



HAL
open science

Résistance à l'Insuline du Système Sérotoninergique : Implication dans les Troubles de l'Humeur Comorbides au Diabète De Type 2

Hugo Martin

► **To cite this version:**

Hugo Martin. Résistance à l'Insuline du Système Sérotoninergique : Implication dans les Troubles de l'Humeur Comorbides au Diabète De Type 2. Neurosciences. Université de Bordeaux, 2021. Français. NNT : 2021BORD0156 . tel-03293780

HAL Id: tel-03293780

<https://theses.hal.science/tel-03293780>

Submitted on 21 Jul 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.

THÈSE PRÉSENTÉE
POUR OBTENIR LE GRADE DE

**DOCTEUR DE
L'UNIVERSITÉ DE BORDEAUX**

ÉCOLE DOCTORALE SCIENCES DE LA VIE ET DE LA SANTE
SPÉCIALITÉ NEUROSCIENCES

Par Hugo MARTIN

**RESISTANCE A L'INSULINE DU SYSTEME
SEROTONINERGIQUE:
IMPLICATION DANS LES TROUBLES DE
L'HUMEUR COMORBIDES AU DIABETE DE TYPE 2**

Sous la direction de: Xavier FIORAMONTI

Soutenue le 18 Juin 2021

Membres du jury:

Pr. Pascal FOSSAT, Professeur, CNRS, Université de Bordeaux	Président
Dr. Nasser HADDJERI, Directeur de recherche, INSERM, Université de Lyon	Rapporteur
Dr. Amandine GAUTIER-STEIN, Chargé de recherche, INRAE, Université de Lyon	Rapporteur
Pr. Christophe MAGNAN, Professeur, CNRS, Université Paris-Diderot	Examineur
Pr. Catherine BELZUNG, Professeure, INSERM, Université de Tours	Examineur
Pr. Bruno GUIARD, Professeur, CNRS, Université Toulouse III- Paul Sabatier	Invité

Les Hommes connaissent tous l'utilité d'être utile,

mais aucun ne connaît l'utilité d'être inutile

Tchouang-Tseu

REMERCIEMENTS

Je souhaite en premier lieu remercier le Dr **Nasser Haddjeri** et le Dr **Amandine Gautier-Stein** d'avoir accepté d'être rapporteur de cette thèse. A ce titre, je remercie également les examinateurs de ce jury, le Pr **Catherine Belzung**, le Pr **Bruno Guiard** et le Pr **Christophe Magnan** ainsi que le Pr **Pascal Fossat** pour avoir accepté de présider cette soutenance de thèse. Merci à l'ensemble des membres du jury de m'avoir fait l'honneur d'accepter d'évaluer mon travail de thèse.

Je remercie mon encadrant, **Xavier Fioramonti**, d'avoir accepté un étudiant venant d'une latitude plus haute que Montauban, je suis conscient de l'effort que cela représente. Merci de m'avoir encadré pendant ces années de thèse, j'ai pu grandir scientifiquement mais aussi humainement à ton contact et en cela, je te témoigne ma plus grande gratitude. Je te remercie de m'avoir fait confiance tout au long de ce projet et d'avoir ainsi pu laisser cours à mon imagination et à ma créativité. Merci aussi pour ta patience et ton optimisme qui m'ont permis de me remotiver dans les moments de doute. Enfin, merci pour ta bienveillance et ta générosité tout au long de ces quatre années qui m'ont fait oublier les difficultés passagères de la thèse.

J'adresse également mes sincères remerciements à **Sophie Layé**, directrice du laboratoire NutriNeuro. Merci d'avoir toujours pris le temps pour discuter, avant mais aussi pendant ma thèse, que ce soit au détour d'un couloir pour pseudo-philosopher sur la vie ou bien lors d'échanges scientifiques au cours de nos réunions. Merci pour ta bienveillance et ton ouverture d'esprit.

Mes remerciements vont aussi au Pr **Bruno Guiard**. Merci pour ta disponibilité et la pédagogie de tes explications. Je te remercie d'avoir toujours pris le temps de répondre aux nombreuses questions « sérotonine » que j'ai pu te poser. Merci aussi à **Sébastien Bullich** et au Dr **Luc Pénicaud** pour votre contribution scientifique pertinente lors de nos échanges. Nos

réunions tous ensemble autour de ce projet m'ont permis d'élargir mon horizon scientifique et de remettre en question le fondement de mes interprétations ou de mes croyances.

Merci aux différents chercheurs et ingénieurs avec lesquels nous avons collaboré au cours de ce projet et notamment l'équipe du Dr **Daniela Cota** du Neurocentre Magendie. Merci à **Vincent Simon** et **Samantha James** pour leur implication et leur énergie. Merci également au Pr **Philippe De Deurwaerdere** pour son aide mais aussi pour nos discussions scientifiques qui ont été très enrichissantes.

Mes remerciements s'adressent également au Pr **Igor Branchi**. Merci pour votre investissement et votre écoute. Votre expérience et vos suggestions m'ont toujours permis d'aborder sous un autre angle mes travaux et d'explorer de nouvelles pistes de réflexion. Grazie mille.

Je souhaite également remercier les chercheurs et personnels du laboratoire NutriNeuro avec qui j'ai pu échanger et plus particulièrement: le Dr **Pierre Trifilieff**, le Pr **Muriel Darnaudéry**, le Dr **Clémentine Bosh-Bouju** et le Dr **Guillaume Ferreira**.

Cette thèse n'aurait pas été la même sans la bonne humeur des **doctorants** et **post-doctorants** du laboratoire NutriNeuro, merci pour tous ces bons moments partagés. Merci à **Andréa et Andy** pour les beaux moments d'amitié que nous avons partagés au sein du *Pizza Club*. Merci aussi à mes amis d'Alsace: **Karl et Apo, Bruno, Sophie et Steve, Jao, Andy et Jhonny** pour vos visites et les bolées d'air frais qu'elles m'ont procurées. Je remercie particulièrement **Mélissa** et ses talents artistiques ainsi que pour son tuto *Illustrator* qui m'a été très utile.

Merci à mon parrain, **François**, pour les relectures de ce manuscrit ainsi que les différents commentaires qui m'ont aidé lors de la rédaction.

Merci à **Gigi** et **El Cousino** pour leurs multiples visites et tous les bons moments de franche rigolade passés ensemble. Nos encouragements n'auront pas été vains : quatre ans que Strasbourg est invaincu en Gironde. Toulalan...

Merci à mes **parents** pour les relectures et le temps qu'ils y ont investi. Merci pour votre soutien tout au long du chemin. Merci à ma **mère** (et La Poste) pour les bredalas et autres réjouissances culinaires. Merci à mon **père** de m'avoir toujours tenu informé de la parution du nouveau numéro de *Cyclist* ou de *200*, un moment salvateur.

Merci à ma **sœur** d'être ma sœur. Grandir à tes côtés m'a appris beaucoup plus que ce que tous les livres du monde ne pourraient enseigner. Lire ton invariable SMS quotidien matinal est toujours source de joie.

Merci à ma **Camille** de me laisser gagner aux dames le soir quand je suis grognon et de sourire tendrement à mes jeux de mots douteux. Merci pour ton soutien infaillible, la justesse et la finesse de tes mots me poussent à me remettre en question et à toujours avancer.

Je remercie tous les gens qui m'inspirent au quotidien et me poussent à grandir ou à me dépasser, à me remettre à ma place et à relativiser, qu'ils soient d'illustres inconnus ou de grands sages oubliés.

Enfin, je remercie les soirs d'été pour avoir laissé le vent caresser mes narines du doux parfum des pins que j'aime tant.

$$P_A = \rho_f \times V_f \times g$$

RESUME

Les études épidémiologiques mettent en évidence que les patients atteints de diabète de type 2 (DT2) ont deux fois plus de risque de souffrir de dépression majeure (DM), un trouble mental caractérisé par une tristesse intense et/ou une anhédonie. Plus précisément, les données de la littérature indiquent que la résistance à l'insuline, qui est la caractéristique majeure du DT2, est positivement corrélée à la sévérité des symptômes dépressifs. Etant donné le rôle essentiel que joue la neurotransmission sérotoninergique (5-HT) dans la physiopathologie de la DM, nous avons émis l'hypothèse que la résistance à l'insuline sélective de ce système neuronal est responsable des troubles de l'humeur associés au DT2. En ce sens, des altérations du système 5-HT ont été observées dans un modèle de troubles émotionnels associés à un DT2. En effet, le régime obésogène utilisé dans ce modèle induit une altération significative des propriétés électrophysiologiques des neurones 5-HT du Raphé dorsal (DR) ainsi qu'une diminution des taux de sérotonine. Cette étude vise également à déterminer l'action de l'insuline cérébrale sur le comportement émotionnel et le système sérotoninergique. En utilisant une approche par électrophysiologie *ex-vivo*, nous avons pu observer que l'insuline module positivement l'activité des neurones 5-HT du RD. Nous avons également pu mettre en évidence un effet de type anxiolytique de l'action de l'insuline sur le cerveau par voie intranasale. Cet effet est accompagné d'une diminution des taux de sérotonine (5-HT) tissulaires dans certaines structures cérébrales impliquées dans la régulation de l'anxiété. Enfin, nous avons utilisé un modèle transgénique grâce auquel nous avons invalidé sélectivement le récepteur à l'insuline dans les neurones 5-HT. L'étude comportementale a permis de mettre en évidence une diminution du comportement de type anxieux chez ces animaux, associé à une diminution de l'activité des neurones sérotoninergiques du RD. L'ensemble de ces données suggèrent que l'insuline peut moduler le comportement émotionnel notamment via le système sérotoninergique. Ces éléments pourront contribuer à la possible découverte de nouveaux traitements et à la prise en charge des troubles de l'humeur chez les patients atteints de DT2.

ABSTRACT

Type-2 Diabetes (T2D) is mainly characterized by insulin-resistance and accompanied by comorbidities such as Major Depressive Disorder (MDD). Indeed, patients with T2D are twice more likely to suffer from MDD and clinical studies have shown that insulin resistance was positively correlated with the severity of depressive symptoms. As the serotonergic (5-HT) system in the brain is one of the major neurotransmission involved in the pathophysiology of depression, we hypothesized that insulin resistance at the level of 5-HT neurons participates in the development of mood disorders during T2D. Supporting this hypothesis, we first show that mice fed a high fat diet (HFD) for 16 weeks display both hallmarks of T2D (including insulin resistance) and anxio/depressive-like behavior that is associated with decreased serotonin levels and alterations of Dorsal Raphe nucleus (DR) 5-HT neurons. Another point of the project aimed at studying brain insulin's action onto the 5-HT system and emotional behavior. Using patch-clamp electrophysiology, we show that insulin increases firing activity of DR 5-HT neurons. Our results also show that intranasal insulin administration elicits anxiolytic-like effect associated with decreased 5-HT levels in areas related to anxiety processing. Finally, using an original transgenic mouse model, we show that the selective ablation of the IR in 5-HT neurons decreases the activity of DR 5-HT neurons and leads to diminished innate anxiety-like behavior. Altogether, this study suggests that insulin modulates emotional behavior in acting onto the 5-HT system. Such findings would help improving treatment for T2D patients suffering from comorbid mood disorders.

SOMMAIRE:

PREAMBULE	1
PARTIE 1: DIABETE DE TYPE 2 ET DEPRESSION MAJEURE	9
1. LES DIABETES	10
1.1 LE DIABETE DE TYPE 1	10
1.2 LE DIABETE GESTATIONNEL	10
1.3 LE DIABETE DE TYPE 3	10
1.4 LE DIABETE DE TYPE 2	11
2. LA DEPRESSION MAJEURE	12
3. PREVALENCE DE LA DEPRESSION MAJEURE DANS LA POPULATION ATTEINTE DE DIABETE DE TYPE 2	15
4. HYPOTHESE MECANISTIQUE	16
PARTIE 2: L'INSULINE	17
1. GENERALITES	19
2. GENE, BIOSYNTHESE ET STRUCTURE DE L'INSULINE	19
3. LIBERATION ET DEGRADATION DE L'INSULINE	21
4. VOIE DE SIGNALISATION DE L'INSULINE PAR SON RECEPTEUR	23
4.1 RECEPTEUR A L'INSULINE	23
4.2 SUBSTRAT DU RECEPTEUR A L'INSULINE	26
4.2.1 Famille des IRS	26
4.2.2 Protéines Shc (Src-homology-2-containing protein)	27
4.2.3 Autres substrats du récepteur à l'insuline	27
4.3 MODULATEURS NEGATIFS DE LA VOIE DE SIGNALISATION DU RECEPTEUR A L'INSULINE	28
5. ACTION PERIPHERIQUE DE L'INSULINE	30
6. ACTION CENTRALE DE L'INSULINE	32
6.1 RECEPTEUR DE L'INSULINE ET VOIE DE SIGNALISATION DANS LE SNC	32
6.2 TRANSPORT DE L'INSULINE AU TRAVERS DE LA BARRIERE HEMATO-ENCEPHALIQUE	33
6.3 INJECTION INTRANASALE D'INSULINE	35
6.4 SYNTHESE D'INSULINE <i>IN SITU</i> DANS LE SNC	36
6.5 FONCTIONS CENTRALES DANS LE METABOLISME ENERGETIQUE ET L'HOMEOSTASIE GLUCIDIQUE	38

6.5.1	<i>Modulation de populations neuronales hypothalamiques</i>	38
6.5.2	<i>Modulation du système de récompense</i>	40
6.6	FONCTIONS DANS LA CROISSANCE, LE DEVELOPPEMENT ET LA PLASTICITE	42
6.7	ACTION DE L'INSULINE SUR LE COMPORTEMENT EMOTIONNEL	45
7.	RESISTANCE A L'INSULINE	46
7.1	LA RESISTANCE A L'INSULINE	46
7.2	MECANISMES MOLECULAIRES DE L'INSULINO-RESISTANCE	47
7.2.1	<i>Implications des éléments de la voie de signalisation du récepteur à l'insuline</i>	47
7.2.2	<i>Lipotoxicité</i>	48
7.2.3	<i>Inflammation</i>	49
7.2.4	<i>Régulation négative par l'hyperglycémie</i>	49
7.2.5	<i>Dysfonctionnement mitochondrial et stress oxydant</i>	49
7.2.6	<i>Stress du réticulum endoplasmique</i>	50
8.	LA RESISTANCE CENTRALE A L'INSULINE DANS LE DIABETE DE TYPE 2	51
8.1	INSULINO-RESISTANCE CENTRALE CHEZ L'HUMAIN	51
8.2	MODELES ANIMAUX DU DIABETE DE TYPE 2	53
8.3	RESISTANCE CENTRALE A L'INSULINE DANS LES MODELES MURINS DE DIABETE DE TYPE 2	55
	PARTIE 3: RESISTANCE A L'INSULINE ET TROUBLES EMOTIONNELS	57
1.	RESISTANCE A L'INSULINE PERIPHERIQUE ET TROUBLES EMOTIONNELS	59
1.1	TROUBLES EMOTIONNELS ASSOCIE A UNE INSULINO-RESISTANCE	59
1.2	FACTEURS INFLUENÇANT LA SENSIBILITE A L'INSULINE ET TROUBLES EMOTIONNELS	60
1.3	EFFET ANTIDEPRESSEUR DES AGENTS ANTIDIABETIQUES ET INSULINO-SENSIBILISANTS	61
1.3.1	<i>En condition d'insulino-résistance</i>	61
1.3.2	<i>En condition physiologique de sensibilité à l'insuline</i>	63
1.3.3	<i>Mécanismes d'action</i>	64
2.	RESISTANCE A L'INSULINE CENTRALE ET TROUBLES EMOTIONNELS	65
2.1	ACTION CENTRALE DES ANTIDIABETIQUES ET INSULINO-SENSIBILISANTS	66
2.2	INVALIDATION/DELETION CEREBRALE DU RECEPTEUR A L'INSULINE	67
	PARTIE 4: LA SEROTONINE ET SON IMPLICATION DANS LES TROUBLES ANXIO/DEPRESSIFS	69
1.	LA SEROTONINE	71
1.1	GENERALITES	71
1.2	NEUROANATOMIE DES NOYAUX DU RAPHE	71
1.3	DEVELOPPEMENT DES NEURONES SEROTONINERGIQUES	73
1.4	BIOSYNTHESE, LIBERATION ET DEGRADATION DE LA SEROTONINE	74

1.5 RECEPTEURS SEROTONINERGIQUES.....	77
1.5.1 Le récepteur 5-HT1A	78
1.6 PROPRIETES ELECTROPHYSIOLOGIQUES DES NEURONES 5-HT DU RAPHE DORSAL.....	78
1.7 REGULATION DE L'ACTIVITE DES NEURONES 5-HT DU RAPHE DORSAL ET DE LA LIBERATION DE SEROTONINE.....	81
1.7.1 Régulation somatodendritique	81
1.7.2 Régulation présynaptique.....	82
1.7.3 Régulation postsynaptique	82
2. IMPLICATION DE LA SEROTONINE DANS LA DEPRESSION MAJEURE ET LES TROUBLES ANXIEUX	84
2.1 IMPLICATION DE LA SEROTONINE DANS LA PHYSIOPATHOLOGIE DE LA DEPRESSION MAJEURE: EVIDENCES CLINIQUES....	84
2.2 MODELES ANIMAUX DES TROUBLES ANXIO/DEPRESSIFS	87
2.3 ALTERATIONS SEROTONINERGIQUES DANS LES MODELES ANIMAUX DE TROUBLES ANXIO/DEPRESSIFS	91
2.4 MODULATION DU COMPORTEMENT EMOTIONNEL PAR LA SEROTONINE	93
3. TRAITEMENTS ANTIDEPRESSEURS	97
3.1 REPONSE AUX TRAITEMENTS ANTIDEPRESSEURS	97
3.2 LES CLASSES D'ANTIDEPRESSEURS: FOCUS SUR LES ISRS.....	98
3.3 ADMINISTRATION AIGÛE D'UN ISRS	99
3.4 TRAITEMENT CHRONIQUE AVEC UN ISRS	99
3.4.1 Désensibilisation du récepteur 5-HT1A.....	99
3.4.2 Neuroplasticité.....	103
3.4.3 Neurogénèse.....	103
PARTIE 5:MODULATION DU SYSTEME SEROTONINERGIQUE PAR L'INSULINE: IMPLICATION DANS LES TROUBLES EMOTIONNELS	105
1. EFFET DIRECT DE L'INSULINE SUR LE SYSTEME SEROTONINERGIQUE	107
2. CONVERGENCE DES VOIES DE SIGNALISATION DE L'INSULINE ET DE LA SEROTONINE	108
3. EFFETS ANTIDEPRESSEURS DES ANTIDIABETIQUES ET MODULATION DU SYSTEME SEROTONINERGIQUE	111
OBJECTIFS:.....	115
MATERIELS ET METHODES.....	119
1. AUTORISATION A EXPERIMENTER.....	121
2. ANIMAUX	121
2.1 HEBERGEMENT	121
2.2 REGIMES ALIMENTAIRES.....	122
2.3 SOURIS SAUVAGES	122
2.4 LIGNEES TRANSGENIQUES	123

2.4.1 Lignée <i>Pet1-cre-mCherry</i>	123
2.4.2 Lignée <i>Insulin Receptor lox/lox (IR^{lox/lox})</i>	123
2.4.3 Lignée <i>SeIRKO (Serotonergic Insulin Receptor Knock-Out ; Pet1-cre :: IR^{lox/lox} ::mCherry)</i>	123
3. TRAITEMENTS PHARMACOLOGIQUES	124
3.1 TRAITEMENT AIGUE A LA FLUOXETINE.....	124
3.2 TRAITEMENT SUBCHRONIQUE.....	125
3.2.1 <i>Traitement PCPA</i>	125
3.3 INJECTION INTRANASALE D'INSULINE.....	125
4. TESTS METABOLIQUES	126
4.1 TEST DE « FASTING REFEEDING »	126
4.2 MESURE DE LA GLYCEMIE A JEUN	126
4.3 TEST DE TOLERANCE AU GLUCOSE.....	126
5. TESTS COMPORTEMENTAUX.....	127
5.1 TESTS MESURANT LE COMPORTEMENT PSEUDO-ANXIEUX.....	127
5.1.1 <i>Test du champ ouvert (Open Field ; OF)</i>	127
5.1.2 <i>Test du labyrinthe en croix surélevée (Elevated Plus Maze ; EPM)</i>	128
5.1.3 <i>Test de la boîte clair/obscur</i>	128
5.1.4 <i>Alimentation supprimé par néophobie (Novelty Suppressed Feeding test ; NSF)</i>	129
5.2 TEST MESURANT LE COMPORTEMENT DE RESIGNATION	130
5.2.1 <i>Test de suspension par la queue (Tail Suspension Test; TST)</i>	130
6. MODELE DE STRESS DE CONTENTION CHRONIQUE	131
6.1 PROCEDURE.....	131
6.2 TRAITEMENTS ET GROUPE EXPERIMENTAUX.....	131
7. ELECTROPHYSIOLOGIE	132
7.1 ELECTROPHYSIOLOGIE IN VIVO	1332
7.2 ELECTROPHYSIOLOGIE EX VIVO/PATCH CLAMP	133
8. STATISTIQUES	136
8.1 DISTRIBUTION GAUSSIENNE.....	136
8.2 TEST STATISTIQUES.....	136
8.3 ANALYSE POST-HOC	137
RESULTATS ET INTERPRETATIONS EXPERIMENTALES.....	128
PARTIE I: EFFET DE L'INSULINE AU NIVEAU CENTRAL SUR LE COMPORTEMENT EMOTIONNEL ET SUR LE	
SYSTEME 5-HT	141

1. MODULATION DE L'ACTIVITE DES NEURONES 5-HT DU RAPHE DORSAL PAR L'INSULINE	143
2. CONSEQUENCES DE L'INJECTION INTRANASALE D'INSULINE SUR LE COMPORTEMENT	
EMOTIONNEL.....	148
2.1 CONTROLE DES EFFETS DE L'INJECTION INTRANASALE D'INSULINE SUR LE METABOLISME	148
2.2 MODULATION DES TAUX DE SEROTONINE EN REPONSE A L'INJECTION INTRANASALE D'INSULINE.....	150
2.3 EFFET DE L'INJECTION INTRANASALE D'INSULINE SUR LE COMPORTEMENT EMOTIONNEL.....	151
3. INTERPRETATION EXPERIMENTALE	153
3.1 MECANISME D'ACTION DE L'INSULINE SUR LES NEURONES 5-HT DU RD	153
3.2 EFFETS COMPORTEMENTAUX DE L'INSULINE CEREBRALE ET IMPLICATION DU SYSTEME 5-HT	158
PARTIE II:MODULATION DU SYSTEME 5-HT ET DES COMPORTEMENTS ANXIO/DEPRESSIFS ASSOCIES, EN	
CONDITION PHYSIOPATHOLOGIQUE DE DT2	161
1. ALTERATION DE LA SENSIBILITE A L'INSULINE DES NEURONES 5-HT ET DE LA REPONSE ANXIOLYTIQUE	
A L'INJECTION INTRANASALE D'INSULINE PAR LE REGIME OBESOGENE HFD	163
2. EFFETS METABOLIQUES DU REGIME OBESOGENE HFD ET AMELIORATION PAR UN TRAITEMENT	
CHRONIQUE DE METFORMINE.....	165
3. MODULATION DU COMPORTEMENT EMOTIONNEL SELON LE STATUT DE SENSIBILITE A L'INSULINE	168
4. MODIFICATIONS DES PROPRIETES ELECTROPHYSIOLOGIQUES DES NEURONES 5-HT DU RD SELON LE	
STATUT DE SENSIBILITE A L'INSULINE	171
5. INTERPRETATION EXPERIMENTALE	175
5.1 IMPLICATION DU SYSTEME 5-HT DANS LES TROUBLES EMOTIONNELS COMORBIDES AU DT2 MODELISE PAR LE REGIME	
HFD	175
5.2 MECANISMES IMPLIQUES DANS L'AMELIORATION DU COMPORTEMENT EMOTIONNEL PAR LA RESTAURATION D'UN ETAT	
DE SENSIBILITE A L'INSULINE.....	178
5.3 ROLE DE LA RESISTANCE A L'INSULINE DES NEURONES 5-HT DANS LE DEVELOPPEMENT DES TROUBLES EMOTIONNELS	182
PARTIE III: CONSEQUENCES COMPORTEMENTALES ET FONCTIONNELLES D'UNE RESISTANCE A	
L'INSULINE SPECIFIQUE DES NEURONES 5-HT	183
1. CREATION ET VALIDATION DE LA LIGNEE TRIPLE TRANSGENIQUE SEIRKO	185
2. CONSEQUENCE DE LA DELETION DU RECEPTEUR A L'INSULINE DES NEURONES 5-HT SUR LE	
METABOLISME ENERGETIQUE ET L'HOMEOSTASIE GLUCIDIQUE	188
3. CARACTERISATION ELECTROPHYSIOLOGIQUE DES NEURONES 5-HT DU RD DES SOURIS SEIRKO	190
4 CONSEQUENCE DE LA DELETION DU RECEPTEUR A L'INSULINE DES NEURONES 5-HT SUR LE	
COMPORTEMENT EMOTIONNEL.....	193
5. INTERPRETATION EXPERIMENTALE	196

5.1 HOMEOSTASIE GLUCIDIQUE DES SOURIS SEIRKO	196
5.2 RELATION ENTRE L'ETAT DU SYSTEME SEROTONINERGIQUE ET LE PHENOTYPE COMPORTEMENTAL DES SOURIS SEIRKO	196
PARTIE IV: MODULATION DE LA SENSIBILITE CEREBRALE_A L'INSULINE DANS LA REPONSE AU TRAITEMENT ANTIDEPRESSEUR DE TYPE ISRS.	203
1. ETUDE DE LA REPONSE ANTIDEPRESSEUR A UN ISRS DES SOURIS SEIRKO	205
2. ETUDE DE LA COMBINAISON DE L'INJECTION INTRANASALE D'INSULINE ET DE LA FLUOXETINE DANS LA REPONSE ANTIDEPRESSEUR AIGUE	206
3. ETUDE DE LA COMBINAISON DE L'INJECTION INTRANASALE D'INSULINE ET DE LA FLUOXETINE DANS LA REPONSE ANTIDEPRESSEUR AU COURS D'UN STRESS DE CONTENTION CHRONIQUE	209
4. INTERPRETATION EXPERIMENTALE	211
4.1 NON REPONSE A L'EFFET ANTIDEPRESSEUR DE LA FLUOXETINE CHEZ LES SOURIS SEIRKO	211
4.2 EVALUATION DE LA STRATEGIE DE COMBINAISON DE L'INSULINE INTRANASALE ET DE LA FLUOXETINE EN VUE D'UNE POTENTIALISATION DE L'EFFET ANTIDEPRESSEUR	212
4.3 HYPOTHESE MECANISTIQUE	212
SYNTHESE DES RESULTATS.....	215
PERSPECTIVES EXPERIMENTALES.....	217
DISCUSSION GENERALE.....	200
1. ROLE DE L'INSULINE SUR LE COMPORTEMENT EMOTIONNEL EN PERIODE POSTPRANDIALE	221
2. IMPLICATION PHYSIOPATHOLOGIQUE: PEUT-ON TRAITER LA DEPRESSION MAJEURE EN AMELIORANT LA SENSIBILITE A L'INSULINE ?	231
2.1 DEPRESSION MAJEURE COMORBIDE AU DIABETE DE TYPE 2.....	231
2.2 DEPRESSION MAJEURE NON COMORBIDE A UN TROUBLE METABOLIQUE PRIMAIRE.	234
2.3 TRAITEMENT ANTIDEPRESSEUR ISRS COMBINE A L'INJECTION INTRANASALE	235
CONCLUSION	239
RÉFÉRENCES	241
ANNEXES	289

LISTE DES TABLEAUX

Tableau 1: Diagnostic du TD2

Tableau 2: Diagnostic de la DM d'après le DSM-V

Tableaux 3: Modèles animaux du DT2

Tableau 4: Approche par RDoC de la DM

Tableau 5: Modèles animaux de la DM

Tableau 6: Récapitulatif des conséquences comportementales induites par la manipulation du système sérotoninergique

Tableau 7: Antidépresseurs de la classe des Inhibiteurs Sélectifs de la Recapture de Sérotonine

Tableau 8: Modulations sérotoninergiques associées aux effets antidépresseurs de différents agents antidiabétiques

Tableau 9: Composition nutritionnelle des régimes standard (STD) et obésogène (HFD)

Tableau 10: Composition des solutions externes utilisées en électrophysiologie *ex-vivo*

Tableau 11: Composition des solutions internes utilisées en électrophysiologie *ex-vivo*

Tableau 12: Récapitulatif de la caractérisation métabolique, comportementale et électrophysiologique des souris SeIRKO

Tableau 13: Conséquences comportementales d'un hyposérotoninergisme central dans différents modèles murins

Tableau 14: Synthèse des effets centraux de l'insuline en relation avec le système sérotoninergique

LISTE DES ILLUSTRATIONS

Figure 1: Structure insuline

Figure 2: Libération d'insuline par la cellule β en réponse au glucose

Figure 3: Structure du récepteur à l'insuline

Figure 4: Affinité de l'insuline, de IGF-1 et de IGF-2 pour leurs différents récepteurs

Figure 5: Voie de signalisation du récepteur à l'insuline

Figure 6: Modulateurs négatifs de la voie de signalisation du récepteur à l'insuline

Figure 7: Absorption du glucose par GLUT4 en réponse à l'insuline

Figure 8: Distribution de IR, IGF-1R, IRS-1 et IRS-2 dans le cerveau

Figure 9: Distribution de l'insuline en fonction de différentes voies d'administration

Figure 10: Modulation de l'activité de populations neuronales hypothalamiques par l'insuline

Figure 11: Evolution phylogénétique de l'insuline

Figure 12: Mécanismes moléculaires impliqués dans la résistance à l'insuline

Figures 13: Localisation et projections des noyaux du Raphé

Figure 14: Biosynthèse de la sérotonine

Figure 15: La synapse sérotoninergique

Figure 16: Caractérisation électrophysiologique des neurones 5-HT du Raphé dorsal

Figure 17: Régulation de l'activité des neurones 5-HT du Raphé dorsal par différents circuits neuronaux

Figure 18: Mécanisme d'action des ISRS impliquant la désensibilisation du récepteur 5-HT_{1A} au cours d'un traitement chronique

Figure 19: Convergence des voies de signalisation du récepteur à l'insuline et des récepteurs sérotoninergiques

Figure 20: Schéma du croisement de la lignée SeIRKO

Figure 21: Le champ ouvert

Figure 22: Le labyrinthe en croix surélevée

Figure 23: La boîte clair/obscur

Figure 24: Alimentation supprimée par néophobie

Figure 25: Test de suspension par la queue

Figure 26: Procédure expérimentale du stress de contention chronique

Figure 27: L'insuline module positivement l'activité des neurones sérotoninergiques du Raphé dorsal.

Figure 28: L'administration d'insuline périphérique diminue la libération de sérotonine dans l'hippocampe ventral *in-vivo* au travers d'un mécanisme d'autoinhibition médié par le récepteur 5-HT_{1A}.

Figure 29: Mesure du tonus sérotoninergique autoinhibiteur du récepteur 5-HT_{1A} en patch-clamp

Figure 30: L'injection intranasale d'insuline ne modifie pas la glycémie périphérique ni la prise alimentaire après un jeûne de 24h.

Figure 31: L'injection intranasale d'insuline diminue les taux de sérotonine dans des structures impliquées dans la régulation du comportement émotionnel.

Figure 32: L'effet anxiolytique de l'injection intranasale d'insuline requiert l'implication du système sérotoninergique.

Figure 33: Mécanisme présumé de l'effet permissif de l'IR dans la synergie des voies de signalisation des récepteurs IR et IGF-1R en réponse à l'insuline

Figure 34: Hypothèse mécanistique de l'effet net inhibiteur de l'insuline sur les neurones 5-HT du Raphé dorsal

Figure 35: Le régime obésogène HFD induit une résistance à l'insuline des neurones 5-HT du RD qui est associée à la perte de l'effet anxiolytique en réponse à l'injection intranasale d'insuline.

Figure 36: Le traitement chronique par la metformine permet de reverser les effets métaboliques délétères induit par le régime obésogène HFD.

Figure 37: Le traitement par la metformine permet d'améliorer les troubles du comportement émotionnel induit par le régime obésogène HFD.

Figure 38: Le traitement par la metformine permet de reverser les altérations des propriétés intrinsèques et d'excitabilité des neurones 5-HT du RD induites par le régime obésogène HFD.

Figure 39: Modèle mécanistique des altérations du système 5-HT observées dans les troubles émotionnels comorbides au régime HFD.

Figure 40: Les souris de la lignée SeIRKO présentent une délétion du récepteur à l'insuline dans les neurones 5-HT qui est observable sur le plan moléculaire et fonctionnel.

Figure 41: Evaluation de différents paramètres métaboliques chez la souris SeIRKO.

Figure 42: Les souris SeIRKO présentent une diminution de l'activité des neurones 5-HT du Raphé dorsal associée à des altérations de leurs propriétés intrinsèques

Figure 43: La délétion du récepteur à l'insuline dans les neurones 5-HT diminue le comportement de type anxieux et de résignation des souris.

Figure 44: La délétion du récepteur à l'insuline dans les neurones 5-HT altère la réponse à la fluoxétine au cours du TST

Figure 45: L'injection intranasale d'insuline potentialise l'effet antidépresseur de la fluoxétine dans le TST tandis que cet effet est abrogé par un régime de type obésogène HFD.

