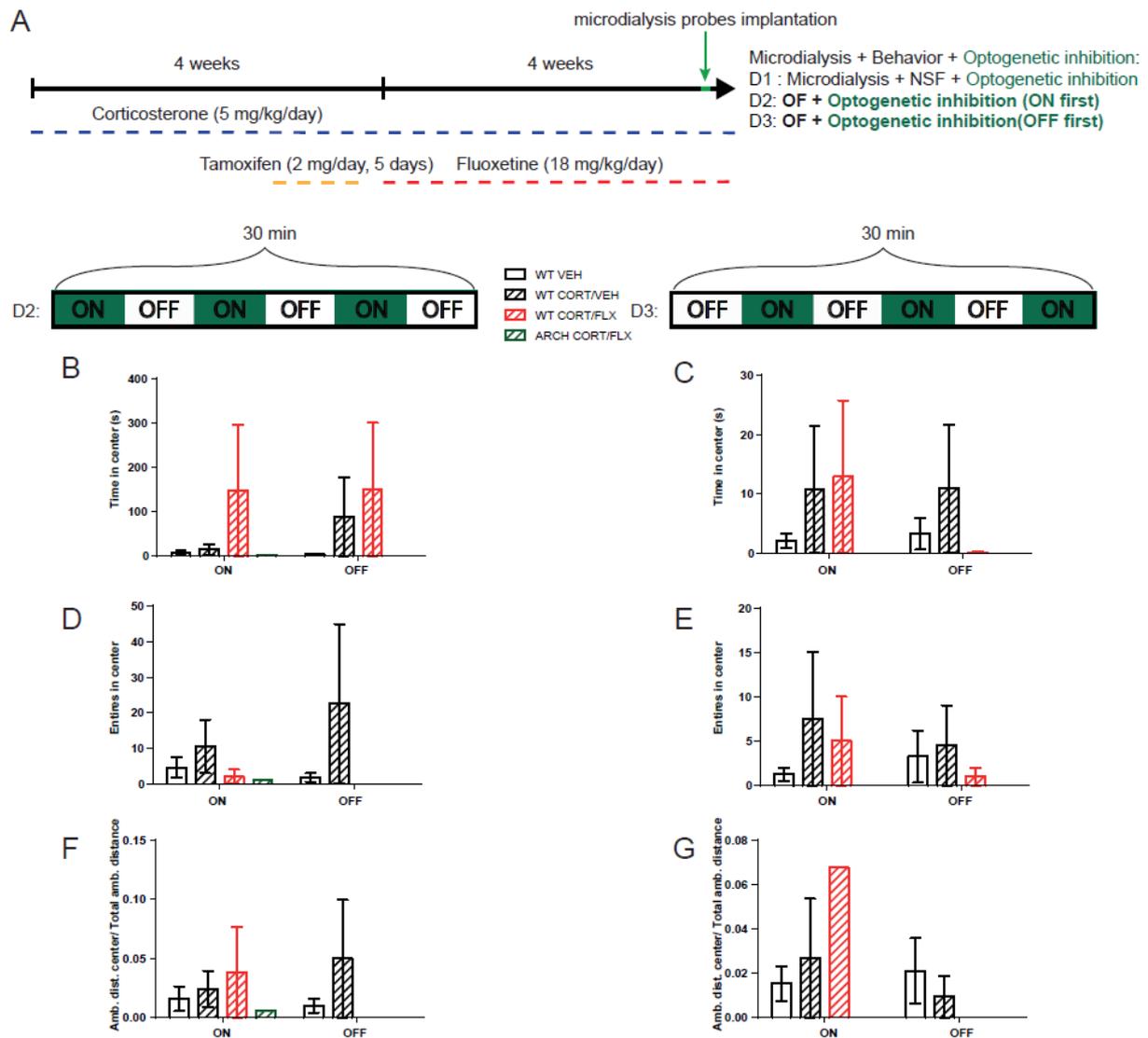


Figure 42 - Effets comportementaux dans l'OF de l'inhibition des jeunes neurones après 4 semaines de traitement à la fluoxétine (18 mg/kg/jour) dans le modèle CORT chez des souris WT et chez des souris Nestine-Arch (ARCH), en fonction de la séquence à laquelle l'illumination a été réalisée. (A) Protocole d'étude de l'effet de l'inhibition des jeunes neurones. (B et C) Temps passé dans le centre du champ lors de l'illumination ou non, en fonction de la journée de test et de la séquence d'illumination. (D et E) Nombre d'entrées dans le centre du champ lors de l'illumination ou non, en fonction de la journée de test et de la séquence d'illumination. (F et G) Distance ambulatoire parcourue lors de l'illumination ou non, en fonction de la journée de test et de la séquence d'illumination. Les données sont représentées en moyenne \pm SEM.

Ainsi, du fait de cette mortalité très importante, nous n'avons pas pu obtenir un nombre suffisant d'animaux dans chaque groupe afin de pouvoir analyser de façon rigoureuse de telles données. De plus, l'observation de ces animaux a montré leurs difficultés à récupérer de la chirurgie ce qui rend encore plus incertaine l'interprétation des résultats. Ces faits nous ont fait considérer qu'il n'était pas judicieux de doser les échantillons issus de la microdialyse.

DISCUSSION

Les EDC sont des troubles mentaux courants et invalidants. Les ISRS sont la classe d'antidépresseurs la plus prescrite, mais leur mécanisme d'action n'est pas totalement élucidé. L'intégration des jeunes neurones issus de la neurogenèse adulte hippocampique dans le GD jouerait un rôle clef dans le mécanisme d'action des antidépresseurs. Ces travaux de thèse ont permis d'étudier grâce à différentes techniques combinées chez la souris le rôle des jeunes neurones dans les effets des antidépresseurs. Nous nous sommes intéressés aux variations de neurotransmissions engendrées suite à l'intégration de ces nouveaux neurones dans le GD ventral après un traitement chronique avec la fluoxétine.

I. Lien des jeunes neurones avec les cellules granulaires matures : Deux hypothèses

Concernant les efférences du GD, les cellules granulaires projettent vers l'arborisation dendritique des cellules pyramidales de l'aire CA3 de l'hippocampe, mais pas uniquement. D'autres efférences ont été étudiées par des marquages d'immunohistochimie chez le rat, révélant une projection des cellules granulaires vers des interneurons GABAergiques de la région hilare du GD (Acsady et al., 1998).

Plus précisément pour les nouveaux neurones issus de la neurogenèse adulte hippocampique, une étude électrophysiologique sur tranches hippocampiques de souris a révélé des contacts synaptiques entre les jeunes neurones avec les cellules pyramidales de l'aire CA3 ainsi qu'avec des interneurons situés dans le hile du GD (Toni et al., 2008). Il a été mis en évidence par imagerie par colorant sensible au potentiel, chez un modèle génétique de souris Nestine-CreER^{T2}/Bax permettant une augmentation du nombre de jeunes neurones, ainsi que chez des souris irradiées aux rayons X au niveau de l'hippocampe permettant une suppression de la neurogenèse, que les jeunes neurones influençaient l'excitabilité des cellules granulaires via ces interneurons (Ikrar et al., 2013). Par la suite, la connexion entre les jeunes neurones et les neurones matures, notamment via ces interneurons du hile, a été évaluée par une expérience d'optogénétique couplée à de l'électrophysiologie sur tranches chez des souris exposés à un environnement enrichi (Drew et al., 2016). Dans cette dernière étude, les courants post-synaptiques des cellules granulaires matures ont été mesurés, après stimulation optogénétique des jeunes neurones jusqu'à 7 semaines après division. Suite à l'exposition à l'environnement enrichi, la stimulation des jeunes neurones augmente l'amplitude des courants inhibiteurs post-synaptiques. De plus, l'amplitude de ces courants est diminuée après application d'antagonistes de récepteurs NMDA et AMPA glutamatergiques (NBQX + AP-5)

après blocage synaptique, suggérant ainsi que ces courants inhibiteurs résultent d'un circuit di-synpatique entre les jeunes neurones et les neurones matures, via un interneurone GABAergique. Ceci est étayé par l'étude de Bergami (2015) dans laquelle la neurogenèse hippocampique adulte est augmentée après exposition des animaux à un environnement enrichi pendant 6 semaines. Dans ce modèle, la stimulation des jeunes neurones induit une diminution de la fréquence des courants post-synaptiques excitateurs (Bergami et al., 2015), qui sont la conséquence d'une diminution de la transmission glutamatergique. Au commencement de cette thèse, ce lien étroit entre les jeunes neurones et les neurones matures via des interneurons GABAergiques faisait consensus dans la littérature (Anacker & Hen, 2017 pour revue).

Cependant, une récente étude a étudié les interactions entre les jeunes neurones et les neurones matures par électrophysiologie (voir paragraphe III.2 de l'introduction). Cette étude a montré l'absence d'un lien indirect entre les jeunes neurones et les neurones matures impliquant un interneurone GABAergique dans leurs conditions expérimentales (notamment sans environnement enrichi). Cette étude a par ailleurs précisé la nature du lien direct entre les jeunes neurones et les neurones matures, via les récepteurs métabotropiques du glutamate mGluR2 couplés à des canaux K^+ GIRK ou via les récepteurs NMDA en fonction d'une faible libération ou d'une libération importante de glutamate par les jeunes neurones, respectivement (Luna et al., 2019). La présence de récepteurs métabotropiques du glutamate mGluR2 couplés à des canaux K^+ GIRK sur les neurones matures avait par ailleurs déjà été décrite ; contrairement aux jeunes neurones, qui ne présentent pas d'activité de ces récepteurs métabotropiques du glutamate mGluR2 couplés à des canaux K^+ GIRK (Gonzalez et al., 2018).

Nous avons choisi de considérer que l'ensemble des expériences mentionnées ci-dessus coexistaient, du fait des différences expérimentales, notamment l'augmentation ou non du nombre de jeunes neurones par l'utilisation d'un modèle génétique ou par l'utilisation d'un environnement enrichi, pouvant engendrer une réorganisation de la connectivité des jeunes neurones (Bergami et al., 2015). Les résultats des expériences mentionnées ci-dessus pourraient ainsi être complémentaires dans la description des efférences des jeunes neurones (Figure 43), qui pourraient expliquer comment les jeunes neurones influencent la réponse des ISRS.

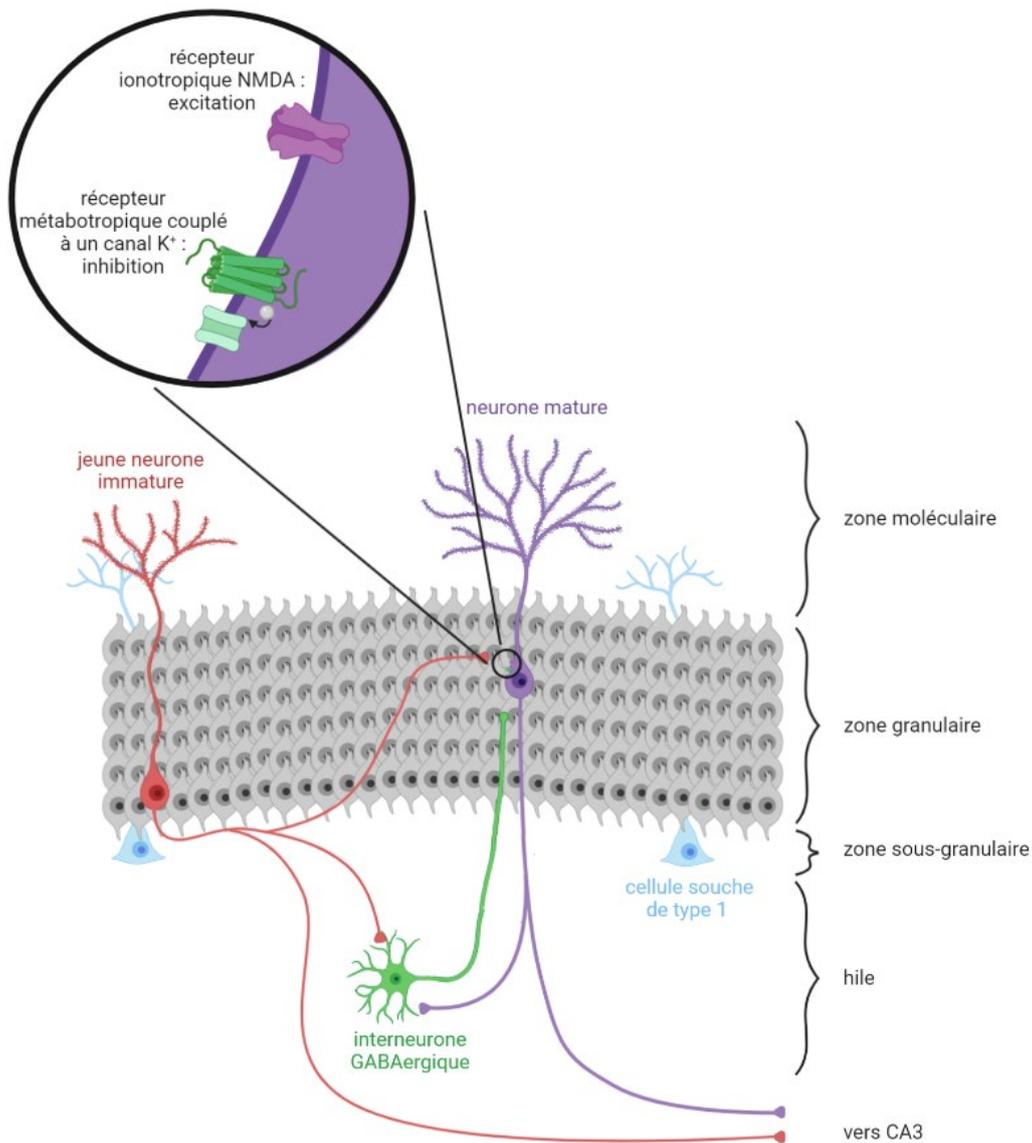


Figure 43 – Efférences des jeunes neurones immatures dans le gyrus dentelé de l’hippocampe, selon la littérature. Les jeunes neurones s’intègrent dans le gyrus dentelé. Les jeunes neurones et les neurones matures sont en compétition synaptique pour les afférences en provenance du cortex entorhinal. Les jeunes neurones projettent vers la CA3, mais ils projetteraient également vers des interneurons GABAergiques du hile du gyrus dentelé ainsi que directement vers les neurones matures de la zone granulaire. Concernant ce lien direct entre les jeunes neurones et les neurones matures, il est établi par des récepteurs ionotropiques NMDA du glutamate responsables d’une excitation des neurones matures, ainsi que par des récepteurs métabotropiques du glutamate couplés à des canaux K⁺ responsables d’une inhibition des neurones matures, en fonction d’une libération importante ou d’une faible libération de glutamate par les jeunes neurones, respectivement.