Figure 46: L'injection intranasale d'insuline potentialise l'effet antidépresseur de la fluoxétine dans un modèle de stress de contention chronique

Figure 47: Modèle mécanistique de l'action postprandiale de l'insuline sur le système sérotoninergique favorisant l'état trophotropique au travers d'un circuit neuronal polysynaptique particulier impliquant l'amygdale

Figure 48: Conséquence de la résistance à l'insuline du système sérotoninergique en condition postprandiale au travers d'un circuit neuronal polysynaptique particulier impliquant l'amygdale

Figure 49: Arbre décisionnel de la prise en charge thérapeutique de la DM en considérant la résistance à l'insuline

LISTE DES ABREVIATIONS

- [5-HT]_{ext}**: Concentration de sérotonine extracellulaire
- 5-HIAA**: 5-hydroxyindol-acetic-acid
- 5-HT**: 5-hydroxytryptamine
- 5-HT^{IR-KO}**: Animaux SEIRKO
- 5-HT^{IR-WT}**: Animaux contrôle SEIRKO
- 8-OH-DPAT**: (±)-8-Hydroxy-2-dipropylaminotetralin hydrobromide
- aCSF**: artificial cerebrospinal fluid
- AgRP**: Agouti Related Peptide
- AHP**: Afterhyperpolarization
- AMPA**: Acide 2-amino-3-(5-méthyl-3-hydroxy-1,2-oxazol-4-yl) propanoïque
- AMPK**: AMP-activated Protein Kinase
- ARNsi**: ARN silencing
- ATP** : Adénosine-Triphosphate
- ATV**: Aire Tegmentale Ventrale
- BCAA**: Branched-chained amino acid (acide aminé à chaîne latérale ramifiée)
- BDNF**: Brain-derived Neurotrophic Factor
- BHE**: Barrière Hémato-Encéphalique
- BIRKO**: Beta cell Insulin Receptor Knock-Out
- CRS**: Chronic Restraint Stress, stress de contention chronique
- DAG**: Diacylglycérol
- DAT**: Dopamine Transporter
- DM**: Dépression Majeure
- DMT**: Diméthyltryptamine
- DMV**: Dorsal Motor nucleus of the Vagus
- DSM**: Diagnostic and Statistical Manual of Mental Disorders
- DT1**: Diabète de Type 1
- DT2**: Diabète de Type 2
- EPM**: Elevated Plus Maze; labyrinthe en croix surélevée
- EPSC**: Excitatory postsynaptic currents; courants postsynaptiques excitateurs

FLX: Fluoxétine, Prozac.

FST: Forced Swim Test; test de nage forcée, test de Porsolt

GABA: Acide γ -aminobutyrique

GIRK: G-protein coupled Inwardly Rectifying Potassium channel

GLUT: Glucose Transporter

GIRKO: Glial Insulin Receptor Knock-Out

GSK-3: Glycogen synthase kinase-3

GTT: Glucose Tolerance Test; test de tolérance au glucose

HFD: High Fat Diet

HOMA-IR: Homeostatic Model Assessment of Insulin Resistance

HPA: Hypothalamo-hypophyso-surrénalien (axe)

HR: Insulin/insulin-like growth factor Hybrid Receptor

Icv: Intra-cérébroventriculaire

IGF: Insulin-like Growth Factor

IGF-R: Insulin-like Growth Factor Receptor

IMAO: Inhibiteur de la Monoamine Oxydase

IMC: Indice de Masse Corporelle

INI: Injection Intranasale d'Insuline

i.p: Intrapéritonéale

IPSC: Inhibitory postsynaptic currents; courant postsynaptiques inhibiteurs

IR: Insulin Receptor

IRS: Insulin Receptor Substrate

ISRS: Inhibiteurs Sélectifs de la Recapture de Sérotonine

IU: International Units

Kir: Canaux potassique à rectification entrante

L/D: Light/Dark test; test de la boîte clair/obscur

LAT1: Large neutral Amino acid Transporter 1

LCR: Liquide Céphalo-Rachidien

LPS: Lipopolysaccharide

LSD: N,N-diéthyllysergamide

L-Trp: L-Tryptophane

MAO: Monoamine Oxydase

MDMA: 3,4-méthyl énedioxy méthamphétamine; ecstasy

Metf: Métformine

mTOR: Mammalian Target Of Rapamycin

NAc: Noyau Accumbens

NET: Norepinephrine Transporter

NIRKO: Neuronal Insulin Receptor Knock-Out

NMDA: Acide N-méthyl-D-aspartique

NMDG : N-méthyl-D-glucamine

NPY: Neuropeptide Y

NSF: Novelty suppressed Feeding test; test de l'alimentation supprimée par la néophobie

OF: Open Field test; test du champ ouvert

PA: Potentiel d'Action

PCPA: DL-P-chlorophenylalanine-methyl-ester-hydrochlorate

PFC: Prefrontal Cortex

PHE: phényléphrine

PI3K: phosphoinositide 3-kinase

PKC: Protéine Kinase C

POMC: Pro-opiomelanocortin

PPP: Picropodophyllotoxine

PTEN: Phosphatase and Tensin homolog

PTP1B: Protéine-Tyrosine Phosphatase 1B

RD: Raphé dorsal

RdoC: Research Domain Criteria

RM: Raphé médian

ROS : Reactive Oxygen Species

RT-qPCR : Reverse Transcription-quantitative Polymerase Chain Reaction

SeIRKO: Serotonin Insulin Receptor Knock-Out

Ser : sérine

SERT : Serotonin Transporter

SN: Substansia Nigra

SNC: Système Nerveux Central

STD: Standard Diet

STZ: Streptozotocine

TCA: Tricyclic Antidepressant; Antidépresseur Tricyclique

Thr: thréonine

TNF- α : Tumor Necrosis Factor alpha

TPH: Tryptophan Hydroxylase

TRPC-5: Transient Receptor Potential Canonical channel-5

TST: Tail Suspension Test

UCMS: Unpredictable Chronic Mild Stress

VMAT2: Vesicular Monoamine Transporter-2

PREAMBULE

Les maladies mentales représentent un enjeu médical et sociétal de haute importance. En effet, l'OMS estime qu'une personne sur quatre souffrira, au cours de sa vie, de troubles mentaux, soit environ 350 millions d'êtres humains dans le monde. La pandémie actuelle du COVID-19 que nous traversons et les confinements successifs sont d'autant plus révélateurs de cet enjeu qu'est la santé mentale alors même que certains psychiatres alertent l'Etat que « [la troisième vague psychiatrique est là] » (Bocher et al., 2020; Nalbandian et al., 2021). Parmi les troubles psychiatriques, la dépression majeure (DM) et l'anxiété représentent respectivement les troisième et cinquième causes d'invalidité en France (GBD 2016 Disease and Injury Incidence and Prevalence Collaborators, 2017). Malgré la disponibilité de traitements pharmacologiques, un tiers des patients ne répondent pas aux traitements antidépresseurs (Little, 2009). De plus, la récurrence importante de ces troubles mentaux est particulièrement importante (Belsher and Costello, 1988; Lewinsohn et al., 1994). Ce constat souligne la nécessité et le besoin de la recherche et de l'innovation dans ce domaine.

Historiquement, dans toutes les civilisations, on retrouve des récits décrivant des symptômes de troubles mentaux qui, à cette époque, était largement attribués à des punitions divines ou des phénomènes mystiques. Durant l'antiquité grecque, dans son ouvrage « *L'homme de génie et la mélancolie* », Aristote (384-322 av J-C) suggère pour la première fois que les troubles mentaux pourraient avoir comme origine une cause organique et physique. Au cours du 20^{ème} et 21^{ème} siècle, les avancées en recherche biomédicale, en neuroscience et en psychologie cognitive et comportementale ont permis une approche rationnelle et nosologique des troubles mentaux. Dès lors, les causes des maladies psychiatriques sont aujourd'hui admises comme étant le résultat d'interactions complexes et multifactorielles entre facteurs génétiques et environnementaux. Par ailleurs, les troubles mentaux évoluent eux-mêmes, comme en témoignent les modifications successives de la classification des maladies mentales du DSM (ouvrage majeur du diagnostic psychiatrique moderne, cf chapitre 1), car ils sont également souvent des marqueurs d'évolution sociale et sociétale.

L'étiologie des troubles psychiatriques s'est largement appuyée sur les mécanismes d'action des médicaments traitants ces pathologies. Ainsi, la neuropsychopharmacologie a permis d'élaborer les premières hypothèses des causes neurobiologiques des troubles mentaux. L'introduction en psychiatrie de la chlorpromazine, premier neuroleptique, par Henri Laborit en 1951 révolutionna à la fois la trajectoire thérapeutique des patients mais ouvrit également une voie vers l'étude de l'étiologie des maladies mentales, en l'occurrence la schizophrénie. De la même manière, la découverte par sérendipité des premiers traitements antidépresseurs

(tricycliques et inhibiteurs de la monoamine oxydase) dont les mécanismes d'action permettent d'augmenter les taux de monoamines, a fait émerger une première hypothèse selon laquelle la DM proviendrait d'une déficience centrale en monoamines. De plus, la découverte de la fluoxétine (Prozac®) en 1972, chef de file des antidépresseurs de type ISRS (Inhibiteurs Sélectifs de la Recapture de Sérotonine) et de son mécanisme d'action orientèrent, entre autres, les travaux de recherche sur l'hypothèse d'une déficience spécifique en sérotonine dans la DM. Cette hypothèse a notamment été supportée par l'observation d'altérations du système sérotoninergique au cours d'études *post-mortem*, sérologiques et par imageries fonctionnelles chez des patients souffrants de DM (Mann, 1999). De ce fait, la **sérotonine** est un élément clef de la physiopathologie de la dépression et la cible pharmacologique actuellement prépondérante dans son traitement (Hamon and Blier, 2013).

De la fin du 20^{ème} siècle à aujourd'hui, l'émergence de nouvelles technologies a également permis la découverte de nouveaux facteurs impliqués dans l'étiologie de la DM. Outre les études mettant en évidence l'implication de polymorphismes génétiques, différents travaux de recherche mirent en évidence des altérations métaboliques et protéomiques dans les troubles mentaux (Baune, 2019). De manière intéressante, des travaux récents suggèrent que des altérations du métabolisme énergétique pourraient participer au développement des maladies mentales (Sestan-Pesa and Horvath, 2016). Il a notamment été mis en évidence que plusieurs hormones du métabolisme lipidique comme la ghréline ou la leptine influencent le comportement de type anxieux et dépressif (Bali and Jaggi, 2016; Lu, 2007). Toutefois, peu de données de la littérature permettent d'établir une corrélation entre l'altération du métabolisme glucidique et le développement des troubles mentaux. Cette observation peut sembler surprenante au regard du rôle que joue le glucose dans l'apport énergétique des neurones. Les données épidémiologiques indiquent que les patients diabétiques ont, au moins, deux fois plus de risques de souffrir de DM que la population sans comorbidités métaboliques (Anderson et al., 2001; Bąk et al., 2020). Cette observation nous pousse à nous questionner sur un plausible mécanisme physiopathologique commun à ces deux pathologies et notamment au rôle d'une hormone clef dans l'homéostasie glucidique et le diabète: **l'insuline**.

Ce n'est pas la première fois de l'histoire que l'insuline se retrouve mêlée aux troubles mentaux. De manière anecdotique, le psychiatre autrichien Manfred Sakel l'utilisait chez des patients atteints de schizophrénie pour provoquer des comas hypoglycémiques lors de ses cures de « choc insuliniques » dans les années 1930. Ne démontrant pas d'efficacité supérieure à celle d'un traitement placebo, la technique fut abandonnée avec l'apparition des premiers

neuroleptiques. Malgré cet échec thérapeutique, rien ne peut exclure que l'insuline pourrait jouer un rôle dans l'étiologie des troubles de l'humeur ou de l'anxiété. Tout comme la ghréline ou la leptine, l'insuline peut-elle influencer le comportement émotionnel ? Si tel est le cas, par quel(s) mécanisme(s) biologique(s) ? A l'inverse, une perte d'efficacité du signal insulinaire sur ces mécanismes présumés peut-elle favoriser le développement de troubles émotionnels ?

C'est à ces questions que ces travaux de thèse tentent d'apporter une réponse. Aux vues de l'implication du système sérotoninergique dans les troubles de l'humeur, nous avons choisis d'étudier **l'impact fonctionnel de l'insuline sur le système sérotoninergique central en relation avec les conséquences comportementales relatives à la DM.**

Ces travaux de thèse permettent d'apporter des éléments de réponse qui n'ont pas été démontrés dans la littérature scientifique. En effet, bien que le rôle de l'insuline au niveau central ait été particulièrement étudié, les données sur d'autres effets centraux sont peu connues. Il en est de même en ce qui concerne la corrélation entre la résistance à l'insuline et les troubles émotionnels qui, d'un point de vue épidémiologique est clairement établie mais dont les mécanismes sous-jacents sont encore obscurs à ce jour. Enfin, ces travaux sont innovants au regard de l'étude de l'interaction entre l'insuline et le système sérotoninergique dans la régulation des émotions, sujet qui n'a pas été abordé par la communauté scientifique. La création d'un modèle génétique spécifique à ces questions scientifiques ou encore l'utilisation de méthodes à fort potentiel translationnel sont d'autres témoins de l'originalité de ce projet.

Au moment de la rédaction de ce manuscrit, ces travaux de thèse, dont la durée totale aura été de 3,5 ans, ont abouti à une publication (Zemdegs et al., 2019) et une revue (Martin et al., 2021) en tant que co-premier auteur. Deux autres articles sont en cours de préparation et j'ai également pu participer à trois autres articles de recherche indépendamment de mon sujet de thèse (un en révision et deux publiés : Bouyakdan et al., 2019; Busquets-Garcia et al., 2018).

Les résultats de ce travail de recherche sont aussi le fruit de plusieurs collaborations et n'auraient pu être réalisés sans l'aide de:

- Bruno Guiard et Sébastien Bullich, Centre de Recherche sur la Cognition Animale, Université Toulouse III-Paul Sabatier

- Daniela Cota, Vincent Simon, Samantha James et Camille Allard, Neurocentre Magendie, Université de Bordeaux

- Philippe De Deurwaerdere, Institut des Neurosciences Cognitives et Intégrative d'Aquitaine, Université de Bordeaux

- André Kleinridders, Institute of Nutritional Science, Université de Potsdam, Allemagne

L'objectif majeur de cette thèse est de comprendre la contribution de l'insuline dans la modulation des comportements anxieux et dépressifs au travers du système sérotoninergique. Par conséquent, la rédaction de ce manuscrit est largement orientée sur les conséquences des états de sensibilité à l'insuline dans la physiopathologie de la DM. L'introduction consistera en des rappels bibliographiques qui traiteront successivement de chacun des éléments clés de cette problématique. La première partie portera sur les généralités et le diagnostic clinique du diabète et de la DM. Nous détaillerons aussi les études épidémiologiques corrélant l'association de la résistance à l'insuline et la forte incidence de la DM dans la population diabétique. Dans la 2nde partie, nous traiterons de l'insuline, de son rôle dans le cerveau et de la résistance à l'insuline au cours du diabète. La partie 3 abordera les liens de corrélation et de causalité entre la résistance centrale à l'insuline et le comportement émotionnel. Au cours de la partie 4, nous traiterons de la neurotransmission sérotoninergique et de son implication dans la régulation des émotions, des troubles de l'humeur et de la réponse aux antidépresseurs. Enfin, la 5^{ème} partie portera sur les évidences suggérant que l'insuline peut moduler le système sérotoninergique et les comportements qui y sont associés.

INTRODUCTION

PARTIE 1:

DIABETE DE TYPE 2

ET

DEPRESSION MAJEURE

1. Les diabètes

Il existe plusieurs types de diabète parmi lesquels le diabète de type 1, le diabète de type 2, le diabète de type 3 et enfin, le diabète gestationnel. Bien que cette thèse porte sur le diabète de type 2, il me paraît important d'apporter de brèves notions sur les autres types de diabète.

1.1 Le diabète de type 1

Le diabète de type 1 (DT1; diabète auto-immun, diabète insulino-dépendant) est caractérisé par un défaut de sécrétion d'insuline par les cellules β du pancréas (Association, 2018). Ce défaut est conséquent à la destruction des cellules β par une réaction auto-immune de l'organisme. La prise en charge de ce diabète nécessite donc une administration quotidienne d'insuline. Le DT1 se développe majoritairement pendant l'enfance, généralement autour de l'âge de 5-7 ans et représente 5 à 10% des cas de diabète (Atkinson et al., 2014). Enfin, le DT1 est associé à de nombreuses comorbidités comme des rétinopathies et des néphropathies (Chiang et al., 2014).

1.2 Le diabète gestationnel

Le diabète gestationnel se caractérise par le développement d'une hyperglycémie au cours du 2^{ème} trimestre de la grossesse mais en deçà des valeurs cliniques permettant d'établir un diagnostic de diabète de type 2 (Szmuilowicz et al., 2019). Ce type de diabète a une prévalence variant de 1 à 14% des cas de grossesse et augmente le risque de développer un diabète de type 2 par la suite (Association, 2018).

1.3 Le diabète de type 3

Le diabète de type 3 est caractérisé par une résistance à l'insuline du cerveau associé à la maladie d'Alzheimer (Nguyen et al., 2020). Il est basé sur le fait que la résistance cérébrale à l'insuline participe à l'accumulation du peptide amyloïde β , un des mécanismes

physiopathologiques majeurs de cette maladie neurodégénérative. Il n'existe toutefois pas d'outil de diagnostic clinique pour établir clairement et objectivement le diabète de type 3.

1.4 Le diabète de type 2

Le diabète de type 2 (DT2; diabète sucré) est une pathologie caractérisée par une altération du métabolisme glucidique, lipidique et protéique résultant **d'une résistance à l'insuline et/ou de son défaut de sécrétion**. Le diagnostic biochimique du DT2 est établi lorsque la glycémie à jeun est ≥ 126 mg/dl, que le taux d'hémoglobine glyquée HbA1c est $\geq 6,5$ % et que la glycémie est ≥ 200 mg/dl en réponse à un test de tolérance au glucose oral (DeFronzo et al., 2015; **tableau 1**). Le DT2 touche 352 millions d'adultes à travers le monde (DeFronzo et al., 2015), avec plus de 80% des cas dans des pays pauvres ou en développement, dont particulièrement en Asie (Inde et Chine) (Chan et al., 2009). Il représente 90% des cas de diabète et est plus élevée chez l'homme avec une prévalence de 14,6% contre 9,1% chez la femme (Nordström* et al., 2016). On estime de manière générale que l'immense majorité des DT2 serait évitables par la mise en place d'une hygiène de vie incluant une alimentation saine, une activité physique quotidienne d'au moins 30 minutes, le maintien d'un IMC < 25 kg.m⁻² ainsi qu'une diminution de la consommation d'alcool et de tabac (Hu et al., 2001; Schellenberg et al., 2013). Le facteur de risque le plus important du DT2 est l'augmentation de la masse adipeuse (Chan et al., 1994; Colditz et al., 1995) bien que d'autres facteurs de risque aient été identifiés comme la sédentarité, le tabagisme, les troubles du sommeil et de manière générale une mauvaise hygiène nutritive (Grøntved and Hu, 2011; Ley et al., 2014; Shan et al., 2015). D'autre part, les études d'associations pangénomiques ont permis de mettre en évidence plus d'une centaine de variants génétiques conférant une susceptibilité au développement de la pathologie (Morris et al., 2012). Toutefois ces variants génétiques ne seraient impliqués que dans 10 à 20% des cas, suggérant l'implication importante de facteur environnementaux. Le DT2 est une maladie chronique complexe et multifactorielle nécessitant la prise en charge du patient et d'un traitement pharmacologique adéquat. Ces traitements médicamenteux consistent à améliorer la sensibilité et/ou la sécrétion d'insuline jusqu'à un certain point pouvant nécessiter une insulinothérapie. La non-prise en charge médicale des patients atteints de DT2 favorise le développement de comorbidité dont, entre autres, les troubles cardiovasculaires (Ferrannini and Cushman, 2012) et les troubles psychiatriques (Ducat et al., 2014).

Parameters	Normal	Prediabetes	T2D
Haemoglobin A1C	<6,0%	6,0-6,4%	>6,5%
Fasting plasma glucose	<110 mg/dl	110-125 mg/dl	>126 mg/dl
Two-hour plasma OGTT	<140 mg/dl	140-199 mg/dl	>200 mg/dl

Tableau 1: Diagnostic clinique du DT2.

D'après DeFronzo et al., 2015.

2. La dépression majeure

La dépression majeure (DM) est un trouble mental dont les conséquences médicales et socio-économiques associées sont importantes. Elle représente ainsi la première cause d'invalidité à travers le monde et participe grandement au développement d'autres pathologies (Otte et al., 2016). La DM a une prévalence moyenne au cours de la vie d'environ 16%, sachant que les femmes sont deux fois plus touchées que les hommes (Kessler et al., 2003). Par ailleurs, la prévalence de la DM varie selon des critères sociodémographiques (Kessler and Bromet, 2013). Le diagnostic clinique, déterminé à l'aide du DSM-5 (American Psychiatric Association, 2015) repose sur deux symptômes majeurs qui sont une condition *sine qua non* du diagnostic: « une perte d'intérêt ou de plaisir » ou « une humeur dépressive ». Pour que le diagnostic d'un épisode dépressif caractérisé soit positif, l'individu doit présenter en tout 5 symptômes sur une période d'au moins deux semaines (**tableau 2**). En recherche clinique, plusieurs échelles de score de dépression peuvent être utilisées (ex: Hamilton Depression Rating Scale, Montgomery-Asberg Depression Rating Scale, Beck's Depression Inventory). Il existe plusieurs sous-types de dépression ayant des différents degrés de sévérité dont la dépression mélancolique, la dépression atypique ou encore la dépression réactionnelle. Les épisodes dépressifs caractérisés peuvent également être comorbides à un autre trouble psychiatrique comme la schizophrénie, les troubles bipolaires ou encore les troubles anxieux et peuvent ainsi

conduire à un diagnostic différentiel (Belmaker and Agam, 2008). L'anxiété est la comorbidité psychiatrique la plus importante dans la DM, dont souffre 67% des patients (Lamers et al., 2011). A ce titre, le syndrome anxio/dépressif peut caractériser un épisode dépressif caractérisé accompagné de symptômes anxieux majeurs. Le traitement de la DM inclue la psychothérapie pour les formes légères et un traitement pharmacologique pour les formes modérées et sévères. Par ailleurs, le traitement pharmacologique en association avec la psychothérapie permet un meilleur taux de rémission que la prise en charge pharmacologique seule (de Jonghe et al., 2001).

Malgré leur efficacité clinique, seul 1/3 des patients achèvent une rémission en réponse à un traitement antidépresseur (Trivedi et al., 2006). En plus de cette limite thérapeutique s'ajoute le long délai d'action des antidépresseurs qui varie de 2 à 8 semaines. De plus, la récurrence de la dépression est importante puisque le risque de souffrir d'un second épisode dépressif caractérisé dans les cinq années consécutives à un premier épisode est de 50% (Belsher and Costello, 1988; Lewinsohn et al., 1994).

Bien qu'à l'heure actuelle, l'étiologie exacte de la DM soit inconnue, il existe diverses hypothèses neurobiologiques tentant d'en expliquer l'origine. Les principales sont listées ci – après:

- L'hypothèse de la déficience en monoamine: cette théorie considère que pour tous les cas de DM il existe une déficience plus ou moins importante en monoamine qui altère la fonction des neurotransmissions sérotoninergique, noradrénergique et/ou dopaminergique. Cette théorie découle en partie du mécanisme d'action des traitements antidépresseurs.
- L'hypothèse de l'axe HPA: cette théorie considère que la sur-activation de l'axe hypothalamo-hypophyso-surrénalien (HPA), ou axe corticotrope, est responsable de la DM en raison de son implication dans la réponse neuroendocrine au stress.
- L'hypothèse neurotrophique: théorie considérant que la diminution de la neurogénèse hippocampique, en association avec des réarrangements et des altérations de la plasticité synaptique est responsable de la DM.

- L'hypothèse inflammatoire: cette théorie considère que des processus inflammatoires périphérique et centraux participent au développement de la DM

Chacune de ces hypothèses présentent des mécanismes biologiques qui sont intimement liés et qui s'influencent les uns et les autres (Gold, 2015). La véracité d'une hypothèse par rapport à une autre peut refléter différents endophénotypes de la dépression. Par ailleurs, la DM étant une maladie psychiatrique, elle est intrinsèquement liée à la psychologie de l'individu. Par conséquent, divers modèles cognitifs psychopathologiques de la dépression ont été proposés en s'appuyant sur différents substrats neurobiologiques (pour revue voir Badcock et al., 2017; Disner et al., 2011).

An individual will show five (or more) of the following symptoms, which should be present during the same 2-week period nearly every day and should represent a change from previous functioning:

- | | |
|---|--|
| • Depressed mood* | • Decrease or increase in appetite |
| • Markedly diminished interest or pleasure in all, or almost all, activities* | • Psychomotor agitation or retardation |
| • Insomnia or hypersomnia | • Feelings of worthlessness, or excessive or inappropriate guilt |
| • Fatigue or loss of energy | |
| • Diminished ability to think or concentrate, or indecisiveness | • Recurrent thoughts of death or suicidal ideation |

*Depressed mood and/or diminished interest or pleasure must be evident for a diagnosis

Tableau 2: Diagnostic de la DM d'après le DSM-V.

D'après American Psychiatric Association, 2015.

En somme, la DM est un syndrome complexe et hétérogène présentant une grande variabilité interindividuelle et évolutive au cours du temps. Nous aborderons en détail l'hypothèse de la déficience sérotoninergique de la dépression au cours de la partie 4.

3. Prévalence de la dépression majeure dans la population atteinte de diabète de type 2

L'Association entre le diabète et les maladies mentales n'est pas récente. Au 17^{ème} siècle, l'anatomiste anglais Thomas Willis disait du diabète qu'il était « la conséquence d'un état de tristesse prolongée ». Au cours des deux dernières décennies, l'intensification des recherches à ce sujet a permis de mettre à jour un lien étroit entre les deux pathologies. En effet, d'après les études épidémiologiques, les individus atteints de diabète, indépendamment du type 1 ou 2, ont au moins deux fois plus de risque de souffrir de DM que des individus sains (Anderson et al., 2001; Ciechanowski et al., 2003). Toutefois, la prévalence de la DM est plus importante dans le DT2 que dans le DT1 (Bağ et al., 2020; Silverstein et al., 2015). L'inflammation observée au cours du DT2 pourrait en être une explication. En effet, les marqueurs inflammatoires sont corrélés au symptôme dépressif pour le DT2, ce qui n'est pas le cas pour le DT1 (Herder et al., 2018). Par ailleurs les individus avec un DT2 ont plus de risque de souffrir de troubles anxieux généralisés, une comorbidité fréquente et bidirectionnelle de la DM (Huang et al., 2020). Comme c'est le cas pour la DM, on observe que dans la population atteinte de DT2, les femmes ont plus de risques de souffrir de DM que les hommes (Al-Ozairi et al., 2020; Bağ et al., 2020; Roy and Lloyd, 2012). Par ailleurs, de manière générale, la durée de l'épisode dépressif dans le DT2 est légèrement plus long: 14 mois contre 12 mois dans la population avec un épisode dépressif caractérisé sans comorbidité (Eaton et al., 2008; de Groot et al., 2016). De plus, la prévalence significativement plus importante de la DM ne s'explique pas par un biais de diagnostic conséquent au suivi médical plus important dont les patients atteints de DT2 sont l'objet (Manderbacka et al., 2014). Enfin, bien que vivre avec une maladie chronique est un facteur de risque pour développer une DM (J. Katon, 2011), un mécanisme biologique commun pourrait être sous-jacent aux deux pathologies. La résistance à l'insuline pourrait être la pierre angulaire de ces deux pathologies. En effet, étant une caractéristique majeure du DT2, elle pourrait être une autre explication de la plus forte prévalence de DM chez ces individus plutôt que chez ceux atteints du DT1.

4. Hypothèse mécanistique

Au cours d'une méta-analyse, Kan et ses collaborateurs rapportent que la résistance à l'insuline (insulino-résistance) est significativement corrélée aux symptômes dépressifs (Kan et al., 2013). De manière similaire, plusieurs études rapportent une association significative entre une insulino-résistance élevée et la prévalence de la DM (Chiba et al., 2000; Everson-Rose et al., 2004; Pearson et al., 2010; Timonen et al., 2005; Watson et al., 2021). Il est également intéressant de noter que cette corrélation significative entre une insulino-résistance et les troubles dépressifs est également retrouvée chez des patients sans troubles métaboliques apparents ou diagnostiqués (Lee et al., 2017; Timonen et al., 2006). Par ailleurs, chez des patients souffrant de DM non-diabétique, on observe une hyperinsulinémie qui est un mécanisme compensatoire de l'insulino-résistance (Çakici et al., 2019). Cette observation peut également suggérer qu'il s'agit d'un cas de pré-diabète de type 2. Cette hypothèse n'est pas à exclure étant donné le lien bidirectionnel entre DT2 et DM. En effet, l'incidence du DT2 est également significativement plus élevée chez les patients atteints de DM que chez les individus sains (Vancampfort et al., 2015). D'autre part, une étude longitudinale rapporte que l'insulino-résistance est associée à une augmentation du risque de suicide (Golomb et al., 2002). Or, le taux de suicide est particulièrement élevé chez les individus atteints de DM (Angst et al., 1999). Enfin, au cours d'une étude clinique, Singh et ses collaborateurs ont mis en évidence que des taux élevés de résistance à l'insuline sont positivement corrélés à la sévérité des symptômes dépressifs (Singh et al., 2019).

En nous appuyant sur l'ensemble de ces données, nous émettons l'hypothèse que la résistance à l'insuline est à l'origine du développement de la DM chez les patients atteints de DT2.

PARTIE 2:

L'INSULINE

1. Généralités

L'insuline est un peptide composé de 51 acides aminés (aa) qui fut extrait d'un pancréas de chien pour la première fois en 1921 par un jeune chirurgien, Frederick Banting, et son assistant, Charles Best. Le mot insuline dérive du mot latin « insula » qui signifie île, en référence aux îlots de Langerhans du pancréas synthétisant ce peptide. L'insuline a été fortement conservée au cours de l'évolution et est présente chez les organismes vertébrés et invertébrés sous différentes formes apparentées. Elle est probablement le peptide endocrinien le plus étudié et sa découverte fait partie des avancées majeures de la médecine moderne car il n'existait auparavant aucun traitement pour les patients diabétiques de type 1. En 1922, un jeune adolescent de 14 ans, Leonard Thompson, fut le premier Humain à recevoir une injection d'insuline, lui évitant une issue tragique. En 1923, Banting et Macleod reçurent le prestigieux Prix Nobel de Physiologie ou Médecine qu'ils partagèrent avec Best et Collip. Par ailleurs, l'insuline fut la première protéine dont la séquence (1951) et la structure tertiaire (1969) furent connues. Enfin, la découverte de l'insuline permit à la fois des avancées technologiques (dosage radio-immunologique; Berson et al., 1956) et médicales qui participèrent également à sa notoriété au sein de la société.

2. Gène, biosynthèse et structure de l'insuline

Le gène codant pour l'insuline a été remarquablement conservé au cours de l'évolution, comme le témoigne la conservation des ponts disulfure caractéristiques de la superfamille des récepteurs insuline/IGF-R. Chez l'Humain le gène codant pour l'insuline *INS* est porté par le chromosome 11 sur le loci 11p15.5 (Harper et al., 1981), qui fut cloné par Bell et ses collaborateurs en 1980 (Bell et al., 1980). De manière singulière, on retrouve deux gènes différents codant pour l'insuline (*Ins1* et *Ins2*) chez la souris et le rat (Cordell et al., 1979). La transcription, l'épissage alternatif et la traduction successive du gène de l'insuline conduit à la production d'un peptide précurseur de 110 aa, nommé préproinsuline (Steiner et al., 1967). La partie N-terminale de la préproinsuline comporte une séquence de 25 aa servant de « peptide-signal ». C'est le clivage de cette partie dans le réticulum endoplasmique par des enzymes protéolytiques qui permet la maturation de la proinsuline (Eskridge and Shields, 1983). La

proinsuline est composée de chaînes A et B maintenues entre elles par deux ponts disulfure et connectées par le peptide C. La conversion de la proinsuline en insuline a lieu dans l'appareil de Golgi où les prohormones convertase 2 et 3 ainsi que la carboxypeptidase H, entraînent le clivage du peptide C (Docherty et al., 1989; Naggert et al., 1995). L'insuline est alors stockée dans des vésicules où elle sera co-libérée dans la circulation sanguine avec le peptide C en fonction des besoins de régulation de l'homéostasie glucidique. L'insuline mature est formée par une séquence de 51 aa dont le poids est de 5,8 kDa (Ryle et al., 1955). Cette hormone peptidique est un hétérodimère constitué de deux chaînes polypeptidiques: la chaîne A formée par 21 aa et la chaîne B formée de 30 aa. Au total, trois ponts disulfure participent au maintien de la cohésion structurale de l'insuline. Ces ponts lient notamment les chaînes A et B (A7-B7 et A20-B19) et la chaîne A au moyen d'un pont intracaténaire (A6-A11) (Adams et al., 1969; Blundell et al., 1971; **figure 1**). Bien que l'insuline soit active sous forme globulaire monomérique, elle peut également se polymériser en hexamères formant des cristaux (forme de stockage) (Derewenda et al., 1991).

La régulation de l'expression du gène de l'insuline est sous contrôle de différents activateurs ou répresseurs. L'activité de ces facteurs de régulation peut être modulée par des substrats énergétiques et des hormones. De manière générale, le glucose est le régulateur principal en tant que puissant stimulant de la biosynthèse de l'insuline. Le rôle de l'hormone hypoglycémisante sur la régulation de sa propre synthèse est encore controversé. Certaines études rapportent un effet inhibiteur tandis que de nouvelles études observent à l'inverse un effet stimulant (Koranyi et al., 1992; Leibiger et al., 2000).

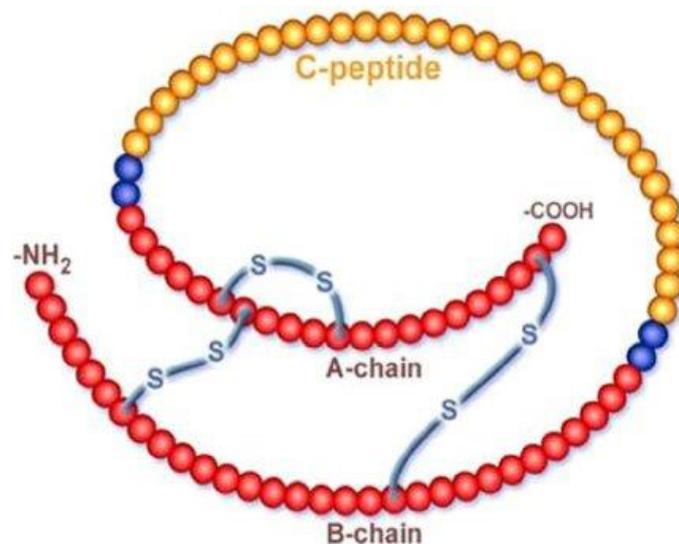


Figure 1: Structure de l'insuline.

D'après Akinlade et al., 2014.