II. Objectif 1 : La diminution de la transmission glutamatergique après un traitement chronique avec la fluoxétine suggère l'implication d'interneurones GABAergiques

Ainsi, nous nous sommes intéressés à cette relation étroite entre jeunes neurones issus de la neurogenèse hippocampique adulte et traitement antidépresseur, et notamment entre ces liens directs ou indirects entre les jeunes neurones et les neurones matures. Pour cela, nous avons utilisé la technique de microdialyse chez l'animal éveillé afin d'étudier les variations des concentrations extracellulaires de glutamate et de GABA dans le GD ventral suite à l'intégration de ces nouveaux neurones dans le GD après un traitement chronique avec la fluoxétine.

Dans un premier temps, nous avons évalué les modifications de neurotransmissions dans le GD ventral chez des souris après un traitement chronique avec la fluoxétine. Tout d'abord, nous avons confirmé qu'un traitement chronique avec la fluoxétine augmente la transmission sérotoninergique dans le GD ventral, comme déjà constaté dans l'hippocampe (Popa et al., 2010). Cette expérience a de plus révélé une diminution de la transmission glutamatergique après un traitement chronique avec la fluoxétine. Cette diminution pourrait s'expliquer par l'implication de la neurogenèse stimulée par ce traitement (Santarelli et al., 2003; J. W. Wang et al., 2008). Cette diminution ne semble pas refléter la libération de glutamate par les jeunes neurones glutamatergiques, ces derniers étant plus nombreux, ils conduiraient dans ce cas à une augmentation de la transmission glutamatergique. Les jeunes neurones pourraient être impliqués via la dépolarisation des interneurones GABAergiques situés dans le hile du GD (Drew et al., 2016), qui inhibent alors les cellules granulaires matures du GD ; cette inhibition des cellules granulaires matures glutamatergiques conduirait à cette diminution de la transmission glutamatergique. De plus, la population de jeunes neurones étant augmentée après le traitement chronique à la fluoxétine, le phénomène de compétition synaptique des jeunes neurones avec les neurones matures pour recevoir les afférences de la voie perforante en provenance du cortex entorhinal (voir paragraphe III.2 de l'introduction, Article 1) favoriserait la stimulation des jeunes neurones. Ceci renforcerait le phénomène d'inhibition des neurones matures décrit ci-dessus et aboutissant à la diminution de libération du glutamate (Figure 44). Nos résultats ne confirment pas l'existence d'un lien direct entre les jeunes neurones et les neurones matures, comme décrit dans l'étude de Luna (Luna et al., 2019). Selon cette hypothèse, une augmentation du nombre de jeunes neurones (par la stimulation

des différentes étapes de neurogenèse adulte avec la fluoxétine) devrait conduire à une libération importante de glutamate par ces jeunes neurones, et ainsi à l'excitation des neurones matures via les récepteurs NMDA : nous aurions dans ce cas dû observer une augmentation de la transmission glutamatergique dans le GD ventral. La diminution de la transmission glutamatergique obtenue (Figure 30C) pourrait s'expliquer selon cette hypothèse par l'inhibition des neurones matures via les récepteurs métabotropiques du glutamate mGluR2 couplés aux canaux GIRK, qui ont une forte affinité pour le glutamate (voir paragraphe III.2 de l'introduction, Figure 10). Or, dans cette expérience, la libération de glutamate par les jeunes neurones ne serait pas faible mais importante. Nos premiers résultats ne confirment donc pas le lien direct entre les jeunes neurones et les neurones matures ; ils semblent plutôt favoriser uniquement l'hypothèse impliquant un interneurone GABAergique. Cependant, la technique de microdialyse que nous avons utilisée ne permet peut-être pas d'apporter des informations si précises sur les projections des jeunes neurones, du fait de la longue durée de collecte des dialysats de plusieurs minutes qui pourrait permettre l'intervention de différentes cellules. Les concentrations extracellulaires de glutamate et de GABA pourraient provenir d'autres facteurs et l'origine neuronale par les neurones granulaires reste à vérifier. En effet, elles sont impliquées dans la synapse tripartite entre les neurones pré-synaptiques, les neurones post-synaptiques et les astrocytes (voir paragraphe I.2.4 de l'introduction), dans laquelle les mitochondries et plus particulièrement le cycle de Krebs ont un rôle important. Lors d'expériences de microdialyse, l'utilisation de tétrotoxine bloquant les canaux sodique voltage-dépendant indique que les concentrations extracellulaires de glutamate reflèterait la balance entre la libération neuronale du glutamate et la recapture par les neurones post-synaptiques ainsi que par les astrocytes (Rocher et al., 1999).

Dans cette première expérience chez des souris 129Sv/Pas, l'étude des variations des concentrations extracellulaires de glutamate et de GABA dans le GD ventral suite à l'intégration des nouveaux neurones issus de la neurogenèse hippocampique adulte dans le GD a été limitée par le manque de sélectivité des effets du traitement chronique avec la fluoxétine. Ainsi, la diminution des concentrations extracellulaires basales de glutamate que nous avons mis en évidence pourrait s'expliquer par l'implication de la neurogenèse stimulée par le traitement chronique à la fluoxétine, mais elle pourrait également s'expliquer par l'augmentation de la transmission sérotoninergique conduisant à la dépolarisation d'interneurones médiée par des récepteurs 5-HT₃ (Turner et al., 2004). Afin de confirmer l'implication de la neurogenèse hippocampique adulte sur les variations des concentrations

extracellulaires de glutamate et de GABA dans le GD ventral, nous avons par la suite réalisé une expérience avec une approche pharmacologique afin de cibler ces nouveaux neurones.

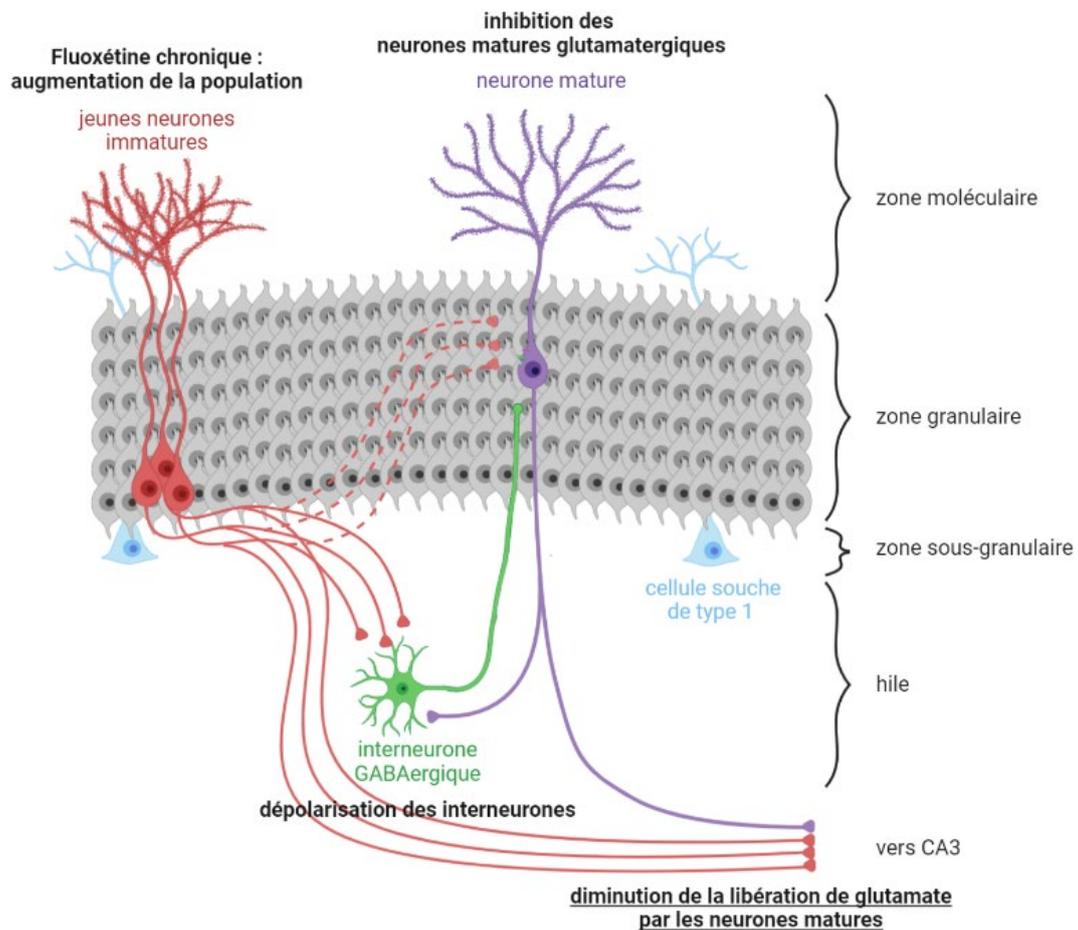


Figure 44 - Efférences des jeunes neurones immatures dans le gyrus dentelé de l'hippocampe après traitement chronique avec la fluoxétine

III. Objectif 2 : L'augmentation de la transmission glutamatergique après diminution de l'activité électrique des jeunes neurones serait due à la désinhibition d'interneurons GABAergiques

Afin de cibler les jeunes neurones possédant des récepteurs NMDA contenant la sous-unité GluN2B, nous avons administré localement le Ro25-6981 dans le GD ventral, chez des souris ayant reçu un traitement chronique avec la fluoxétine après établissement du modèle CORT. L'expression de ces récepteurs NMDA contenant la sous-unité GluN2B étant importante chez les jeunes neurones, l'antagonisme de ces récepteurs devrait diminuer l'activité électrique chez cette population neuronale et ainsi affecter l'effet comportemental qui leur est associé. Dans cette hypothèse, le Ro25-6981 bloquerait la sous-unité GluN2B conduirait ainsi à une perte de l'effet de type antidépresseur neurogenèse-dépendant dans le NSF lors d'un

traitement chronique avec la fluoxétine. De plus, notre hypothèse était soutenue par le fait que, dans un modèle génétique de souris n'exprimant plus la sous-unité GluN2B de façon spécifique dans les jeunes neurones, cet effet comportemental neurogénèse-dépendant était aboli (Tannenholz et al., 2016). Contrairement à ce que nous attendions, nous avons constaté un effet de type antidépresseur de l'administration locale du Ro25-6981 dans le test du NSF, indépendamment du traitement avec la fluoxétine. Ces différents résultats entre l'approche génétique et notre approche pharmacologique pourraient s'expliquer par l'antagonisme de la sous-unité GluN2B par la fluoxétine, démontré *in vitro* (Kiss et al., 2012). Cela expliquerait qu'en l'absence de cette sous-unité GluN2B chez les jeunes neurones par l'approche génétique, l'effet de type antidépresseur neurogénèse-dépendant ne soit pas retrouvé. Dans notre approche pharmacologique, la fluoxétine et le Ro25-6981 auraient donc bien le même effet d'antagonisme de la sous-unité GluN2B conduisant à un effet de type antidépresseur. L'injection bilatérale de Ro25-6981 évite une compensation de l'hippocampe controlatéral qui pourrait avoir lieu lors d'une injection unilatérale (Durham et al., 2011). De plus, cette approche pharmacologique d'administration locale de Ro25-6981 dans le GD ventral souligne l'importance du GD dans les effets observés, mais nous ne pouvons pas affirmer que les effets obtenus soient uniquement dus à l'antagonisme des récepteurs NMDA contenant la sous-unité GluN2B des jeunes neurones. D'une part, l'injection dans le GD ventral pourrait avoir diffusée dans l'hippocampe voire en dehors de l'hippocampe et le Ro25-6981 ainsi cibler d'autres types cellulaires, tels que les neurones pyramidaux exprimant également la sous-unité GluN2B (Kannangara et al., 2014; Kheirbek et al., 2012; Rauner & Kohr, 2011); d'autre part, le Ro25-6981 pourrait cibler des récepteurs NMDA contenant la sous-unité GluN2B extra-synaptiques (Groc et al., 2006; Tovar & Westbrook, 1999). L'antagonisme de l'ensemble de ces récepteurs NMDA contenant la sous-unité GluN2B dans l'ensemble des cellules hippocampiques pourrait causer les effets observés du Ro25-6981. Ainsi, comme lors d'une administration systémique (N. Li et al., 2010; N. Li et al., 2011; Talbot et al., 2016), l'application locale de Ro25-6981 dans le GD ventral induit un effet de type antidépresseur.