3. Libération et dégradation de l'insuline

L'insuline est synthétisée par les cellules Bêta (cellules β) des îlots de Langerhans du pancréas et contrôle les trois grands types de métabolismes: glucidique, lipidique et protéique. Le glucose est le stimulus principal conditionnant la libération d'insuline. En effet, l'hormone est libérée par les cellules β du pancréas en réponse à une augmentation des taux sanguin de glucose (hyperglycémie) postprandiale. Dans ces conditions, le glucose pénètre dans les cellules pancréatiques via le transporteur GLUT2 (Guillam et al., 2000). La glucokinase agit comme un « détecteur de glucose » et stimule le processus de glycolyse. La métabolisation du glucose conduit à l'augmentation du taux d'ATP intracellulaire ayant pour conséquence la fermeture de canaux potassium sensibles à l'ATP (K_{ATP}). La fermeture de ces canaux induit la dépolarisation de la cellule, un influx massif de Ca^{2+} via des canaux calciques voltages dépendant et déclenche ainsi la libération de l'insuline par exocytose (Matschinsky, 1990; **figure 2**). La sécrétion d'insuline est biphasique et dotée d'un caractère pulsatile avec des oscillations de sécrétion lentes et rapides (Seino et al., 2011). La première phase de sécrétion correspond à la libération immédiate de l'insuline préalablement synthétisée et stockée dans les granules tandis que la seconde phase de sécrétion correspond à l'insuline synthétisée *de novo*

dans les cellules β . La sécrétion peut être modulée par de multiples facteurs comme des hormones, des acides aminés ou des lipides sous l'effet permissif du glucose. D'autre part, le système nerveux central (SNC) peut également inhiber cette libération au travers de l'axe sympathique ou la favoriser via l'axe parasympathique (pour revue, voir Magnan and Ktorza, 2005). Chez l'Humain, la demi-vie de l'insuline est de 4 à 8 minutes dans la circulation sanguine (Dreyer et al., 1986; Duckworth, 1988). L'hormone hypoglycémiante est ensuite dégradée par une enzyme spécifique qui est l'enzyme de dégradation de l'insuline (IDE pour *insulin degrading-enzyme*). Cette enzyme est une metallo-protéase de 110 kDa permettant le clivage de l'insuline en plusieurs fragments inactifs (Duckworth, 1988).

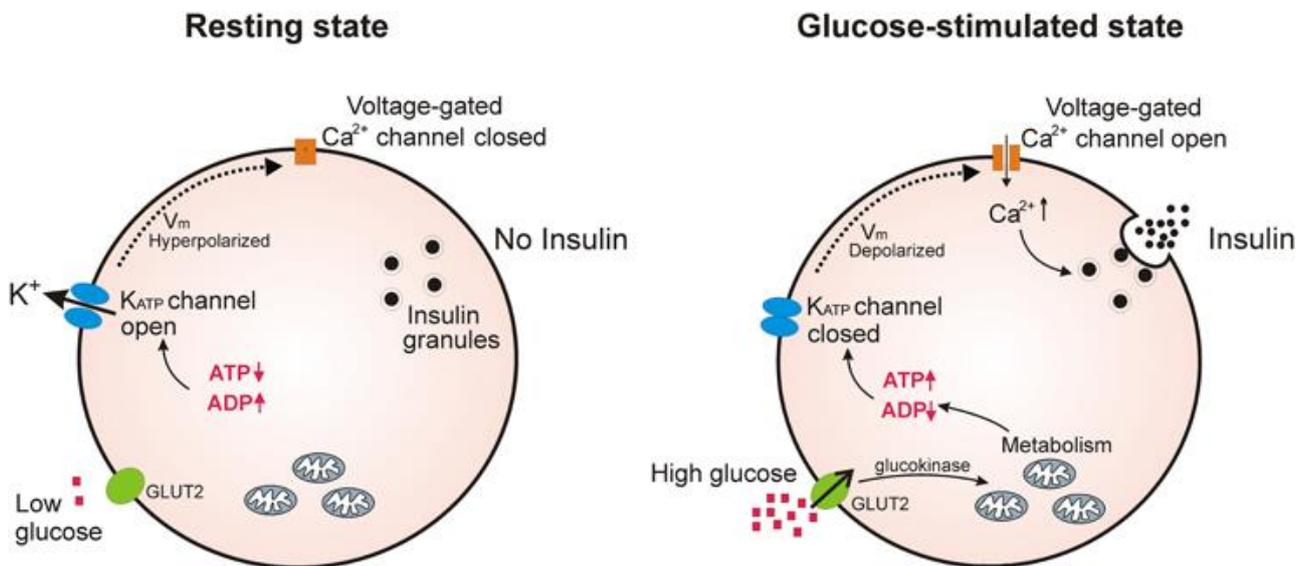


Figure 2: Libération d'insuline par la cellule β en réponse au glucose.

D'après Martin et al., 2013.

4. Voie de signalisation de l'insuline par son récepteur

Au cours de cette partie, nous ne nous focaliserons pas sur un tissu particulier pour décrire la voie de signalisation du récepteur à l'insuline. Les particularités singulières du récepteur à l'insuline dans le cerveau seront spécifiées dans la partie traitant du système nerveux central.

4.1 Récepteur à l'insuline

Le récepteur à l'insuline (IR) appartient à la classe II de la famille des Récepteurs Tyrosine Kinase (RTK) tout comme le récepteur à IGF-1 (IGF-1R) et l'IRR (Insulin Related-Receptor protein) (van der Geer et al., 1994). Au cours d'une étude de fixation ligand-récepteur, Freychet et ses collaborateurs mettent en évidence pour la première fois la présence du récepteur à l'insuline au niveau de la membrane plasmique des hépatocytes (Freychet et al., 1971). L'ADNc de l'IR a ensuite été cloné de manière concomitante par deux groupes de recherche distincts (Ebina et al., 1985; Ullrich et al., 1985). La séquence codante de l'IR de 120 kpb comprend 22 exons (Seino et al., 1989). Le gène codant pour l'IR, *INSR*, est d'abord traduit en un prorécepteur qui est ensuite glycosylé puis clivé par les protéases furine pour obtenir un hétérotétramère qui forme l'IR mature (Bravo et al., 1994). La structure quaternaire de cette protéine indique que l'IR est composé de deux sous-unités α extracellulaires de 125 kda et de deux chaînes β intracellulaires de 90 kda, reliées par des ponts disulfures (Massague et al., 1980; Sparrow et al., 1997; **figure 3**). L'insuline se fixe sur son récepteur via deux sites présents au niveau de la sous-unité α extracellulaire: le site en C-term (α CT) et un autre site correspondant au domaine de répétition riche en leucine L1 (Menting et al., 2013). La fixation de l'insuline sur l'IR entraîne un changement conformationnel du récepteur, ayant pour conséquence une transphosphorylation des sous-unité β intracellulaire au niveau des tyrosines 1158, 1162, et 1163 du domaine tyrosine kinase (Kasuga et al., 1982; Zhang and Roth, 1991). C'est cette transphosphorylation qui initie la transduction du signal de l'insuline en induisant une cascade de 122 phosphorylations de résidus tyrosine sur 89 protéines différentes (Schmelzle et al.,

2006). La transduction du signal de l'insuline au travers de l'IR permet diverses actions au niveau cellulaire, moléculaire et génomique.

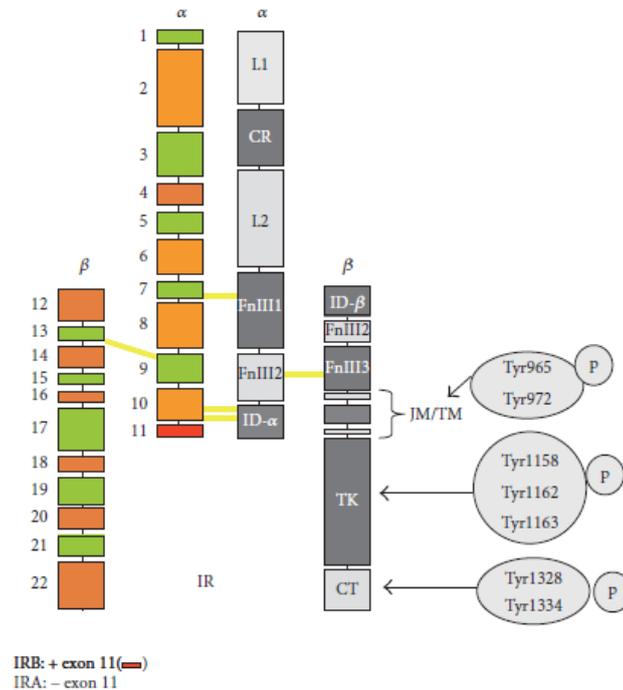


Figure 3: Structure du récepteur à l'insuline.

D'après Escribano et al., 2017.

Par ailleurs lors de sa transcription, le gène *INSR* peut subir un épissage alternatif au niveau de l'exon 11, pour donner lieu à deux isoformes de l'IR: IR-A (contenant l'exon 11) et IR-B (ne contenant pas l'exon 11) (Moller et al., 1989). Cet épissage alternatif est directement régulé par l'insuline au travers de la voie Ras-MAPK/ERK qui permet ainsi de moduler l'expression des isoformes dans un tissu (Malakar et al., 2016). Les deux isoformes de l'IR se différencient d'un point de vue structurel mais également sur le plan fonctionnel en activant des processus biologiques différents. De manière intéressante, lorsque les deux isoformes sont exprimés en proportion stœchiométrique dans un même tissu, l'insuline présente une plus grande affinité pour l'isoforme IR-A (Knudsen et al., 2011). Les isoformes de l'IR peuvent également former des récepteurs hybrides (HR) avec IGF-1R, noté HR-A ou HR-B selon l'isoforme de l'IR hybridé. Ces formes d'hybridation modifient également l'affinité des ligands endogènes (insuline, proinsuline, IGF-1, IGF-2) pour ces récepteurs. L'affinité de l'insuline pour les HR

et pour IGF1-R est plus faible que pour l'IR (Sciacca et al., 2010). En ce qui concerne, IGF-1 et IGF-2, on observe qu'ils présentent une forte affinité pour IR-A, ce qui n'est pas le cas pour IR-B (Frasca et al., 1999; Pandini et al., 2002). Concernant les HR, IGF-1 et IGF-2 ont une affinité supérieure à l'insuline pour les deux isoformes HR (Belfiore et al., 2017; Slaaby, 2015). Les différentes affinités de ces peptides pour l'ensemble des récepteurs de leur famille sont récapitulées dans la **figure 4**. Au vu du rôle trophique médié par les IGF, leur forte affinité pour IR-A suggère que cet isoforme permet préférentiellement la transduction de signaux mitogéniques. La distribution tissulaire des isoformes de l'IR confirme en effet cette idée. Bien que l'IR soit exprimé de manière ubiquitaire dans tous les tissus, on observe que IR-A est préférentiellement exprimé dans les tissus en développement ou nécessitant une importante activité mitogénique (Joost, 1995). A l'inverse, IR-B est quant à lui préférentiellement exprimé dans les tissus impliqués dans l'action métabolique de l'insuline et la régulation de l'homéostasie glucidique comme le tissu adipeux ou le foie (Joost, 1995). Par ailleurs, les isoformes et les HR activent des voies de signalisation qui peuvent être différentes. Cette diversité de récepteurs permet à l'insuline une pléiade d'activités biologiques au sein de l'organisme.

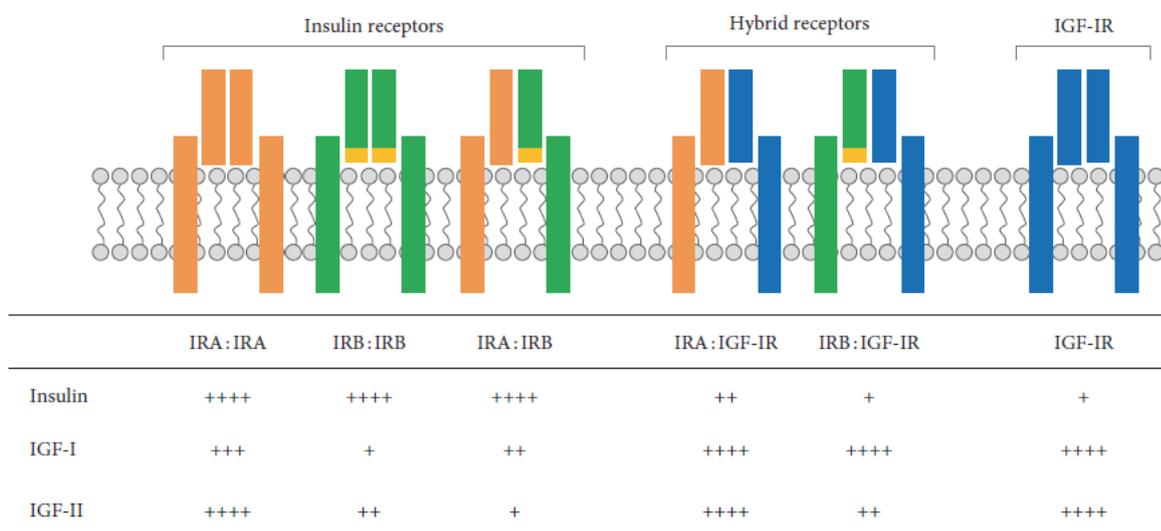


FIGURE 2: Insulin and IGFs receptor family. Each receptor binds insulin, IGF-I, or IGF-II with a different affinity. Ligand affinities are showed as + (very low affinity), ++ (low affinity), +++ (high affinity), and ++++ (very high affinity).

Figure 4: Affinité de l'insuline, de IGF-1 et de IGF-2 pour leurs différents récepteurs.

D'après Escribano et al., 2017.

4.2 Substrat du récepteur à l'insuline

Il existe au total 11 substrats différents du récepteur à l'insuline. Les substrats majeurs de l'IR, font partie de la famille des IRS (Insulin Receptor Substrate), dont les plus étudiés sont IRS-1 et IRS-2. Ils permettent l'activation des deux voies majeures de signalisation de l'IR qui sont la voie PI3K/Akt et la voie Ras/MAPK (**figure 5**).

4.2.1 Famille des IRS

La famille des IRS est composée de 6 isoformes dont IRS-1 et IRS-2 qui sont exprimés de manière ubiquitaire tandis que l'expression de IRS-3/4/5/6 est spécifique de certains tissus (Taniguchi et al., 2006). La transphosphorylation de l'IR permet le recrutement de la protéine IRS-1 au niveau du site juxtamembranaire (JM) via ses domaines PTB (phosphotyrosine binding) et PH (pleckstrin homology) en N-terminal (Eck et al., 1996; O'Neill et al., 1994). Les sites de phosphorylation SH2 (Src-homology-2-containing protein) en C-terminal de IRS-1 et IRS-2 permettent par la suite de recruter des protéines sous-effectrices pour assurer la transduction du signal (Sun et al., 1992, 1995). Cette phosphorylation permet notamment l'activation de la protéine PI3K (phosphoinositide 3-kinase) via le recrutement de sa sous-unité régulatrice p85. L'activation des IRS permet aussi le recrutement de la protéine Grb2 (Growth factor receptor bound protein 2) qui, en interagissant avec la protéine SOS (Son Of Sevenless), permet l'activation de la voie Ras/MAPK (Myers et al., 1994; Skolnik et al., 1993). Ces deux voies canoniques de l'IR ont des fonctions différentes. En effet, la voie PI3K/Akt est responsable des effets métaboliques tandis que Ras/MAPK est impliquée dans les effets mitogéniques de l'insuline (Taniguchi et al., 2006). De plus l'activation des différents substrats IRS de l'IR peut également induire des effets biologiques différents. Ainsi, IRS-2 entraîne de manière préférentielle l'activation de voie métabolique tandis que IRS-1 semble plus important pour la croissance cellulaire dans certains tissus (White, 2002). De manière générale et selon les tissus, l'activation de l'IR permet la stimulation de la prolifération cellulaire, la survie cellulaire, la synthèse de protéines, de lipides et de glycogène ou encore le transport actif du glucose (Boucher et al., 2014).

4.2.2 Protéines Shc (Src-homology-2-containing protein)

Les protéines Shc, réparties en quatre membres différents (Shc/ShcA, ShcB/Sli, ShcC/Rai/N-Shc, et ShcD/RaLP) sont des substrats de l'IR alternatifs aux IRS (Finetti et al., 2009). ShcA existe en trois isoformes différents: p66, p52 et p46 (Ravichandran, 2001). La phosphorylation des isoformes p52/46 entraîne l'activation de la voie de signalisation Ras/MAPK via Grb2 (Kim et al., 1998). A l'inverse, la phosphorylation de l'isoforme p66 entraîne son inhibition (Tomilov et al., 2011). La compétition pour le domaine de fixation JM de l'IR entre les substrats favorise soit la voie métabolique (IRS), soit la voie mitogénique (Shc) (Sasaoka et al., 2001).

4.2.3 Autres substrats du récepteur à l'insuline

Il existe également d'autres substrats de l'IR. Parmi eux se trouve les protéines GAB (GRB2-associated-binding protein 2) et les protéines DOK (downstream of kinases) qui ne sont pas spécifiques à l'IR et qui sont faiblement phosphorylées par celui-ci (Versteyhe et al., 2010). La famille de protéines APS/SH2-B est également un groupe de substrat de l'IR (Kotani et al., 1998). Elles ont un domaine SH2 leur permettant d'être recrutées suite à la transphosphorylation de l'IR et sont notamment impliquées dans la translocation du transporteur au glucose Glut4 (Leto and Saltiel, 2012). En outre, diverses protéines peuvent agir comme substrat de l'IR, mais de façon indépendante à la phosphorylation de résidus tyrosine. La transduction du signal se fait alors au travers du recrutement de différentes protéines comme les β -arrestin, Rack1, intégrines, Grb7/10/14, cytohésines (Siddle, 2012).

La diversité de la transduction du signal de l'IR peut également s'apprécier au travers de la découverte d'un mécanisme jusque-là inconnu. En effet, l'IR peut se transloquer dans le noyau de la cellule pour s'associer directement à des promoteurs de transcriptions et réguler l'expression génique (Hancock et al., 2019).

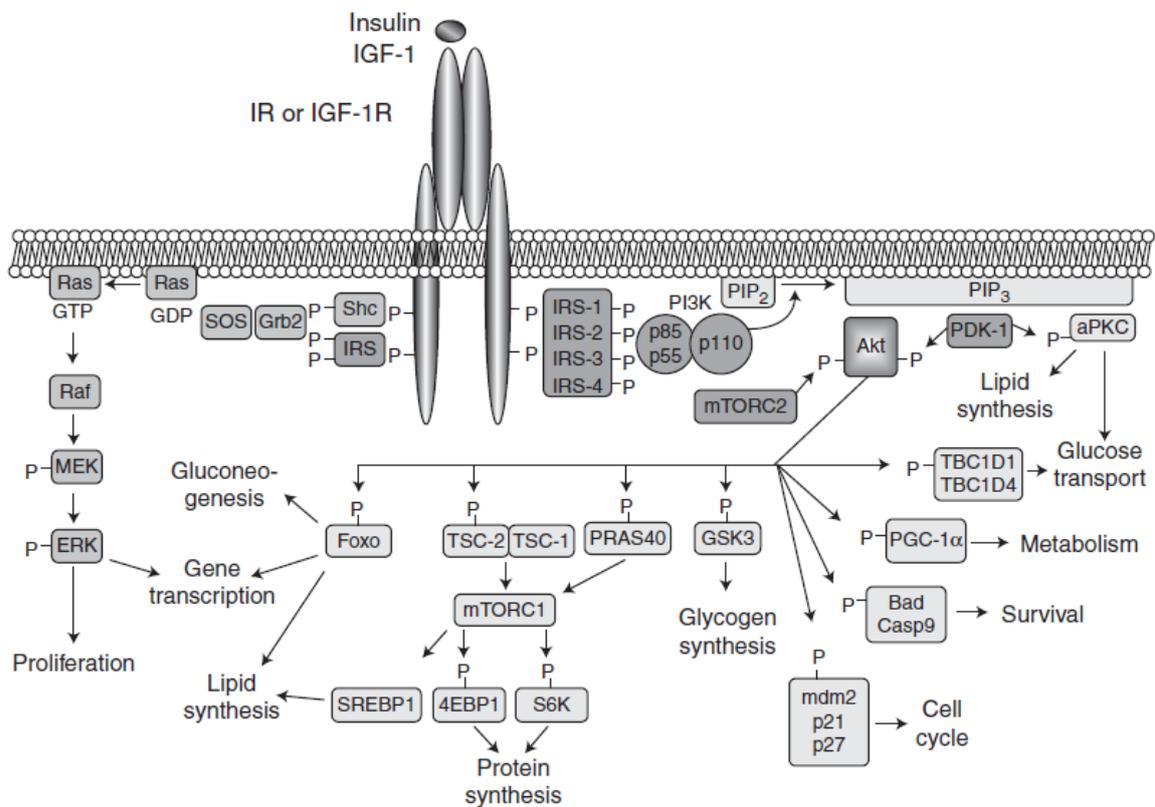


Figure 5: Voie de signalisation du récepteur à l'insuline.

D'après Boucher et al., 2014.

4.3 Modulateurs négatifs de la voie de signalisation du récepteur à l'insuline

Le signal de transduction intracellulaire de l'insuline par son récepteur est régulé à plusieurs niveaux de la voie de signalisation par différents mécanismes de rétrocontrôle direct ou indirect (**figure 6**). Ces modulateurs négatifs permettent de réguler finement les processus biologiques conséquent à l'activation de l'IR mais peuvent aussi être impliqués dans la résistance à l'insuline.

Parmi les régulateurs négatifs de la voie de signalisation de l'IR on trouve les protéines tyrosine phosphatase. Ces protéines inhibent la transduction du signal par déphosphorylation des résidus tyrosine du domaine à activité tyrosine kinase de l'IR. Les protéines tyrosine phosphatase PTP1B (Protein-Tyrosine Phosphatase 1B) et LAR (Leukocyte common antigen-

related phosphatases) déphosphorylent les résidus tyrosine de l'IR et de IRS-1 et de surcroît inhibe la fixation de IRS-1 sur l'IR (Galic et al., 2003; Goldstein, 1993; Goldstein et al., 2000; Salmeen et al., 2000). Les lipides phosphatases issues du gène PTEN (Phosphatase et TENsin homolog) déphosphorylent le messager PIP3 entraînant une diminution du signal de la voie PI3K (Cantley and Neel, 1999; Carracedo and Pandolfi, 2008). La régulation négative de PTEN est également observée *in vivo* dès lors que son inhibition permet d'augmenter la sensibilité à l'insuline chez la souris (Kurlawalla-Martinez et al., 2005; Stiles et al., 2004). Les protéines adaptatrices Grb10 et Grb14 sont des protéines cytoplasmiques adaptatives inhibant la voie de signalisation de l'insuline. Elles bloquent la fixation de protéines effectrices au niveau de l'IR et d'IRS-1, diminuant ainsi le signal de transduction (Holt and Siddle, 2005). Les protéines SOCS (Suppressor Of Cytokine Signal) inhibent la signalisation de l'IR de la même manière que Grb10 et Grb14 tout en favorisant également la dégradation d'IRS-1 (Emanuelli et al., 2000; Rui et al., 2002; Ueki et al., 2004). Enfin la phosphorylation de résidus sérine/thréonine (Ser/Thr) au niveau d'IRS-1 et de l'IR est un mécanisme majeur de l'inhibition de la transduction du signal. Plusieurs kinases peuvent être responsables de ces phosphorylations en réponse à des phénomènes inflammatoires, des acides gras signaux, ou encore par rétrocontrôle de l'insuline elle-même via la voie PI3K/Akt. La phosphorylation de la serine 307 (Ser-307) d'IRS-1 a fait l'objet de nombreuses études dans l'inhibition de la voie de signalisation de l'insuline et de son implication dans l'insulino-résistance (Aguirre et al., 2002).

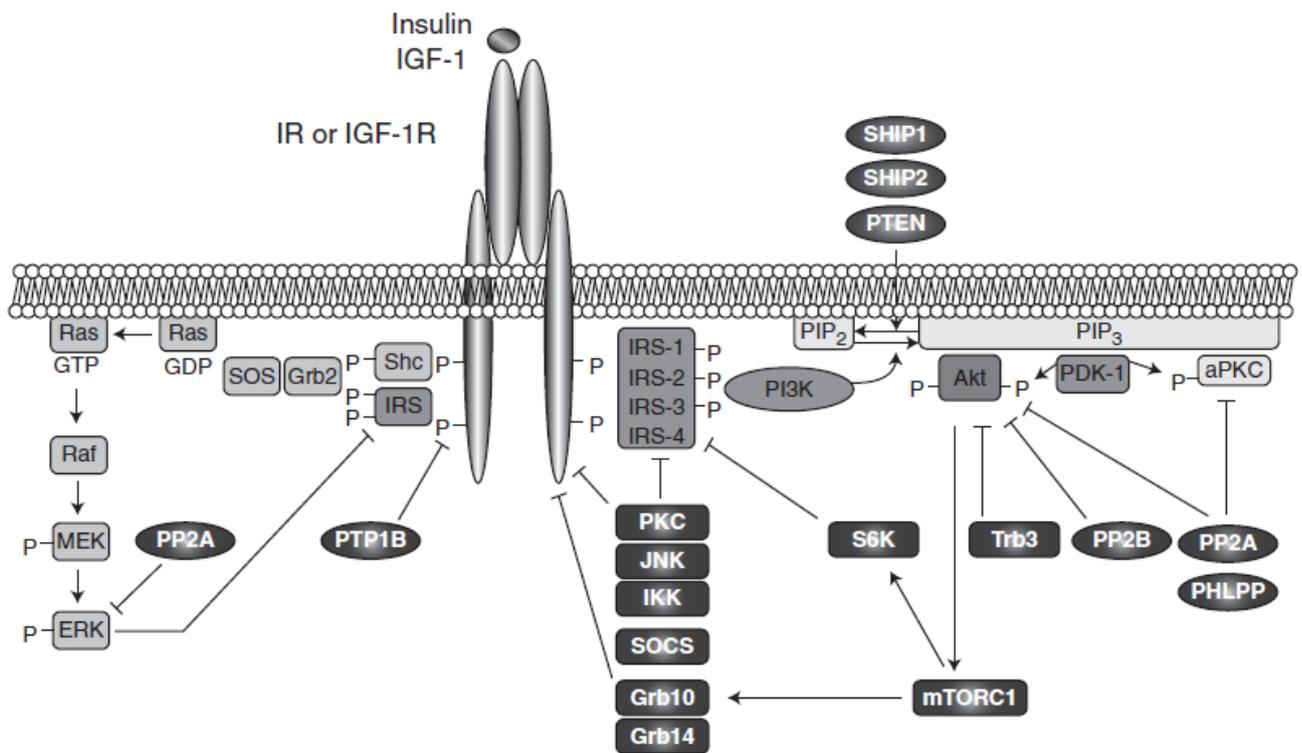


Figure 6: Modulateurs négatifs de la voie de signalisation du récepteur à l'insuline.

D'après Boucher et al., 2014.

5. Action périphérique de l'insuline

En raison de l'orientation de ce manuscrit sur l'action centrale de l'insuline, les rôles périphériques de l'insuline seront décrits de manière succincte et simplifiée.

L'action principale de l'insuline est de promouvoir l'absorption, le stockage et l'utilisation du glucose dans les tissus cibles. Elle a par conséquent un rôle anabolisant. La fixation de l'insuline sur son récepteur permet, entre autre, la translocation des transporteurs GLUT4 à la membrane permettant l'entrée du glucose dans la cellule comme c'est le cas pour le tissu adipeux et le muscle (Holman and Kasuga, 1997; Myers and White, 1996; **figure 7**). Dans ce dernier, l'insuline va stimuler la glycogénogénèse (Dimitriadis et al., 2011). Dans les

adipocytes, le glucose sera mis en réserve sous forme de triglycéride au cours de la lipogenèse qui est stimulée par l'insuline (Dimitriadis et al., 2011).

Le foie est un organe cible primordial de l'insuline. Les hépatocytes absorbent le glucose via le transporteur GLUT2 qui est indépendant de l'insuline. Au niveau des hépatocytes, l'insuline inhibe la glycogénolyse et la néoglucogénèse tout en stimulant la glycogénèse faisant du foie l'organe majeur du stockage du glucose (Cherrington et al., 2007).

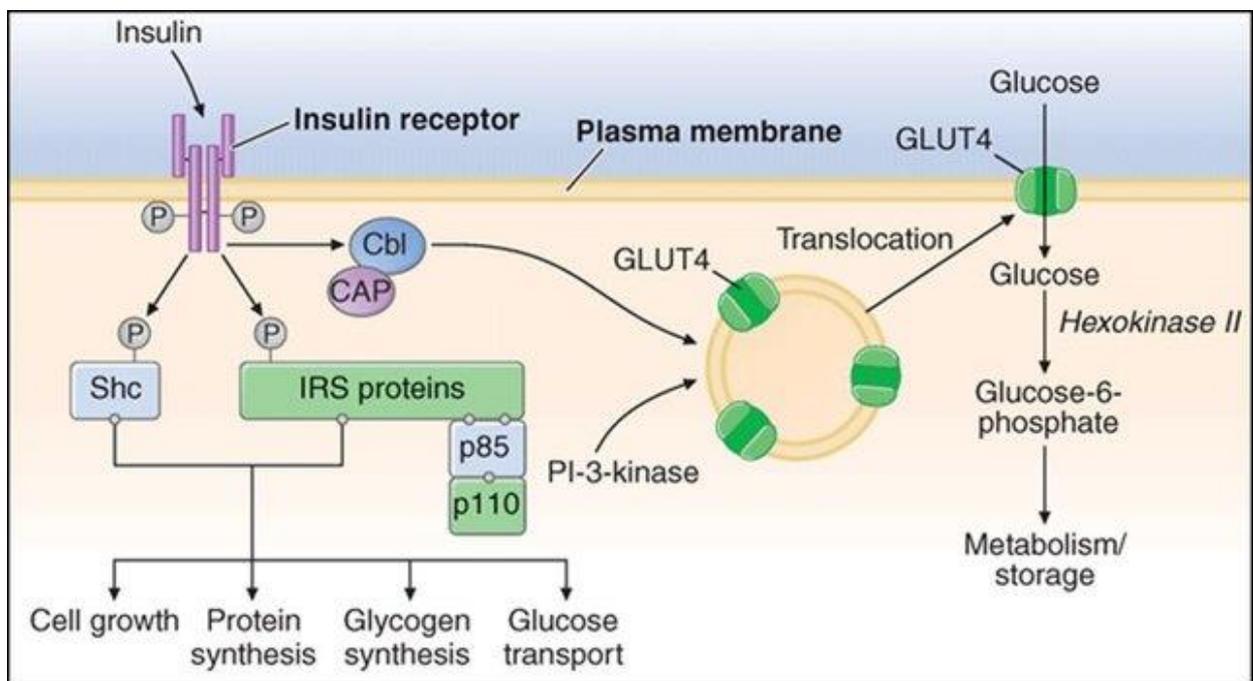


Figure 7: Absorption du glucose par GLUT4 en réponse à l'insuline.

D'après Ingle, 2018.

6. Action centrale de l'insuline

6.1 Récepteur de l'insuline et voie de signalisation dans le SNC

Pendant longtemps le cerveau a été considéré comme un organe insensible à l'insuline. En effet, les neurones absorbent le glucose majoritairement via le transporteur de haute affinité GLUT3 (Koepsell and Vallon, 2020). Or, le transport du glucose au travers de ce transporteur est indépendant de l'insuline, à l'inverse de GLUT4.

En 1978, Havrankova et ses collaborateurs mettent en évidence que le récepteur à l'insuline (IR) est largement exprimé dans le cerveau au travers d'expérience *in vitro* (Havrankova et al., 1978). Plusieurs régions sont enrichies en IR (par ordre décroissant): bulbes olfactifs > cortex cérébral > hippocampe > hypothalamus > tronc cérébral. L'IR est localisé à la fois au niveau du corps cellulaire des neurones et de la synapse (Abbott et al., 1999; Chiu et al., 2008). La présence des deux isoformes de l'IR a aussi été observée au niveau du SNC. En effet, l'IR-A est majoritairement exprimé dans les neurones tandis que les cellules gliales et notamment les astrocytes expriment l'isoforme IR-B (Garwood et al., 2015). Il est également intéressant de noter la présence de l'hybride IR/IGF-1R dans les neurones ainsi que dans les cellules gliales, bien que son expression soit plus faible au sein de cette population cellulaire (Martinez-Rachadell et al., 2019). Au niveau central, plusieurs études s'accordent à dire que l'activation de l'IR cérébral entraîne l'activation des deux voies majeures canoniques observées en périphérie: PI3K/Akt et MAPK (Banks et al., 2012; Mirshamsi et al., 2004; Niswender et al., 2003). Tout comme l'expression des différents isoformes de l'IR, plusieurs études ont également observé l'expression de plusieurs isoformes des IRS dans le SNC (Taniguchi et al., 2006). Cette diversité d'expression des isoformes de l'IR et de ses substrats reflète une richesse du spectre d'action de l'insuline au sein du SNC (**figure 8**). Toutefois, l'action de l'insuline sur ses récepteurs cérébraux requiert soit 1) son transport de la périphérie vers le cerveau soit 2) sa synthèse *in situ* au sein de celui-ci.