Par ailleurs, et bien que ces résultats doivent encore être confirmés avec le dosage des derniers échantillons disponibles issus de la microdialyse, nous avons mis en évidence dans le GD ventral une augmentation de la transmission glutamatergique après administration bilatérale intra-hippocampique de Ro25-6981 chez des souris ayant ou non reçu un traitement chronique avec la fluoxétine. Ainsi, bien que les récepteurs NMDA antagonisés ne soient pas exclusivement ceux des jeunes neurones, il semblerait que l'inhibition de l'activité électrique

des jeunes neurones augmente les concentrations extracellulaires de glutamate dans le GD ventral. Il s'agit de l'effet inverse de ce qui avait été obtenu précédemment par l'augmentation de cette population neuronale avec le traitement chronique à la fluoxétine. Ici encore, il semble que cette augmentation de la transmission glutamatergique ne reflète pas la libération de glutamate par les jeunes neurones, qui en serait diminuée par l'inhibition de leur activité électrique, et non pas augmentée, comme constatée. Ainsi, grâce à l'antagonisme des récepteurs NMDA contenant la sous-unité GluN2B, l'activité électrique des jeunes neurones serait inhibée : ils ne feraient plus intervenir les interneurons GABAergiques situés dans le hile du GD, ce qui conduirait alors à la désinhibition des neurones matures glutamatergiques (Figure 45). Concernant l'hypothèse du lien direct, ces résultats ici ne semblent pas l'étudier, l'activité électrique des jeunes neurones étant inhibée, les jeunes neurones ne libèreraient plus de glutamate vers les neurones matures.

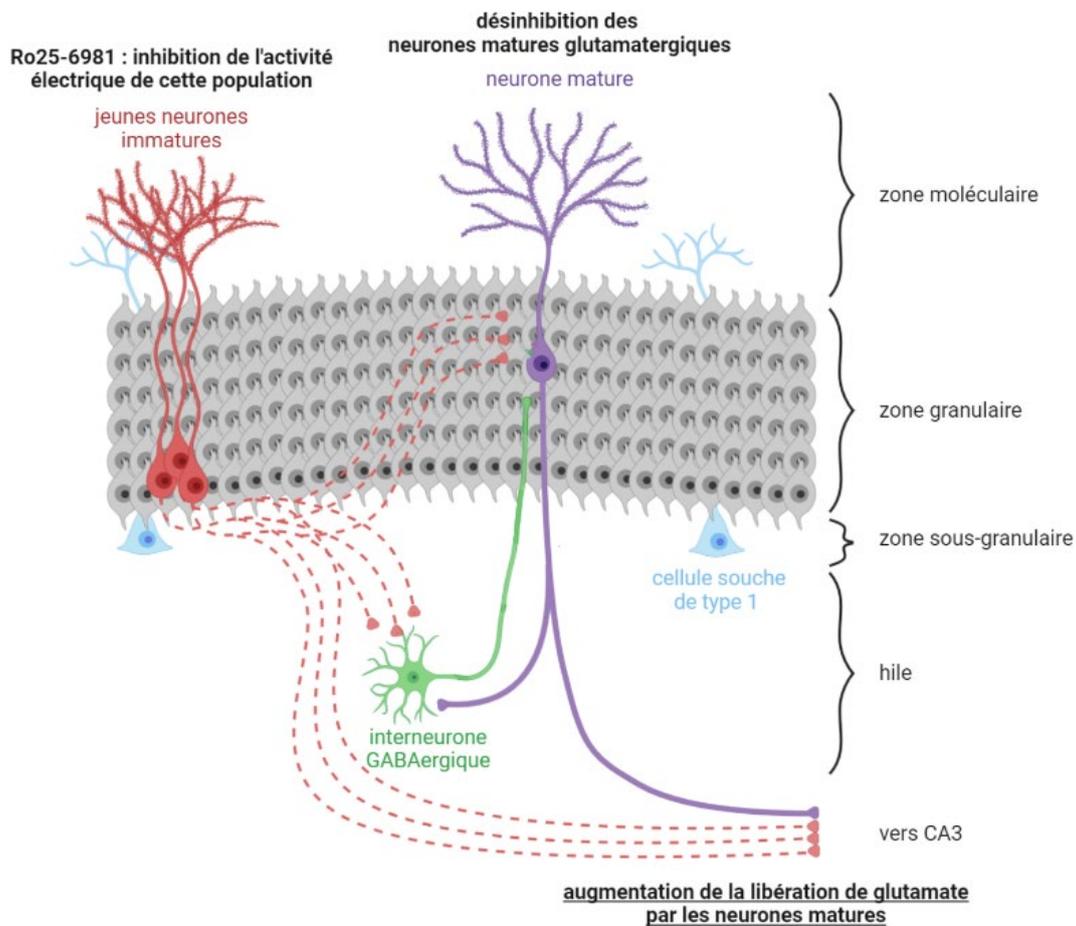


Figure 45 - Efférences des jeunes neurones immatures dans le gyrus dentelé de l'hippocampe après traitement chronique avec la fluoxétine et après administration locale intra-hippocampique de Ro25-6981.

Dans cette expérience d'injection locale intra-hippocampique du Ro25-6981, nous avons également constaté une tendance à une augmentation de la transmission GABAergique

uniquement chez les animaux traités à la fluoxétine. L'observation de cet effet spécifiquement chez le groupe traité avec la fluoxétine pourrait indiquer que cette augmentation de la transmission GABAergique soit dépendante de l'augmentation du nombre de jeunes neurones : cette augmentation permettrait ainsi une inhibition d'un nombre plus important de jeunes neurones par l'administration locale de Ro25-6981 ; cette augmentation pourrait également être liée à une augmentation du phénomène de décarboxylation du glutamate par la GAD dans la synapse tripartite. Dans le contexte de l'hypothèse du lien indirect entre les 2 populations des cellules granulaires, l'administration de Ro25-6981 devrait conduire à une diminution de la transmission GABAergique. Nos résultats ne sont pas en accord avec cette hypothèse. L'origine de cette augmentation des concentrations extracellulaires de GABA réside peut-être dans une des limites de cette expérience par approche pharmacologique. Une étude menée chez la souris indique qu'un traitement chronique avec la fluoxétine inhiberait la libération de GABA des interneurones à cholécystokinine. Ceux-ci projetant sur des interneurones à parvalbumine, ils seraient alors désinhibés (Medrihan et al., 2017). D'autre part, une autre étude d'électrophysiologie indique que l'application de Ro25-6981 sur des tranches d'hippocampe de souris réduit l'activité électrique des interneurones (Hanson et al., 2013). Ces 2 études pourraient expliquer l'effet synergique de l'administration locale intra-hippocampique du Ro25-6981 et du traitement chronique avec la fluoxétine, sur la transmission GABAergique dans le GD ventral.

Ainsi, l'utilisation de la technique de microdialyse avec un temps de collecte de plusieurs minutes limite à nouveau l'interprétation de ces résultats préliminaires et notamment de l'ensemble des cellules impliquées. Cette expérience d'injection locale est également limitée dans la sélectivité des cellules situées à proximité du site d'injection qui exprimeraient la sous-unité GluN2B ; les effets observés pourraient donc refléter ceux de l'antagonisme de plusieurs types cellulaires ou encore ceux de l'antagonisme de récepteurs NMDA contenant la sous-unité GluN2B extra-synaptiques. Enfin, les doses utilisées de fluoxétine et de Ro25-6981 n'ont pas révélé un effet additif ou synergique : il n'est pas à exclure que des doses plus faibles auraient pu permettre l'observation de tels effets.

IV. Objectif 3 : L'augmentation de la transmission GABAergique après la stimulation des jeunes neurones confirme l'implication d'interneurones GABAergiques

Enfin, au vu des limites de sélectivité de l'approche pharmacologique, nous avons utilisé une approche optogénétique après un traitement chronique avec la fluoxétine, afin d'évaluer l'implication sélective des jeunes neurones dans les variations neurochimiques dans le GD ventral. Bien que nous n'ayons pas pu observer un effet de type antidépresseur de la stimulation des jeunes neurones ni du traitement chronique avec la fluoxétine dans cette expérience, ce travail a mis en évidence que la stimulation des jeunes neurones augmente la transmission GABAergique dans le GD ventral, sans effet sur la transmission glutamatergique (Figure 46). Tout comme lors des résultats obtenus dans l'objectif 1 (voir paragraphe II), une augmentation des concentrations extracellulaires de GABA dans le GD ventral après stimulation optogénétique des jeunes neurones est en accord avec l'hypothèse d'un lien indirect entre jeunes neurones et neurones matures. En effet, la stimulation des jeunes neurones après le traitement chronique avec la fluoxétine pourrait dans ce cas conduire à la libération plus importante du GABA. Cette augmentation des concentrations extracellulaires de GABA pourrait indiquer une inhibition plus importante des neurones matures, qui devrait alors se refléter par une diminution de la transmission glutamatergique dans le GD ventral. Une telle diminution n'a pas été constatée. Cela est peut-être dû à la libération augmentée de glutamate suite à la stimulation des jeunes neurones. Le lien direct entre les jeunes neurones et les neurones matures pourrait également expliquer cela ; en effet, la stimulation des jeunes neurones engendrerait une libération importante de glutamate, favorisant ainsi l'excitation des neurones matures via les récepteurs NMDA. L'excitation des neurones matures pourrait alors contrebalancer l'inhibition plus importante de ces neurones. Ce contre balancement de l'effet sur les neurones matures pourrait alors expliquer l'absence d'un effet de type antidépresseur par la stimulation des jeunes neurones. En conclusion, cette expérience d'optogénétique serait à la fois en accord avec l'existence des liens direct et indirect entre les jeunes neurones et les neurones matures.

Dans cette expérience d'optogénétique, la stimulation des jeunes neurones a été réalisée avec des paramètres destinés à reproduire la fréquence de décharge électrique des cellules granulaires ; cependant, il s'agit d'une stimulation synchrone de l'ensemble des jeunes neurones exposés à la lumière par les optrodes. Ces limites techniques de la stimulation

optogénétique la différencie certainement des conditions physiologiques. De plus, les conséquences neurochimiques de la stimulation des jeunes neurones n'ont pas été à l'origine d'effets comportementaux dans le NSF ou dans l'OF, tout comme le traitement chronique avec la fluoxétine. Afin d'étudier ces effets comportementaux, nous avons réalisé une nouvelle expérience d'optogénétique en utilisant cette fois-ci le modèle CORT. Cette étude a été limitée par la mortalité très importante des animaux ainsi que par la difficulté à récupérer de l'anesthésie et de la chirurgie chez la souche de souris 129SV/BL6 dans ce modèle CORT.

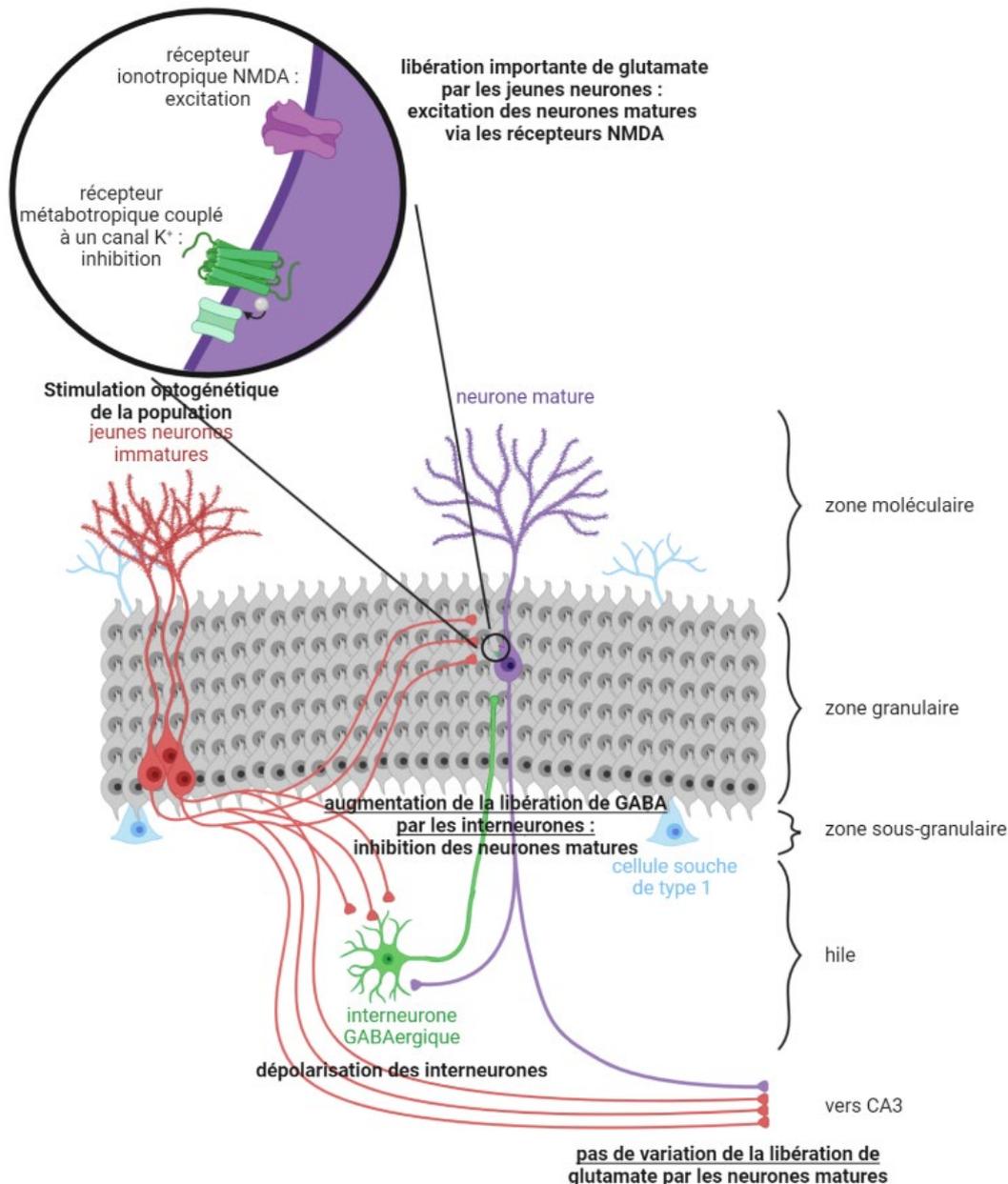


Figure 46 - Efférences des jeunes neurones immatures dans le gyrus dentelé de l'hippocampe après traitement chronique avec la fluoxétine et après stimulation optogénétique des jeunes neurones.

Conclusions

Tableau 6 – Récapitulatif des résultats neurochimiques obtenus

Expériences réalisées	Modèle animal	[5-HT] _{ext}	[Glu] _{ext}	[GABA] _{ext}
Traitement chronique fluoxétine	Naïf	↑	↓	∅
Administration intra-hippocampique Ro25-6981	Modèle CORT	Non- inclus	↑	∅
Stimulation optogénétique des jeunes neurones	Naïf	∅	∅	↑
Inhibition optogénétique des jeunes neurones	Modèle CORT	Non- inclus	Non- inclus	Non- inclus

Ainsi, de nombreuses études ont révélé la connectivité des jeunes neurones issus de la neurogenèse adulte hippocampique avec des interneurons GABAergiques du hile du GD. La récente étude publiée par Luna et al. (2019) est la première à décrire un lien direct bidirectionnel entre les jeunes neurones et les neurones matures. Elle conteste l'existence d'un lien indirect entre les jeunes neurones et les neurones matures (Luna et al., 2019). Ce lien indirect ne semble pas se retrouver par une approche électrophysiologique, qui permet l'étude des conséquences immédiates (dans la seconde suivante) de la stimulation des jeunes neurones. Durant cette thèse, nous nous sommes intéressés aux variations de neurotransmissions sur des dialysats recueillis toutes les 15 minutes. Cette durée plus importante pourrait permettre l'implication de la neurotransmission GABAergique. De plus, les conditions expérimentales ne sont pas les mêmes que celles de Luna et al. (2019). Dans nos expériences, nous nous sommes intéressés à l'effet du traitement chronique avec la fluoxétine ; tandis que dans l'étude de Luna, il n'y a pas de traitement avec un antidépresseur. Ce traitement chronique avec la fluoxétine pourrait engendrer une réorganisation de la connectivité des jeunes neurones, comme cela est le cas lors d'un environnement enrichi (Bergami et al., 2015). Nos résultats (Tableau 6) semblent confirmer l'implication d'interneurones GABAergiques situés dans le hile du GD après un traitement chronique avec la fluoxétine. Les jeunes neurones dans le GD issus de la neurogenèse adulte hippocampique, dont les différentes étapes sont stimulées avec la fluoxétine, semblent donc capables d'influencer l'activité globale du GD, bien qu'ils ne constituent qu'une petite population

neuronal du GD. Cela serait en grande partie lié aux interneurons GABAergiques situés dans le hile du GD et projetant vers les neurones matures du GD. Concernant le lien direct, nos expériences suggèrent qu'il s'agit d'un lien potentiel entre ces 2 populations neuronales, privilégié ou non selon nos conditions expérimentales. Lors de l'expérience de stimulation optogénétique des jeunes neurones, les 2 hypothèses du lien indirect et du lien direct semblent bien être complémentaires.

En conclusion, bien qu'il s'agisse d'une faible population de cellules, les nouveaux neurones dans le DG issus de la neurogenèse hippocampique adulte modifient les neurotransmissions glutamatergiques et GABAergiques dans le GD ventral. L'utilisation de la microdialyse couplée à l'optogénétique confirme que l'activité électrique des jeunes neurones est à l'origine d'un effet neurochimique dans le GD ventral, et qu'il s'agit bien d'un effet propre à ces jeunes neurones.

Perspectives

Ces travaux ont mis en évidence une diminution des concentrations extracellulaires de glutamate dans le GD de l'hippocampe suite au traitement chronique avec un ISRS, la fluoxétine. Par la suite, les travaux d'inhibition de l'activité électrique des jeunes neurones par une approche pharmacologique ont montré une augmentation de ces concentrations extracellulaires de glutamate dans le GD de l'hippocampe. Ces résultats supposent que les jeunes neurones influencent l'activité globale du GD en modifiant l'activité électrique des neurones matures, par l'intervention d'interneurones GABAergiques hilaires. Enfin, les expériences de stimulation optogénétique ont confirmé cette hypothèse en révélant une augmentation des concentrations extracellulaires de GABA dans le GD de l'hippocampe.

Il serait intéressant de poursuivre ces travaux, tout d'abord en vérifiant si cette augmentation de la transmission GABAergique dans le GD suite à la stimulation optogénétique des jeunes neurones s'accompagne bien d'effets comportementaux de type antidépresseur neurogenèse-dépendant. Il faudrait ainsi réaliser les mêmes expériences d'optogénétique couplés à la microdialyse lors de plusieurs tests comportementaux neurogenèse-dépendant ou -indépendant dans le modèle CORT. A l'inverse, la réalisation de ces expériences en inhibant les jeunes neurones permettrait de confirmer ces résultats. Cela est d'autant plus prometteur puisque l'utilisation de la technique de chimiogénétique (plus précisément DREADD (*Designer Receptor Exclusively Activated by Designer Drugs*, récepteur activé uniquement par un ligand synthétique)) montre des résultats dans des tests neurogenèse-indépendant. L'inhibition de l'activité électrique des jeunes neurones, après un traitement chronique avec la fluoxétine ou non, entraîne une augmentation du temps d'immobilité dans le TST et une diminution de la distance parcourue dans le centre de l'OF. Au contraire, la stimulation des jeunes neurones par chimiogénétique, sans traitement avec la fluoxétine, entraîne une diminution du temps d'immobilité dans le TST et une augmentation de la distance parcourue dans le centre de l'OF (Tunc-Ozcan et al., 2019).

Enfin, de nouvelles expérimentations pourraient être mises en place :

- ✚ La potentialisation de la transmission GABAergique par l'administration locale intra-hippocampique d'un modulateur allostérique positif des interneurones GABAergiques (diazépam). En effet nos données soulignent le rôle de la transmission GABAergique dans l'activité des jeunes neurones du GD. En revanche, la stimulation optogénétique est synchrone et ubiquitaire ce qui la différencie certainement des

conditions physiologiques. Ainsi, le fait de potentialiser localement la transmission GABAergique en administrant le diazépam n'affectera pas aussi drastiquement l'activité des jeunes neurones que la stimulation optogénétique. Nous espérons donc ainsi corréler la potentialisation de l'effet comportemental de la fluoxétine dans le NSF avec les effets sur les transmissions GABAergique et glutamatergique hippocampiques.

- ✚ L'inhibition optogénétique des interneurons GABAergiques du hile du GD, qui devrait empêcher les effets de type antidépresseur neurogène-dépendant ?
- ✚ Confirmer la présence ou l'absence de lien entre les jeunes neurones et les neurones matures en détruisant les jeunes neurones aux rayons X ou en utilisant des souris génétiquement modifiées GFAP-TK (Saxe et al., 2006).
- ✚ La mesure des variations de neurotransmissions dans le subiculum, la région de projection des cellules pyramidales de l'aire CA1, après la stimulation ou l'inhibition optogénétique des jeunes neurones.

BIBLIOGRAPHIE

A

- Abbott, R., Whear, R., Nikolaou, V., Bethel, A., Coon, J. T., Stein, K., & Dickens, C. (2015). Tumour necrosis factor-alpha inhibitor therapy in chronic physical illness: A systematic review and meta-analysis of the effect on depression and anxiety. *J Psychosom Res*, *79*(3), 175-184. doi: 10.1016/j.jpsychores.2015.04.008
- Acsady, L., Gorcs, T. J., & Freund, T. F. (1996). Different populations of vasoactive intestinal polypeptide-immunoreactive interneurons are specialized to control pyramidal cells or interneurons in the hippocampus. *Neuroscience*, *73*(2), 317-334. doi: 10.1016/0306-4522(95)00609-5
- Acsady, L., Kamondi, A., Sik, A., Freund, T., & Buzsaki, G. (1998). GABAergic cells are the major postsynaptic targets of mossy fibers in the rat hippocampus. *J Neurosci*, *18*(9), 3386-3403.
- Adam, E. K., Doane, L. D., Zinbarg, R. E., Mineka, S., Craske, M. G., & Griffith, J. W. (2010). Prospective prediction of major depressive disorder from cortisol awakening responses in adolescence. *Psychoneuroendocrinology*, *35*(6), 921-931. doi: 10.1016/j.psyneuen.2009.12.007
- Aimone, J. B., Li, Y., Lee, S. W., Clemenson, G. D., Deng, W., & Gage, F. H. (2014). Regulation and function of adult neurogenesis: from genes to cognition. *Physiol Rev*, *94*(4), 991-1026. doi: 10.1152/physrev.00004.2014
- Al-Hakeim, H. K., Twayej, A. J., Al-Dujaili, A. H., & Maes, M. (2020). Plasma Indoleamine-2,3-Dioxygenase (IDO) is Increased in Drug-Naive Major Depressed Patients and Treatment with Sertraline and Ketoprofen Normalizes IDO in Association with Pro-Inflammatory and Immune-Regulatory Cytokines. *CNS Neurol Disord Drug Targets*, *19*(1), 44-54. doi: 10.2174/1871527319666200102100307
- Altman, J., & Das, G. D. (1965). Autoradiographic and histological evidence of postnatal hippocampal neurogenesis in rats. *J Comp Neurol*, *124*(3), 319-335. doi: 10.1002/cne.901240303
- Amaral, D. G., Scharfman, H. E., & Lavenex, P. (2007). The dentate gyrus: fundamental neuroanatomical organization (dentate gyrus for dummies). *Prog Brain Res*, *163*, 3-22. doi: 10.1016/S0079-6123(07)63001-5
- Anacker, C., Cattaneo, A., Luoni, A., Musaelyan, K., Zunszain, P. A., Milanese, E., . . . Pariante, C. M. (2013). Glucocorticoid-related molecular signaling pathways regulating hippocampal neurogenesis. *Neuropsychopharmacology*, *38*(5), 872-883. doi: 10.1038/npp.2012.253
- Anacker, C., & Hen, R. (2017). Adult hippocampal neurogenesis and cognitive flexibility - linking memory and mood. *Nat Rev Neurosci*, *18*(6), 335-346. doi: 10.1038/nrn.2017.45
- Asberg, M., Bertilsson, L., Martensson, B., Scalia-Tomba, G. P., Thoren, P., & Traskman-Bendz, L. (1984). CSF monoamine metabolites in melancholia. *Acta Psychiatr Scand*, *69*(3), 201-219. doi: 10.1111/j.1600-0447.1984.tb02488.x

B

- Banasr, M., Lepack, A., Fee, C., Duric, V., Maldonado-Aviles, J., DiLeone, R., . . . Sanacora, G. (2017). Characterization of GABAergic marker expression in the chronic unpredictable stress model of depression. *Chronic Stress (Thousand Oaks)*, *1*. doi: 10.1177/2470547017720459
- Ben-Ari, Y. (2007). [GABA, a key transmitter for fetal brain maturation]. *Med Sci (Paris)*, *23*(8-9), 751-755. doi: 10.1051/medsci/20072389751
- Bergami, M., Masserdotti, G., Temprana, S. G., Motori, E., Eriksson, T. M., Gobel, J., . . . Berninger, B. (2015). A critical period for experience-dependent remodeling of adult-born neuron connectivity. *Neuron*, *85*(4), 710-717. doi: 10.1016/j.neuron.2015.01.001
- Bernstein, H. G., Meyer-Lotz, G., Dobrowolny, H., Bannier, J., Steiner, J., Walter, M., & Bogerts, B. (2015). Reduced density of glutamine synthetase immunoreactive astrocytes in different cortical areas in major depression but not in bipolar I disorder. *Front Cell Neurosci*, *9*, 273. doi: 10.3389/fncel.2015.00273
- Boareto, M., Iber, D., & Taylor, V. (2017). Differential interactions between Notch and ID factors control neurogenesis by modulating Hes factor autoregulation. *Development*, *144*(19), 3465-3474. doi: 10.1242/dev.152520
- 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*(3), 298-302. doi: 10.1007/BF00181937
- Boldrini, M., Butt, T. H., Santiago, A. N., Tamir, H., Dwork, A. J., Rosoklija, G. B., . . . Mann, J. J. (2014). Benzodiazepines and the potential trophic effect of antidepressants on dentate gyrus cells in mood disorders. *Int J Neuropsychopharmacol*, *17*(12), 1923-1933. doi: 10.1017/S1461145714000844
- Boldrini, M., Fulmore, C. A., Tartt, A. N., Simeon, L. R., Pavlova, I., Poposka, V., . . . Mann, J. J. (2018). Human Hippocampal Neurogenesis Persists throughout Aging. *Cell Stem Cell*, *22*(4), 589-599 e585. doi: 10.1016/j.stem.2018.03.015
- Boldrini, M., Santiago, A. N., Hen, R., Dwork, A. J., Rosoklija, G. B., Tamir, H., . . . John Mann, J. (2013). Hippocampal granule neuron number and dentate gyrus volume in antidepressant-treated and untreated major depression. *Neuropsychopharmacology*, *38*(6), 1068-1077. doi: 10.1038/npp.2013.5
- Bonaguidi, M. A., Wheeler, M. A., Shapiro, J. S., Stadel, R. P., Sun, G. J., Ming, G. L., & Song, H. (2011). In vivo clonal analysis reveals self-renewing and multipotent adult neural stem cell characteristics. *Cell*, *145*(7), 1142-1155. doi: 10.1016/j.cell.2011.05.024
- Bordiuk, O. L., Smith, K., Morin, P. J., & Semenov, M. V. (2014). Cell proliferation and neurogenesis in adult mouse brain. *PLoS One*, *9*(11), e111453. doi: 10.1371/journal.pone.0111453
- Bristow, L. J., Gulia, J., Weed, M. R., Srikumar, B. N., Li, Y. W., Graef, J. D., . . . Sinz, M. (2017). Preclinical Characterization of (R)-3-((3S,4S)-3-fluoro-4-(4-hydroxyphenyl)piperidin-1-yl)-1-(4-methylbenzyl)pyrrolidin-2-one (BMS-986169), a Novel, Intravenous, Glutamate N-Methyl-d-Aspartate 2B Receptor Negative Allosteric Modulator with Potential in Major Depressive Disorder. *J Pharmacol Exp Ther*, *363*(3), 377-393. doi: 10.1124/jpet.117.242784
- Bruel-Jungerman, E., Davis, S., Rampon, C., & Laroche, S. (2006). Long-term potentiation enhances neurogenesis in the adult dentate gyrus. *J Neurosci*, *26*(22), 5888-5893. doi: 10.1523/JNEUROSCI.0782-06.2006