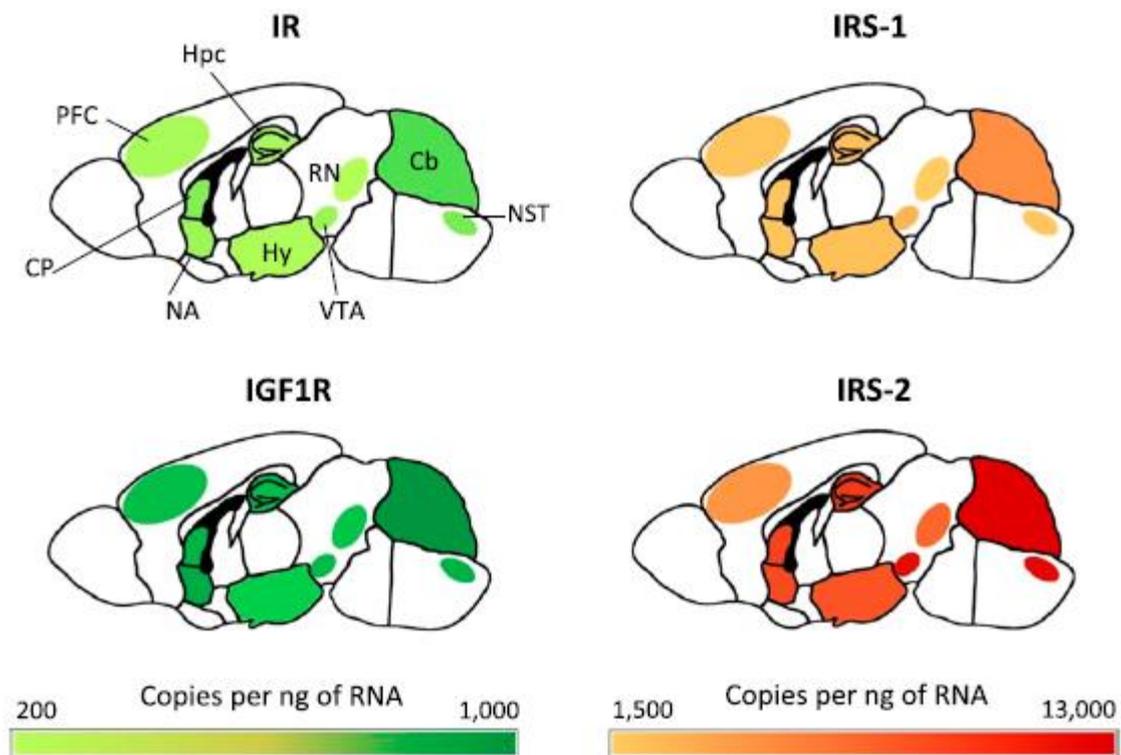


Figure 8: Distribution de IR, IGF-1R, IRS-1 et IRS-2 dans le cerveau.

D'après Kleinridders et al., 2014.

6.2 Transport de l'insuline au travers de la barrière hémato-encéphalique

En 1967, Margolis et Alszuler mettent en évidence la présence d'insuline dans le liquide céphalorachidien (LCR) de chien, suggérant que l'insuline puisse traverser la BHE (Margolis and Alszuler, 1967). D'autres études suggèrent également un passage de la BHE notamment suite à l'observation de la fixation de l'insuline au niveau des capillaires sanguins cérébraux *in vivo* chez l'animal (Frank et al., 1985; van Houten and Posner, 1979) et sur des tissus *post mortem* chez l'Humain (Pardridge et al., 1985). Plusieurs études indiqueront par la suite que le passage de l'insuline au travers de la BHE est permis au moyen d'un transporteur saturable

(Baura et al., 1993; Hachiya et al., 1988; King and Johnson, 1985; Schwartz et al., 1990). L'injection d'insuline radiomarquée par voie intraveineuse, permet d'observer la présence de l'insuline dans plusieurs structures cérébrales. Toutefois c'est au niveau de l'hypothalamus qu'on retrouve les taux les plus élevés (Banks and Kastin, 1998) mettant en évidence des différences d'absorption et de dégradation de l'insuline en fonction des aires cérébrales (Banks et al., 1999). Le passage de l'insuline au travers de la BHE peut être modulé par différents facteurs. Ainsi, l'influx d'insuline est plus important en période de développement, lors d'un jeûne prolongé et au cours d'un état inflammatoire (Cashion et al., 1996; Frank et al., 1985; Xaio et al., 2001).

Cependant, la nature du transporteur de l'insuline au sein de la BHE reste controversée. Les premières données de la littérature suggèrent que l'insuline traverse les cellules endothéliales de la BHE au moyen de son propre récepteur. En effet, des études *in vitro* ont mis en évidence que le transport de l'insuline à travers la BHE était spécifiquement inhibé par S961, un inhibiteur de l'IR (Meijer et al., 2016). D'autre part, une étude rapporte que le transport de l'insuline au travers de la BHE résulte de la transcytose de l'IR au moyen de radeaux lipidiques (Gray et al., 2017). En impliquant le rôle du récepteur à l'insuline dans ce transport, une étude met en évidence une diminution du transport de l'insuline vers le cerveau lors de la délétion génétique du récepteur à l'insuline spécifiquement dans les astrocytes (García-Cáceres et al., 2016), suggérant que ces cellules gliales jouent un rôle essentiel dans ce transport. Toutefois, il a été démontré *in vitro* que malgré l'inhibition de l'IR par S961, l'insuline était toujours capable de traverser les cellules endothéliales des capillaires cérébraux (Hersom et al., 2018). De plus, le même résultat a également été observé *in vivo* en combinant l'inhibition pharmacologique de l'IR et son invalidation génétique dans les cellules endothéliales (Rhea et al., 2018). Dans le même sens, une étude rapporte que le transport de l'insuline au travers de l'endothélium est également indépendant de l'IR dans un autre tissu (Williams et al., 2018). Par conséquent, il est clairement établi que l'insuline puisse traverser la BHE pour atteindre le cerveau. Toutefois, la nature de son (ou de ces) transporteur(s) n'est pas précisément défini à l'heure actuelle.

6.3 Injection intranasale d'insuline

Bien que n'existant pas à l'état physiologique, l'administration intranasale d'insuline est une technique intéressante que nous avons largement utilisée au cours de ce projet de thèse.

L'injection intranasale d'insuline (INI) est une méthode rapide et non invasive permettant l'administration d'insuline au niveau central. Cette technique permet notamment de contourner le passage de la BHE mais surtout d'étudier l'action de l'insuline uniquement au niveau cérébral sans altérer l'homéostasie glucidique périphérique. En effet, contrairement à une injection périphérique, l'INI n'entraîne pas d'hypoglycémie (Benedict et al., 2007; Schmid et al., 2018). L'insuline administrée par voie intranasale pénètre rapidement dans le cerveau où elle est transportée via son propre récepteur (IR) au travers de l'épithélium nasal (Rhea et al., 2017) et on estime qu'au même titre que l'injection intraveineuse, seul 0,05%/g de cerveau d'insuline injecté est retrouvée dans le cerveau par cette voie d'administration (Salameh et al., 2015). L'administration intranasale permet à l'insuline d'atteindre de multiples régions cérébrales bien que le bulbe olfactif soit celle qui en présente les plus hauts taux (Rhea et al., 2017). Toutefois, la distribution dans le cerveau de l'insuline administrée par voie intranasale diffère légèrement d'une administration intrapéritonéale ou intraveineuse (Rhea et al., 2019; **figure 9**). D'un point de vue mécanistique, l'insuline peut être transporté au travers de l'épithélium de la cavité nasale via l'IR pour ensuite atteindre les régions frontales dont notamment le bulbe olfactif et le cortex préfrontal (Dhuria et al., 2010; Rhea et al., 2017). L'insuline peut également être acheminée au moyen d'un transport axonal par le nerf trijumeau qui lui permet d'atteindre préférentiellement les régions du mésencéphale et du tronc cérébral (Dhuria et al., 2010; Fan et al., 2019). De cette manière, certaines études mettent en évidence que ces régions du tronc cérébral sont des cibles majeures de l'INI.

Enfin, l'utilisation de l'injection intranasale d'insuline chez l'Humain fait de cette méthode une technique à fort potentiel translationnel. A ce titre, l'INI représente une méthode de choix au cours des études précliniques pour étudier l'action de l'insuline au niveau du SNC.

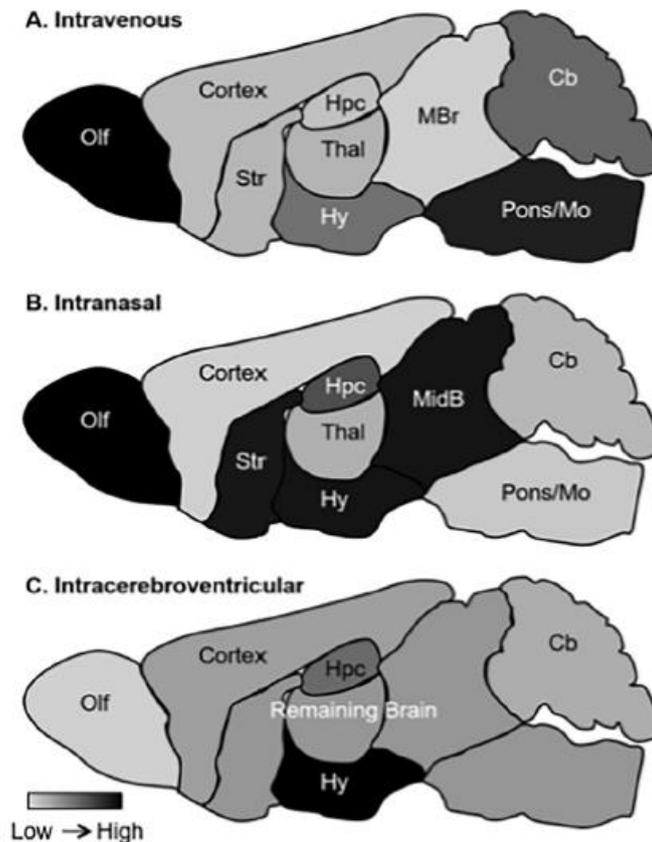


Figure 9: Distribution de l'insuline en fonction de différentes voies d'administration.

D'après Rhea et al., 2019.

6.4 Synthèse d'insuline *in situ* dans le SNC

Historiquement, les cellules β du pancréas sont le lieu unique de production de l'insuline. Toutefois, il existe plusieurs indices pouvant suggérer que la synthèse de l'insuline pourrait également avoir lieu dans le cerveau. Tout d'abord, on observe que seulement 0.05%/g de cerveau d'un bolus intraveineux radiomarqué d'insuline est retrouvé dans le cerveau (Banks et al., 1997). Or plusieurs études rapportent la présence d'insuline dans le cerveau dont les taux sont 10 à 100 fois plus élevés qu'en périphérie (Havrankova et al., 1979; Oomura and Kita, 1981). Bien que cela puisse résulter d'une haute affinité du transporteur de l'insuline et d'un important volume de transport au travers de la BHE, ces données suggèrent d'une part que l'insuline joue un rôle essentiel au niveau central mais qu'elle pourrait aussi y être synthétisée.

La phylogénie et l'évolution du système insulinergique sont d'autres indices probants en faveur d'une production cérébrale *in situ* d'insuline. Tout d'abord, il est intéressant ici de rappeler que plusieurs organismes vivants chez lesquels l'insuline régule des processus cruciaux n'ont pas de pancréas (Budd and Pansky, 1987). Nous pouvons dès lors émettre l'hypothèse qu'au cours de l'évolution, les animaux ayant développé un pancréas ont tout de même conservé le ou les organe(s) qui ancestralement synthétisai(en)t l'insuline et qu'il(s) jouerai(en)t toujours ce rôle dans des conditions particulières.

En accord avec l'hypothèse d'une synthèse centrale, les taux d'insuline restent stables dans le cerveau dans un modèle murin de diabète de type 1 induit par streptozotocine (STZ) détruisant les cellules β du pancréas (Havrankova et al., 1979). Oomura et Kita font la même observation en rapportant que les taux d'insuline centraux ne sont pas affectés par des modulations de l'insulinémie périphérique (Oomura and Kita, 1981). Appuyant l'idée d'une synthèse centrale, l'ARNm de l'insuline et de la préproinsuline sont détectés par hybridation *in situ* et par immunohistochimie dans des neurones adultes et en cours de développement ainsi que dans des cellules neuronales progénitrices (Devaskar et al., 1994; Dorn et al., 1983; Kuwabara et al., 2011; Young, 1986). De manière intéressante, seul l'ARNm du gène *Ins2* est retrouvé dans le système nerveux central de la souris (Mehran et al., 2012). Dans un contexte physiopathologique de DT2, une étude rapporte une augmentation de l'ARNm de l'insuline dans des neurones hippocampiques (Dutheil et al., 2016). On retrouve ce même phénomène compensatoire en périphérie chez des patients atteints de DT2 et dans des modèles animaux lors de la première phase de la maladie (DeFronzo, 1997; Withers et al., 1998). D'autre part, Clarke et ses collaborateurs observent qu'en réponse à un stimulus, les neurones hippocampiques en culture se dépolarisent et sécrètent de l'insuline (Clarke et al., 1986). Par ailleurs, une étude fonctionnelle récente a mis en évidence que l'insuline est libérée par les cellules GABAergique corticales neurogliaformes et par les cellules épithéliales du bulbe olfactif (Lacroix et al., 2008; Molnár et al., 2014). Enfin, la production d'insuline a également été observée au sein du plexus choroïde, sous régulation sérotoninergique (Mazucanti et al., 2019). L'ensemble de ces données indique que la synthèse d'insuline *in situ* dans le cerveau est fortement probable.

La découverte de l'IR dans le cerveau et du passage de l'insuline à travers la BHE engendra un engouement qui visa dans un premier temps à explorer l'action de l'insuline dans le cerveau en relation avec la régulation du métabolisme énergétique puis de s'intéresser plus tard à ses effets non-métaboliques.

6.5 Fonctions centrales dans le métabolisme énergétique et l'homéostasie glucidique

Le rôle de l'insuline sur le cerveau a été historiquement découvert au travers de son implication dans le métabolisme énergétique et l'homéostasie glucidique. Ainsi, l'infusion d'insuline par voie intracérébroventriculaire (icv) réduit la prise alimentaire et le poids corporel, et inhibe la production hépatique de glucose (Brief and Davis, 1984; Florant et al., 1991; Obici et al., 2002; Porte and Woods, 1981; Woods et al., 1979).

L'utilisation d'outils d'inactivation génétique sélectif de l'IR a permis de mieux comprendre le rôle de l'insuline dans le SNC. De cette manière, on observe que la délétion de l'IR neuronal induit une prise de poids chez les souris femelles NIRKO (Neuronal Insulin Receptor Knock-Out). De plus, cette délétion confère également une susceptibilité au développement de l'obésité, accompagnée d'altérations métaboliques dont une insulino-résistance moyenne et une insulinémie élevée (Brüning et al., 2000). Ces résultats soulignent le rôle crucial de l'IR neuronal sur la régulation du métabolisme énergétique. L'IR astrocytaire n'est pas d'une moindre importance dans cette régulation puisque son inactivation induit une intolérance au glucose chez les souris GIRKO (Glial Insulin Receptor Knock-Out) (Cai et al., 2018).

6.5.1 Modulation de populations neuronales hypothalamiques

En raison de son rôle majeur dans la régulation du métabolisme énergétique, le rôle de l'insuline dans le cerveau s'est largement porté sur l'hypothalamus (Coll and Yeo, 2013). Comme nous l'avons vu précédemment, l'IR est exprimé de manière quasi-ubiquitaire dans le cerveau. Toutefois, l'hypothalamus fait partie des régions enrichies en ce récepteur, suggérant le rôle primordial de l'insuline au sein de cette structure (Corp et al., 1986). Ainsi, l'INI chez des patients sains améliore la sensibilité à l'insuline du corps entier tout en favorisant la perte de poids et une inhibition de la prise alimentaire via l'activation de neurones hypothalamiques (Hallschmid et al., 2004; Heni et al., 2014; Jauch-Chara et al., 2012). L'INI induit également la suppression de la production hépatique de glucose et augmente la seconde phase de sécrétion d'insuline (Dash et al., 2015; Heni et al., 2020). Chez l'animal, l'administration intra-

hypothalamique d'insuline permet de reproduire les effets anorexigènes observés lors d'infusion icv (Benoit et al., 2002; McGowan et al., 1993) alors même que cet effet est reversé par l'injection d'anticorps anti-insuline dans cette même structure (Strubbe and Mein, 1977).

Il existe dans l'hypothalamus plusieurs populations neuronales régulant le métabolisme énergétique, dont deux majeurs exprimant l'IR dans presque toutes leurs cellules: les neurones POMC (*Proopiomélanocortine*) et les neurones AgRP/NPY (*Agouti Related Protein/Neuropeptide Y*). Concernant les neurones POMC, la fixation de l'insuline sur son récepteur induit l'activation de la voie PI3K ce qui a pour conséquence l'activation de canaux TRPC-5 (Transient Receptor Potential Canonical-5) dépolarisant (Qiu et al., 2014). D'un point de vue fonctionnel, l'activation des neurones POMC par l'insuline a pour conséquence un effet anorexigène (Benoit et al., 2002; Qiu et al., 2014). Toutefois, certains neurones POMC sont inhibés par l'insuline au travers de l'activation de canaux potassium sensibles à l'ATP (K_{ATP}), aboutissant à leur hyperpolarisation (Williams et al., 2010). Ces résultats confirment l'existence de sous-populations neuronales POMC dont la réponse à l'insuline peut varier (Dodd et al., 2018). Par ailleurs, la présence ou non d'ion Zn^{2+} dans la formulation d'insuline ou encore les concentrations de glucose utilisées peuvent également être des biais expérimentaux expliquant la diversité des réponses à l'insuline (Cotero and Routh, 2009; Qiu et al., 2014).

Les neurones orexigènes AgRP/NPY co-expriment deux peptides orexigènes qui sont AgRP et NPY. La fixation de l'insuline sur l'IR exprimé par ces neurones entraîne l'ouverture de canaux K_{ATP} . S'en suit une hyperpolarisation de la cellule et *in fine*, l'inhibition du neurone AgRP/NPY (Könner et al., 2007). C'est également au travers de l'ouverture des K_{ATP} sur les neurones AgRP/NPY que l'insuline induit la suppression de la production hépatique du glucose au niveau central (Könner et al., 2007; Pocai et al., 2005).

Au regard de la littérature, l'insuline semble moduler le métabolisme énergétique au niveau central au travers de deux populations neuronales hypothalamiques majeurs qu'elle régule par deux mécanismes impliquant soit des canaux K_{ATP} ou bien des canaux TRPC-5 (**figure 10**).

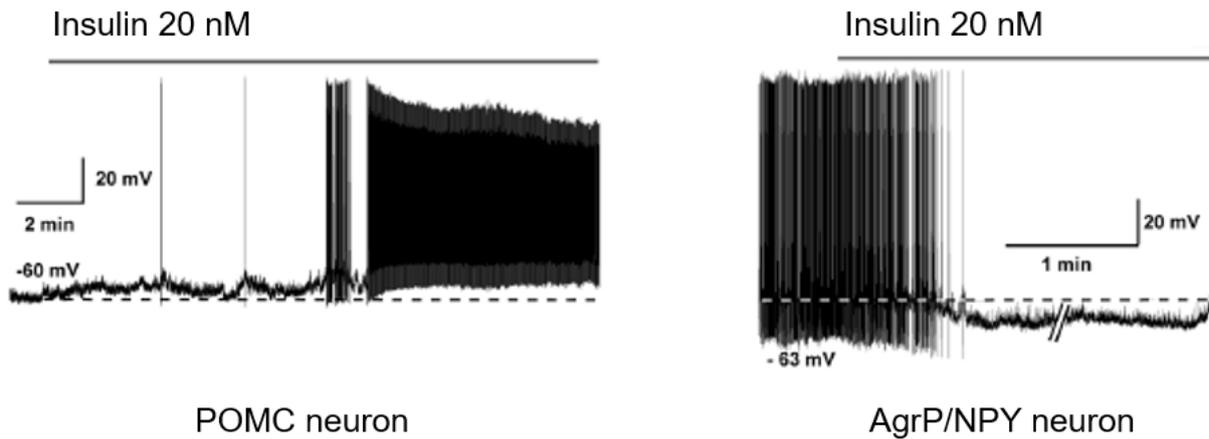


Figure 10: Modulation de l'activité de populations neuronales hypothalamiques par l'insuline.

D'après Qiu et al., 2014.

6.5.2 Modulation du système de récompense

L'action de l'insuline centrale a également été mise en évidence dans d'autres structures et systèmes impliqués dans la régulation du métabolisme énergétique et de l'homéostasie glucidique. Il s'agit notamment des systèmes et circuits neuronaux impliqués dans le comportement alimentaire qui est intimement lié au système de la récompense et de la motivation (Figlewicz and Sipols, 2010). Le système de la récompense et de la motivation implique plusieurs structures cérébrales dont notamment les noyaux dopaminergiques de l'aire tegmentale ventrale (ATV) et de la substance noire (SN), le striatum et plusieurs régions corticales (Studer and Knecht, 2016). Ce système est constitué de circuits neuronaux qui forment les voies dopaminergique mésocorticolimbique et nigrostriée (Levy, 2012).

Plusieurs études rapportent que l'insuline peut moduler la voie dopaminergique mésocorticolimbique et par conséquent les comportements qui y sont associés. Tout d'abord, l'IR est exprimé dans plusieurs structures du système de la récompense comme le striatum, l'ATV, la SN ou encore le cortex préfrontal (Figlewicz et al., 2003; Havrankova et al., 1978). La délétion du récepteur à l'insuline dans les neurones dopaminergiques de la SN et de l'ATV se traduit par l'augmentation de la prise alimentaire et de la masse grasseuse (Könner et al.,

2007). Chez l'humain, l'injection intranasale d'insuline module la voie dopaminergique mésolimbique et modifie l'appétence à un stimulus palatable (Edwin Thanarajah et al., 2019; Kullmann et al., 2013; Tiedemann et al., 2017). De plus, les neurones dopaminergiques de la SN et de l'ATV sont sensibles à l'insuline comme le rapportent des expériences électrophysiologiques *ex-vivo*, où l'on observe une augmentation de la fréquence de décharge de ces neurones en réponse à l'insuline (Könner et al., 2007). En ce sens, la perfusion d'insuline sur des tranches de NAc induit une augmentation de la libération de dopamine via le recrutement des interneurones cholinergiques (Stouffer et al., 2015). En accord avec l'étude de Stouffer et al., la délétion de l'IR dans les neurones ou dans les astrocytes a pour conséquence une diminution des taux de dopamine dans le NAc (Cai et al., 2018; Kleinriders et al., 2015).

Toutefois, on observe une diminution des taux de dopamine dans le NAc en réponse à l'injection d'insuline intra-ATV (Naef et al., 2019). Ce résultat pourrait s'expliquer par une recapture plus importante de la DA comme le suggère l'augmentation de la synthèse de l'ARNm du transporteur de la dopamine suite à l'administration icv d'insuline (Figlewicz et al., 1998). De plus, cette observation est soutenue par le fait que l'insuline diminue les taux de dopamine somatodendritique en augmentant sa recapture dans l'ATV lors d'expérience *ex-vivo* (Mebel et al., 2012). Enfin, l'insuline diminue les courants post-synaptiques excitateurs perçus par les neurones dopaminergiques de l'ATV et induit une plasticité de dépression à long terme dans ces neurones (Labouèbe et al., 2013).

Bien que contradictoire, ces résultats sont très intéressants et pourraient être unifiés en suggérant que l'insuline peut réguler de manière différentielle la libération de dopamine somatodendritique mais également sa libération au niveau synaptique. Ce qui est tout à fait possible, car comme nous l'avons vu précédemment, l'IR est exprimé sur le soma des neurones mais également à la synapse (Abbott et al., 1999; Chiu et al., 2008).

Collectivement, ces données mettent en évidence que l'insuline module les voies dopaminergiques nigrostriée et mésocorticolimbique du système de la récompense. D'un point de vue fonctionnel, ces modulations du système de récompense permettent la modulation de la palatabilité des aliments et de la récompense qui y est associée. De cette manière, l'action de l'insuline sur le système de récompense est un mécanisme complémentaire de la régulation de l'homéostasie énergétique au niveau central.

6.6 Fonctions dans la croissance, le développement et la plasticité

L'insuline existe dans une large variété d'organismes invertébrés et vertébrés appartenant au groupe des métazoaires sous forme de peptide similaire à l'insuline appelé « insulin-like peptide ». La superfamille de l'insuline inclut également des facteurs de croissance appariés à l'insuline (Insulin-like Growth Factor ; IGF-1 et IGF-2). La composition en acides aminés des domaines A et B de ces peptides partage une homologie de 50% chez l'Homme (Rinderknecht and Humbel, 1978). Cette homologie de séquence souligne la forte probabilité que ces peptides aient dérivé d'un même ancêtre commun (**figure 11**). De plus, les voies de signalisation ainsi que la structure des récepteurs IR, IGF-1R et IGF-2R présentent de forte homologies (Ebina et al., 1985; Ullrich et al., 1986). De manière générale, chez les vertébrés, l'insuline a pour rôle la régulation du métabolisme et de l'homéostasie glucidique tandis que les IGFs sont impliqués dans la régulation de la croissance des tissus pendant le développement. Ils sont donc pourvus d'une fonction mitogénique. Chez les organismes invertébrés, les peptides insulin-like comme la bombyxine, ont tous une structure appariée à l'insuline, suggérant qu'il n'existe pas de peptides appariés aux IGF. Cette hypothèse est soutenue par le fait que chez ces organismes, les peptides insulin-like ont tous la fonction de facteur de croissance. Ils jouent notamment un rôle crucial dans le vieillissement et la reproduction (Kenyon et al., 1993). Ainsi, au cours de l'évolution chez les vertébrés, la famille des peptides insulin-like a laissé place à un peptide dévoué à une fonction métabolique tandis que les IGF ont continué de perpétuer le rôle de facteur de croissance ancestral de l'insuline.

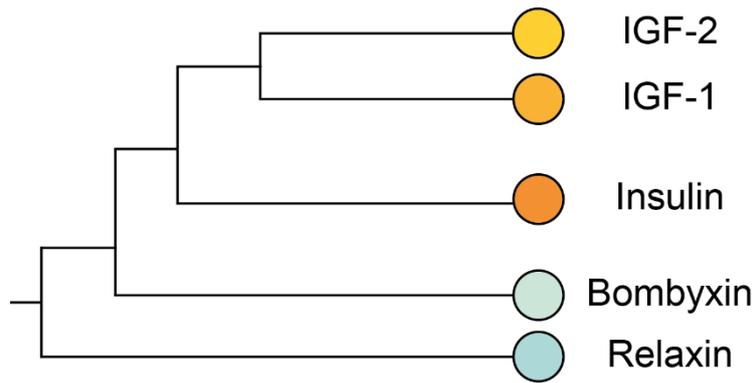


Figure 11: Evolution phylogénétique de l'insuline.

Adapté de Jin Chan and Steiner, 2000.

Cependant, la ségrégation métabolisme/facteur de croissance ne semble toutefois pas si évidente au niveau du système nerveux central. En effet, comme nous l'avons vu précédemment, l'immense majorité des neurones absorbent le glucose par des mécanismes indépendants de l'insuline. Par conséquent, l'action de l'insuline neuronale pourrait être similaire à sa fonction ancestrale et jouer un rôle dans la croissance et le développement au sein du SNC. Cette idée est confirmée par la délétion génétique de l'IR neuronal qui a pour conséquence une diminution de la spermatogénèse et de la folliculogénèse ovarienne (Brüning et al., 2000). Toutefois, de manière surprenante la délétion de l'IR neuronal n'induit pas d'altérations de développement du cerveau et n'impacte pas la survie neuronale chez les souris NIRKO au cours du développement (Brüning et al., 2000).

Au niveau des circuits neuronaux, l'insuline favorise la maturation et le développement des synapses silencieuses des neurones néocorticaux du rat en les rendant fonctionnelles (Plitzko et al., 2001). Ce rôle développemental est également retrouvé chez le Xenope, où la voie de signalisation de l'IR est nécessaire à la formation des circuits optiques neuronaux (Chiu et al., 2008). L'insuline est aussi impliquée dans des rôles de survie neuronale et de neuroprotection. De cette manière, la signalisation de l'IR permet la survie de neurones hippocampiques de rat dans un milieu de culture déprivé en glucose et en oxygène (Mielke and Wang, 2005). De plus, l'insuline protège les neurones corticaux de l'excitotoxicité glutamatergique et les cellules rétinienne embryonnaires de l'apoptose (Krasil'nikova et al., 2019; Valenciano et al., 2006).

D'autre part, l'insuline est capable d'action de neuroplasticité comme l'induction d'un type de dépression synaptique à long terme spécifique, différent de celui observé par un protocole de stimulation électrique. Un tel mécanisme a été décrit dans plusieurs études au travers de l'endocytose des récepteurs AMPA glutamatergique (Beattie et al., 2000; Huang et al., 2003; Man et al., 2000; Zhou et al., 2001). De plus, l'insuline inhibe également les potentiels post-synaptiques excitateurs dans plusieurs structures cérébrales dont notamment le NAc et l'hippocampe (Fetterly et al., 2021; Zhao et al., 2019). La transmission inhibitrice est également la cible de l'action de l'insuline puisque celle-ci permet le recrutement des récepteurs GABA_A post-synaptiques et la potentialisation des potentiels post-synaptiques inhibiteurs qui y sont associés (Hammoud et al., 2021; Ma et al., 2003; Vetiska et al., 2007; Wan et al., 1997). Par conséquent, l'insuline peut moduler à la fois la plasticité synaptique des neurotransmissions excitatrices et inhibitrices dans différentes structures cérébrales (Lo and Erzurumlu, 2018).

Par ailleurs, plusieurs des cibles des sous effecteurs de la voie de signalisation de l'IR comme la voie PI3K/Akt/mTOR et la voie Ras/MAPK sont impliquées dans les processus de structuration dendritique ou de maintien de fonction des synapses excitatrices (Agostinone et al., 2018; Ferrario and Reagan, 2018). En outre, l'insuline est impliquée dans la neurogénèse adulte hippocampique, notamment via l'activation de la voie Akt/GSK-3 β , qui est essentielle à ce processus (Eom and Jope, 2009a). De la même façon, l'insuline joue un rôle crucial dans le renouvellement des cellules souches neuronales (Ziegler et al., 2012). Elle permet également la croissance des épines dendritiques qui sont impliquées dans le développement, la fonction et la plasticité de la synapse (Abbott et al., 1999; Choi et al., 2005). Enfin, l'insuline favorise également la synthèse de PSD-95 qui est une protéine essentielle au fonctionnement de la machinerie synaptique (Lee et al., 2005).

A la lumière de ces données, le rôle de l'insuline au niveau cérébral ne se limite donc pas à une fonction métabolique. L'action de l'insuline au niveau central vise divers processus essentiels et fondamentaux dont la croissance, le développement, la maturation, la neurogénèse et la plasticité synaptique des réseaux neuronaux.

L'intégration de tous ces processus au niveau du SNC suggère que l'insuline pourrait participer à des fonctions cérébrales complexes et élaborées en dehors du champ métabolique. C'est notamment le cas de la cognition et du comportement émotionnel qui impliquent des processus de neuroplasticité intenses. Dès lors, nous pouvons nous questionner sur le rôle que pourrait jouer l'insuline dans ces fonctions particulières.

6.7 Action de l'insuline sur le comportement émotionnel

Depuis quelques années, l'implication potentielle de la résistance centrale à l'insuline dans la maladie d'Alzheimer (diabète de type 3) a donné lieu à un grand nombre de travaux explorant les propriétés pro-cognitive de l'insuline. De cette manière, des études rapportent que l'INI améliore la mémoire ou les capacités cognitives exécutives chez des patients sains, mais aussi chez des patients en déclin cognitif (Benedict et al., 2007; Claxton et al., 2015; Ritze et al., 2018). Les études sur le rongeur ont également reproduit les effets pro-cognitifs observés en recherche clinique comme le montre l'amélioration de la mémoire des animaux dans plusieurs tests cognitifs en réponse à l'INI (Maimaiti et al., 2016; Marks et al., 2009; Sukhov et al., 2020).

En ce qui concerne le comportement émotionnel, les études chez l'Humain mettent en évidence que l'INI induit une diminution de la réponse de stress de l'axe HPA, une amélioration du sentiment de bien-être et la potentialisation de l'extinction de la peur lors de psychothérapies (Benedict, 2004; Bohringer et al., 2008; Ferreira de Sá et al., 2020). De manière intéressante, plusieurs auteurs rapportent également des propriétés de type anxiolytique consécutives à l'INI chez le rongeur (Beirami et al., 2017; Marks et al., 2009). D'autre part, l'injection icv d'insuline produit une réponse de type antidépresseur robuste. Toutefois, il n'est pas à exclure que ces effets soient partiellement médiés par le récepteur de IGF-1 (Mueller et al., 2018). Plusieurs données de la littérature suggèrent que ces divers effets comportementaux pourraient être la conséquence de modifications mitochondriales, de phosphorylations de canaux potassiques ou encore de changements morphologiques dendritiques associés à des réarrangements synaptiques (Kim et al., 2019; Maimaiti et al., 2016; Marks et al., 2009; Torabi et al., 2021).

Collectivement, ces données suggèrent fortement que l'action centrale de l'insuline est capable de moduler les dimensions cognitives et émotionnelles du comportement. Par conséquent, la diminution du signal de l'insuline en condition pathologique soulève de nombreuses questions quant à l'altération possible de ces fonctions. Dès lors, pouvons-nous envisager que la résistance à l'insuline cérébrale peut induire des troubles cognitifs et émotionnels ?

7. Résistance à l'insuline

7.1 La résistance à l'insuline

La résistance à l'insuline (ou insulino-résistance) est une caractéristique majeure de la physiopathologie du DT2. Sur le plan physiologique la résistance à l'insuline se traduit par une diminution significative de la capacité de l'insuline à diminuer la glycémie. Elle peut être définie par **une diminution de l'efficacité de l'action de l'insuline à induire l'activation de sa voie de signalisation au travers de son récepteur**. De cette manière, pour atteindre une activation similaire à celle obtenue en condition physiologique, des concentrations plus importantes d'insuline seront nécessaire en condition d'insulino-résistance. Par conséquent, l'insulino-résistance entraîne une diminution de l'activation de la voie de signalisation PI3K/Akt (Cusi et al., 2000; Krook et al., 2000). Chez les individus souffrant de DT2, l'insulino-résistance est le premier marqueur biologique détectable (DeFronzo and Tripathy, 2009; Martin et al., 1992). On l'observe dans différents tissus comme le foie et le muscle, le tissu adipeux, le rein, le tractus gastro-intestinal ou encore le système vasculaire (Federico et al., 2006; Nizar et al.; Perry et al., 2014; Vaag et al., 1992; Yang et al., 2016b). Au cours du développement du DT2, la résistance à l'insuline induit une cascade d'évènements biologiques. On observe dans un premier temps une augmentation de la sécrétion d'insuline dans le but de compenser l'insulino-résistance. Toutefois, au cours du temps, l'épuisement des cellules β entraîne une insuffisance de sécrétion d'insuline. Ce défaut de sécrétion provoque une hyperglycémie consécutive à la diminution de l'absorption du glucose par les cellules des muscles striés et des adipocytes, également associé à un défaut d'inhibition de la production hépatique de glucose (DeFronzo, 1997). Des études *post-mortem* chez des patients atteints de DT2 mettent en évidence une diminution de 30 à 40% de la masse des cellules β (Klöppel et al., 1985; Rahier et al., 2008). En outre, au cours du DT2 la sensibilité de détection du glucose de la cellule β est amoindrie, diminuant la libération d'insuline et augmentant donc l'hyperglycémie et l'insulino-résistance (Ferrannini et al., 2011). L'insuffisance des cellules β à produire de l'insuline est consécutive à plusieurs facteurs: le vieillissement (Muller et al., 1996), des anomalies génétiques (Morris et al., 2012), des résistances ou déficiences aux hormones incrélines (Madsbad, 2014), un important stress oxydant (Tangvarasittichai, 2015) ou encore la présence d'un état inflammatoire (Romeo et al., 2012).