Buntinx, M., Moreels, M., Vandenabeele, F., Lambrechts, I., Raus, J., Steels, P., . . . Ameloot, M. (2004). Cytokine-induced cell death in human oligodendroglial cell lines: I. Synergistic effects of IFN-gamma and TNF-alpha on apoptosis. *J Neurosci Res*, *76*(6), 834-845. doi: 10.1002/jnr.20118

C

- Cajal, S.R. (1928). Degeneration & regeneration of the nervous system. *Oxford University Press*.
- Calabrese, F., Rossetti, A. C., Racagni, G., Gass, P., Riva, M. A., & Molteni, R. (2014). Brain-derived neurotrophic factor: a bridge between inflammation and neuroplasticity. *Front Cell Neurosci*, *8*, 430. doi: 10.3389/fncel.2014.00430
- Cameron, H. A., & McKay, R. D. (2001). Adult neurogenesis produces a large pool of new granule cells in the dentate gyrus. *J Comp Neurol*, *435*(4), 406-417. doi: 10.1002/cne.1040
- Campbell, S., Marriott, M., Nahmias, C., & MacQueen, G. M. (2004). Lower hippocampal volume in patients suffering from depression: a meta-analysis. *Am J Psychiatry*, *161*(4), 598-607. doi: 10.1176/appi.ajp.161.4.598
- Canales, Juan J. (2016). *Adult Neurogenesis in the Hippocampus: Health, Psychopathology, and Brain Disease*.
- Caspi, A., Hariri, A. R., Holmes, A., Uher, R., & Moffitt, T. E. (2010). Genetic sensitivity to the environment: the case of the serotonin transporter gene and its implications for studying complex diseases and traits. *Am J Psychiatry*, *167*(5), 509-527. doi: 10.1176/appi.ajp.2010.09101452
- Chen, B., Dowlatshahi, D., MacQueen, G. M., Wang, J. F., & Young, L. T. (2001). Increased hippocampal BDNF immunoreactivity in subjects treated with antidepressant medication. *Biol Psychiatry*, *50*(4), 260-265. doi: 10.1016/s0006-3223(01)01083-6
- Chen, M. J., & Russo-Neustadt, A. A. (2009). Running exercise-induced up-regulation of hippocampal brain-derived neurotrophic factor is CREB-dependent. *Hippocampus*, *19*(10), 962-972. doi: 10.1002/hipo.20579
- Chiu, W. C., Su, Y. P., Su, K. P., & Chen, P. C. (2017). Recurrence of depressive disorders after interferon-induced depression. *Transl Psychiatry*, *7*(2), e1026. doi: 10.1038/tp.2016.274
- Choi, K. W., Na, E. J., Fava, M., Mischoulon, D., Cho, H., & Jeon, H. J. (2018). Increased adrenocorticotrophic hormone (ACTH) levels predict severity of depression after six months of follow-up in outpatients with major depressive disorder. *Psychiatry Res*, *270*, 246-252. doi: 10.1016/j.psychres.2018.09.047
- Colle, R., Trabado, S., David, D. J., Brailly-Tabard, S., Hardy, P., Falissard, B., . . . Corruble, E. (2017). Plasma BDNF Level in Major Depression: Biomarker of the Val66Met BDNF Polymorphism and of the Clinical Course in Met Carrier Patients. *Neuropsychobiology*, *75*(1), 39-45. doi: 10.1159/000478862

D

- Danielson, N. B., Kaifosh, P., Zaremba, J. D., Lovett-Barron, M., Tsai, J., Denny, C. A., . . . Kheirbek, M. A. (2016). Distinct Contribution of Adult-Born Hippocampal Granule Cells to Context Encoding. *Neuron*, *90*(1), 101-112. doi: 10.1016/j.neuron.2016.02.019
- Dantzer, R., O'Connor, J. C., Freund, G. G., Johnson, R. W., & Kelley, K. W. (2008). From inflammation to sickness and depression: when the immune system subjugates the brain. *Nat Rev Neurosci*, *9*(1), 46-56. doi: 10.1038/nrn2297
- Dauer, W., & Przedborski, S. (2003). Parkinson's disease: mechanisms and models. *Neuron*, *39*(6), 889-909. doi: 10.1016/s0896-6273(03)00568-3
- David, D. J., Samuels, B. A., Rainer, Q., Wang, J. W., Marsteller, D., Mendez, I., . . . Hen, R. (2009). Neurogenesis-dependent and -independent effects of fluoxetine in an animal model of anxiety/depression. *Neuron*, *62*(4), 479-493. doi: 10.1016/j.neuron.2009.04.017
- David, D. J., Wang, J., Samuels, B. A., Rainer, Q., David, I., Gardier, A. M., & Hen, R. (2010). Implications of the functional integration of adult-born hippocampal neurons in anxiety-depression disorders. *Neuroscientist*, *16*(5), 578-591. doi: 10.1177/1073858409360281
- Davies, D. A., Greba, Q., Selk, J. C., Catton, J. K., Baillie, L. D., Mulligan, S. J., & Howland, J. G. (2017). Interactions between medial prefrontal cortex and dorsomedial striatum are necessary for odor span capacity in rats: role of GluN2B-containing NMDA receptors. *Learn Mem*, *24*(10), 524-531. doi: 10.1101/lm.045419.117
- Defaix, C., Solgadi, A., Pham, T. H., Gardier, A. M., Chaminade, P., & Tritschler, L. (2018). Rapid analysis of glutamate, glutamine and GABA in mice frontal cortex microdialysis samples using HPLC coupled to electrospray tandem mass spectrometry. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, *152*, 31-38. doi: 10.1016/j.jpba.2018.01.039
- 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*(41), 10380-10386. doi: 10.1523/JNEUROSCI.3863-06.2006
- Deltheil, T., Guiard, B. P., Cerdan, J., David, D. J., Tanaka, K. F., Reperant, C., . . . Gardier, A. M. (2008). Behavioral and serotonergic consequences of decreasing or increasing hippocampus brain-derived neurotrophic factor protein levels in mice. *Neuropharmacology*, *55*(6), 1006-1014. doi: 10.1016/j.neuropharm.2008.08.001
- Diaz, S. L., Doly, S., Narboux-Neme, N., Fernandez, S., Mazot, P., Banas, S. M., . . . Maroteaux, L. (2012). 5-HT(2B) receptors are required for serotonin-selective antidepressant actions. *Mol Psychiatry*, *17*(2), 154-163. doi: 10.1038/mp.2011.159
- Doan, J., Gardier, A. M., & Tritschler, L. (2019). Role of adult-born granule cells in the hippocampal functions: Focus on the GluN2B-containing NMDA receptors. *Eur Neuropsychopharmacol*, *29*(10), 1065-1082. doi: 10.1016/j.euroneuro.2019.07.135
- Dowlati, Y., Herrmann, N., Swardfager, W., Liu, H., Sham, L., Reim, E. K., & Lanctot, K. L. (2010). A meta-analysis of cytokines in major depression. *Biol Psychiatry*, *67*(5), 446-457. doi: 10.1016/j.biopsych.2009.09.033
- Dranovsky, A., & Hen, R. (2006). Hippocampal neurogenesis: regulation by stress and antidepressants. *Biol Psychiatry*, *59*(12), 1136-1143. doi: 10.1016/j.biopsych.2006.03.082

- Drew, L. J., Kheirbek, M. A., Luna, V. M., Denny, C. A., Cloyd, M. A., Wu, M. V., . . . Hen, R. (2016). Activation of local inhibitory circuits in the dentate gyrus by adult-born neurons. *Hippocampus*, *26*(6), 763-778. doi: 10.1002/hipo.22557
- Dulawa, S. C., Holick, K. A., Gundersen, B., & Hen, R. (2004). Effects of chronic fluoxetine in animal models of anxiety and depression. *Neuropsychopharmacology*, *29*(7), 1321-1330. doi: 10.1038/sj.npp.1300433
- Durham, Paul, Garrett, F., Hawkins, J., & Hayden, Joshua. (2011). Differential behavioral response to thermal stimuli following unilateral or bilateral temporomandibular joint inflammation. *Journal of Pain - J PAIN*, *12*. doi: 10.1016/j.jpain.2011.02.167

E

- Encinas, J. M., Michurina, T. V., Peunova, N., Park, J. H., Tordo, J., Peterson, D. A., . . . Enikolopov, G. (2011). Division-coupled astrocytic differentiation and age-related depletion of neural stem cells in the adult hippocampus. *Cell Stem Cell*, *8*(5), 566-579. doi: 10.1016/j.stem.2011.03.010
- Eriksson, P. S., Perfilieva, E., Bjork-Eriksson, T., Alborn, A. M., Nordborg, C., Peterson, D. A., & Gage, F. H. (1998). Neurogenesis in the adult human hippocampus. *Nat Med*, *4*(11), 1313-1317. doi: 10.1038/3305
- Esposito, M. S., Piatti, V. C., Laplagne, D. A., Morgenstern, N. A., Ferrari, C. C., Pitossi, F. J., & Schinder, A. F. (2005). Neuronal differentiation in the adult hippocampus recapitulates embryonic development. *J Neurosci*, *25*(44), 10074-10086. doi: 10.1523/JNEUROSCI.3114-05.2005

F

- Fan, L. Z., & Lin, M. Z. (2015). Optical control of biological processes by light-switchable proteins. *Wiley Interdiscip Rev Dev Biol*, *4*(5), 545-554. doi: 10.1002/wdev.188
- Farioli-Vecchioli, S., Mattera, A., Micheli, L., Ceccarelli, M., Leonardi, L., Sarauli, D., . . . Tirone, F. (2014). Running rescues defective adult neurogenesis by shortening the length of the cell cycle of neural stem and progenitor cells. *Stem Cells*, *32*(7), 1968-1982. doi: 10.1002/stem.1679
- Feyissa, A. M., Chandran, A., Stockmeier, C. A., & Karolewicz, B. (2009). Reduced levels of NR2A and NR2B subunits of NMDA receptor and PSD-95 in the prefrontal cortex in major depression. *Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry*, *33*(1), 70-75. doi: 10.1016/j.pnpbp.2008.10.005
- Fischer, G., Mutel, V., Trube, G., Malherbe, P., Kew, J. N., Mohacsi, E., . . . Kemp, J. A. (1997). Ro 25-6981, a highly potent and selective blocker of N-methyl-D-aspartate receptors containing the NR2B subunit. Characterization in vitro. *J Pharmacol Exp Ther*, *283*(3), 1285-1292.
- Fornaro, M., Anastasia, A., Valchera, A., Carano, A., Orsolini, L., Vellante, F., . . . De Berardis, D. (2019). The FDA "Black Box" Warning on Antidepressant Suicide Risk in Young Adults: More Harm Than Benefits? *Front Psychiatry*, *10*, 294. doi: 10.3389/fpsy.2019.00294

Freis, E. D. (1954). Mental depression in hypertensive patients treated for long periods with large doses of reserpine. *N Engl J Med*, 251(25), 1006-1008. doi: 10.1056/NEJM195412162512504

G

- Gabbay, V., Mao, X., Klein, R. G., Ely, B. A., Babb, J. S., Panzer, A. M., . . . Shungu, D. C. (2012). Anterior cingulate cortex gamma-aminobutyric acid in depressed adolescents: relationship to anhedonia. *Arch Gen Psychiatry*, 69(2), 139-149. doi: 10.1001/archgenpsychiatry.2011.131
- Gartlehner, G., Wagner, G., Matyas, N., Titscher, V., Greimel, J., Lux, L., . . . Lohr, K. N. (2017). Pharmacological and non-pharmacological treatments for major depressive disorder: review of systematic reviews. *BMJ Open*, 7(6), e014912. doi: 10.1136/bmjopen-2016-014912
- Ge, S., Pradhan, D. A., Ming, G. L., & Song, H. (2007). GABA sets the tempo for activity-dependent adult neurogenesis. *Trends Neurosci*, 30(1), 1-8. doi: 10.1016/j.tins.2006.11.001
- Geeraerts, T., Duranteau, J., & Vigue, B. (2008). Microdialyse cérébrale : méthodologie et applications cliniques. *Réanimation*, 17, 702-707.
- 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(1), 183-186. doi: 10.1016/0031-9384(81)90320-6
- Ghosh, H. S. (2019). Adult Neurogenesis and the Promise of Adult Neural Stem Cells. *J Exp Neurosci*, 13, 1179069519856876. doi: 10.1177/1179069519856876
- Goncalves, J. T., Schafer, S. T., & Gage, F. H. (2016). Adult Neurogenesis in the Hippocampus: From Stem Cells to Behavior. *Cell*, 167(4), 897-914. doi: 10.1016/j.cell.2016.10.021
- Gonzalez, J. C., Epps, S. A., Markwardt, S. J., Wadiche, J. I., & Overstreet-Wadiche, L. (2018). Constitutive and Synaptic Activation of GIRK Channels Differentiates Mature and Newborn Dentate Granule Cells. *J Neurosci*, 38(29), 6513-6526. doi: 10.1523/JNEUROSCI.0674-18.2018
- Groc, L., Heine, M., Cousins, S. L., Stephenson, F. A., Lounis, B., Cognet, L., & Choquet, D. (2006). NMDA receptor surface mobility depends on NR2A-2B subunits. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 103(49), 18769-18774. doi: 10.1073/pnas.0605238103
- Groisman, A. I., Yang, S. M., & Schinder, A. F. (2020). Differential Coupling of Adult-Born Granule Cells to Parvalbumin and Somatostatin Interneurons. *Cell Rep*, 30(1), 202-214 e204. doi: 10.1016/j.celrep.2019.12.005
- Guilloux, J. P., David, D. J., Guiard, B. P., Chenu, F., Reperant, C., Toth, M., . . . Gardier, A. M. (2006). Blockade of 5-HT1A receptors by (+/-)-pindolol potentiates cortical 5-HT outflow, but not antidepressant-like activity of paroxetine: microdialysis and behavioral approaches in 5-HT1A receptor knockout mice. *Neuropsychopharmacology*, 31(10), 2162-2172. doi: 10.1038/sj.npp.1301019
- Guilloux, J. P., Douillard-Guilloux, G., Kota, R., Wang, X., Gardier, A. M., Martinowich, K., . . . Sibille, E. (2012). Molecular evidence for BDNF- and GABA-related dysfunctions in the amygdala of female subjects with major depression. *Mol Psychiatry*, 17(11), 1130-1142. doi: 10.1038/mp.2011.113

H

- Hanson, J. E., Weber, M., Meilandt, W. J., Wu, T., Luu, T., Deng, L., . . . Zhou, Q. (2013). GluN2B antagonism affects interneurons and leads to immediate and persistent changes in synaptic plasticity, oscillations, and behavior. *Neuropsychopharmacology*, *38*(7), 1221-1233. doi: 10.1038/npp.2013.19
- Hennings, J. M., Kohli, M. A., Uhr, M., Holsboer, F., Ising, M., & Lucae, S. (2019). Polymorphisms in the BDNF and BDNFOS genes are associated with hypothalamus-pituitary axis regulation in major depression. *Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry*, *95*, 109686. doi: 10.1016/j.pnpbp.2019.109686
- Hochgerner, H., Zeisel, A., Lonnerberg, P., & Linnarsson, S. (2018). Conserved properties of dentate gyrus neurogenesis across postnatal development revealed by single-cell RNA sequencing. *Nat Neurosci*, *21*(2), 290-299. doi: 10.1038/s41593-017-0056-2
- Holick, K. A., Lee, D. C., Hen, R., & Dulawa, S. C. (2008). Behavioral effects of chronic fluoxetine in BALB/cJ mice do not require adult hippocampal neurogenesis or the serotonin 1A receptor. *Neuropsychopharmacology*, *33*(2), 406-417. doi: 10.1038/sj.npp.1301399
- Horstmann, S., Dose, T., Lucae, S., Kloiber, S., Menke, A., Hennings, J., . . . Ising, M. (2009). Suppressive effect of mirtazapine on the HPA system in acutely depressed women seems to be transient and not related to antidepressant action. *Psychoneuroendocrinology*, *34*(2), 238-248. doi: 10.1016/j.psyneuen.2008.09.004
- Howren, M. B., Lamkin, D. M., & Suls, J. (2009). Associations of depression with C-reactive protein, IL-1, and IL-6: a meta-analysis. *Psychosom Med*, *71*(2), 171-186. doi: 10.1097/PSY.0b013e3181907c1b
- Hyde, C. L., Nagle, M. W., Tian, C., Chen, X., Paciga, S. A., Wendland, J. R., . . . Winslow, A. R. (2016). Identification of 15 genetic loci associated with risk of major depression in individuals of European descent. *Nat Genet*, *48*(9), 1031-1036. doi: 10.1038/ng.3623

I

- Ibrahim, L., Diaz Granados, N., Jolkovsky, L., Brutsche, N., Luckenbaugh, D. A., Herring, W. J., . . . Zarate, C. A., Jr. (2012). A Randomized, placebo-controlled, crossover pilot trial of the oral selective NR2B antagonist MK-0657 in patients with treatment-resistant major depressive disorder. *J Clin Psychopharmacol*, *32*(4), 551-557. doi: 10.1097/JCP.0b013e31825d70d6
- Ida, T., Hara, M., Nakamura, Y., Kozaki, S., Tsunoda, S., & Ihara, H. (2008). Cytokine-induced enhancement of calcium-dependent glutamate release from astrocytes mediated by nitric oxide. *Neurosci Lett*, *432*(3), 232-236. doi: 10.1016/j.neulet.2007.12.047
- Ikrar, T., Guo, N., He, K., Besnard, A., Levinson, S., Hill, A., . . . Sahay, A. (2013). Adult neurogenesis modifies excitability of the dentate gyrus. *Front Neural Circuits*, *7*, 204. doi: 10.3389/fncir.2013.00204

J

Jett, J. D., Bulin, S. E., Hatherall, L. C., McCartney, C. M., & Morilak, D. A. (2017). Deficits in cognitive flexibility induced by chronic unpredictable stress are associated with impaired glutamate neurotransmission in the rat medial prefrontal cortex. *Neuroscience*, 346, 284-297. doi: 10.1016/j.neuroscience.2017.01.017

K

Kannangara, T. S., Bostrom, C. A., Ratzlaff, A., Thompson, L., Cater, R. M., Gil-Mohapel, J., & Christie, B. R. (2014). Deletion of the NMDA receptor GluN2A subunit significantly decreases dendritic growth in maturing dentate granule neurons. *PLoS One*, 9(8), e103155. doi: 10.1371/journal.pone.0103155

Keller, J., Gomez, R., Williams, G., Lembke, A., Lazzeroni, L., Murphy, G. M., Jr., & Schatzberg, A. F. (2017). HPA axis in major depression: cortisol, clinical symptomatology and genetic variation predict cognition. *Mol Psychiatry*, 22(4), 527-536. doi: 10.1038/mp.2016.120

Kempermann, G., Gast, D., Kronenberg, G., Yamaguchi, M., & Gage, F. H. (2003). Early determination and long-term persistence of adult-generated new neurons in the hippocampus of mice. *Development*, 130(2), 391-399. doi: 10.1242/dev.00203

Kempermann, G., Kuhn, H. G., & Gage, F. H. (1997). Genetic influence on neurogenesis in the dentate gyrus of adult mice. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 94(19), 10409-10414. doi: 10.1073/pnas.94.19.10409

Kempton, M. J., Salvador, Z., Munafo, M. R., Geddes, J. R., Simmons, A., Frangou, S., & Williams, S. C. (2011). Structural neuroimaging studies in major depressive disorder. Meta-analysis and comparison with bipolar disorder. *Arch Gen Psychiatry*, 68(7), 675-690. doi: 10.1001/archgenpsychiatry.2011.60

Kessler, R. C., & Bromet, E. J. (2013). The epidemiology of depression across cultures. *Annu Rev Public Health*, 34, 119-138. doi: 10.1146/annurev-publhealth-031912-114409

Kheirbek, M. A., Drew, L. J., Burghardt, N. S., Costantini, D. O., Tannenholz, L., Ahmari, S. E., . . . Hen, R. (2013). Differential control of learning and anxiety along the dorsoventral axis of the dentate gyrus. *Neuron*, 77(5), 955-968. doi: 10.1016/j.neuron.2012.12.038

Kheirbek, M. A., Tannenholz, L., & Hen, R. (2012). NR2B-dependent plasticity of adult-born granule cells is necessary for context discrimination. *J Neurosci*, 32(25), 8696-8702. doi: 10.1523/JNEUROSCI.1692-12.2012

Kiselycznyk, C., Jury, N. J., Halladay, L. R., Nakazawa, K., Mishina, M., Sprengel, R., . . . Holmes, A. (2015). NMDA receptor subunits and associated signaling molecules mediating antidepressant-related effects of NMDA-GluN2B antagonism. *Behav Brain Res*, 287, 89-95. doi: 10.1016/j.bbr.2015.03.023

Kiss, J. P., Szasz, B. K., Fodor, L., Mike, A., Lenkey, N., Kurko, D., . . . Vizi, E. S. (2012). GluN2B-containing NMDA receptors as possible targets for the neuroprotective and antidepressant effects of fluoxetine. *Neurochem Int*, 60(2), 170-176. doi: 10.1016/j.neuint.2011.12.005

Kline, N. S. (1958). Clinical experience with iproniazid (marsilid). *J Clin Exp Psychopathol*, 19(2, Suppl. 1), 72-78; discussion 78-79.

- Kriegstein, A., & Alvarez-Buylla, A. (2009). The glial nature of embryonic and adult neural stem cells. *Annu Rev Neurosci*, 32, 149-184. doi: 10.1146/annurev.neuro.051508.135600
- Kuhn, R. (1957). [Treatment of depressive states with an iminodibenzyl derivative (G 22355)]. *Schweiz Med Wochenschr*, 87(35-36), 1135-1140.
- Kunugi, H., Hori, H., & Ogawa, S. (2015). Biochemical markers subtyping major depressive disorder. *Psychiatry Clin Neurosci*, 69(10), 597-608. doi: 10.1111/pcn.12299
- Kuwabara, T., Hsieh, J., Muotri, A., Yeo, G., Warashina, M., Lie, D. C., . . . Gage, F. H. (2009). Wnt-mediated activation of NeuroD1 and retro-elements during adult neurogenesis. *Nat Neurosci*, 12(9), 1097-1105. doi: 10.1038/nn.2360

L

- Lambert, G., Johansson, M., Agren, H., & Friberg, P. (2000). Reduced brain norepinephrine and dopamine release in treatment-refractory depressive illness: evidence in support of the catecholamine hypothesis of mood disorders. *Arch Gen Psychiatry*, 57(8), 787-793. doi: 10.1001/archpsyc.57.8.787
- Lavado, A., Lagutin, O. V., Chow, L. M., Baker, S. J., & Oliver, G. (2010). Prox1 is required for granule cell maturation and intermediate progenitor maintenance during brain neurogenesis. *PLoS Biol*, 8(8). doi: 10.1371/journal.pbio.1000460
- Li, B., Yang, X. Y., Qian, F. P., Tang, M., Ma, C., & Chiang, L. Y. (2015). A novel analgesic approach to optogenetically and specifically inhibit pain transmission using TRPV1 promoter. *Brain Res*, 1609, 12-20. doi: 10.1016/j.brainres.2015.03.008
- Li, N., Lee, B., Liu, R. J., Banasr, M., Dwyer, J. M., Iwata, M., . . . Duman, R. S. (2010). mTOR-dependent synapse formation underlies the rapid antidepressant effects of NMDA antagonists. *Science*, 329(5994), 959-964. doi: 10.1126/science.1190287
- Li, N., Liu, R. J., Dwyer, J. M., Banasr, M., Lee, B., Son, H., . . . Duman, R. S. (2011). Glutamate N-methyl-D-aspartate receptor antagonists rapidly reverse behavioral and synaptic deficits caused by chronic stress exposure. *Biol Psychiatry*, 69(8), 754-761. doi: 10.1016/j.biopsych.2010.12.015
- Licht, T., Rothe, G., Kreisel, T., Wolf, B., Benny, O., Rooney, A. G., . . . Keshet, E. (2016). VEGF preconditioning leads to stem cell remodeling and attenuates age-related decay of adult hippocampal neurogenesis. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 113(48), E7828-E7836. doi: 10.1073/pnas.1609592113
- Llorens-Martin, M. (2019). Adult-born neurons in brain circuitry. *Science*, 364(6440), 530. doi: 10.1126/science.aax5186
- Lopez-Rojas, J., & Kreutz, M. R. (2016). Mature granule cells of the dentate gyrus--Passive bystanders or principal performers in hippocampal function? *Neurosci Biobehav Rev*, 64, 167-174. doi: 10.1016/j.neubiorev.2016.02.021
- Lorincz, A., & Nusser, Z. (2008). Cell-type-dependent molecular composition of the axon initial segment. *J Neurosci*, 28(53), 14329-14340. doi: 10.1523/JNEUROSCI.4833-08.2008
- Lu, W., Du, J., Goehring, A., & Gouaux, E. (2017). Cryo-EM structures of the triheteromeric NMDA receptor and its allosteric modulation. *Science*, 355(6331). doi: 10.1126/science.aal3729
- Lucas, G., Rymar, V. V., Du, J., Mnie-Filali, O., Bisgaard, C., Manta, S., . . . Debonnel, G. (2007). Serotonin(4) (5-HT(4)) receptor agonists are putative antidepressants with a rapid onset of action. *Neuron*, 55(5), 712-725. doi: 10.1016/j.neuron.2007.07.041