7.2 Mécanismes moléculaires de l'insulino-résistance

La mise en place de la résistance à l'insuline ainsi que son développement au cours du DT2 a été imputée à différents facteurs innés ou acquis. De manière générale, l'insulino-résistance résulte d'une part de l'accroissement de l'activité des modulateurs négatifs de la voie de signalisation de l'insuline et d'autre part de la diminution de l'efficacité des activateurs de cette même voie (**figure 12**).

7.2.1 Implications des éléments de la voie de signalisation du récepteur à l'insuline

La résistance à l'insuline peut être causée par des mutations génétiques qui diminuent l'efficacité de la transduction du signal de l'insuline à travers son récepteur. Il peut s'agir de mutation de l'IR diminuant son expression, son affinité pour l'insuline ou son activité tyrosine kinase (Haruta et al., 1995; Kahn et al., 1996; Taylor et al., 1991). Des polymorphismes de IRS-1 peuvent également en être la cause lorsqu'ils sont responsables d'une diminution de l'activation de la voie effectrice (Almind et al., 1996; Burguete-Garcia et al., 2010; Hribal et al., 2008; Martínez-Gómez et al., 2011). D'autre part, certaines mutations de protéines impliquées dans la voie de signalisation de l'IR ont également été associées à une insulino-résistance, c'est notamment le cas d'Akt et de PI3K (Baier et al., 1998; George et al., 2004; Tan et al., 2007).

Chez la souris, la délétion constitutive du récepteur à l'insuline (IR) n'est pas viable (Accili et al., 1996). En outre, la phosphorylation de résidus Ser/Thr par différentes kinases au niveau des domaines de l'IR peut également inhiber sa transphosphorylation et donc diminuer la transduction du signal intracellulaire (Coba et al., 2004). D'autre part, les souris hétérozygotes $-/+$ pour l'IR et pour IRS-1 développent une forte insulino-résistance et 40% d'entre elles un DT2 au bout de 4 à 6 mois. Les souris hétérozygotes $-/+$ pour uniquement IR ou IRS-1 ont de légères modifications de l'homéostasie glucidique sans incidence pathologique (Brüning et al., 1997). Beaucoup d'études ont exploré le rôle des résidus sérine dans l'activité de IRS-1 et ont démontré que leur phosphorylation induit une diminution de sensibilité à l'insuline (Aguirre et al., 2002; Qiao et al., 1999, 2002). L'altération d'autres éléments moléculaires de la voie de

signalisation de l'IR a été impliquée dans l'insulino-résistance bien que son rôle dans ce processus reste mineur (pour revue, voir Boucher et al., 2014).

7.2.2 Lipotoxicité

L'accumulation ectopique de lipide, en particulier d'acides gras, contribue par différents mécanismes au développement de la résistance à l'insuline. Le rôle de l'accumulation de ces lipides dans l'insulino-résistance se traduit notamment par l'augmentation des taux de diacylglycérol (DAG), qui active l'enzyme protéine kinase C (PKC) (Gassaway et al., 2018; Yu et al., 2002). Cette enzyme phosphoryle les résidus sérine des IRS, inhibant ainsi la voie de signalisation de l'IR (Ishizuka et al., 2004). De ce fait, la diminution des taux de DAG dans les muscles squelettiques et le foie protège de l'insulino-résistance induite par un régime obésogène chez la souris (Ahmadian et al., 2009; Liu et al., 2007; Samuel et al., 2010). On observe également chez les patients atteints de DT2 et dans les modèles animaux que l'accumulation de céramides sphingolipides est positivement corrélée au degré d'insulino-résistance (Boon et al., 2013; Haus et al., 2009). Les céramides participent à l'insulino-résistance en activant des kinases inhibitrices de la voie de signalisation de l'IR comme la PKC ou la kinase c-Jun N-terminal (JNK) (Schenk et al., 2008) mais aussi en inhibant l'activation de Akt (Powell et al., 2003; Teruel et al., 2001). La résistance à l'insuline peut notamment être améliorée chez l'animal par l'inhibition de la synthèse des céramides (Holland et al., 2007). Plus particulièrement, l'inhibition de la synthèse de céramide *de novo* dans le cerveau permet de restaurer la sensibilité à l'insuline de neurones hypothalamiques et la fonction de la cellule β chez l'animal (Campana et al., 2018). Enfin, on observe chez les patients DT2 une augmentation du ratio des acides gras saturés/non-saturés, ce qui a pour conséquence de réduire la fluidité membranaire, un paramètre altérant la sensibilité à l'insuline (Bakan et al., 2006; Field et al., 1990).

7.2.3 Inflammation

Plusieurs études ont mis en évidence que la présence de certains marqueurs inflammatoires était prédictifs de l'incidence du DT2 (Duncan et al., 2003; Pradhan et al., 2001). De plus, les données de la littérature indiquent que les patients atteints de DT2 présentent une inflammation chronique à bas bruit (Pitsavos et al., 2007). L'augmentation de la sécrétion de cytokine pro-inflammatoire par les cellules immunitaires et les adipocytes favorise l'insulino-résistance notamment à travers l'activation des Ser/Thr kinases par JNK ou IKK (I κ B kinase) (Hirosumi et al., 2002; Ozes et al., 2001; Yuan et al., 2001; Zhang et al., 2008) tout comme la diminution de l'expression de IRS-1 (Rotter et al., 2003). De manière intéressante, bloquer l'action de médiateurs inflammatoires permet, de manière modérée, d'améliorer la sensibilité à l'insuline (Huvers et al., 2007).

7.2.4 Régulation négative par l'hyperglycémie

Des études rapportent que le glucose en concentration supra-physiologique altère la sensibilité à l'insuline du muscle, du tissu adipeux et diminue la sécrétion d'insuline par la cellule β (Hager et al., 1991; Leahy et al., 1986). L'hyperglycémie provoque une résistance à l'insuline notamment par des mécanismes liés au stress oxydant (Evans et al., 2005). De plus, la glycosylation terminale de certaines protéines inhibe la signalisation de l'IR au travers de phosphorylations de sérines d'IRS-1 (Riboulet-Chavey et al., 2006). En outre, l'hyperglycémie favorise la formation de DAG (Xia et al., 1994), dont la conséquence est l'activation de la PKC inhibant également *in fine* l'activation de IRS-1 (Cassese et al., 2008; Miele et al., 2003).

7.2.5 Dysfonctionnement mitochondrial et stress oxydant

La formation d'espèces réactives de l'oxygène (Reactive Oxygen Species ; ROS) apparaît lors du processus de respiration et son accumulation est un élément majeur de dysfonctionnement de la chaîne respiratoire mitochondriale (Chang and Chuang, 2010). Les études cliniques rapportent des taux élevés de ROS chez des patients atteints de DT2 qui

peuvent être alternativement causés par une augmentation du flux de métabolite dans la mitochondrie, une altération des protéines mitochondriales ou encore une réduction de l'activité des enzymes antioxydants (Evans et al., 2005; Rösen et al., 2001; West, 2000). Comme c'est le cas pour d'autres facteurs pro-insulino-résistant, les ROS induisent l'activation de kinase qui vont phosphoryler les sérines inhibitrices de IRS-1, diminuant en conséquence le signal de transduction de l'IR (Dokken et al., 2008; Evans et al., 2005; Rudich et al., 1998). De plus, comme l'inflammation, l'hyperglycémie et la lipotoxicité, le stress oxydant va également provoquer une accumulation de DAG qui, en activant la PKC, va favoriser l'insulino-résistance (Koh et al., 2005; Zhang et al., 2008).

7.2.6 Stress du réticulum endoplasmique

La réponse de stress du réticulum endoplasmique est un processus adaptatif permettant la maturation et la bonne conformation structurale des protéines au travers de la réponse UPR (Unfolded Protein Response). On observe chez les patients atteints de résistance à l'insuline une forte activité de la réponse de stress endoplasmique pour compenser les taux importants de protéines malformées (Hotamisligil, 2010). De plus dans des modèles murins, on observe que cette suractivation engendre une insulino-résistance au travers de l'activation de JNK et IKK par le biais de phosphorylations de résidus sérine d'IRS-1 (Ozcan et al., 2004).

D'autres mécanismes participent également au processus de résistance à l'insuline. La surexpression et/ou suractivation de la phosphatase inhibitrice PTP1B reverse la phosphorylation des résidus tyrosine de l'IR et de cette manière diminue sa voie de signalisation pour favoriser l'insulino-résistance (Elchebly et al., 1999; Klaman et al., 2000; Koren and Fantus, 2007; Sun et al., 2007). A l'inverse, l'invalidation génétique de PTP1B (*PTP1B*^{-/-}) permet d'améliorer la sensibilité à l'insuline chez la souris où l'on observe notamment une augmentation du taux de phosphorylation de IRS-1 (Elchebly et al., 1999). Bien que sporadique, l'insulino-résistance peut être le résultat d'une accélération de la dégradation de l'insuline par des anticorps auto-immuns dirigés contre l'insuline (Kasuga et al., 1999; Schlessinger et al., 1980). Enfin, des mutations du transporteur du glucose GLUT4 peuvent également être la cause indirecte de résistance à l'insuline en favorisant l'hyperglycémie et les phénomènes pathologiques qui en découlent (Song et al., 2013; Wandel et al., 1995).

Les multiples mécanismes impliqués dans la résistance à l'insuline sont interdépendants, résultant de prédispositions et de vulnérabilités innées ou acquises, s'influençant réciproquement. En effet, le stress oxydant, par exemple, favorise l'inflammation et *vice versa*. La résistance à l'insuline est donc un phénomène complexe et multimodal sous-jacent à une myriade d'altérations physiologiques.

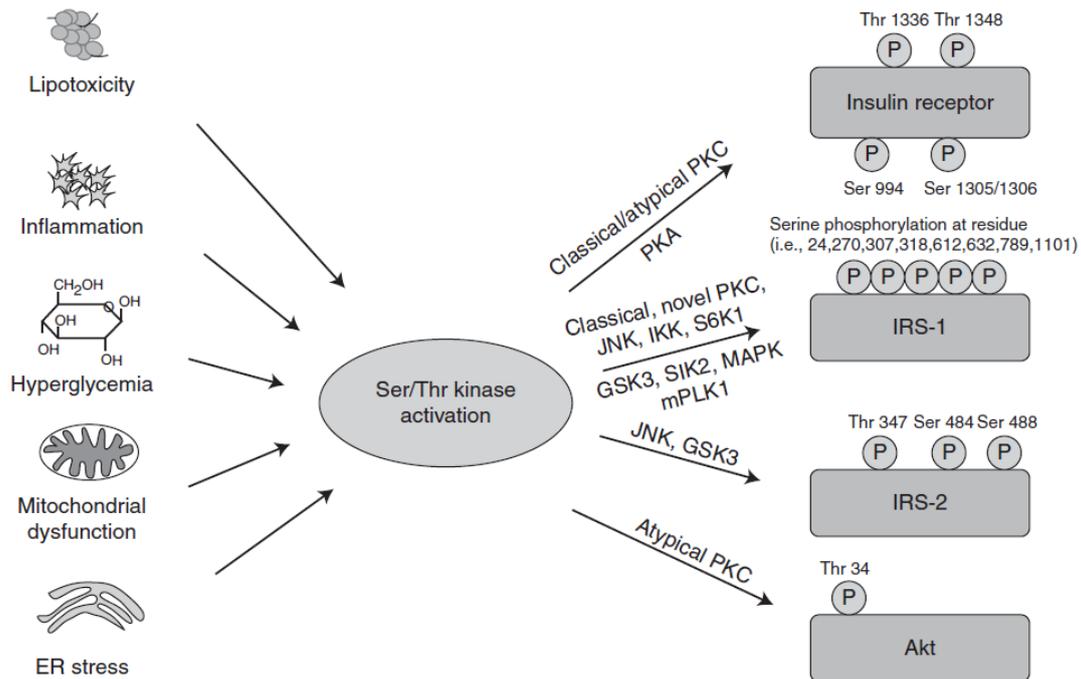


Figure 12: Mécanismes moléculaires impliqués dans la résistance à l'insuline.

D'après Boucher et al., 2014.

8. La résistance centrale à l'insuline dans le diabète de type 2

8.1 Insulino-résistance centrale chez l'humain

Très peu de preuves cliniques directes permettent d'établir clairement et objectivement la présence d'une résistance à l'insuline dans le cerveau de patients atteints de DT2. Ce manque d'évidences peut s'expliquer en partie par les difficultés techniques rencontrées pour étudier

l'action centrale de l'insuline chez l'Humain. Actuellement les techniques d'imageries cérébrales sont des méthodes de choix pour étudier *in vivo* la résistance à l'insuline dans le cerveau. C'est en utilisant l'INI couplée à de l'imagerie par résonance magnétique fonctionnelle (IRMf) que plusieurs études ont pu mettre en évidence une résistance à l'insuline centrale chez des patients obèses présentant une insulino-résistance périphérique. En effet, l'INI inhibe la production hépatique de glucose endogène chez des individus sains (Xiao et al., 2018) alors que ce n'est plus le cas chez des patients obèses insulino-résistant en périphérie (Dash et al., 2015). Les études animales montrent que l'hypothalamus est responsable de l'inhibition de la production hépatique de glucose endogène (Buettner and Camacho, 2008; Obici et al., 2002), suggérant que chez ces sujets, cette structure soit résistante à l'insuline. En accord avec ces résultats, une étude par IRMf a également mis en évidence que l'INI induit une inhibition de l'hypothalamus chez des sujets en surpoids qui est diminuée en comparaison à la réponse des sujets contrôles (Kullmann et al., 2015).

Néanmoins, d'autres études pointent l'absence de preuve d'une insulino-résistance centrale chez les sujets atteints de DT2. En effet, Zhang et ses collaborateurs observent une activation de la région de l'hippocampe chez des sujets DT2 en réponse à l'INI (Zhang et al., 2015a). Toutefois, l'absence d'un groupe contrôle de sujets sains dans cette étude ne permet pas d'apprécier d'éventuelles différences de réponses à l'INI entre ces deux populations. Enfin, au cours de tests évaluant la mémoire visiospatiale, on observe une amélioration des capacités cognitives associée à une vasodilatation en réponse à l'INI chez des sujets sains mais aussi chez des patients atteints de DT2 (Novak et al., 2014). Par ailleurs, plusieurs études cliniques ont comparé les différences structurelles et anatomiques ou encore la fonctionnalité et connectivité du cerveau à l'état basal entre des patients sains et des patients DT2 (Chen et al., 2014; Roy et al., 2020). Cependant, bien que des altérations significatives aient pu être mises en évidence chez les patients atteints de DT2, elles ne sont pas une preuve directe d'une résistance à l'insuline centrale. Elles sont au mieux une conséquence de l'insulino-résistance centrale, sinon le résultat de mécanismes pathologiques associés au diabète (inflammation, stress oxydant, etc...). En outre, ces techniques ne peuvent pas apprécier de manière précise des différences fines de sensibilité à l'insuline cérébrales, ce qui peut également expliquer la variabilité des résultats de certaines études, biaisant également leur interprétation. Par conséquent, les études cliniques ne permettent donc pas de conclure de manière claire sur la présence ou non d'une insulino-résistance centrale fonctionnelle chez les patients DT2.

Les études chez l'animal permettent de répondre à ces questions notamment au moyen de l'utilisation de techniques invasives. De manière générale, la méthode la plus directe permettant d'évaluer la résistance à l'insuline est de déterminer le taux de phosphorylation des différentes protéines de la voie de signalisation. Il peut s'agir de phosphorylations au niveau de résidus tyrosine qui activent la voie de signalisation ou bien la phosphorylation de résidus Ser/Thr qui eux inhibent la transduction du signal.

8.2 Modèles animaux du diabète de type 2

Cette méthode a permis d'évaluer la résistance à l'insuline centrale dans plusieurs modèles animaux de la pathologie du diabète de type 2 (pour revue, voir King, 2012; **tableau 3**). Ces modèles peuvent être induits par une obésité résultant d'un défaut de sécrétion de la leptine (ob/ob) ou par invalidation de son récepteur (souris db/db et rat ZDF fa/fa (Zucker Diabetic Fatty)). Ils peuvent également être le résultat d'une obésité résultant de mutations polygéniques (souris KK, souris NZO). Ces modèles d'obésité génétique induite sont intéressants car ils permettent de modéliser le développement de la pathologie du DT2, dont notamment une insulino-résistance périphérique. Une autre approche consiste en une intervention nutritionnelle permettant d'obtenir un phénotype pathologique du DT2 à l'aide d'une diète obésogène riche en gras et en sucres (High fat Diet ; HFD). Cette diète obésogène fournit en moyenne 40-60% de son énergie calorique via la matière grasse contre environ 10-15% pour les diètes standards. Le modèle de DT2 induit par HFD a été introduit chez la souris par Surwit et ses collaborateurs en 1988 (Surwit et al., 1988). Les souris nourries à un régime chronique HFD présentent des marqueurs biologiques caractéristiques du DT2 comme une obésité, une hyperinsulinémie et une altération de l'homéostasie glucidique associé à une insulino-résistance. Ce modèle est intéressant car il présente une analogie aux symptômes et à la physiopathologie du DT2. En effet, l'induction et les conséquences physiopathologiques de la diète obésogène sont proches de la trajectoire physiopathologique observée chez l'Humain. De plus, comme chez l'Humain, il existe une variabilité interindividuelle en réponse au HFD au sein d'une même lignée congénitale de souris (Burcelin et al., 2002).

Induction mechanism	Model	Main features
Obese models (monogenic)	Lep ^{ob/ob} mice	Obesity-induced hyperglycemia
	Lep ^{db/db} mice	
	ZDF rats	
Obese models (polygenic)	KK mice	Obesity-induced hyperglycemia
	OLETF rat	
	NZO mice	
	TallyHo/Jng mice	
	TNoncNZo10/LtJ mice	
Induced obesity	High fat feeding (mice or rats)	Obesity-induced hyperglycemia
	Desert gerbil	
	Nile grass rats	
Non-obese models	GK rats	Hyperglycemia induced by insufficient beta cel function/mass
Genetically induced models of beta cell dysfunction	hIAPP mice	Amyloid deposition in islets
	AKITA mice	Beta cell destruction due to ER stress

Tableaux 3: Modèles animaux du DT2.

D'après King, 2012.

8.3 Résistance centrale à l'insuline dans les modèles murins de diabète de type 2

La résistance centrale à l'insuline a été observée au cours de différentes études dans les modèles de DT2 (ob/ob, db/db, HFD) (Kim et al., 2011; Li et al., 2020; Liu et al., 2015). Cette résistance à l'insuline s'observe sur des homogénats de cerveaux entiers notamment à travers la diminution de la phosphorylation de résidus tyrosine du récepteur à l'insuline et de Akt en réponse à l'insuline (Kothari et al., 2017). Ces modifications sont également accompagnées d'une augmentation de la phosphorylation de résidus sérine inhibiteurs de IRS-1 (Kothari et al., 2017). Une autre étude rapporte également qu'une diète de type HFD induit une diminution de l'expression de IRS-1 cérébral qui est également associée à une diminution de l'activation de la voie de signalisation de l'IR dans des homogénats de cerveaux (Liu et al., 2015). La résistance à l'insuline centrale induite par la diète HFD est également observable au sein de structures cérébrales particulières comme le cortex cérébral, l'amygdale, l'hypothalamus ou encore l'hippocampe (Boghossian et al., 2009; Fu et al., 2020, 2017; Petrov et al., 2015; Wakabayashi et al., 2019). De manière intéressante, on retrouve dans ces modèles des marqueurs moléculaires associés à l'insulino-résistance comme un stress oxydant cérébral et une neuroinflammation (Fu et al., 2017; Kothari et al., 2017).

La résistance centrale à l'insuline dans les modèles animaux de DT2 peut également s'apprécier au travers de techniques fonctionnelles comme c'est le cas au travers d'une approche par électrophysiologie *ex-vivo*. En effet, Spanswick et ses collaborateurs rapportent que l'activation des canaux K_{ATP} en réponse à l'insuline de neurones hypothalamiques est abrogé chez les rats Zucker obèse (Spanswick et al., 2000). Plus particulièrement, une diète obésogène de type HFD prévient l'action de l'insuline sur les neurones POMC (Qiu et al., 2018), mais également sur les neurones AgRP/NPY (Qiu et al., 2020). De manière intéressante, la réponse à l'insuline des neurones AgRP/NPY n'est pas abrogé chez les femelles en raison du rôle insulino-protecteur que joue l'œstradiol sur ces neurones (Qiu et al., 2020). Par ailleurs, les neurones glucose-excitable de l'hypothalamus sont également sensibles à la résistance à l'insuline. En effet, chez les souris db/db, l'insuline ne prévient plus la diminution de fréquence de décharge de ces neurones en réponse à une hypoglycémie (0,1 mM) (Cotero et al., 2010). D'autre part, l'insulino-résistance centrale ne touche pas uniquement les populations neuronales hypothalamiques. Ainsi, une étude indique que chez les BTBR présentant une insulino-résistance

périphérique (Flowers et al., 2007), l'insuline n'est plus capable d'induire une dépression à long terme des neurones dopaminergiques de l'ATV (Labouèbe et al., 2013). De plus, le régime obséogène HFD induit une insulino-résistance des neurones MSN du NAc, chez lesquels de faible dose d'insuline ne permet plus la modulation de la plasticité glutamatergique (Fetterly et al., 2021). Enfin, en accord avec ces résultats, l'utilisation de la voltamétrie sur tranche de NAc met en évidence que le régime HFD abroge l'augmentation de la libération de dopamine en réponse à l'insuline dans cette structure.

L'ensemble de ces données met en évidence de manière claire que la modélisation du DT2 chez l'animal est associée à une résistance à l'insuline au niveau central pouvant toucher plusieurs structures et populations neuronales et suggère que le même phénomène pathologique serait présent chez les patients atteints de DT2. La diminution du signal de transduction de l'insuline causée par l'insulino-résistance au niveau central pourrait se traduire par des répercussions négatives sur le comportement émotionnel, dont nous avons vu précédemment qu'elle pouvait en moduler la fonction.

PARTIE 3:

RESISTANCE A L'INSULINE

ET

TROUBLES EMOTIONNELS

L'implication de la résistance à l'insuline dans les troubles émotionnels et cognitifs fait l'objet d'une recherche intensive. Il existe dans la littérature un nombre très important de données qui mettent en évidence que la résistance à l'insuline centrale et/ou périphérique est associée avec des altérations cognitives, en relation avec la maladie d'Alzheimer. Toutefois, nous nous attacherons ici à identifier uniquement les troubles du comportement émotionnel (comportement de pseudo-anxiété et pseudo-dépression) associé à l'insulino-résistance.

1. Résistance à l'insuline périphérique et troubles émotionnels

La littérature biomédicale est riche d'indices permettant de mettre en évidence la relation réciproque entre résistance à l'insuline et troubles émotionnels. Ces évidences proviennent à la fois de données cliniques et précliniques indiquant que la modulation du statut de sensibilité à l'insuline peut influencer le comportement émotionnel.

1.1 Troubles émotionnels associé à une insulino-résistance

Comme nous l'avons vu dans le chapitre 1, la résistance à l'insuline est significativement associée à la DM chez l'humain. De plus, la résistance à l'insuline est positivement corrélée à la sévérité des symptômes dépressifs. L'ensemble des données des études cliniques et épidémiologiques suggèrent que l'insulino-résistance puisse participer au développement des troubles de l'humeur. Cependant, l'absence de preuves mécanistiques ou causales ne permet pas d'affirmer ou d'infirmer cette hypothèse. Néanmoins, la littérature relative aux modèles animaux permet tout de même d'apporter de nouveaux éléments de réponses.

On observe la présence comorbide de symptômes de type pseudo-dépressifs et pseudo-anxieux dans de multiples modèles de DT2 (Dinel et al., 2011; Li et al., 2014; van de Vondervoort et al., 2019). Ces altérations du comportement émotionnel ont également été observées dans le modèle de DT2 induit par la diète obésogène HFD (André et al., 2014; Dutheil et al., 2016; Papazoglou et al., 2015; Sharma and Fulton, 2013; Zemdegs et al., 2016, 2019). En outre, la diète obésogène est un facteur aggravant puisqu'elle exacerbe les symptômes pseudo-dépressifs dans un modèle de dépression génétique et dans un modèle de stress chronique imprédictible modéré (Unpredictable Chronic Mild stress ; UCMS) (Abildgaard et

al., 2011; Yang et al., 2016a). Bien que la physiopathologie du diabète de type 1 soit différente, sa modélisation chez l'animal nous permet d'étudier une diminution voire un défaut d'activité de la voie de signalisation de l'IR. En effet, le modèle le plus commun consiste à l'injection de streptozotocine (STZ), un antibiotique, qui inhibe la sécrétion d'insuline en détruisant les cellule β . Plusieurs études utilisant ce modèle rapportent également la présence d'un phénotype de type pseudo-anxieux et pseudo-dépressif associé aux troubles métaboliques (Gupta et al., 2014; Huang et al., 2016; Miyata et al., 2004).

Il est intéressant de noter qu'une insulino-résistance périphérique peut également observée dans des modèles de UCMS, de défaite sociale ou encore de dépression induite par administration de dexaméthasone ou de corticostérone (Delanogare et al., 2020; van Donkelaar et al., 2014; Pan et al., 2013; Tsuneki et al., 2013). Il est toutefois difficile de déterminer si les troubles du comportement émotionnels sont les conséquences de la résistance à l'insuline ou l'inverse. Ce constat est d'autant plus vrai qu'il existe un lien bidirectionnel entre DM et DT2, puisque comme nous l'avons vu dans la partie 1, les patients atteints de DM ont une incidence plus élevée de DT2 (Vancampfort et al., 2015). En ce sens, une étude récente a mis en évidence l'implication d'un circuit neuronal impliquant les neurotransmissions sérotoninergiques et GABAergiques au sein de l'hypothalamus, sur lequel pourrait reposer cette réciprocity entre troubles métaboliques et troubles émotionnels (Xia et al., 2021).

1.2 Facteurs influençant la sensibilité à l'insuline et troubles émotionnels

Plusieurs facteurs influençant la sensibilité à l'insuline périphérique et centrale ont été incriminés dans la physiopathologie de la DM. Parmi eux se trouve l'adiponectine, qui est une hormone circulante sécrétée par les adipocytes. Elle possède des propriétés insulino-sensibilisante et est impliquée dans la physiopathologie du diabète de type 2 (Lihn et al., 2005; Trujillo and Scherer, 2005). Plusieurs études cliniques suggèrent que l'adiponectine pourrait également être impliquée dans la physiopathologie de la DM (Formolo et al., 2019; Lehto et al., 2010; Leo et al., 2006). En effet, on observe une corrélation entre la diminution des taux d'adiponectine et les symptômes dépressifs chez des patients souffrant de DM comorbide au diabète de type 1 et 2 (Herder et al., 2018). De manière similaire, chez l'animal, de faibles taux d'adiponectine représentent une vulnérabilité à développer un comportement de type pseudo-dépressif au cours d'une procédure de stress (Liu et al., 2012). Ces études indiquent que, dans

des conditions particulières, les troubles émotionnels ou leur occurrence sont positivement corrélés à une diminution des taux d'adiponéctine. Or, en regard de l'action de cette hormone, cette diminution correspond également à des états de diminution de la sensibilité à l'insuline.

Un autre indice nous vient des études comportementales en lien avec le métabolisme des céramides, dont nous avons vu au cours du chapitre 2 que leur accumulation favorisait l'insulino-résistance. En effet, plusieurs études cliniques ont mis en évidence des altérations du métabolisme des céramides chez des patients atteints de DM (Demirkan et al., 2013; Kornhuber et al., 2005). Chez la souris, l'accumulation de ces lipides au moyen de la surexpression de leur enzyme de synthèse, l'acide-sphingomyélinase (Asm), induit un comportement de type pseudo-dépressif (Gulbins et al., 2013).

Au travers de ces résultats nous remarquons que des **troubles du comportement émotionnel sont associés et parfois directement induits par une résistance à l'insuline périphérique**. A l'inverse, nous pouvons nous questionner sur une amélioration possible du comportement émotionnel via une augmentation de la sensibilité à l'insuline par des traitements antidiabétiques et/ou insulino-sensibilisants.

1.3 Effet antidépresseur des agents antidiabétiques et insulino-sensibilisants

1.3.1 En condition d'insulino-résistance

En condition physiopathologique d'insulino-résistance, moduler la sensibilité à l'insuline au travers d'agents pharmacologiques permet de diminuer voire restaurer certains symptômes de type pseudo-dépressif ou pseudo-anxieux.

Plusieurs études cliniques rapportent que des agents antidiabétiques oraux, aux propriétés insulino-sensibilisatrice ou insulino-sécrétoire, exercent des effets de type antidépresseurs. C'est le cas par exemple de la metformine (classe des biguanides) dont l'administration diminue significativement les symptômes dépressifs chez des sujets présentant une intolérance au glucose et chez des patients diabétiques (Ackermann et al., 2009; Guo et al., 2014). D'autres molécules comme le rosiglitazone et le pioglitazone (classe des thiazolidinediones) ont

démonstrées les mêmes effets antidépresseurs chez des patients insulino-résistants (Rasgon et al., 2010). Concernant la classe des sulfonylurées, peu de données existent sur leur potentiel effet antidépresseur en comparaison à un placebo. Cependant, Wahlqvist et ses collaborateurs ont mis en évidence dans une étude observationnelle qu'une bithérapie combinant la metformine et un sulfonyluré permettait de diminuer l'incidence de la DM et des troubles bipolaires chez des patients atteints de DT2 (Wahlqvist et al., 2012).

Les effets antidépresseurs des antidiabétiques et de l'insuline dans des modèles animaux de résistance à l'insuline ont également été rapportés. Tout d'abord, dans un modèle de DT2, l'injection chronique intrapéritonéale (i.p) d'insuline réduit le comportement de résignation de manière similaire à l'antidépresseur sertraline (Sestile et al., 2016). Cet effet antidépresseur de l'insuline est également observé dans des modèles de troubles émotionnels associé à un DT1 induit par STZ (Gupta et al., 2014; Ho et al., 2012). Enfin, le traitement subchronique par voie intrapéritonéale d'insuline permet aussi de reverser le comportement de réponse de peur de type « freezing » sans atténuer l'hyperglycémie (Miyata et al., 2007). Ces dernières données suggèrent un effet thérapeutique propre à l'action de l'insuline, indépendant de modifications glycémiques. Par ailleurs, la metformine induit une diminution du comportement de résignation dans plusieurs modèles de dépression comorbide au diabète (Shivavedi et al., 2017). Les thiazolidinediones exercent aussi des effets antidépresseurs dans plusieurs modèles de troubles émotionnels comorbides au diabète (Sharma et al., 2012; Soliman et al., 2020). L'exenatide (classes des incréтино-mimétiques) permet également de diminuer le comportement de type résignation dans un modèle de dépression comorbide au DT2 (Komsuoglu Celikyurt et al., 2014). Enfin, les études sur le rongeur montrent que le glibenclamide (sulfonyluré) permet aussi de diminuer le comportement de résignation et d'anhédonie dans plusieurs modèles de dépression comorbide au diabète ou à une insulino-résistance (Soliman et al., 2020; Su et al., 2017).

En conclusion, l'amélioration de la sensibilité à l'insuline par des agents antidiabétiques permet une amélioration du comportement de type pseudo-dépressif comorbide à une résistance à l'insuline. Toutefois, il est intéressant de déterminer si ces molécules conservent leurs effets antidépresseurs dans des conditions physiologiques d'insulino-sensibilité.

1.3.2 En condition physiologique de sensibilité à l'insuline

Au cours d'une étude incluant des patients souffrant de DM et de troubles bipolaires sans altérations métaboliques, la pioglitazone s'est révélée posséder des propriétés antidépresseurs en diminuant de façon significative le score de dépression (Lin et al., 2015; Zeinoddini et al., 2015). De la même manière, le traitement chronique au liraglutide permet une réduction significative des symptômes dépressifs et une amélioration générale du domaine cognitif chez des patients atteints de DM et de trouble bipolaires (Mansur et al., 2017). En ce qui concerne les études chez l'animal, la metformine permet une amélioration du comportement de type anhédonique et de résignation dans des modèles de UCMS, de stress de contention chronique et de défaite sociale (Ai et al., 2020; Fang et al., 2020). Le pioglitazone permet également de diminuer le comportement de type résignation dans des modèles de dépression non comorbide à un trouble métabolique (Soliman et al., 2020; Zhao et al., 2016). De manière intéressante, plusieurs études rapportent un effet opposé sur le comportement de type anxieux et pseudo-dépressif selon la durée de traitement par les incréтино-mimétiques dont font partie le liraglutide et l'exenatide. Ainsi une administration unique augmente le comportement de type anxieux tandis qu'une administration chronique de la molécule diminue le comportement de résignation chez des souris naïves et dans des modèles de dépression (Anderberg et al., 2016; Weina et al., 2018). Par ailleurs, le glibenclamide diminue le comportement de résignation et d'anhédonie dans différents modèles de dépression par stress chronique ou par induction pharmacologique (Rosado et al., 2021; Soliman et al., 2020). En outre, dans un modèle de dépression de stress chronique induit par la corticostérone, le traitement chronique par l'adiporon (un agoniste au récepteur de l'adiponéctine) exerce des effets de type antidépresseur (Nicolas et al., 2018). Enfin, le diccholine succinate, un agent insulino-sensibilisant, prévient l'apparition d'un comportement pseudo-dépressif et pseudo-anxieux dans un modèle de défaite sociale et dans un modèle de stress chronique (Cline et al., 2012, 2015). La même molécule diminue de manière significative le comportement de résignation chez des souris naïves (Cline et al., 2015). Par conséquent, les agents antidiabétiques semblent doués de propriétés de type antidépresseur en condition d'insulino-résistance mais aussi en condition physiologique de sensibilité à l'insuline.