- Lucas, N., Hubain, P., Loas, G., & Jurysta, F. (2017). [Treatment resistant depression: actuality and perspectives in 2017]. *Rev Med Brux*, 38(1), 16-25.
- Luna, V. M., Anacker, C., Burghardt, N. S., Khandaker, H., Andreu, V., Millette, A., . . . Hen, R. (2019). Adult-born hippocampal neurons bidirectionally modulate entorhinal inputs into the dentate gyrus. *Science*, 364(6440), 578-583. doi: 10.1126/science.aat8789
- Lupinsky, D., Moquin, L., & Gratton, A. (2017). Interhemispheric regulation of the rat medial prefrontal cortical glutamate stress response: role of local GABA- and dopamine-sensitive mechanisms. *Psychopharmacology (Berl)*, 234(3), 353-363. doi: 10.1007/s00213-016-4468-6

M

- Machado-Vieira, R., Baumann, J., Wheeler-Castillo, C., Latov, D., Henter, I. D., Salvatore, G., & Zarate, C. A. (2010). The Timing of Antidepressant Effects: A Comparison of Diverse Pharmacological and Somatic Treatments. *Pharmaceuticals (Basel)*, 3(1), 19-41. doi: 10.3390/ph3010019
- Madisen, L., Mao, T., Koch, H., Zhuo, J. M., Berenyi, A., Fujisawa, S., . . . Zeng, H. (2012). A toolbox of Cre-dependent optogenetic transgenic mice for light-induced activation and silencing. *Nat Neurosci*, 15(5), 793-802. doi: 10.1038/nn.3078
- Magalhaes, A. C., Holmes, K. D., Dale, L. B., Comps-Agrar, L., Lee, D., Yadav, P. N., . . . Ferguson, S. S. (2010). CRF receptor 1 regulates anxiety behavior via sensitization of 5-HT₂ receptor signaling. *Nat Neurosci*, 13(5), 622-629. doi: 10.1038/nn.2529
- Marcin, L. R., Warriar, J., Thangathirupathy, S., Shi, J., Karageorge, G. N., Pearce, B. C., . . . Macor, J. E. (2018). BMS-986163, a Negative Allosteric Modulator of GluN2B with Potential Utility in Major Depressive Disorder. *ACS Med Chem Lett*, 9(5), 472-477. doi: 10.1021/acsmchemlett.8b00080
- Medrihan, L., Sagi, Y., Inde, Z., Krupa, O., Daniels, C., Peyrache, A., & Greengard, P. (2017). Initiation of Behavioral Response to Antidepressants by Cholecystokinin Neurons of the Dentate Gyrus. *Neuron*, 95(3), 564-576 e564. doi: 10.1016/j.neuron.2017.06.044
- 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-HT₄ receptor agonist are mediated by a neurogenesis-independent mechanism. *Neuropsychopharmacology*, 39(6), 1366-1378. doi: 10.1038/npp.2013.332
- Method of the Year 2010. (2011). *Nature Methods*, 8(1), 1-1. doi: 10.1038/nmeth.f.321
- Miller, A. H., Maletic, V., & Raison, C. L. (2009). Inflammation and its discontents: the role of cytokines in the pathophysiology of major depression. *Biol Psychiatry*, 65(9), 732-741. doi: 10.1016/j.biopsych.2008.11.029
- Miller, M., Pate, V., Swanson, S. A., Azrael, D., White, A., & Sturmer, T. (2014). Antidepressant class, age, and the risk of deliberate self-harm: a propensity score matched cohort study of SSRI and SNRI users in the USA. *CNS Drugs*, 28(1), 79-88. doi: 10.1007/s40263-013-0120-8
- Miller, O. H., Yang, L., Wang, C. C., Hargroder, E. A., Zhang, Y., Delpire, E., & Hall, B. J. (2014). GluN2B-containing NMDA receptors regulate depression-like behavior and are critical for the rapid antidepressant actions of ketamine. *Elife*, 3, e03581. doi: 10.7554/eLife.03581
- Molteni, R., Calabrese, F., Bedogni, F., Tongiorgi, E., Fumagalli, F., Racagni, G., & Riva, M. A. (2006). Chronic treatment with fluoxetine up-regulates cellular BDNF mRNA

- expression in rat dopaminergic regions. *Int J Neuropsychopharmacol*, 9(3), 307-317. doi: 10.1017/S1461145705005766
- Moreno-Jimenez, E. P., Jurado-Arjona, J., Avila, J., & Llorens-Martin, M. (2019). The Social Component of Environmental Enrichment Is a Pro-neurogenic Stimulus in Adult c57BL6 Female Mice. *Front Cell Dev Biol*, 7, 62. doi: 10.3389/fcell.2019.00062
- Moriguchi, S., Yamada, M., Takano, H., Nagashima, T., Takahata, K., Yokokawa, K., . . . Suhara, T. (2017). Norepinephrine Transporter in Major Depressive Disorder: A PET Study. *Am J Psychiatry*, 174(1), 36-41. doi: 10.1176/appi.ajp.2016.15101334

N

- Neves, G., Cooke, S. F., & Bliss, T. V. (2008). Synaptic plasticity, memory and the hippocampus: a neural network approach to causality. *Nat Rev Neurosci*, 9(1), 65-75. doi: 10.1038/nrn2303
- Noto, B., Klempin, F., Alenina, N., Bader, M., Fink, H., & Sander, S. E. (2016). Increased adult neurogenesis in mice with a permanent overexpression of the postsynaptic 5-HT1A receptor. *Neurosci Lett*, 633, 246-251. doi: 10.1016/j.neulet.2016.09.051
- Nowak, L., Bregestovski, P., Ascher, P., Herbet, A., & Prochiantz, A. (1984). Magnesium gates glutamate-activated channels in mouse central neurones. *Nature*, 307(5950), 462-465. doi: 10.1038/307462a0

O

- Overstreet-Wadiche, L. S., Bensen, A. L., & Westbrook, G. L. (2006). Delayed development of adult-generated granule cells in dentate gyrus. *J Neurosci*, 26(8), 2326-2334. doi: 10.1523/JNEUROSCI.4111-05.2006

P

- Papouin, T., Ladepeche, L., Ruel, J., Sacchi, S., Labasque, M., Hanini, M., . . . Oliet, S. H. (2012). Synaptic and extrasynaptic NMDA receptors are gated by different endogenous coagonists. *Cell*, 150(3), 633-646. doi: 10.1016/j.cell.2012.06.029
- 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(3), 149-167. doi: 10.1016/0165-0270(85)90031-7
- Perera, T. D., Dwork, A. J., Keegan, K. A., Thirumangalakudi, L., Lipira, C. M., Joyce, N., . . . Coplan, J. D. (2011). Necessity of hippocampal neurogenesis for the therapeutic action of antidepressants in adult nonhuman primates. *PLoS One*, 6(4), e17600. doi: 10.1371/journal.pone.0017600
- Picco, L., Subramaniam, M., Abidin, E., Vaingankar, J. A., & Chong, S. A. (2017). Gender differences in major depressive disorder: findings from the Singapore Mental Health Study. *Singapore Med J*, 58(11), 649-655. doi: 10.11622/smedj.2016144

- Popa, D., Cerdan, J., Reperant, C., Guiard, B. P., Guilloux, J. P., David, D. J., & Gardier, A. M. (2010). A longitudinal study of 5-HT outflow during chronic fluoxetine treatment using a new technique of chronic microdialysis in a highly emotional mouse strain. *Eur J Pharmacol*, 628(1-3), 83-90. doi: 10.1016/j.ejphar.2009.11.037
- Porsolt, R. D., Bertin, A., & Jalfre, M. (1977). Behavioral despair in mice: a primary screening test for antidepressants. *Arch Int Pharmacodyn Ther*, 229(2), 327-336.
- Porsolt, R. D., Chermat, R., Lenegre, A., Avril, I., Janvier, S., & Steru, L. (1987). Use of the automated tail suspension test for the primary screening of psychotropic agents. *Arch Int Pharmacodyn Ther*, 288(1), 11-30.

Q

- Quesseveur, G., David, D. J., Gaillard, M. C., Pla, P., Wu, M. V., Nguyen, H. T., . . . Guiard, B. P. (2013). BDNF overexpression in mouse hippocampal astrocytes promotes local neurogenesis and elicits anxiolytic-like activities. *Transl Psychiatry*, 3, e253. doi: 10.1038/tp.2013.30

R

- Rauner, C., & Kohr, G. (2011). Triheteromeric NR1/NR2A/NR2B receptors constitute the major N-methyl-D-aspartate receptor population in adult hippocampal synapses. *J Biol Chem*, 286(9), 7558-7566. doi: 10.1074/jbc.M110.182600
- Ravasz, D., Kacso, G., Fodor, V., Horvath, K., Adam-Vizi, V., & Chinopoulos, C. (2017). Catabolism of GABA, succinic semialdehyde or gamma-hydroxybutyrate through the GABA shunt impair mitochondrial substrate-level phosphorylation. *Neurochem Int*, 109, 41-53. doi: 10.1016/j.neuint.2017.03.008
- Reddy, P. L., Khanna, S., Subhash, M. N., Channabasavanna, S. M., & Rao, B. S. (1992). CSF amine metabolites in depression. *Biol Psychiatry*, 31(2), 112-118. doi: 10.1016/0006-3223(92)90198-9
- Revest, J. M., Dupret, D., Koehl, M., Funk-Reiter, C., Grosjean, N., Piazza, P. V., & Abrous, D. N. (2009). Adult hippocampal neurogenesis is involved in anxiety-related behaviors. *Mol Psychiatry*, 14(10), 959-967. doi: 10.1038/mp.2009.15
- Rice, F., Harold, G., & Thapar, A. (2002). The genetic aetiology of childhood depression: a review. *J Child Psychol Psychiatry*, 43(1), 65-79. doi: 10.1111/1469-7610.00004
- Rocher, C., Jacquot, C., & Gardier, A. M. (1999). Simultaneous effects of local dexfenfluramine application on extracellular glutamate and serotonin levels in rat frontal cortex: a reverse microdialysis study. *Neuropharmacology*, 38(4), 513-523. doi: 10.1016/s0028-3908(98)00212-3
- Ruhe, H. G., Mason, N. S., & Schene, A. H. (2007). Mood is indirectly related to serotonin, norepinephrine and dopamine levels in humans: a meta-analysis of monoamine depletion studies. *Mol Psychiatry*, 12(4), 331-359. doi: 10.1038/sj.mp.4001949

S

- Sahay, A., Scobie, K. N., Hill, A. S., O'Carroll, C. M., Kheirbek, M. A., Burghardt, N. S., . . . Hen, R. (2011). Increasing adult hippocampal neurogenesis is sufficient to improve pattern separation. *Nature*, *472*(7344), 466-470. doi: 10.1038/nature09817
- Santarelli, L., Saxe, M., Gross, C., Surget, A., Battaglia, F., Dulawa, S., . . . Hen, R. (2003). Requirement of hippocampal neurogenesis for the behavioral effects of antidepressants. *Science*, *301*(5634), 805-809. doi: 10.1126/science.1083328
- Saxe, M. D., Battaglia, F., Wang, J. W., Malleret, G., David, D. J., Monckton, J. E., . . . Drew, M. R. (2006). Ablation of hippocampal neurogenesis impairs contextual fear conditioning and synaptic plasticity in the dentate gyrus. *Proc Natl Acad Sci U S A*, *103*(46), 17501-17506. doi: 10.1073/pnas.0607207103
- Schmaal, L., Veltman, D. J., van Erp, T. G., Samann, P. G., Frodl, T., Jahanshad, N., . . . Hibar, D. P. (2016). Subcortical brain alterations in major depressive disorder: findings from the ENIGMA Major Depressive Disorder working group. *Mol Psychiatry*, *21*(6), 806-812. doi: 10.1038/mp.2015.69
- Schmittgen, T. D., & Livak, K. J. (2008). Analyzing real-time PCR data by the comparative C(T) method. *Nat Protoc*, *3*(6), 1101-1108. doi: 10.1038/nprot.2008.73
- Schwabe, L., Tegenthoff, M., Hoffken, O., & Wolf, O. T. (2013). Mineralocorticoid receptor blockade prevents stress-induced modulation of multiple memory systems in the human brain. *Biol Psychiatry*, *74*(11), 801-808. doi: 10.1016/j.biopsych.2013.06.001
- Scott-Burden, T. (1995). Regulation of nitric oxide production by tetrahydrobiopterin. *Circulation*, *91*(1), 248-250. doi: 10.1161/01.cir.91.1.248
- Sierra, A., Encinas, J. M., Deudero, J. J., Chancey, J. H., Enikolopov, G., Overstreet-Wadiche, L. S., . . . Maletic-Savatic, M. (2010). Microglia shape adult hippocampal neurogenesis through apoptosis-coupled phagocytosis. *Cell Stem Cell*, *7*(4), 483-495. doi: 10.1016/j.stem.2010.08.014
- Snyder, J. S., Soumier, A., Brewer, M., Pickel, J., & Cameron, H. A. (2011). Adult hippocampal neurogenesis buffers stress responses and depressive behaviour. *Nature*, *476*(7361), 458-461. doi: 10.1038/nature10287
- Song, H., Stevens, C. F., & Gage, F. H. (2002). Astroglia induce neurogenesis from adult neural stem cells. *Nature*, *417*(6884), 39-44. doi: 10.1038/417039a
- Sorrells, S. F., Caso, J. R., Munhoz, C. D., & Sapolsky, R. M. (2009). The stressed CNS: when glucocorticoids aggravate inflammation. *Neuron*, *64*(1), 33-39. doi: 10.1016/j.neuron.2009.09.032
- Souery, D., Papakostas, G. I., & Trivedi, M. H. (2006). Treatment-resistant depression. *J Clin Psychiatry*, *67 Suppl 6*, 16-22.
- Spalding, K. L., Bergmann, O., Alkass, K., Bernard, S., Salehpour, M., Huttner, H. B., . . . Frisen, J. (2013). Dynamics of hippocampal neurogenesis in adult humans. *Cell*, *153*(6), 1219-1227. doi: 10.1016/j.cell.2013.05.002
- 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*(1), 12-23. doi: 10.1038/nprot.2011.413
- Srivastava, A., Tang, M. X., Mejia-Santana, H., Rosado, L., Louis, E. D., Caccappolo, E., . . . Marder, K. (2011). The relation between depression and parkin genotype: the CORE-PD study. *Parkinsonism Relat Disord*, *17*(10), 740-744. doi: 10.1016/j.parkreldis.2011.07.008