1.3.3 Mécanismes d'action

L'insuline inhibe l'activité de GSK-3 à travers sa voie de signalisation. Or, cette inhibition est le mécanisme d'action par lequel le lithium, qui est le traitement de première intention chez les patients bipolaires, produit son effet thérapeutique (Freland and Beaulieu, 2012). Par conséquent, l'insuline pourrait également améliorer le comportement émotionnel au travers de l'inhibition de GSK-3. Les améliorations du comportement émotionnel induites par la metformine ont été associées à une diminution du stress oxydant, une augmentation des taux du facteur neurotrophique BDNF ou encore, à une réduction de l'activité de l'axe HPA (Fang et al., 2020; Shivavedi et al., 2017). De plus, l'activation de la voie de l'AMPK hippocampique semble être cruciale puisque l'effet antidépresseur de la metformine est inhibé par inactivation génétique de l'AMPK ou un inhibiteur de la voie de signalisation en amont (Ai et al., 2020). Concernant les thiazolidinediones, leurs effets bénéfiques sur le comportement de résignation sembleraient être médiés par une diminution du stress oxydant et des taux de facteur inflammatoire comme TNF-alpha (Liao et al., 2017; Soliman et al., 2020). Les mécanismes d'action des effets antidépresseurs des incréтино-mimétiques, impliquent une modulation de la plasticité synaptique hippocampique, notamment par la voie de signalisation mTOR (Palleria et al., 2017; Weina et al., 2018). Enfin, l'effet antidépresseur du glibenclamide semble être médié par différents mécanismes d'action dont une diminution de l'activité de l'axe HPA associé à une diminution du statut inflammatoire (Esmaeili et al., 2018; Su et al., 2017). On remarque que les mécanismes sous-tendant les effets antidépresseurs des antidiabétiques sont impliqués dans des processus physiopathologiques influençant la sensibilité à l'insuline mais aussi impliqués dans la DM (stress oxydant, réponse inflammatoire, neuroplasticité, ...). De plus, plusieurs des éléments moléculaires modulés par les antidiabétiques et par lesquels sont supposés reposer leur effet antidépresseur, sont des cibles de la voie de signalisation de l'insuline.

Ces éléments permettent de mettre en évidence sous un autre angle que **le statut de la sensibilité à l'insuline peut moduler le comportement émotionnel**. De manière intéressante, les effets antidépresseurs des antidiabétiques s'exercent à la fois dans des conditions d'insulino-résistance mais également en condition de sensibilité physiologique à l'insuline.

Il n'y a toutefois pas d'éléments de causalité permettant d'affirmer que les améliorations des symptômes dépressifs soient directement le résultat de l'amélioration de la sensibilité à

l'insuline. En effet, en dehors de l'amélioration des facteurs pro-insulino-résistant, il se peut que les antidiabétiques exercent leurs effets antidépresseurs par des mécanismes « off-target », indépendants des rôles physiologiques que peut jouer l'insuline. Enfin une question reste ouverte: si toutefois ces effets sont médiés par la modulation de la sensibilité à l'insuline, est-ce l'amélioration de l'insulino-résistance périphérique et/ou cérébral qui permet l'amélioration des symptômes dépressifs ? Bien que les molécules antidiabétiques puissent traverser la BHE (El-Mir et al., 2008), il est possible que leurs effets antidépresseurs aient une origine périphérique:

- l'amélioration de la résistance à l'insuline périphérique pourrait permettre une résolution de l'insulino-résistance centrale qui exercerait ainsi un effet antidépresseur.

- une action périphérique permettant l'amélioration de la résistance à l'insuline centrale par des messagers (hormonaux, nerf vague, microbiote, etc...) et permettrait ainsi d'exercer un effet antidépresseur.

Enfin, aucune donnée ne permet d'exclure le fait que l'amélioration de la résistance à l'insuline périphérique soit suffisante à l'amélioration des symptômes dépressifs, quand bien même une insulino-résistance centrale demeurerait. Par conséquent, dans ce contexte expérimental il est difficile d'évaluer l'implication de la résistance à l'insuline centrale dans le développement des troubles émotionnels.

L'effet antidépresseur de certains agents antidiabétiques est associé à des modulations du système sérotoninergique. Ces différentes études seront détaillées au cours de la partie 5, afin que nous puissions préalablement introduire le chapitre 4, traitant de la sérotonine.

2. Résistance à l'insuline centrale et troubles émotionnels

Comme nous l'avons vu précédemment, les modèles animaux de DT2 présentant une insulino-résistance périphérique peuvent également présenter une insulino-résistance centrale. Par conséquent, il est possible de corréliser la résistance à l'insuline central avec les troubles émotionnels comorbides observés dans ces modèles animaux. Une approche spécifique de

l'insulino-résistance centrale peut toutefois permettre une meilleure appréciation de cette association. De ce fait, l'administration intracérébrale dans l'hippocampe dorsal du céramide C16, favorisant la résistance à l'insuline, entraîne une augmentation du comportement de résignation et de pseudo-anxiété (Zoicas et al., 2020). De la même manière, la modulation du métabolisme des céramides dans les neurones de l'hippocampe contribue de manière cruciale à la régulation du comportement pseudo-anxieux (Panayotis et al., 2018). En outre, l'inactivation génétique ou pharmacologique dans l'hippocampe de l'enzyme *Asm*, synthétisant les céramides, entraîne l'apparition d'un phénotype de type pseudo-dépressif. Enfin, il est intéressant de noter que la restauration de ce phénotype comportemental est consécutive à la diminution des taux de céramides par un traitement antidépresseur (Gulbins et al., 2013).

2.1 Action centrale des antidiabétiques et insulino-sensibilisants

L'administration centrale d'agents antidiabétiques et l'évaluation de leurs effets antidépresseurs peut être un moyen d'évaluer l'implication de l'état de sensibilité à l'insuline cérébrale dans les troubles émotionnels. Ainsi, l'injection chronique d'exénatide par voie icv diminue le comportement de résignation (Anderberg et al., 2016). Le même effet antidépresseur est observé après injection de pioglitazone et de rosiglitazone par la même voie d'administration (Rosa et al., 2008; Salehi-Sadaghiani et al., 2012). De plus, l'administration cérébrale du glibenclamide par injection icv potentialise l'effet antidépresseur de la venlafaxine, évalué au travers du comportement de résignation (Bortolatto et al., 2010). La même voie d'administration permet de mettre en évidence que la metformine diminue le comportement pseudo-anxieux induit par un sevrage nicotinique, associé à l'activation de l'AMPK hippocampique (Brynildsen et al., 2018). L'administration icv de l'adiponéctine, induit des effets antidépresseurs rapides (Liu et al., 2012) qui pourraient être attribués notamment à la modulation de la plasticité synaptique dans l'hippocampe (Pousti et al., 2018). Ces résultats sont renforcés par le fait que l'activation directe de la voie de signalisation des récepteurs à l'adiponéctine cérébraux participe à ses effets antidépresseurs (Yau et al., 2014). Collectivement ces données indiquent que la **modulation spécifique de la sensibilité à l'insuline au niveau central est associée à des effets de type antidépresseurs**. Cependant, en raison de l'impossibilité de maîtriser les effets « off-target » de ces molécules, ces résultats ne représentent pas d'éléments de causalité appuyant l'idée que l'augmentation de la sensibilité à

l'insuline au niveau cérébral produit un effet de type antidépresseur. Pour ce faire, l'invalidation génétique spécifique du récepteur à l'insuline est une technique de choix.

2.2 Invalidation/délétion cérébrale du récepteur à l'insuline

Les modèles murins d'invalidation génétique de l'IR sont des outils particulièrement utiles pour étudier les conséquences comportementales d'un défaut de signalisation de la voie de signalisation de l'insuline. En 2015, Kleinridders et ses collaborateurs mettent en évidence des altérations du comportement émotionnel chez les souris NIRKO (Neuronal Insulin Receptor Knock-Out) ayant une invalidation génétique spécifique de l'IR neuronal. En effet, la délétion de l'IR dans les neurones induit un phénotype de type pseudo-anxieux et pseudo-dépressif chez ces souris (Kleinridders et al., 2015). En ciblant des structures cérébrales particulières, d'autres études ont mis en évidence que l'inactivation de l'IR par approche lentivirale dans l'hypothalamus et dans l'hippocampe engendrait respectivement des altérations du comportement émotionnel et des altérations cognitives (Grillo et al., 2011, 2015). De la même manière, la double invalidation génétique simultanée de l'IR et de l'IGF-1R dans l'hippocampe ou dans l'amygdale provoque également l'apparition de comportements de type pseudo-anxieux ainsi que des altérations cognitives chez la souris (Soto et al., 2019). Néanmoins, cette étude ne permet pas de déterminer si un seul récepteur aurait permis de reproduire les altérations comportementales observées lors de la double invalidation. Etant donné que l'IR est aussi exprimé dans les astrocytes (Heni et al., 2011) et que ceux-ci sont partie intégrante de la neurotransmission basale (Panatier et al., 2011), la question des conséquences de l'inactivation de l'IR dans cette population gliale se pose également. Cai et ses collaborateurs indiquent que la délétion constitutive ou inductible de l'IR au sein des astrocytes induit un comportement de type pseudo-anxieux et pseudo-dépressif chez la souris GIRKO (Glial Insulin Receptor Knock-Out) (Cai et al., 2018).

L'ensemble de ces données suggèrent qu'un défaut d'activation cérébrale de l'IR provoque une altération du comportement émotionnel, indifféremment de la population cellulaire ciblée. Accumulé aux précédentes données, un nombre important d'arguments soulignent le rôle crucial que joue l'insuline au niveau cérébral dans la régulation des comportements de type anxieux et dépressifs. Ces éléments renforcent l'hypothèse selon laquelle une **insulino-**

résistance centrale présente chez des sujets diabétiques peut favoriser l'apparition de troubles émotionnels.

Suite à la délétion de l'IR dans les neurones et dans les astrocytes, plusieurs altérations ont été observées au niveau du système dopaminergique (Cai et al., 2018; Kleinriders et al., 2015). Toutefois, l'invalidation de l'IR de manière spécifique dans les neurones dopaminergiques n'entraîne pas l'apparition de troubles du comportement émotionnel (Evans et al., 2018). Par conséquent, les altérations dopaminergiques des souris NIRKO et GIRKO peuvent être des conséquences collatérales impliquées, mais ne sont pas la cause du phénotype pseudo-dépressif et pseudo-anxieux observé chez ces souris. Par conséquent, **les réseaux neuronaux affectés par l'insulino-résistance centrale sous tendant les comportements dépressifs et anxieux n'ont pas, à ce jour, été identifiés.** Il est donc probable qu'un autre circuit et/ou système de neurotransmission soit impliqué dans ce phénotype comportemental. Dans ce projet de thèse, nous avons ainsi étudié la potentielle modulation du système sérotoninergique par l'insuline contextualisée dans le comportement émotionnel.

PARTIE 4:

LA SEROTONINE

ET SON IMPLICATION

DANS

LES TROUBLES ANXIO/DEPRESSIFS

1. La sérotonine

1.1 Généralités

Au début des années 1930, à l'université de Pavie en Italie, le physiologiste Vittorio Erspamer extrait une molécule aux propriétés vasoconstrictives des cellules entérochromaffines du lapin, qu'il nomme entéramine. C'est en 1952 que le Dr Erspamer découvre que l'entéramine est la même molécule que la sérotonine, une indolamine dont la cristallisation a eu lieu quelques années auparavant (Erspamer and Asero, 1952; Rapport et al., 1948). C'est de son rôle vasoconstricteur sur le système cardio vasculaire que la sérotonine tire son nom puisqu'il provient de la contraction de « serum » et « tonic ». Les connaissances actuelles montrent que la sérotonine est une des plus anciennes molécules du monde vivant puisqu'on la retrouve chez les invertébrés, chez les vertébrés mais aussi dans le règne végétal (Barbas et al., 2003; Chen et al., 2020; Ishihara et al., 2008; Mathias et al., 1957; Murch et al., 2009). Chez l'Humain, la sérotonine est produite à 90% par les cellules entérochromaffines, à 5% par les thrombocytes et à 5% par le SNC où elle joue un rôle essentiel. En dépit de sa faible proportion dans le cerveau comparé aux tissus périphériques, et bien que moins d'un neurone sur un million ne produise de sérotonine, celle-ci est impliquée dans un nombre important et varié de processus physiologiques. Ainsi la sérotonine cérébrale est impliquée dans la régulation du comportement sexuel, des cycles veille/sommeil, de la respiration, de l'appétit, de la douleur ou encore de la température corporelle. De plus, elle régule de manière cruciale les états émotionnels affectifs dont notamment l'anxiété et l'humeur. De ce fait, la sérotonine est un neurotransmetteur impliqué dans la physiopathologie d'un très vaste champ de maladies psychiatriques comme, les troubles de l'humeur, les troubles anxieux, les troubles addictifs ou encore les troubles psychotiques.

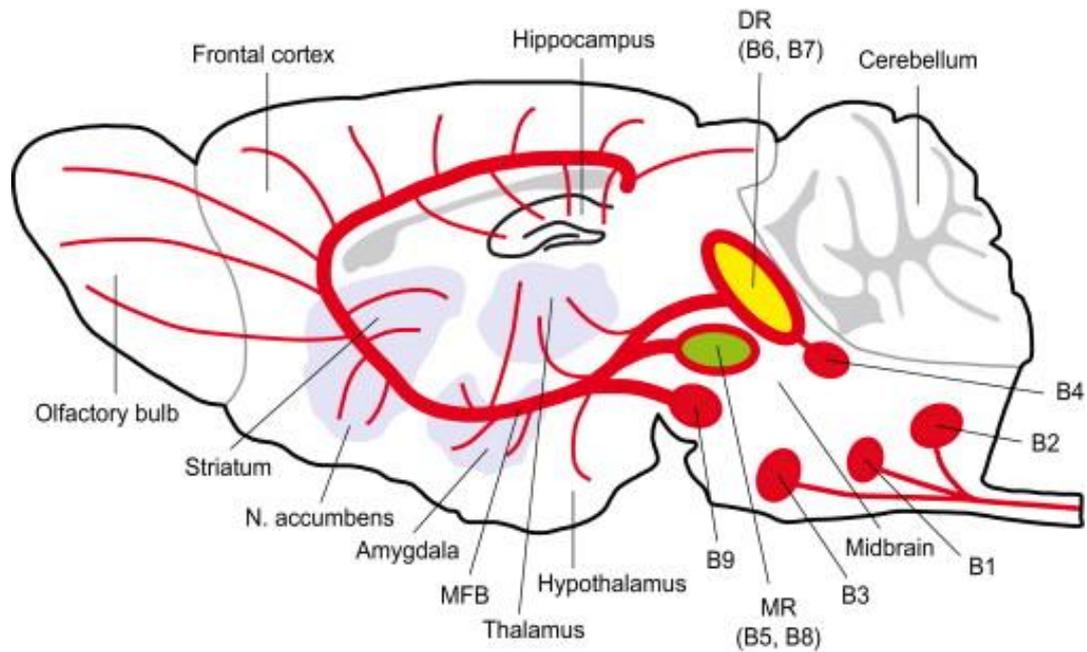
1.2 Neuroanatomie des noyaux du Raphé

Les neurones sérotoninergiques sont localisés en groupes restreints dans plusieurs noyaux du Raphé numérotés de B1 à B9 qui sont situés au niveau du pont, du mésencéphale et du bulbe rachidien (Dahlstroem and Fuxe, 1964; **figure 13**). Ces noyaux sont compartimentés en deux

groupes distincts (Törk, 1990). En effet, les neurones des noyaux les plus caudaux (B1-B4) projettent majoritairement vers la moelle épinière par des voies descendantes. Le groupe de noyau rostral (B5-B9) innervent quant à eux des structures du télencéphale et du mésencéphale par des voies ascendantes. On retrouve parmi ces noyaux le Raphé dorsal (RD), constitué des noyaux B6 et B7 et le raphé médian (RM), constitué des noyaux B5 et B8. Ces deux noyaux sont à l'origine de l'immense majorité de la synthèse de sérotonine cérébrale qu'ils projettent dans tout le cerveau dont l'hippocampe, l'amygdale, l'hypothalamus, le cortex préfrontal ou encore le striatum (Azmitia and Segal, 1978; Pollak Dorocic et al., 2014; Vertes, 1991; **figure 13**). Les projections sérotoninergiques ascendantes peuvent également former des collatérales. Ces collatérales sont de deux natures: extra-raphé ou intra-raphé. Ainsi les neurones sérotoninergiques du RD peuvent être modulés par des afférences sérotoninergiques provenant d'autres noyaux du Raphé (principalement du RM) ou bien par leur propres collatérales en provenance du même noyau (Mosko et al., 1977).

Les différentes études du système sérotoninergique réalisées au cours de ma thèse ont porté sur le noyau du Raphé dorsal, et plus particulièrement les expériences d'électrophysiologie, c'est pourquoi il occupera un rôle central dans cette introduction.

Le noyau du Raphé dorsal est divisé en trois sous-structures neuroanatomiques dont la partie ventromédiane, la partie dorsomédiane et les ailes latérales (Calizo et al., 2011). Au sein de ce noyau, les neurones sérotoninergiques représentent entre 30 et 60% du nombre total de neurones selon les études, soit environ 9000 neurones chez la souris (Descarries et al., 1982; Ishimura et al., 1988; Jacobs and Azmitia, 1992). Les autres populations de neurones sont majoritairement GABAergique (Allers and Sharp, 2003; Belin et al., 1979) mais également, dopaminergique (Lin et al., 2020; Lindvall and Björklund, 1974) ou encore peptidergique (substance P, neurotensine, Neuropeptide Y, enképhaline) (Michelsen et al., 2007). De plus, au sein du RD, plusieurs populations de neurones sérotoninergiques et catécholaminergiques co-libèrent du glutamate (Johnson, 1994; Kaneko et al., 1990; Liu et al., 2014).



Figures 13: Localisation et projections des noyaux du Raphé.

D'après Lesch and Waider, 2012.

1.3 Développement des neurones sérotoninergiques

Plusieurs études pointent une importante diversité au sein de la population des neurones sérotoninergiques. En effet, outre leur capacité à synthétiser la sérotonine, ces neurones se catégorisent selon leurs paramètres topographiques, morphologiques, hodologiques, leurs lignées développementales, leur expression génique et leur caractéristiques électrophysiologiques (pour revue voir Okaty et al., 2019). Les différents rhombomères du tube neural définissent la sous-lignée cellulaire sérotoninergique à laquelle appartiendront les cellules progénitrices. Elles sont également définies pendant les stades développementaux par l'expression spécifique de deux facteurs de transcriptions majeurs. *Lmx1b* et *Pet-1* (dont l'expression est chronologiquement postérieure à *Lmx1b*) sont essentiels au développement et à la mise en place de l'identité du neurone sérotoninergique (Ding et al., 2003; Hendricks et al., 1999; Zhao et al., 2006). De cette manière, l'inactivation génétique de *Lmx1b* conduit à une déplétion totale des neurones 5-HT (Ding et al., 2003) tandis que le KO de *Pet-1* entraîne une diminution d'environ 80% de ces neurones (Hendricks et al., 1999). En accord avec ces résultats, une étude indique que la faible proportion de neurones 5-HT non régulée par *Pet-1*,

présente des caractéristiques hodologiques et fonctionnelles bien définies (Kiyasova et al., 2011). En outre, l'étude transcriptomique des neurones sérotoninergiques a permis de les classer en 14 sous lignées cellulaires (Huang et al., 2019; Okaty et al., 2020; Ren et al., 2019). Ainsi les neurones 5-HT font preuves d'une hétérogénéité importante permettant un large spectre d'actions physiologiques au travers de sous-populations de neurones impliqués dans des circuits neuronaux spécialisés.

1.4 Biosynthèse, libération et dégradation de la sérotonine

La sérotonine (5-hydroxytryptamine ; 5-HT) est une monoamine synthétisée à partir d'un acide aminé précurseur qui est le L-tryptophane (L-Trp) (**figure 14**). Notre organisme est hétérotrophe pour la sérotonine car le L-Trp est un acide aminé essentiel qui ne peut pas être synthétisé par notre organisme et qui dépend donc de nos apports nutritifs. Par ailleurs, un flux de stock de sérotonine entre la périphérie et le cerveau est impossible en raison de l'incapacité de la 5-HT à franchir la BHE, bien que cette notion soit actuellement remise en question (Lexchin et al., 1977; Nakatani et al., 2008). Le L-Trp est transporté au travers de la BHE grâce au transporteur d'acide aminé neutre large (LAT1) (Fernstrom, 2013; Fernstrom and Wurtman, 1972) afin de jouer son rôle de précurseur lors de la synthèse *in situ* de sérotonine cérébrale dans les différents noyaux du Raphé. La tryptophane hydroxylase (TPH) est l'enzyme limitante de la synthèse de sérotonine. Elle est impliquée dans la réaction d'hydroxylation initiale permettant la transformation du L-Trp en 5-hydroxytryptophane (5-HTP). TPH1 est l'isoforme de synthèse de sérotonine périphérique tandis que TPH2 est l'isoforme impliqué dans la synthèse cérébrale et qui est exprimé dans les neurones 5-HT du Raphé dorsal (RD) (Crane et al., 2015; Walther and Bader, 2003). Toutefois cette compartimentalisation n'est pas une dichotomie stricte puisque des données récentes rapportent également une expression disparate de TPH1 dans le cerveau (Zill et al., 2007). L'enzyme TPH2 est synthétisée dans le corps cellulaire des neurones 5-HT puis est acheminée dans la synapse par transport axonal (Meek and Neff, 1972). C'est au cours d'une seconde réaction enzymatique impliquant l'acide L-aminé aromatique décarboxylase (AAAD) que le 5-HTP est converti en sérotonine.

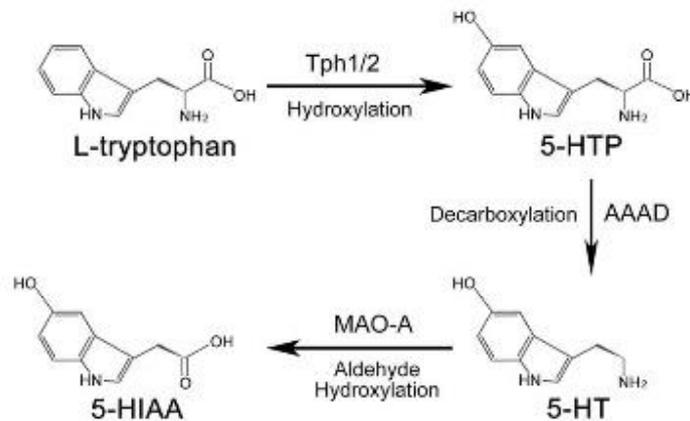


Figure 14: Biosynthèse de la sérotonine.

D'après Lv and Liu, 2017.

De manière consécutive à sa synthèse, la sérotonine est co-stockée avec la protéine de liaison spécifique SBP (Serotonin-Binding Protein) (Tamir and Gershon, 1990) dans des vésicules de sécrétion à la terminaison nerveuse via le transporteur VMAT2 (Fon et al., 1997). La conduction du potentiel d'action à la terminaison nerveuse induit l'influx d'ion Ca^{2+} et entraîne la fusion des vésicules avec la membrane plasmique, conduisant à la libération de la sérotonine dans la fente synaptique (Sanders-Bush, 1982). Cette libération par exocytose est de type calcium-dépendante (Burgoyne and Morgan, 1998) tandis qu'il existe un autre type de libération de sérotonine qui lui, est indépendant du calcium, représentant environ 30% de la libération de sérotonine (Adell et al., 2002). Il s'agit en effet du transport inversé du transporteur de la sérotonine SERT qui permet un efflux de sérotonine intraneuronale vers la fente synaptique (Rudnick and Wall, 1992). Plusieurs éléments sont ainsi en faveur d'une libération paracrine de sérotonine qui serait extrasynaptique, au niveau des dendrites et du soma, comme c'est le cas pour d'autres neurotransmetteurs (Agnati et al., 1995) (ex: dopamine ; Fuxe et al., 2015). La libération somatodendritique de sérotonine se fait par exocytose qui peut être sous régulation du canal calcique de type L ou par le mécanisme d'efflux via le SERT, également exprimé au niveau du compartiment somatodendritique (Bunin and Wightman, 1998; Dewar et al., 1991; Lau et al., 2010; Quentin et al., 2018; Sur et al., 1996). On retrouve ainsi dans le RD

les concentrations de sérotonine extracellulaire les plus importantes du SNC (Piñeyro and Blier, 1999).

Suite à sa libération extracellulaire (**figure 15**), la sérotonine peut être recapturée par le neurone présynaptique via le transporteur sélectif de la sérotonine SERT au moyen d'une pompe Na^+/K^+ ATPase (Chang and Lam, 1998). Une fois à l'intérieur du neurone, la sérotonine est préférentiellement dégradée par la monoamine oxydase A (MAO-A), une enzyme mitochondriale exprimée par les neurones 5-HT (Shih et al., 1999). Cette dégradation formera son métabolite principal, l'acide 5-hydroxyindol-acétique (5-HIAA) que l'on retrouve dans le liquide céphalorachidien puis qui est excrété dans les urines. Par ailleurs la recapture de la sérotonine peut s'opérer de manière indépendante de SERT au travers de transporteurs à faible affinité. En effet, le transporteur des cations organiques (OCT) ou encore les transporteurs de membranes plasmiques (PMAT) peuvent recapturer différentes monoamines dont la sérotonine (Engel et al., 2004; Schmitt et al., 2003). Enfin d'autres transporteurs de recapture de monoamine comme le transporteur de la dopamine (DAT) et le transporteur de la noradrénaline (NET) sont également capable de recapturer la sérotonine (Shaskan and Snyder, 1970; Stamford et al., 1990).

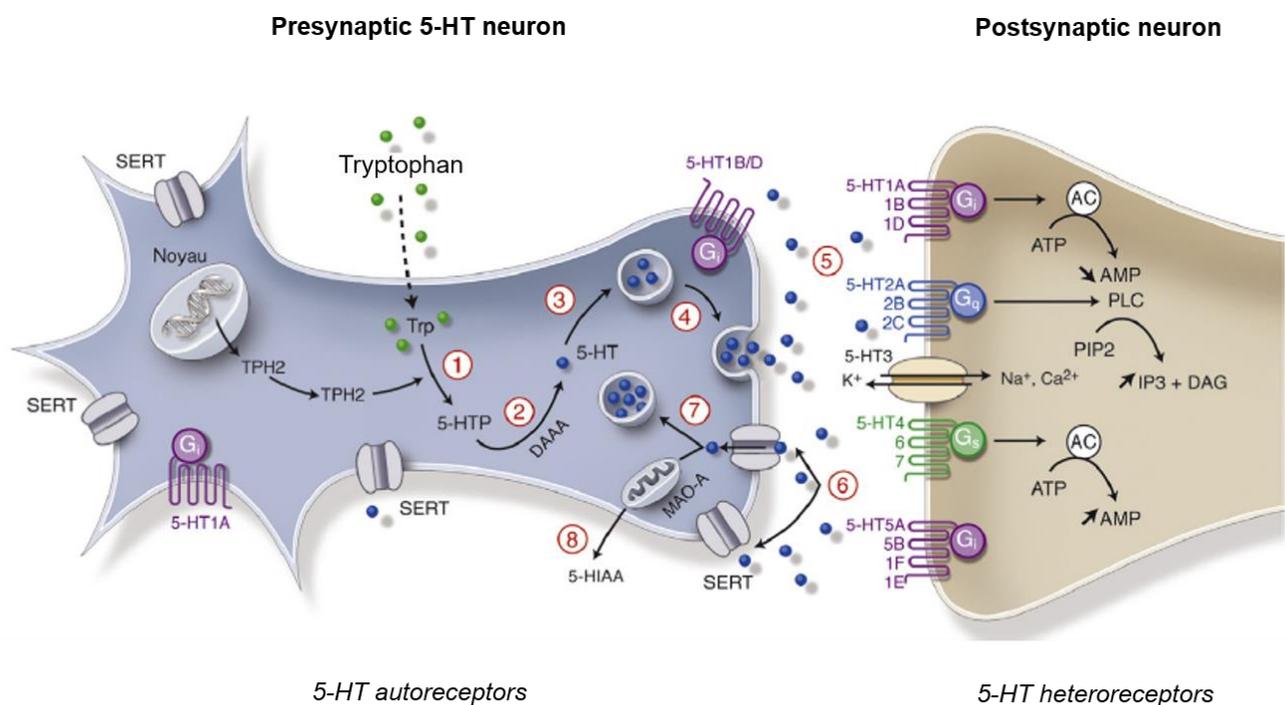


Figure 15: La synapse sérotoninergique.

D'après David and Gardier, 2016.

1.5 Récepteurs sérotoninergiques

Les effets multiples de la sérotonine sont permis par un large éventail de récepteurs sérotoninergiques qui comprend 7 familles (5-HT₁₋₇) chez les mammifères. Tous les récepteurs sont des récepteurs métabotropiques à sept domaines transmembranaires couplés à une protéine G, à l'exception du récepteur 5-HT₃ qui est un récepteur ionotropique. Les 16 sous-types de récepteurs sont classés dans les 7 familles de la manière suivante selon la nomenclature internationale: 5-HT₁ (1A, 1B, 1D, 1E, 1F), 5-HT₂ (2A, 2B, 2C), 5-HT₃ (3A, 3B, 3C), 5-HT₄, 5-HT₅ (5A, 5B), 5-HT₆ et 5-HT₇. Le récepteur 5-HT₃ est un récepteur ionotropique perméable aux cations potassique, sodique et calcique dont l'ouverture stimulée par la sérotonine a pour conséquence de dépolariser de la cellule. Les familles de récepteur 5-HT_{1,5} sont couplés à une protéine G_{i/o} qui inhibe l'adénylate cyclase. Les récepteurs 5-HT₂, sont quant à eux couplés à une protéine G_{q/11} qui active la phospholipase C. Enfin les récepteurs 5-HT_{4,6,7} sont couplés à une protéine G_s stimulant l'adénylate cyclase (pour revue, voir Barnes and Sharp, 1999). La sérotonine est également capable d'activité biologique indépendamment de ses récepteurs notamment au travers de la sérotonylation des histones, permettant une modulation épigénétique (Farrelly et al., 2019). En ce qui concerne la distribution des récepteurs sérotoninergiques, on observe que les 7 familles sont exprimées comme hétérorécepteurs sur des neurones non-sérotoninergiques postsynaptiques dans de nombreuses zones du cerveau (Palacios, 2016). Les récepteurs 5-HT_{1A} sont aussi exprimés sur le corps cellulaire des neurones 5-HT en la qualité d'autorécepteur tout comme les récepteurs 5-HT₇ et 5-HT_{2B}. A l'inverse, les autorécepteur 5HT_{1B/1D} sont exprimés sur les terminaisons synaptiques des neurones sérotoninergiques (Sari, 2004; **figure 15**).

Au cours de ce projet de thèse, les études fonctionnelles portant sur le système sérotoninergique, notamment l'électrophysiologie ex-vivo, et les outils pharmacologiques utilisés, ont été très largement porté sur le récepteur 5-HT_{1A}. Par conséquent, nous ne détaillerons que l'implication de ce récepteur dans les fonctions qui sont traitées au cours des prochains paragraphes.

1.5.1 Le récepteur 5-HT_{1A}

Le récepteur 5-HT_{1A} est abondamment exprimé dans tout le cerveau (Albert et al., 1990; Pompeiano et al., 1992). Ces récepteurs peuvent être catégorisés en deux types: les autorécepteurs présynaptiques localisés sur les dendrites et les corps cellulaires des neurones 5-HT et les hétérorécepteurs postsynaptiques situés sur des neurones non-sérotoninergiques (Albert, 2012; Riad et al., 2000). L'autorécepteur 5-HT_{1A} est fortement exprimé dans les noyaux du Raphé et plus particulièrement dans le RD et le RM, tandis que l'hétérorécepteur est exprimé dans plusieurs structures limbiques comme l'amygdale, l'hippocampe, le septum et le cortex préfrontal (Albert et al., 1990; Pompeiano et al., 1992).

Le récepteur 5-HT_{1A} est couplé à la protéine Gi/o dont l'activation inhibe l'adénylate cyclase (Fargin et al., 1989; Liu and Albert, 1991). Par ailleurs, la liaison de la sérotonine à ce récepteur active également des canaux potassiques à rectification entrante couplés aux protéines G (GIRK) dans l'hippocampe et le RD (Ehrengruber et al., 1997; Penington et al., 1993). Les approches d'inactivations génétiques ont mis en évidence que l'isoforme GIRK2 est celui préférentiellement associé au récepteur 5-HT_{1A} (Llamosas et al., 2015, 2017). Par ailleurs le récepteur 5-HT_{1A} est également couplé aux canaux calcique voltage dépendant (VDCC) qui participent aussi à la diminution de l'excitabilité neuronale (Penington et al., 1991).

Le récepteur 5-HT_{1A} peut être couplé à différentes protéines Gi sous-effectrices selon sa localisation pré- ou post-synaptique (Clarke et al., 1996). Ces différences suggèrent que les conséquences fonctionnelles de l'activation du récepteur 5-HT_{1A} peuvent subtilement varier selon le type neuronal. Nous verrons dans les prochains paragraphes son implication fonctionnelle dans la régulation de l'activité du système 5-HT, dans les troubles anxio/dépressifs et dans la réponse aux antidépresseurs sérotoninergiques.

1.6 Propriétés électrophysiologiques des neurones 5-HT du Raphé dorsal

De manière générale, les neurones sérotoninergiques du Raphé dorsal présentent une activité de décharge tonique régulière et lente variant de 0,5 à 2,5 Hz (Aghajanian et al., 1970). L'activité pacemaker intrinsèque des neurones sérotoninergiques est régie par l'interaction de plusieurs courants ioniques qui régulent leur activité spontanée. Ces courants ioniques

spécifiques incluent une conductance calcique de bas seuil (LTCC) permettant l'initiation de la dépolarisation puis du potentiel d'action. La phase d'hyperpolarisation est induite par un courant potassique sortant dépendant d'une conductance calcique ($I_{K_{Ca^{2+}}}$). La longue durée de l'hyperpolarisation induit une période réfractaire participant à l'activité lente et régulière des neurones 5-HT. Enfin, la présence d'un courant potassique rectifiant entrant (K_{ir}) permet de ramener le neurone à son potentiel membranaire de repos moyen qui est de -60 mV (Burlhis and Aghajanian, 1987). Le potentiel d'action (PA) a une durée moyenne de 1,8 ms, une amplitude de 70 mV et présente une « épaulement » caractéristique lors de la phase de repolarisation. L'hyperpolarisation post-potentiel d'action (AHP) est lente avec une large amplitude (10–20 mV, 200–800 ms) (Beck et al., 2004; Vandermaelen and Aghajanian, 1983; **figure 16**). Toutefois, les paramètres électrophysiologiques des neurones 5-HT du RD ne suffisent pas à leur distinction rigoureuse en comparaison à d'autres populations neuronales du RD. En effet, certaines de leurs propriétés intrinsèques peuvent parfois présenter des similitudes proches avec des neurones non-sérotoninergiques du RD (Kirby et al., 2003). On observe également une hétérogénéité des caractéristiques électrophysiologiques au sein même des neurones sérotoninergiques. De cette manière, les neurones 5-HT du RM et du RD présentent une signature électrophysiologique différente (Beck et al., 2004) alors qu'au sein même du RD, les neurones 5-HT peuvent également présenter des différences de propriétés intrinsèques selon leur localisation topographique (Calizo et al., 2011; Crawford et al., 2010). Enfin, les neurones 5-HT du RD sont également doués d'une activité de type phasique sous forme de bouffées (Allers and Sharp, 2003; Hajós et al., 2007). Ce type d'activité permet notamment une augmentation transitoire de la libération de sérotonine dans les aires post-synaptiques (Gartside et al., 2000). Par ailleurs, les études d'électrophysiologie *in vivo* montrent que l'activité des neurones 5-HT du RD sont sous une régulation tonique excitatrice des neurones noradrénergiques du Locus Coeruleus (Baraban and Aghajanian, 1980; Haddjeri et al., 2004). De cette façon, la suppression du courant K_{ir} par les récepteurs adrénergiques $\alpha 1$ permet la stimulation des neurones 5-HT par la phényléphrine (Aghajanian, 1985; Vandermaelen and Aghajanian, 1983).

Enfin, l'activité des neurones sérotoninergiques varient au cours du cycle veille/sommeil. Ainsi, les neurones 5-HT du DRN sont actifs de manière tonique pendant l'éveil, diminuent leur activité pendant la phase de sommeil profond et sont inhibés au cours de la phase de sommeil paradoxal (Trulson and Jacobs, 1979).

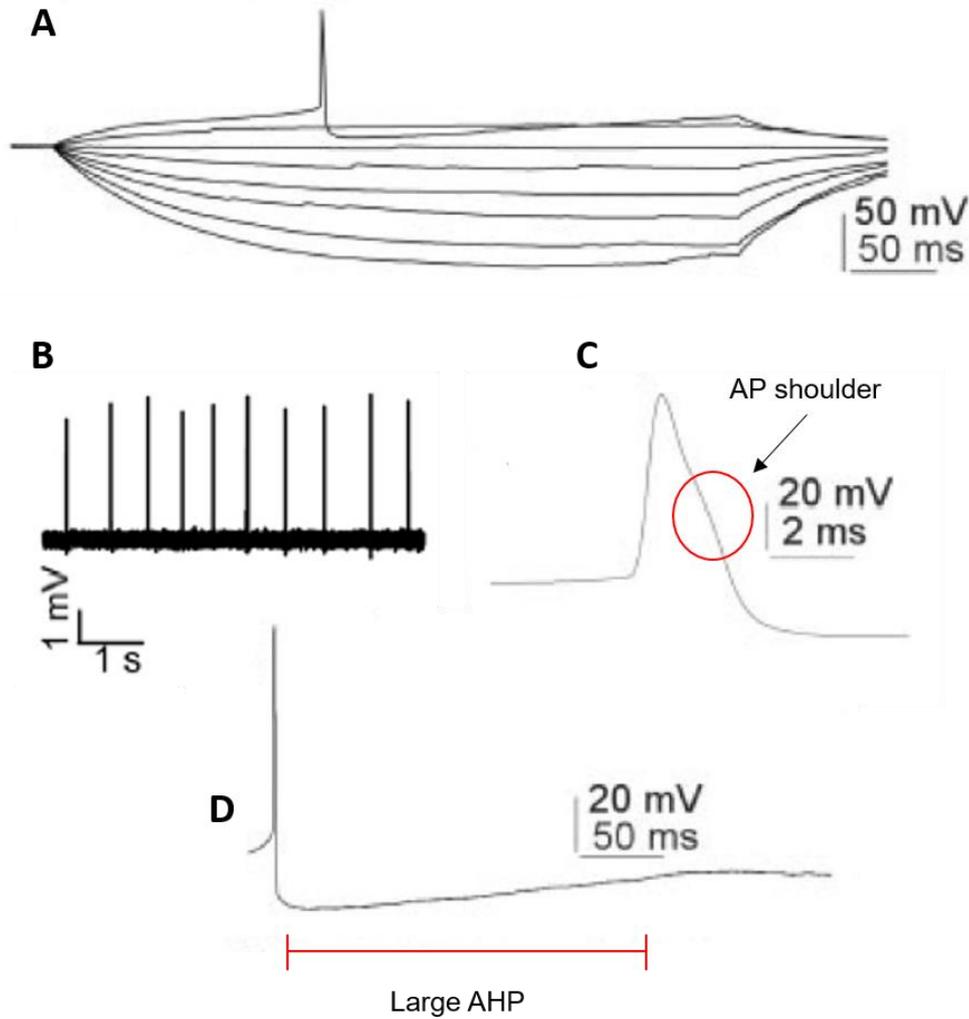


Figure 16: Caractérisation électrophysiologique des neurones 5-HT du Raphé dorsal.

D'après Beck et al., 2004.

A. Réponse d'un neurone 5-HT du RD à des créneaux d'injection de courants hyperpolarisants incrémentiels en mode whole-cell Iclamp. **B.** Activité de décharge des neurones 5-HT du RD en mode whole-cell Iclamp. **C.** Potentiel d'action d'un neurone 5-HT avec l'épaule caractéristique lors de la phase de repolarisation. **D.** L'hyperpolarisation post-potentiel d'action des neurones 5-HT du RD est caractérisée par sa large amplitude et sa longue durée.

1.7 Régulation de l'activité des neurones 5-HT du Raphé dorsal et de la libération de sérotonine

1.7.1 Régulation somatodendritique

Comme nous l'avons vu précédemment l'activité des neurones 5-HT du RD est sous régulation excitatrice d'afférences noradrénergiques médiées par le récepteur $\alpha 1$. Les autorécepteurs 5-HT_{1A} sont quant à eux impliqués dans la balance inhibitrice de l'activité des neurones 5-HT. En effet, la sérotonine en se fixant sur ce récepteur, entraîne l'hyperpolarisation du neurone à travers l'ouverture d'un canal potassique à rectification entrante (K_{ir}) (Aghajanian and Lakoski, 1984; Montalbano et al., 2015). Cette hyperpolarisation a pour conséquence une diminution de la fréquence de décharge du neurone qui est associée à une diminution de la libération de sérotonine dans les aires de projections (Blier and de Montigny, 1987; Haj-Dahmane et al., 1991; Hertel et al., 1998). Dans le Raphé dorsal, le récepteur 5-HT_{1A} est très majoritairement exprimé par les neurones sérotoninergiques (Day et al., 2004) bien que quelques neurones GABAergiques l'expriment aussi (Beck et al., 2004). Le récepteur 5-HT_{2B}, exprimé au niveau du soma est un autre élément intervenant dans la balance activation/inhibition des neurones 5-HT du RD. En effet, l'activation pharmacologique du récepteur 5-HT_{2B} ou sa surexpression génétique permet de réguler positivement l'activité des neurones 5-HT du RD (Belmer et al., 2018).

En outre, au niveau du RD, les neurones 5-HT peuvent également être régulés par des interneurons GABAergiques présent dans cette structure qui expriment les récepteurs 5-HT_{2A/2C} (Hernández-Vázquez et al., 2019). L'activation de ces récepteurs par la sérotonine induit l'augmentation des courants inhibiteurs post-synaptiques au travers du récepteur GABA_A sur les partenaires sérotoninergiques et constitue ainsi un rétrocontrôle négatif (Becquet et al., 1990).

Enfin, au sein du RD, la transmission paracrine de sérotonine joue un rôle important dans l'autoinhibition de l'activité des neurones 5-HT. En effet, ce type de libération permet une homogénéisation de la sérotonine dans l'environnement extracellulaire et permet l'inhibition tonique du neurone 5-HT par le récepteur 5-HT_{1A} observé au cours d'étude d'électrophysiologie *in-vivo* (Haddjeri et al., 2004). Si l'autoinhibition des neurones 5-HT au travers des

autorécepteurs 5-HT_{1A} dépendait uniquement d'une libération synaptique, l'activité de ces neurones s'en retrouverait erratique.

C'est au travers de ces différents mécanismes (qui ne sont pas exhaustifs), que l'action somatodendritique de la sérotonine permet une autorégulation de l'activité de décharge des neurones 5-HT du RD.

1.7.2 Régulation présynaptique

Au niveau de la synapse, les neurones sérotoninergiques expriment deux récepteurs inhibiteurs qui sont le 5HT_{1B} et le 5HT_{1D}. Ces deux récepteurs permettent une régulation fine de la libération de sérotonine dans la fente synaptique. En effet, l'activation du récepteur 5-HT_{1B} diminue la libération de sérotonine ainsi que sa synthèse (Hjorth and Tao, 1991; Hjorth et al., 1995) tout en augmentant son taux de recapture (Daws et al., 2000; Hagan et al., 2012). La recapture de la sérotonine par le SERT régule également la biodisponibilité de la sérotonine dans la fente synaptique. Cette régulation peut aussi être un mécanisme de rétrocontrôle car la sérotonine module elle-même l'expression de SERT à la surface membranaire de la synapse (Jørgensen et al., 2014).

1.7.3 Régulation postsynaptique

L'hétérorécepteur 5-HT_{1A} participe également à la régulation de l'activité des neurones sérotoninergiques. De cette façon, l'application locale d'un agoniste du récepteur 5-HT_{1A} dans le cortex préfrontal médian (mPFC) inhibe l'activité des neurones 5-HT du RD, impliquant une boucle de rétrocontrôle négatif (Celada et al., 2001; Hajós et al., 1999). Plusieurs récepteurs sérotoninergiques post-synaptiques permettent aussi la modulation de l'activité des neurones 5-HT au travers de boucles de rétrocontrôle médiées par des neurotransmissions GABAergiques ou glutamatergiques. Différentes neurotransmissions monomaminergiques peuvent également réguler l'activité des neurones 5-HT du RD. Outre le tonus excitateur noradrénergique susmentionné, les neurones dopaminergiques de l'ATV stimulent également l'activité de décharge de ces neurones (Guiard et al., 2008a), au travers du récepteur D2 (Aman et al., 2007). Ainsi, les effets sur l'activité des neurones et la libération de sérotonine dépendent à la fois de

la nature du récepteur 5-HT mais aussi de celle de la population neuronale (pour revue voir, Sharp et al., 2007). De cette manière plusieurs structures cérébrales comme le mPFC, l'habénula latérale, l'ATV ou encore le NAc modulent l'activité des neurones sérotoninergiques par des voies mono ou multi-synaptiques impliquant des partenaires de différentes natures.

En conclusion, la régulation de l'activité des neurones 5-HT du RD et de la libération de sérotonine dépend de système complexe sérotonine-dépendant et indépendant impliquant de multiples partenaires (**figure 17**). L'arborisation de ces régulations spatio-temporelles fines permet la modulation de divers processus biologiques dont les fonctions cognitives supérieures.

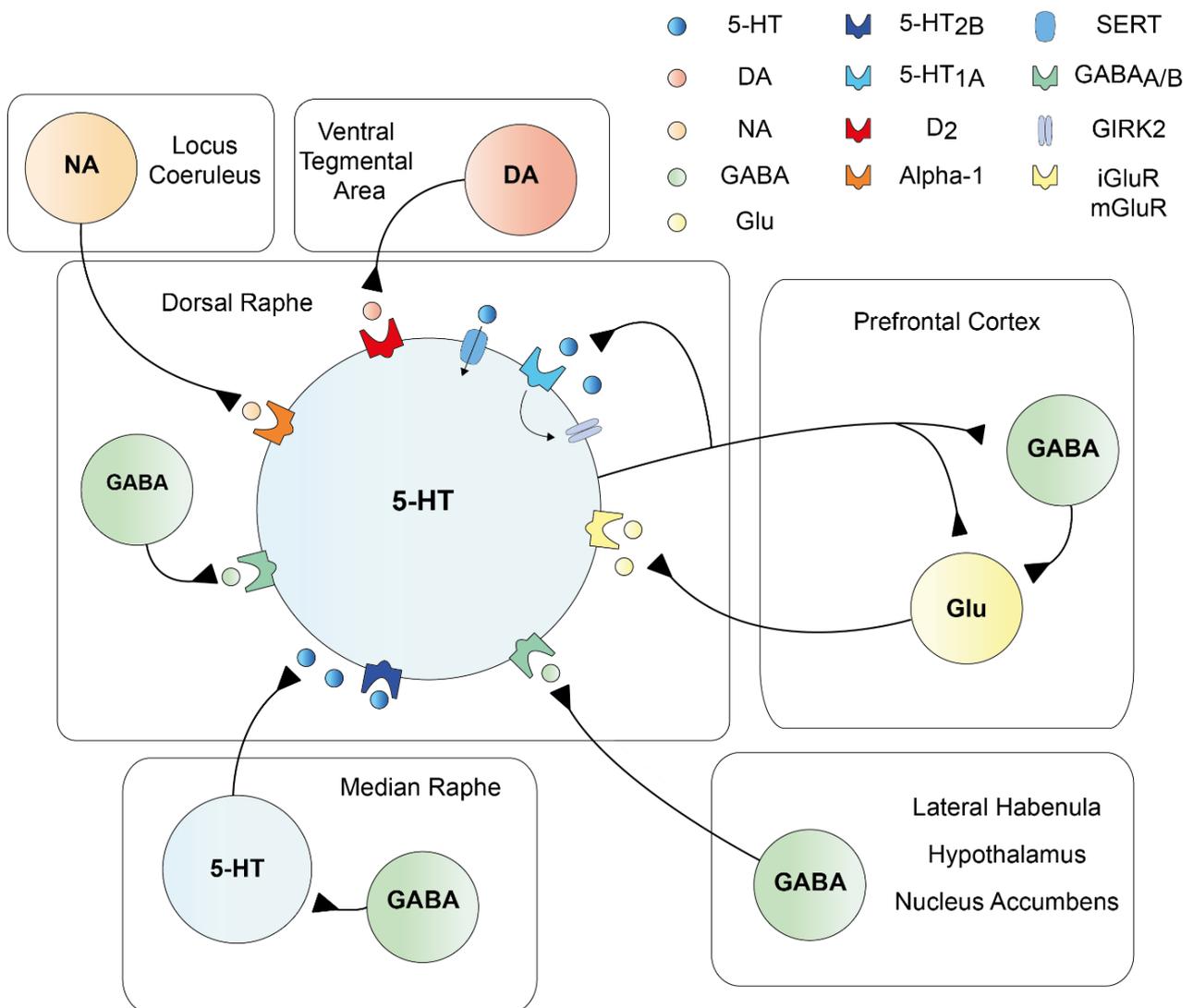


Figure 17: Régulation de l'activité des neurones 5-HT du Raphé dorsal par différents circuits neuronaux

2. Implication de la sérotonine dans la dépression majeure et les troubles anxieux

“It is possible that the 5-HT in our brains plays
an essential part in keeping us sane”.

- Sir John Gaddum, 1954.

2.1 Implication de la sérotonine dans la physiopathologie de la dépression majeure: évidences cliniques

La physiopathologie de la DM est complexe et peut varier selon le type de dépression. Les études d'imageries indiquent que plusieurs régions cérébrales présentent des altérations neuroanatomiques chez les individus souffrant de DM. C'est notamment le cas de structures impliquées dans la régulation des émotions comme l'amygdale et l'hippocampe, qui sont atrophiées chez des individus souffrant de DM (Pittenger and Duman, 2008; Roddy et al., 2019; Weissman et al., 2020). Des altérations fonctionnelles de plusieurs structures ainsi que de leur connectivité ont été rapportées chez ces patients, suggérant un dysfonctionnement des différents circuits régulant le comportement émotionnel (Mulders et al., 2015; Yang et al., 2019; Zhang et al., 2020).

Ces travaux de thèse sont centrés sur l'hypothèse d'une déficience monoaminergique et plus particulièrement sérotoninergique de la DM. Cette pathologie sera donc abordée sous un angle « sérotoninergique » et les autres hypothèses ne seront que brièvement citées, sans être approfondies. Toutefois, une pathologie aussi complexe ne peut se résumer qu'au seul dysfonctionnement d'un élément. Il est certain que les autres hypothèses physiopathologiques de la DM n'en sont pas moins pertinentes et demeurent complémentaires les unes aux autres.

L'hypothèse d'une déficience en monoamines chez les patients atteints de DM a été formulée par Schildkraut en 1965 (Schildkraut, 1965). Cette idée découle largement du

mécanisme d'action des antidépresseurs qui consiste de manière générale à augmenter les taux de monoamines. Encore actuellement, de récentes études justifient cette hypothèse puisque les patients souffrant de DM ont des taux cérébraux de dopamine et noradrénaline significativement diminués (Delgado, 2000; Lambert et al., 2000). En 1967, Coppen propose qu'une déficience spécifique en sérotonine en soit la cause (Coppen, 1967). Cette hypothèse est supportée par le fait que les patients atteints de DM ont des taux de L-Trp plasmatique plus faible, suggérant une diminution de la production de sérotonine (Ogawa et al., 2014). De plus, les taux du métabolite 5-HIAA sont significativement plus élevés chez les patients déprimés ce qui suggère une augmentation de la dégradation de sérotonine (Asberg et al., 1984; Dencker et al., 1966; Mendels et al., 1972; van Praag and de Haan, 1979). En outre, la déplétion de l'acide aminé précurseur L-Trp induit une humeur dépressive chez les individus ayant des risques génétiques élevés de développer une DM (Benkelfat et al., 1994; van der Veen et al., 2007). De la même manière une déplétion en L-Trp ou en sérotonine induit une rechute chez des patients en rémission ou encore une non réponse au traitement antidépresseur (Delgado et al., 1994; Ruhé et al., 2007; Shopsin et al., 1976). Enfin, le taux de renouvellement de la sérotonine (turnover) est singulièrement plus élevé chez ces patients, tandis qu'un traitement antidépresseur de type sérotoninergique permet de normaliser ce taux (Barton et al., 2008). Ces résultats conduisent plusieurs chercheurs à développer l'idée d'un « attribut sérotoninergique » correspondant à une diathèse sérotoninergique aux troubles mentaux, sans spécificité symptomatiques (Depue and Spoont, 1986).

Par ailleurs, plusieurs altérations d'enzymes ou d'éléments clés du système sérotoninergique ont été mis en évidence chez des individus souffrant de DM. Ainsi, chez les individus atteints de DM, on observe une augmentation de l'expression de la MOA-A, enzyme de dégradation de la sérotonine (Chiuccariello et al., 2014; Meyer et al., 2006). De manière intéressante, l'expression de cette enzyme est toujours significativement plus élevée que chez les individus sains malgré la rémission des symptômes après traitement antidépresseur (Meyer et al., 2009). Ces résultats suggèrent donc que la dégradation de sérotonine est plus importante chez les patients dépressifs. Par ailleurs, le fait que l'expression de la MAO-A reste élevée malgré la rémission pourrait être un argument expliquant le fort de taux de rechute.

En ce qui concerne l'enzyme limitante de synthèse de la sérotonine cérébrale, TPH2, plusieurs études indiquent une altération de son activité chez les patients atteints de DM. Ainsi plusieurs polymorphismes génétiques et mutations diminuant l'expression de TPH2 ont été associés à une vulnérabilité accrue à la DM et aux suicides (Lopez de Lara et al., 2007; Yoon

and Kim, 2009; Zhang et al., 2015b). De manière contradictoire, plusieurs études indiquent une augmentation de l'expression de TPH2 chez des patients suicidés atteints de DM (Bach-Mizrachi et al., 2006, 2008). Ces résultats pourraient toutefois refléter un mécanisme de compensation visant à augmenter les taux basaux faibles de sérotonine chez ces individus.

Beaucoup d'études ont exploré la relation entre les polymorphismes du transporteur à la sérotonine SERT, codé par le gène SLC6A4 et la DM. Il existe deux polymorphismes de ce gène: un allèle long « l » et un allèle court « s » (Heils et al., 1996). L'allèle court « s » diminue de 50% l'expression de SERT, conduisant à une diminution de la clairance de sérotonine dans la fente synaptique. D'après plusieurs études, le variant court « s » confère une vulnérabilité accrue au développement de la DM et de l'anxiété dans des conditions stressantes ou d'adversité (Furmark et al., 2004; Luddington et al., 2009). De plus, le variant « s » est associé à un délai de réponse aux antidépresseurs plus long et un taux de réponse plus faible (Murphy et al., 2004; Pollock et al., 2000; Zanardi et al., 2000).

Par ailleurs, plusieurs études constatent une diminution des taux de fixation de ligands radiomarqués sur le récepteur 5-HT_{1A} dans plusieurs structures cérébrales chez des patients atteints de DM non traités (Hirvonen et al., 2008; Sargent et al., 2000). De plus, cette diminution de fixation persiste malgré un traitement antidépresseur (Bhagwagar et al., 2004). D'autre part, l'expression et la distribution du récepteur 5-HT_{1A} est également modifiée dans cette population de patients (Kautzky et al., 2017). En outre, le polymorphisme génétique C(-1019)G du récepteur 5-HT_{1A} est responsable de sa surexpression et est également impliqué dans l'étiologie de divers troubles mentaux dont la DM (Greg, 1986; Lemonde et al., 2003). De cette manière, les individus homozygotes pour le nucléotide G du polymorphisme du récepteur 5-HT_{1A} présentent une vulnérabilité significativement plus importante aux troubles anxieux et aux troubles de l'humeur (Fakra et al., 2009; Strobel et al., 2003). D'autre part, des modifications de l'expression, de la fixation ou de la distribution d'autres récepteurs sérotoninergiques ont également été observées au cours d'études portant sur des sujets atteints de DM (Amidfar et al., 2017; Enoch et al., 1999; Madsen et al., 2014; Svenningsson et al., 2006). Par ailleurs, les nouvelles techniques de différenciation cellulaire, ont permis l'étude de neurones « sérotoninergiques » dérivés de cellules souches de patients atteints de DM. Les résultats de ces études mettent en évidence des altérations morphologiques et fonctionnelles des neurones sérotoninergiques différenciés chez des patients dépressifs ne répondant pas aux traitements antidépresseurs (Vadodaria et al., 2019a, 2019b).

Enfin, en psychologie, on distingue 5 grands traits de personnalités (« big five ») dont un nommé « neuroticisme » (Goldberg, 1993). Or, ce type de personnalité représente un facteur de risque de développer des troubles anxieux ou des troubles de l'humeur (Li et al., 2019; Xia et al., 2011). De manière intéressante, chez les individus de type « neuroticisme » on observe des modifications de l'expression de la MAO-A ou encore de fixation au niveau du transporteur de la sérotonine SERT (Rodríguez-Ramos et al., 2019; Takano et al., 2007; Tuominen et al., 2017).

La DM est une maladie complexe et la simplifier ou la réduire à l'altération d'un unique neurotransmetteur semble peu pertinent. Tout en considérant ce fait, l'ensemble de ces éléments sont de forts arguments quant à l'implication d'altérations sérotoninergiques dans la DM. Toutefois les études cliniques ne permettent pas d'établir de manière claire et précise la direction dans laquelle l'activité du système sérotoninergique est impliquée dans la DM et l'anxiété. La modélisation des comportements pseudo-anxieux et pseudo-dépressif de la DM chez l'animal a permis une meilleure compréhension de ce système dans la pathologie.

2.2 Modèles animaux des troubles anxio/dépressifs

Comme nous l'avons vu précédemment la DM est une maladie mentale dont l'expression symptomatique et biologique est hétérogène, rendant complexe sa modélisation. L'approche par domaine de critère (RDoC) proposé par Insel et ses collaborateurs permet d'identifier des domaines transnosographiques des maladies psychiatriques (Insel et al., 2010). Cette approche est basée sur la classification d'un domaine selon les circuits neuronaux impliqués et leurs conséquences cliniques tout en prenant compte de leur modulation par des facteurs génétiques, moléculaires et cellulaires. L'approche par RDoC propose plusieurs domaines correspondant à des endophénotypes dont on retrouve certains dans la DM (**tableaux 4**). Les différents concepts (constructs) constituant ces domaines peuvent être appréciés chez l'animal au cours de tests comportementaux. Le domaine de la valence négative est particulièrement étudié dans la DM et plus particulièrement le concept de réponse à une menace potentielle. Ce concept s'exprime cliniquement par de l'anxiété et peut être mesuré chez l'animal au travers de tests basés sur un paradigme « d'environnement conflictuel ». L'anxiété de type conditionnée, impliquant une composante mnésique, peut être mesurée au travers d'expériences utilisant l'association pavlovienne entre un stimulus neutre conditionné (ex: son) et un stimulus aversif non conditionné (ex: choc électrique). Le concept de menace aigue ou prolongé de ce même

domaine peut aussi se manifester cliniquement par un comportement de résignation. Ce comportement est mesurable chez l'animal au travers du test de nage forcé (FST ; test de Porsolt ; (Porsolt et al., 1977)) ou encore par le test de suspension par la queue (TST).

RDoC constructs	RDoC domains	Implicated neurocircuitry	Clinical manifestations
<i>Driving depressive pathophysiology</i>			
Sustained threat	Negative valence	Limbic hyper-activity with dysregulation of the amygdala and the anterior cingulate cortex	Anxious arousal; increased conflict detection; attentional bias to threat; helplessness behavior; punishment sensitivity; avoidance
Arousal and sleep-wakefulness	Arousal and regulatory system	Hypothalamic to thalamic and cortical circuits	Sleep-wake dysregulation and sleep dependent behavioral dysfunctions such as affect regulation; emotional reactivity; impulsivity
Loss	Negative valence	Sustained amygdala reactivity and decreased DLPFC recruitment; increased default mode activity	Sadness; guilt; shame; low self-esteem; worry; rumination; increased self-focus; withdrawal behavior
<i>Maintaining depressive psychopathology</i>			
Attention and cognitive control	Cognitive systems	Circuitry involving top down cognitive control: DLPFC; VLPFC; PPC; the insula and limbic system	Concentrations difficulties; distractibility; low impulse control

Tableau 4: Approche par RDoC de la DM.

D'après Henje Blom et al., 2014.

Les différentes avancées dans le traitement pharmacologique mais aussi dans la compréhension des circuits neuronaux impliqués dans la DM ont été largement permises grâce

à la recherche animale. En effet, plusieurs approches ont été développées pour tenter de modéliser au mieux les symptômes cliniques et la physiopathologie de la DM chez l'animal. La modélisation de la DM doit répondre à trois critères majeurs pour être valide (Belzung and Lemoine, 2011; Willner, 1984):

- le critère de validité de face (face validity): modéliser les symptômes cliniques observés chez l'humain.

- le critère de validité de construction (construct validity): reproduire chez l'animal la physiopathologie de la DM humaine

- le critère de validité prédictive (predictive validity): observer une réponse thérapeutique à des traitements antidépresseurs dont l'efficacité est validée chez l'humain

Il existe plusieurs modèles animaux de la DM qui peuvent être induits par manipulation ou sélection génétique, par injection d'un xénobiotique, par des lésions chirurgicales, par des procédures de stress ou encore des interventions nutritionnelles (Czéh et al., 2016; Krishnan and Nestler, 2011; Planchez et al., 2019; Zemdegs et al., 2019; **tableau 5**). Le choix du modèle dépendra de plusieurs facteurs propres à l'expérience et à l'expérimentateur ainsi que de la question scientifique posée.

Behavioral endpoints

Apathy	Grooming; coat state; nest building
Anhedonia	Cookie test; sucrose preference test
Anxiety	EPM, NSF, OF, light/dark test
Despair	FST, TST
Sociability	social interaction test

Animal models of depression

Induction mechanism	Model
Biological	LPS injections; bulbectomy; corticosterone administration; genetic models; optogenetic manipulations
Psychobiological stress	Learned helplessness; UCMS; social defeat
Early-life adversity	Poor mothering; maternal separation

Tableau 5: Modèles animaux de la DM.

D'après Planchez et al., 2019.

Ici seul le modèle de stress par contention chronique sera abordé en raison de son utilisation au cours des expériences de ce projet de thèse.

Le modèle de stress chronique par contention est un modèle de stress induisant un comportement de type anxio/dépressif chez le rat ou la souris. Il consiste en la contention stricte de l'animal dans un tube étroit et ventilé pendant deux heures. Cette opération se répète quotidiennement sur une durée variable allant de 14 à 28 jours (Jangra et al., 2016; Kim and

Han, 2006). Ce protocole de stress est intéressant car il respecte notamment les 3 critères de validités essentiels aux modèles animaux de la DM. En effet, on observe chez les animaux une augmentation du comportement de résignation, du comportement anxieux et aussi de l'anhédonie consécutivement à la procédure (Seo et al., 2017; Son et al., 2019). Ces observations contribuent à la validité de face, bien que la limite majeure de ce modèle réside dans le fait que le phénotype comportemental n'est que transitoire et ne perdure pas dans le temps. Ce modèle respecte également en partie la validité de construction, à savoir retrouver la physiopathologie de la DM dans le modèle animal. En effet, suite à la procédure de contention chronique on observe une altération de la neurotransmission glutamatergique dans le mPFC et dans l'hippocampe (Chiba et al., 2012; Nasca et al., 2015), ce qui est également le cas chez les patients atteints de DM (Duman et al., 2019). De manière similaire, cette procédure a pour conséquences des altérations structurelles et fonctionnelles de l'amygdale (Jung et al., 2012; Qin et al., 2011), ce qui également le cas au cours de la DM (Nestler et al., 2002). Toutefois en raison du caractère transitoire du phénotype anxio/dépressif induit par cette procédure, il est possible que les mécanismes physiopathologiques sous-jacents ne soient pas pérennes. Enfin, le modèle de stress de contention chronique répond à la validité de prédiction puisque les antidépresseurs permettent de reverser le phénotype anxio/dépressif induit par la procédure (Oh et al., 2013; Seo et al., 2012).

2.3 Altérations sérotoninergiques dans les modèles animaux de troubles anxio/dépressifs

La plupart de ces modèles animaux de dépression respectent le critère de validité de conception à savoir présenter des caractéristiques communes de la physiopathologie de la maladie. C'est en effet le cas en ce qui concerne le système sérotoninergique, dont nous avons vu précédemment qu'il était altéré chez les patients atteints de DM. Ainsi dans les modèles de séparation maternelle ou d'adversité précoce, des études rapportent des modifications significatives des taux de sérotonine dans plusieurs structures limbiques (Ohta et al., 2014; Xue et al., 2013). Ces résultats pourraient notamment s'expliquer par une apoptose importante induisant une diminution du nombre de neurones 5-HT dans le RD (Park et al., 2019). La synthèse de sérotonine est également altérée dans le modèle de dépression inflammatoire induite par le LPS ou encore dans le modèle de bulbectomie (Carabelli et al., 2020; Harkin et

al., 2003; Rodrigues et al., 2018). Les lignées par sélection génétique ayant un comportement de type anxio/dépressif prononcé, présentent aussi des dysfonctionnements du système 5-HT. C'est en effet le cas des rats Flinders (FLS) où l'on observe une synthèse de sérotonine basale diminuée qui est associée à des modifications de distribution et d'expression de récepteurs sérotoninergiques (Nishi et al., 2009; Osterlund et al., 1999). De manière similaire, les souris CD1 « helpless » présentent une diminution du tonus sérotoninergique en raison d'une sensibilité accrue du récepteur 5-HT_{1A} associée à leur phénotype pseudo-dépressif (El Yacoubi et al., 2003). Ce type d'altérations est également retrouvé dans les modèles de stress chronique. Ainsi, le protocole de UCMS provoque une diminution des taux de sérotonine et plus précisément une hypofonction du système sérotoninergique dans le mPFC (Ahmad et al., 2010; Lu et al., 2019). Ce résultat peut être la conséquence de la destruction spécifique des neurones 5-HT du RD projetant vers le mPFC, réduisant l'innervation sérotoninergique de cette structure (Natarajan et al., 2017). On observe la même conséquence dans le protocole de contention de stress chronique avec une altération de la morphologie des neurones 5-HT du RD projetant vers le mPFC. De plus, les courants postsynaptiques excitateurs perçus par ces neurones sont diminués, suggérant une diminution de leur excitabilité (Liu and Aghajanian, 2008). Les altérations du système 5-HT conséquentes au modèle de défaite sociale ont été particulièrement détaillées. Ce type de protocole provoque une diminution des taux de sérotonine associée à des modifications spécifiques du RD (Keeney et al., 2006; Zhang et al., 2012). En outre, les neurones GABA du RD jouent un rôle majeur dans le comportement social des animaux, qui est altéré par cette procédure de stress, notamment en augmentant la fréquence des courants postsynaptiques inhibiteurs sur les neurones 5-HT (Challis et al., 2013; Crawford et al., 2013). Dans le modèle de stress induit par administration chronique de corticostérone, on observe une diminution des courants excitateurs postsynaptiques perçus par les neurones 5-HT du RD (Prouty et al., 2019; Sowa et al., 2019). Ces altérations sont également associées à une diminution de l'excitabilité des neurones 5-HT du RD (Prouty et al., 2019) malgré la diminution de sensibilité du récepteur 5-HT_{1A} dans ce modèle (Rainer et al., 2012). Cette diminution de l'excitabilité pourrait expliquer l'augmentation de l'expression de TPH2 dans le RD dans un modèle similaire (Donner et al., 2012), qui pourrait être un mécanisme de compensation. Enfin, comme dans d'autres modèles de dépression murins, on retrouve une diminution des taux de sérotonine dans le PFC des animaux ayant subi le paradigme de « learned helplessness » (Petty et al., 1992). Cette diminution est associée à l'altération du métabolisme général de la sérotonine ainsi que des modifications d'expression de récepteurs sérotoninergiques (Wu et al., 1999).

L'ensemble de ces données mettent en évidence que **les altérations du système sérotoninergique observés chez les humains se retrouvent également dans les modèles animaux de troubles anxio/dépressifs**. Toutefois, aucune relation causale entre le phénotype dépressif et les dysfonctionnements sérotoninergiques ne peuvent être attribuée à ces résultats. Ces liens de causalités ont été explorés au travers de modèles animaux transgéniques permettant la manipulation spécifique d'éléments du système sérotoninergique. Nous aborderons certains de ces modèles dans la partie traitant de la discussion des résultats.