- Steiner, B., Kronenberg, G., Jessberger, S., Brandt, M. D., Reuter, K., & Kempermann, G. (2004). Differential regulation of gliogenesis in the context of adult hippocampal neurogenesis in mice. *Glia*, *46*(1), 41-52. doi: 10.1002/glia.10337
- Stetler, C., & Miller, G. E. (2011). Depression and hypothalamic-pituitary-adrenal activation: a quantitative summary of four decades of research. *Psychosom Med*, *73*(2), 114-126. doi: 10.1097/PSY.0b013e31820ad12b
- Stringaris, A. (2017). Editorial: What is depression? *J Child Psychol Psychiatry*, *58*(12), 1287-1289. doi: 10.1111/jcpp.12844
- Sun, M. Y., Yetman, M. J., Lee, T. C., Chen, Y., & Jankowsky, J. L. (2014). Specificity and efficiency of reporter expression in adult neural progenitors vary substantially among nestin-CreER(T2) lines. *J Comp Neurol*, *522*(5), 1191-1208. doi: 10.1002/cne.23497
- Surget, A., Saxe, M., Leman, S., Ibarguen-Vargas, Y., Chalon, S., Griebel, G., . . . Belzung, C. (2008). Drug-dependent requirement of hippocampal neurogenesis in a model of depression and of antidepressant reversal. *Biol Psychiatry*, *64*(4), 293-301. doi: 10.1016/j.biopsych.2008.02.022

T

- Talbot, J. N., Geffert, L. M., Jorvig, J. E., Goldstein, R. I., Nielsen, C. L., Wolters, N. E., . . . Surratt, C. K. (2016). Rapid and sustained antidepressant properties of an NMDA antagonist/monoamine reuptake inhibitor identified via transporter-based virtual screening. *Pharmacol Biochem Behav*, *150-151*, 22-30. doi: 10.1016/j.pbb.2016.08.007
- Taliaz, D., Stall, N., Dar, D. E., & Zangen, A. (2010). Knockdown of brain-derived neurotrophic factor in specific brain sites precipitates behaviors associated with depression and reduces neurogenesis. *Mol Psychiatry*, *15*(1), 80-92. doi: 10.1038/mp.2009.67
- Tannenholz, L., Hen, R., & Kheirbek, M. A. (2016). GluN2B-Containing NMDA Receptors on Adult-Born Granule Cells Contribute to the Antidepressant Action of Fluoxetine. *Front Neurosci*, *10*, 242. doi: 10.3389/fnins.2016.00242
- Tanti, A., Rainer, Q., Minier, F., Surget, A., & Belzung, C. (2012). Differential environmental regulation of neurogenesis along the septo-temporal axis of the hippocampus. *Neuropharmacology*, *63*(3), 374-384. doi: 10.1016/j.neuropharm.2012.04.022
- Thompson Ray, M., Weickert, C. S., Wyatt, E., & Webster, M. J. (2011). Decreased BDNF, trkB-TK+ and GAD67 mRNA expression in the hippocampus of individuals with schizophrenia and mood disorders. *J Psychiatry Neurosci*, *36*(3), 195-203. doi: 10.1503/jpn.100048
- Toni, N., Laplagne, D. A., Zhao, C., Lombardi, G., Ribak, C. E., Gage, F. H., & Schinder, A. F. (2008). Neurons born in the adult dentate gyrus form functional synapses with target cells. *Nat Neurosci*, *11*(8), 901-907. doi: 10.1038/nn.2156
- Tovar, K. R., & Westbrook, G. L. (1999). The incorporation of NMDA receptors with a distinct subunit composition at nascent hippocampal synapses in vitro. *J Neurosci*, *19*(10), 4180-4188.
- Trullas, R., & Skolnick, P. (1990). Functional antagonists at the NMDA receptor complex exhibit antidepressant actions. *Eur J Pharmacol*, *185*(1), 1-10. doi: 10.1016/0014-2999(90)90204-j

- Tunc-Ozcan, E., Peng, C. Y., Zhu, Y., Dunlop, S. R., Contractor, A., & Kessler, J. A. (2019). Activating newborn neurons suppresses depression and anxiety-like behaviors. *Nat Commun*, *10*(1), 3768. doi: 10.1038/s41467-019-11641-8
- Turner, T. J., Mokler, D. J., & Luebke, J. I. (2004). Calcium influx through presynaptic 5-HT₃ receptors facilitates GABA release in the hippocampus: in vitro slice and synaptosome studies. *Neuroscience*, *129*(3), 703-718. doi: 10.1016/j.neuroscience.2004.08.020

V

- Vaynman, S., Ying, Z., & Gomez-Pinilla, F. (2004). Hippocampal BDNF mediates the efficacy of exercise on synaptic plasticity and cognition. *Eur J Neurosci*, *20*(10), 2580-2590. doi: 10.1111/j.1460-9568.2004.03720.x
- Vitkovic, L., Konsman, J. P., Bockaert, J., Dantzer, R., Homburger, V., & Jacque, C. (2000). Cytokine signals propagate through the brain. *Mol Psychiatry*, *5*(6), 604-615. doi: 10.1038/sj.mp.4000813

W

- Wang, J. W., David, D. J., Monckton, J. E., Battaglia, F., & Hen, R. (2008). Chronic fluoxetine stimulates maturation and synaptic plasticity of adult-born hippocampal granule cells. *J Neurosci*, *28*(6), 1374-1384. doi: 10.1523/JNEUROSCI.3632-07.2008
- Wang, L., Chang, X., She, L., Xu, D., Huang, W., & Poo, M. M. (2015). Autocrine action of BDNF on dendrite development of adult-born hippocampal neurons. *J Neurosci*, *35*(22), 8384-8393. doi: 10.1523/JNEUROSCI.4682-14.2015
- Weihls, K., & Wert, J. M. (2011). A primary care focus on the treatment of patients with major depressive disorder. *Am J Med Sci*, *342*(4), 324-330. doi: 10.1097/MAJ.0b013e318210ff56
- WHO. (2017). Depression and other common mental disorders: Global health estimates: Geneva: World Health Organization.
- Wood, P. L. (1995). The co-agonist concept: is the NMDA-associated glycine receptor saturated in vivo? *Life Sci*, *57*(4), 301-310. doi: 10.1016/0024-3205(95)00288-h

Y

- Yao, Y., Ju, P., Liu, H., Wu, X., Niu, Z., Zhu, Y., . . . Fang, Y. (2020). Ifenprodil rapidly ameliorates depressive-like behaviors, activates mTOR signaling and modulates proinflammatory cytokines in the hippocampus of CUMS rats. *Psychopharmacology (Berl)*, *237*(5), 1421-1433. doi: 10.1007/s00213-020-05469-0
- Young, E. A., Carlson, N. E., & Brown, M. B. (2001). Twenty-four-hour ACTH and cortisol pulsatility in depressed women. *Neuropsychopharmacology*, *25*(2), 267-276. doi: 10.1016/S0893-133X(00)00236-0

- Yu, A., & Lau, A. Y. (2018). Glutamate and Glycine Binding to the NMDA Receptor. *Structure*, 26(7), 1035-1043 e1032. doi: 10.1016/j.str.2018.05.004
- Yuksel, C., & Ongur, D. (2010). Magnetic resonance spectroscopy studies of glutamate-related abnormalities in mood disorders. *Biol Psychiatry*, 68(9), 785-794. doi: 10.1016/j.biopsych.2010.06.016

Z

- Zanoveli, J. M., Pobbe, R. L., de Bortoli, V. C., Carvalho, M. C., Brandao, M. L., & Zangrossi, H., Jr. (2010). Facilitation of 5-HT1A-mediated neurotransmission in dorsal periaqueductal grey matter accounts for the panicolytic-like effect of chronic fluoxetine. *Int J Neuropsychopharmacol*, 13(8), 1079-1088. doi: 10.1017/S146114570999099X
- Zhao, C., Teng, E. M., Summers, R. G., Jr., Ming, G. L., & Gage, F. H. (2006). Distinct morphological stages of dentate granule neuron maturation in the adult mouse hippocampus. *J Neurosci*, 26(1), 3-11. doi: 10.1523/JNEUROSCI.3648-05.2006
- Zhu, S., Stein, R. A., Yoshioka, C., Lee, C. H., Goehring, A., McHaourab, H. S., & Gouaux, E. (2016). Mechanism of NMDA Receptor Inhibition and Activation. *Cell*, 165(3), 704-714. doi: 10.1016/j.cell.2016.03.028
- Zou, J., Wang, W., Pan, Y. W., Abel, G. M., Storm, D. R., & Xia, Z. (2015). Conditional Inhibition of Adult Neurogenesis by Inducible and Targeted Deletion of ERK5 MAP Kinase Is Not Associated with Anxiety/Depression-Like Behaviors. *eNeuro*, 2(2). doi: 10.1523/ENEURO.0014-14.2015

Titre : Contribution des jeunes neurones dans les neurotransmissions dans l'hippocampe après un traitement chronique avec la fluoxétine

Mots clés : fluoxétine, jeunes neurones, neurogenèse adulte hippocampique, glutamate, GABA, gyrus dentelé

Résumé : Les épisodes dépressifs caractérisés sont la première cause d'incapacité dans le monde d'après l'OMS. Les inhibiteurs sélectifs de la recapture de la sérotonine (ISRS) sont la classe d'antidépresseurs la plus prescrite, mais ils ont un délai d'action retardé, non entièrement expliqué par la stimulation de la neurotransmission sérotoninergique. L'intégration des jeunes neurones issus de la neurogenèse adulte hippocampique dans le gyrus dentelé (GD) de l'hippocampe jouerait un rôle clef dans l'efficacité des ISRS. Nous nous sommes intéressés aux variations de neurotransmissions dans le GD ventral engendrées par l'intégration de ces nouveaux neurones après un traitement chronique avec la fluoxétine, grâce à un couplage de la microdialyse intracérébrale à des outils pharmacologiques et optogénétiques chez la souris. L'administration chronique de fluoxétine a engendré une diminution des transmissions glutamatergiques dans le GD.

La sous-unité GluN2B du récepteur NMDA du glutamate des jeunes neurones jouant un rôle important dans les effets antidépresseurs, nous avons souhaité inhiber les jeunes neurones par l'administration locale dans le GD ventral d'un antagoniste sélectif de la sous-unité GluN2B du récepteur NMDA (Ro25-6981) après un traitement chronique avec la fluoxétine, produisant ainsi une libération des concentrations extracellulaires de glutamate dans le GD. Enfin, la stimulation sélective des jeunes neurones par optogénétique a révélé une augmentation des concentrations extracellulaires de GABA dans le GD. Mes travaux de thèse apportent des éléments indirects et directs des effets neurochimiques des jeunes neurones. Ces effets neurochimiques constitueraient le lien entre les effets électrophysiologiques et comportementaux attribués aux jeunes neurones de l'hippocampe.

Title: Contribution of adult-born granule cells on hippocampal neurotransmissions following chronic fluoxetine

Keywords: fluoxetine, young neurons, adult hippocampal neurogenesis, glutamate, GABA, dentate gyrus

Abstract: Major depressive episodes are the leading cause of disability worldwide. Selective serotonin reuptake inhibitors are the most prescribed antidepressant class of drugs. However, they have a delayed onset of action, which is not fully explained by the activation of serotonergic neurotransmission. Does the integration of young neurons from adult hippocampal neurogenesis in the dentate gyrus (DG) of the hippocampus play a key role? To answer this question, we investigated the changes in neurotransmissions in the ventral DG caused by the integration of these new neurons after chronic fluoxetine treatment, by coupling intracerebral microdialysis to pharmacologic and optogenetic tools. Chronic fluoxetine decreased glutamatergic transmissions in the DG.

Since the GluN2B subunit of NMDA receptors in young neurons has a key role in antidepressant effects, we aimed to inhibit young neurons by local administration of a selective GluN2B subunit antagonist (Ro25-6981) in chronically-treated mice with fluoxetine, which increased DG extracellular levels of glutamate. Finally, the selective optogenetic stimulation of young neurons revealed an increase in DG extracellular GABA levels. My thesis work provides indirect and direct arguments for the role of adult-born granule cells' in neurochemical effects, which would provide the link between the electrophysiological and behavioral effects attributed to young neurons.