2.4 Modulation du comportement émotionnel par la sérotonine

L'implication du système sérotoninergique, et de sous-populations de neurones 5-HT, dans les différentes formes de réponse de peur et d'anxiété a été introduit notamment au travers de l'hypothèse de Deakin et Graeff (Deakin and Graeff, 1991). Ce n'est que récemment, avec les avancées technologiques dont l'opto- et la chémo-génétique que le rôle des neurones sérotoninergiques dans ces différents types de comportements a pu être précisé. En tant que neuromodulateur, le système sérotoninergique permet d'adapter la réponse comportementale de peur. En effet l'activation du système 5-HT permet une réponse de type « freezing » face à une menace faible ou modérée. A l'inverse, une menace importante provoquera la mise en place d'une activité locomotrice par le système sérotoninergique pour fuir cette menace (Seo et al., 2019).

De manière plus précise, l'inhibition de l'activité des neurones 5-HT par l'injection intracérébrale dans le RD ou le RM d'un agoniste du récepteur 5-HT_{1A}, le 8-OH-DPAT, induit une anxiolyse (Andrews et al., 1994; Hogg et al., 1994). En accord avec ces résultats, l'activation aigue des neurones 5-HT du RD augmente le comportement anxieux chez la souris (Teissier et al., 2015; Urban et al., 2016). Toutefois, l'effet anxiogénique de l'activation des neurones 5-HT du RD n'est due qu'à une élévation transitoire des taux de 5-HT puisque la stimulation chronique de ces neurones ne modifie pas le comportement anxieux (Urban et al., 2016). Par ailleurs, on observe que l'activation des neurones 5-HT du RD est induite de manière prédominante par des facteurs de stress non-contrôlables (Bland et al., 2003; Grahn et al., 1999).

De façon similaire, l'activation des neurones 5-HT du RM induit le même type de comportement anxieux chez la souris (Ohmura et al., 2014). La réponse anxiogénique induite par les neurones 5-HT du RM est notamment médiée par des projections sérotoninergiques sur

l'hippocampe dorsal (Abela et al., 2020). L'ensemble de ces données suggèrent que l'activation du système 5-HT induit une augmentation du comportement anxieux chez l'animal. Cette notion est notamment confirmée par l'observation d'un comportement de type anxieux chez la souris sans frein inhibiteur du système 5-HT, modélisée par la délétion du récepteur 5-HT_{1A} (Gross et al., 2002; Heisler et al., 1998).

La sérotonine est également impliquée dans la réponse de peur de type conditionnée. En effet, la déplétion du cerveau en sérotonine diminue la réponse de peur en diminuant l'association entre le stimulus conditionné et le stimulus aversif non conditionné (Deryabina et al., 2020). L'amygdale est une structure cérébrale particulièrement impliquée dans ce type de conditionnement. Or, plusieurs études ont mis en évidence que l'activation des neurones 5-HT du RD induit une augmentation de la libération de sérotonine dans l'amygdale au cours de ce type de conditionnement (Amat et al., 1998; Schweimer and Ungless, 2010; Zanoveli et al., 2009). En accord avec ces données, l'activation par optogénétique des projections 5-HT vers l'amygdale augmentent le comportement de type « freezing » et le temps d'extinction de peur consécutif à ce type de conditionnement (Bernabe et al., 2020; Sengupta and Holmes, 2019). A l'inverse, la lésion spécifique des terminaisons nerveuses sérotoninergiques dans l'amygdale diminue l'anxiété et altère également le conditionnement de peur (Johnson et al., 2015). D'autre part, le comportement pseudo-anxieux induit par les projections sérotoninergiques pourrait également être médié par les récepteurs 5-HT_{2C} dans la le noyau du lit de la stria terminalis (Marcinkiewicz et al., 2016).

De manière générale, **l'activation aigüe des neurones sérotoninergiques est responsable de l'augmentation du comportement pseudo-anxieux**, notamment au travers de projections vers l'amygdale (voir **tableau 6**). Le système 5-HT joue également un rôle crucial dans les comportements de peur conditionnée.

Au vue du mécanisme d'action des antidépresseurs ISRS, le comportement de résignation observé dans le FST ou le TST est intimement lié au système sérotoninergique. On observe ainsi que l'activation aigüe des neurones 5-HT du RD induit un effet de type antidépresseur en diminuant le comportement de résignation, ce qui n'est pas le cas pour les neurones 5-HT du RM (Nishitani et al., 2019; Ohmura et al., 2020; Teissier et al., 2015). L'activation chronique des neurones 5-HT du RD induit également un effet de type antidépresseur (Urban et al., 2016). De manière plus précise, la stimulation des terminaisons nerveuses des neurones 5-HT dans l'ATV est suffisante à induire une diminution du comportement de résignation (Ohmura et al., 2020). L'ATV n'est pas la seule structure impliquée dans ce type de comportement. En effet,

on observe que l'activation optogénétique des projections du PFC dans le DR diminue le comportement de résignation chez la souris (Warden et al., 2012). Enfin, une étude rapporte que la durée du temps de nage dans le FST est significativement corrélée aux taux de 5-HT dans le PFC (Pham et al., 2017). Ces résultats soutiennent le rôle essentiel du système 5-HT et plus particulièrement les circuits PFC-RD dans la régulation du comportement de résignation.

Le récepteur 5-HT_{1A} est également impliqué dans ce type de comportement. Dans un premier temps, une étude rapporte que la délétion constitutive du récepteur 5-HT_{1A} diminue significativement le comportement de résignation chez la souris (Heisler et al., 1998). En accord avec ces résultats, la surexpression de ce récepteur augmente le comportement de résignation chez la souris, qui est associé à une diminution de l'activité des neurones 5-HT du RD (Richardson-Jones et al., 2010). Plus précisément, le rôle des hétérorécepteurs 5-HT_{1A} est essentiel dans le comportement de résignation. En effet, l'absence d'un tonus sérotoninergique inhibiteur sur les aires post-synaptiques au cours du développement augmente le temps d'immobilité des animaux dans le FST à l'âge adulte (Richardson-Jones et al., 2011). Le rôle de l'autorécepteur 5-HT_{1A} est également important puisque son inactivation au moyen d'ARNsi induit une diminution significative du comportement de résignation dans le FST (Bortolozzi et al., 2012). Par ailleurs, l'augmentation des taux de sérotonine extracellulaire dans l'hippocampe, permis par l'invalidation génétique du récepteur 5-HT_{1B}, est également associé à une diminution du comportement de résignation dans le FST (Nautiyal et al., 2016). L'ensemble de ces résultats tendent à montrer de manière générale que **l'augmentation de la neurotransmission sérotoninergique, provenant des neurones 5-HT du RD, dans les aires post-synaptiques permet un effet de type antidépresseur (tableau 6).**

	Activation	Anxiety	Brain areas/ neurocircuits	Despair/Depressive-like behavior	Brain areas/ neurocircuits	References
DR 5-HT neurons	Acute	↑	BNST Amygdala	↓	VTA PFC	Urban et al., 2016 Marcinkiewicz et al., 2016 Bocchio et al., 2016 Ohmura et al., 2019
	Chronic	—	Ventral hippocampus	↓	Lateral habenula	Sengupta & Holmes, 2019 Bernabe et al., 2020 Zhang et al., 2018 Warden et al., 2018 Nishitani et al., 2018
MR 5-HT neurons	Acute	↑	Dorsal hippocampus	—		Ohmura et al., 2014
	Chronic	—		—		Abela et al., 2020

Tableau 6: Récapitulatif des conséquences comportementales induites par la manipulation du système sérotoninergique

3. Traitements antidépresseurs

3.1 Réponse aux traitements antidépresseurs

La réponse à un traitement antidépresseur peut être évaluée en fonction de la diminution des symptômes dépressifs ou du score de dépression qui y est associé. On qualifie de non-réponse au traitement antidépresseur lorsque qu'il n'y a pas d'amélioration des symptômes dépressifs ou que celle-ci est très faible. Une réponse de type partielle au traitement est admise lorsque la diminution des symptômes dépressifs est de 25-50%. La diminution d'au moins 50% du score de dépression correspond à une réponse au traitement antidépresseur. Enfin, lorsque seul quelques symptômes résiduels subsistent et que le tableau clinique ne correspond plus au diagnostic du DSM-5 de la DM, on peut considérer la rémission du patient (Nierenberg and DeCecco, 2001). Les données de la littérature rapportent que seul un tiers des patients atteignent une rémission suite à l'initiation d'un traitement antidépresseur (Trivedi et al., 2006). De plus, les probabilités de rémission sont largement diminuées à partir de la non réponse thérapeutique à un second traitement antidépresseur (Rush et al., 2006). En dehors des limites d'efficacité s'ajoute le long délai d'action de la réponse thérapeutique qui varie de 2 à 8 semaines. Il est intéressant de noter que la combinaison de la psychothérapie et du traitement antidépresseur augmente non seulement le taux de rémission mais diminue également le délai d'action des antidépresseurs (de Jonghe et al., 2001; Keller et al., 2000). En outre, le taux de rechute dans la DM est particulièrement élevé. En effet, on constate que 50% des patients ayant eu un épisode dépressif caractérisé souffriront d'un autre épisode au cours des cinq prochaines années (Belsher and Costello, 1988; Lewinsohn et al., 1994). La récurrence des ces épisodes dépressifs caractérisés donne également un trait de chronicité à la pathologie, augmentant également le délai de réponse aux antidépresseurs (Keller et al., 1998). Toutefois, la découverte d'antidépresseurs à action rapide comme la kétamine représentent un nouvel espoir dans le traitement et la prise en charge de la DM (Gerhard et al., 2016). La re-découverte des psychédéliques représente aussi une nouvelle opportunité thérapeutique dans les troubles de l'humeur. En effet, plusieurs études cliniques ont mis en évidence un effet bénéfique de ces molécules (DMT, psilocybine, MDMA, LSD, mescaline) à fort potentiel neuroplastique (Vollenweider and Preller, 2020).

3.2 Les classes d'antidépresseurs: focus sur les ISRS

Les premiers antidépresseurs, découverts par serendipité, furent les antidépresseurs tricycliques (TCA) et les inhibiteurs de la monoamine oxydase (IMAO). Ces classes d'antidépresseurs inhibent respectivement la recapture des monoamines et leur dégradation par la monoamine oxydase. Comme nous l'avons vu précédemment, leurs mécanismes d'action ont largement orienté les travaux de recherche sur l'hypothèse d'une déficience monoaminergique dans la DM. On distingue aujourd'hui plusieurs classes d'antidépresseurs en plus des TCA et des IMAO, dont les mécanismes d'action et les cibles varient principalement autour de la modulation des neurotransmissions monoaminergique. Nous nous intéresserons ici uniquement aux Inhibiteurs Sélectifs de la Recapture de Sérotonine (ISRS; **tableau 7**) en raison de l'utilisation de la fluoxétine (Prozac) au cours des travaux de ce projet de thèse. La fluoxétine est un antidépresseur de seconde génération qui inhibe la recapture de sérotonine en se fixant sur le transporteur SERT pour lequel elle a une forte affinité ($K_i=1,4$ nM ; Owens et al., 2001).

Molécule	SERT affinity (Ki)	Therapeutical doses	References
Fluvoaxime	6,5 nM	50 - 300 mg/j	Inazu et al., 2001
Citalopram	4,4 nM	20 - 60 mg/j	Ben-Daniel et al., 2008
Escitalopram	1,1 nM	10 - 20 mg/j	Owens et al., 2002
Paroxétine	1,1 nM	20 - 50 mg/j	Thomas et al., 1987
Fluoxétine	1,4 nM	20 - 60 mg/j	Owens et al., 2002
Sertraline	0,3 - 3,3 nM	25 - 200 mg/j	Owens et al., 1997

Tableau 7: Antidépresseurs de la classe des Inhibiteurs Sélectifs de la Recapture de Sérotonine.

D'après Ben-Daniel et al., 2008; Inazu et al., 2001; Owens et al., 1997, 2001; Thomas et al., 1987. Fenêtre des doses thérapeutiques: Haute Autorité de Santé (HAS)

3.3 Administration aigüe d'un ISRS

L'administration aigüe d'un ISRS provoque une augmentation drastique des taux extracellulaires de sérotonine ($[5\text{-HT}]_{\text{ext}}$). Cette augmentation est un mécanisme essentiel de leur efficacité puisque la déplétion en sérotonine par la PCPA prévient l'effet antidépresseur de la fluoxétine (Page et al., 1999). Plus précisément, les études de microdialyse mettent en évidence une augmentation de 300% à 600% des taux de $[5\text{-HT}]_{\text{ext}}$ dans le RD et de 150% à 200% dans le PFC chez le rat (Bel and Artigas, 1992; Hervás and Artigas, 1998). Cette différence d'élévation des taux de $[5\text{-HT}]_{\text{ext}}$ entre le RD et les zones de projections peut s'expliquer par le fait que le RD est particulièrement enrichi en SERT comparé à d'autres structures du cerveau antérieur (Bengel et al., 1997). Parallèlement, les études d'électrophysiologie *in vivo* rapportent que l'administration aigüe d'un ISRS diminue l'activité de décharge des neurones 5-HT dans cette structure regroupant les corps cellulaires sérotoninergiques (Chaput et al., 1986; Czachura and Rasmussen, 2000; Sprouse et al., 2000). Cette inhibition est médiée par l'autorécepteur 5HT_{1A} somatodendritique dont l'activation est augmentée par l'élévation des taux endogène de $[5\text{-HT}]_{\text{ext}}$ consécutive au blocage du SERT (Adell et al., 1993; Romero et al., 2003; Sharp and Hjorth, 1990). Cette diminution de l'activité de décharge des neurones du RD a pour conséquence une diminution de la libération de sérotonine dans les aires de projection.

Ce frein biologique exercé par les autorécepteurs explique, du moins en partie, le fait que les effets thérapeutiques de ces molécules ne se manifestent pas lors des premiers jours de traitement. Il est par conséquent intéressant d'examiner les effets induits au cours de l'administration chronique d'ISRS.

3.4 Traitement chronique avec un ISRS

3.4.1 Désensibilisation du récepteur 5-HT_{1A}

Au fur et à mesure que le traitement avec un ISRS se prolonge, notamment entre 14 et 28 jours, on observe un rétablissement progressif de la fréquence de décharge des neurones 5-HT

du RD (Chaput et al., 1986; DE Montigny et al., 1992; El Mansari et al., 2005). Cette normalisation s'explique par une levée d'inhibition imputée à la désensibilisation de l'autorécepteur 5-HT_{1A} consécutive à sa stimulation continue par les taux élevés de 5-HT endogènes dans le RD. De manière intéressante, des études indiquent que l'apparition des effets thérapeutiques comportementaux des ISRS chez l'animal coïncide avec la désensibilisation des récepteurs 5-HT_{1A} (Popa et al., 2010).

Cette désensibilisation peut s'observer au travers d'une diminution de la réponse induite par un agoniste après un traitement chronique. En effet, la dose nécessaire d'un agoniste du récepteur 5-HT_{1A}, le 8-OH-DPAT, pour induire une diminution de la fréquence de décharge des neurones 5-HT du RD est plus importante après un traitement à long terme avec un ISRS, confirmant sa désensibilisation (Chaput et al., 1986; de Montigny et al., 1990; Rainer et al., 2012). De plus, la désensibilisation de ce récepteur s'observe notamment au cours d'études de microdialyse où la diminution des [5-HT]_{ext} en réponse au 8-OH-DPAT est plus faible comparé à un animal n'ayant pas reçu d'antidépresseur de manière prolongé (Invernizzi et al., 1994; Rossi et al., 2008). En outre, on observe que la diminution de la température corporelle induite par l'injection d'un agoniste du récepteur 5-HT_{1A} est significativement plus faible après un traitement chronique par un ISRS (Rainer et al., 2012). La désensibilisation des autorécepteurs 5-HT_{1A} permet donc de rétablir la fréquence de décharge des neurones 5-HT du RD qui s'accompagne alors d'une élévation plus importantes des [5-HT]_{ext} dans les aires de projections que lors d'une administration unique d'ISRS (Bel and Artigas, 1993; Wegener et al., 2003). Cet effet de désensibilisation semble spécifique de l'autorécepteur 5-HT_{1A}, car un traitement à long terme ne modifie pas la sensibilité des hétérorécepteurs 5-HT_{1A} (Piñeyro and Blier, 1999). Au contraire, le renforcement du tonus sérotoninergique sur l'hétérorécepteur 5-HT_{1A} contribuerait aux effets antidépresseurs des ISRS (Piñeyro and Blier, 1999; Santarelli et al., 2003). D'autre part, comme évoqué précédemment, l'implication de l'autorécepteur 5-HT_{1A} dans le comportement de résignation s'apprécie également au travers de son inactivation dans différents modèles murins. De cette manière, la délétion génétique de l'autorécepteur 5-HT_{1A} ou son inactivation par ARNsi au moyen d'une injection intra-RD diminue significativement le comportement de résignation des animaux (Bortolozzi et al., 2012; Richardson-Jones et al., 2010).

La désensibilisation de l'autorécepteur 5-HT_{1A} peut s'expliquer par une diminution de fixation de ses ligands (Rossi et al., 2008; Shen et al., 2002) ou encore une internalisation membranaire du récepteur (Riad et al., 2004). D'autres études suggèrent également que la

désensibilisation pourrait s'opérer par la diminution du signal de transduction par les protéines Gi (Lesch and Manji, 1992; Lesch et al., 1992).

Dans un contexte translationnel, des agonistes partiels (buspirone) ou des antagonistes (pindolol) du récepteur 5-HT_{1A} ont été utilisés comme stratégie de potentialisation des traitements antidépresseurs ISRS, notamment pour diminuer leur délai d'action ou améliorer la réponse thérapeutique chez des patients résistants à cette classe d'antidépresseurs (Celada et al., 2013). De cette manière, les antagonistes des récepteurs 5-HT_{1A} qui empêchent la fixation de la 5-HT sur le récepteur 5-HT_{1A} a pour conséquence de prévenir la diminution transitoire de l'activité de décharge des neurones 5-HT observée lors de l'initiation du traitement ISRS et de potentialiser la libération de 5-HT dans les aires de projection sérotoninergiques (Dreshfield et al., 1996; Guilloux et al., 2006; Romero et al., 1996). La potentialisation de la libération de sérotonine dans les aires de projections en réponse à un ISRS est également observée chez des souris ayant une inactivation spécifique de l'autorécepteur 5-HT_{1A} (Bortolozzi et al., 2012). Cette stratégie thérapeutique a notamment conduit au développement de nouvelles molécules présentant un profil pharmacologique qui cible l'inhibition du SERT, couplant également une activité d'agoniste partiel du 5-HT_{1A}. C'est notamment le cas du vilazodone (Schwartz et al., 2011) et de la vortioxétine (Sanchez et al., 2015).

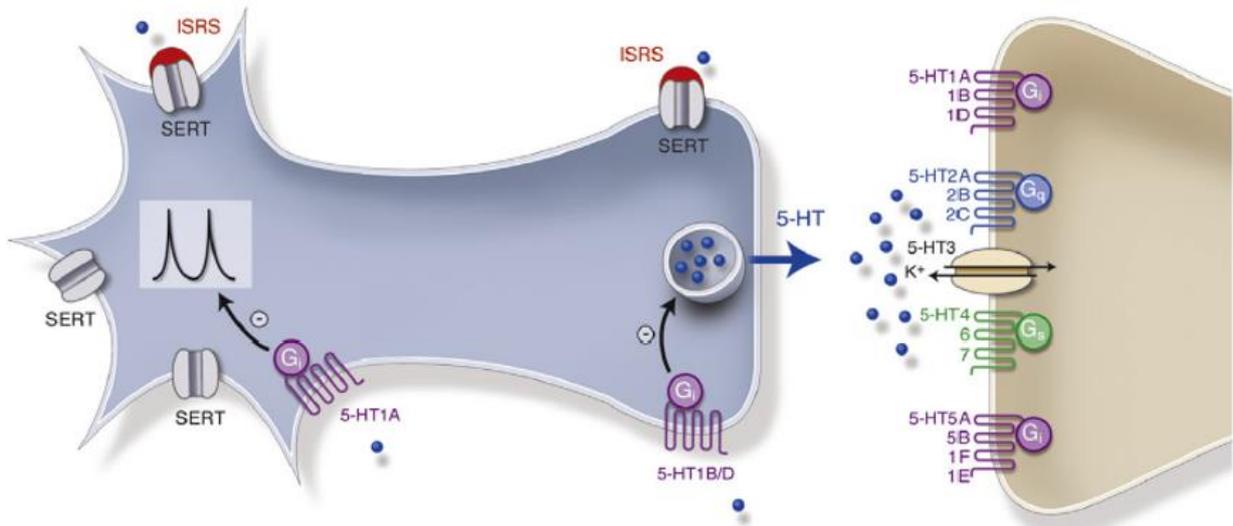
En ce qui concerne la désensibilisation de l'autorécepteur 5-HT_{1B}, les résultats sont contradictoires. En effet, les études sur tranche de Raphé rapportent une désensibilisation du récepteur (el Mansari and Blier, 1996; Piñeyro and Blier, 1996) tandis que des études au niveau d'aires postsynaptiques n'observent pas le même phénomène (Schoups and De Potter, 1988). Toutefois, l'implication du récepteur 5-HT_{1B} dans la réponse antidépresseur des ISRS peut varier d'une structure à une autre. De cette manière, il semblerait que le récepteur 5-HT_{1B} soit désensibilisé au niveau du cortex frontal mais pas dans l'hippocampe ventrale comme le suggère le maintien du frein inhibiteur médié par le récepteur 5-HT_{1B} sur la libération de sérotonine dans cette structure (Gardier et al., 2003).

La désensibilisation de l'autorécepteur 5-HT_{1A} est donc un processus clef de la réponse thérapeutique des antidépresseurs ISRS (figure 18). Toutefois, d'autres mécanismes biologiques consécutifs à leur administration chronique sont également impliqués dans leurs effets thérapeutiques.

Presynaptic 5-HT neuron

Postsynaptic neuron

1. Acute administration



2. Chronic administration

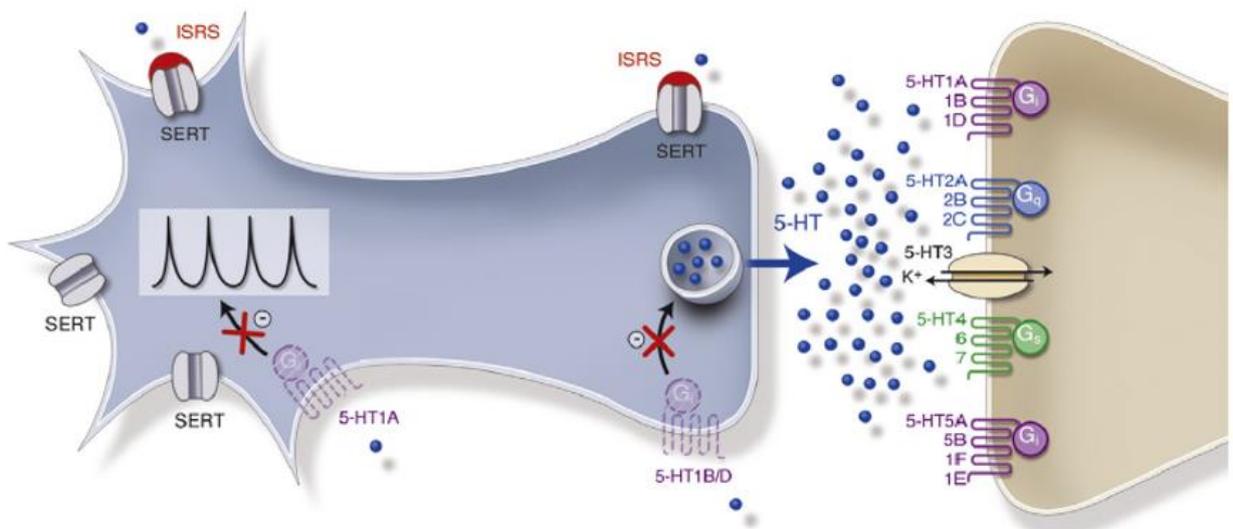


Figure 18: Mécanisme d'action des ISRS impliquant la désensibilisation du récepteur 5-HT_{1A} au cours d'un traitement chronique.

D'après David and Gardier, 2016.

3.4.2 Neuroplasticité

L'effet thérapeutique des antidépresseurs est également soutenu par d'autres mécanismes cellulaires et moléculaires. Dans un premier temps, on observe que les traitements ISRS chroniques permettent une augmentation de la plasticité synaptique en reversant les altérations induites par le stress chronique (Castrén, 2014). Ces effets sont notamment médiés par le facteur neurotrophique BDNF, dont les traitements ISRS chronique augmentent les taux ainsi que ceux de son récepteur TrkB, dans l'hippocampe et le PFC (Nibuya et al., 1995). De plus, la délétion de BDNF dans le cerveau prévient l'effet thérapeutique des antidépresseurs (Monteggia et al., 2004). Enfin, l'augmentation des taux de BDNF résulte notamment de l'activation de la voie de signalisation mTORC1, qui est un acteur clef de la réponse antidépresseur (Ignácio et al., 2016). De plus, cette voie de signalisation est également une cible effectrice des nouveaux antidépresseurs à action rapide comme la kétamine (Duman et al., 2016).

3.4.3 Neurogénèse

La neurogénèse a fait l'objet d'une intense recherche dans le domaine de la DM et de la réponse antidépresseur. Ainsi, une étude *post-mortem* rapporte qu'un traitement antidépresseur chronique permet d'augmenter la prolifération des cellules hippocampiques chez l'humain (Boldrini et al., 2009). Ces résultats sont en accord avec plusieurs études précliniques indiquant qu'un traitement antidépresseur chronique est associé à une augmentation de la neurogénèse chez l'animal (Malberg et al., 2000) et permet de reverser les effets délétères induit par un stress (Malberg and Duman, 2003). A l'inverse, l'inhibition radiophysique ou génétique de la neurogénèse prévient l'effet thérapeutique des antidépresseurs (Li et al., 2008; Santarelli et al., 2003). Toutefois, certaines études n'observent pas de modification de la neurogénèse par les antidépresseurs (Cowen et al., 2008; Hanson et al., 2011) tandis que d'autres mettent en évidence des effets thérapeutiques des antidépresseurs indépendants de la neurogénèse (David et al., 2009). Au vu de l'ensemble des ces résultats nuancés, et bien que l'implication de la neurogénèse dans l'effet thérapeutique des antidépresseurs ne soit clairement définis, ce phénomène biologique semble toutefois contribuer en partie à leur effets bénéfiques.

Cette partie nous rend compte de **l'implication de la sérotonine dans la modulation du comportement émotionnel, dans la physiopathologie de la DM ainsi que dans la réponse antidépresseur**. La modulation du système 5-HT par l'insuline ferait de celui-ci un candidat approprié dans la recherche d'une neurotransmission par laquelle l'insuline modulerait le

comportement émotionnel. Dès lors, nous pouvons nous questionner sur l'existence de telles interactions entre ces deux systèmes.

PARTIE 5:

MODULATION DU SYSTEME

SEROTONINERGIQUE

PAR L'INSULINE:

IMPLICATION DANS LES TROUBLES

EMOTIONNELS

1. Effet direct de l'insuline sur le système sérotoninergique

La littérature scientifique est très restreinte en ce qui concerne la modulation du système sérotoninergique par l'insuline. L'injection d'insuline périphérique augmente les taux plasmatiques et cérébraux du L-Trp, acide aminé précurseur de la sérotonine (Fernstrom and Wurtman, 1972; MacKenzie and Trulson, 1978). On observe par ailleurs, que l'injection périphérique d'insuline diminue les taux plasmatiques d'acides aminés à chaîne courte (BCAA) en favorisant leur catabolisme au niveau hépatique (Shin et al., 2014). Ce même résultat est observé chez l'humain en réponse à un traitement chronique INI (Scherer et al., 2017). Or, les BCAA sont en compétition avec le L-Trp pour le transporteur LAT1 au niveau de la BHE (Fernstrom, 2013). Par conséquent, en diminuant les taux plasmatiques de BCAA, l'insuline favorise l'influx du L-Trp vers le cerveau au travers de la BHE. De ce fait, en augmentant la biodisponibilité du L-Trp au niveau central, ces résultats suggèrent que l'insuline augmente également les taux de sérotonine cérébraux. D'autre part, des études *in vitro* ont mis en évidence la capacité de l'insuline à inhiber l'activité des MAO-A et -B (Kleinridders et al., 2015). L'augmentation des taux de sérotonine pourrait donc également résulter de l'inhibition de sa dégradation. Toutefois, l'effet de l'insuline sur le métabolisme de la sérotonine n'est pas encore clairement défini et reste controversé. En effet, d'autres études indiquent que l'administration périphérique d'insuline augmente le renouvellement et donc le métabolisme de la 5-HT. De cette manière, l'injection i.p d'insuline augmente les taux du métabolite 5-HIAA dans le liquide céphalorachidien et dans le cerveau, suggérant une augmentation de la dégradation de la sérotonine et donc une diminution de sa concentration au niveau central (Danguir et al., 1984; Juskiewicz, 1985; Orosco and Nicolaidis, 1994; Smythe et al., 1985). En outre, l'injection périphérique d'insuline résulte en une diminution de la fréquence de décharge des neurones 5-HT du Raphé Pallidus et du Raphé Obscurus (Martín-Cora et al., 2002). Nuançant ces résultats, l'injection intraveineuse d'insuline ne modifie pas la fréquence de décharge des neurones 5-HT du RD (Fornal et al., 1989). Toutefois, l'interprétation de ces résultats est sujette à précaution en raison de l'effet hypoglycémiant de l'insuline qui résulte d'une injection périphérique. Par conséquent, les modifications du système 5-HT en réponse à l'injection périphérique d'insuline pourraient être le résultat d'un effet métabolique confondant.

L'injection icv permet d'outrepasser une hypoglycémie périphérique confondante. De cette manière, en utilisant cette voie d'administration, on observe une augmentation des taux

de 5-HT et de 5-HIAA mesuré par microdialyse dans le Raphé magnus (Balali Dehkordi et al., 2019). Ces résultats suggèrent que l'action centrale de l'insuline stimule le métabolisme global de la sérotonine. Bien que la présence de l'ARNm de l'IR dans les neurones 5-HT suggèrent une action directe de l'insuline (Okaty et al., 2015), ces effets peuvent également être médiés par d'autres populations neuronales sensibles à l'insuline dont les projections modulent le système 5-HT. De plus, l'expression de l'ARNm du récepteur à IGF-1 dans les neurones 5-HT ne permet pas d'exclure une modulation de ces neurones par l'insuline à travers ce récepteur (Okaty et al., 2015).

Les résultats de la littérature ne permettent pas de conclure sur un possible effet direct de l'insuline sur les neurones 5-HT du RD. L'utilisation de techniques mesurant directement l'impact fonctionnel de l'insuline sur des neurones 5-HT isolés, comme l'électrophysiologie sur tranche, permettraient d'apporter de nouveaux éléments de réponse convaincants.

2. Convergence des voies de signalisation de l'insuline et de la sérotonine

L'expression de l'IR est particulièrement abondante dans le cortex et dans l'hippocampe qui sont également des cibles importantes du système sérotoninergique, notamment dans la régulation des émotions mais aussi dans la réponse antidépresseur. Comme nous l'avons vu précédemment, l'insuline et la sérotonine sont toutes les deux capables de moduler la plasticité synaptique, ainsi que la neurogénèse (Aberg et al., 2003; Lv et al., 2020). De manière intéressante, l'insulino-résistance induite par des modèles génétiques (db/db) ou environnementaux (HFD) est associée à une altération de la neurogénèse hippocampique (Murata et al., 2017; Nam et al., 2017; Okuyama et al., 2018), suggérant le rôle crucial de la signalisation de l'insuline dans ces processus biologiques. L'activation de la voie de l'IR par l'insuline augmente notamment la phosphorylation d'Akt et de GSK-3 β qui sont tous les deux impliqués dans la neurogénèse hippocampique (Eom and Jope, 2009b; Kisoh et al., 2017). De plus, la sérotonine, notamment au travers de l'hétérorécepteur 5-HT_{1A} fortement exprimé dans l'hippocampe, permet également la stimulation de la neurogénèse au travers de ces mêmes éléments moléculaires (Alenina and Klempin, 2015). On observe par ailleurs que la résistance à l'insuline cérébrale induite par un régime HFD de longue durée est associée à une diminution

de l'activation de la voie PI3K/Akt/GsK-3 β dans l'hippocampe en réponse à la sérotonine (Papazoglou et al., 2015).

D'autre part, l'élément mTORC1, impliqué dans les processus de plasticité synaptique et dans la réponse aux antidépresseurs à action rapide, est également activé par l'insuline et par la sérotonine (Lesch and Waider, 2012). De cette manière, l'insuline et la sérotonine sont capables de réguler la plasticité synaptique en stimulant PSD-95 au travers de la voie PI3K/mTOR (Jones et al., 2009; Lee et al., 2016). Cet effet est abrogé par le régime HFD où la résistance à l'insuline cérébrale est associée à des altérations de la densité des épines dendritiques et de l'intégrité synaptique (Arnold et al., 2014; Stranahan et al., 2008). De plus, on observe une augmentation des taux de BDNF dans l'ATV et le NAc chez les animaux résistants à l'insuline et présentant un phénotype anxiodépressif induit par le régime HFD (Sharma and Fulton, 2013). Or, l'augmentation de BDNF dans ces structures a été établie comme étant anxiogène et dépressiogène (Berton et al., 2006), contrairement à ses effets dans le cortex et l'hippocampe. En effet, il est admis que l'augmentation du tonus sérotoninergique dans les aires post-synaptiques en réponse à un antidépresseur stimule la synthèse de BDNF, notamment par la phosphorylation de CREB (Rafa-Zabłocka et al., 2018). De manière réciproque, BDNF augmente significativement l'expression de TPH2 dans les neurones du RD, et peut également moduler leur activité de décharge (Celada et al., 1996; Siuciak et al., 1998). Enfin, l'expression de BDNF module également l'expression du transporteur de la sérotonine SERT et influence ainsi sa recapture (Guiard et al., 2008b). Par conséquent, la diminution de l'expression de BDNF induite par l'insulino-résistance centrale pourrait également engendrer des altérations du système 5-HT.

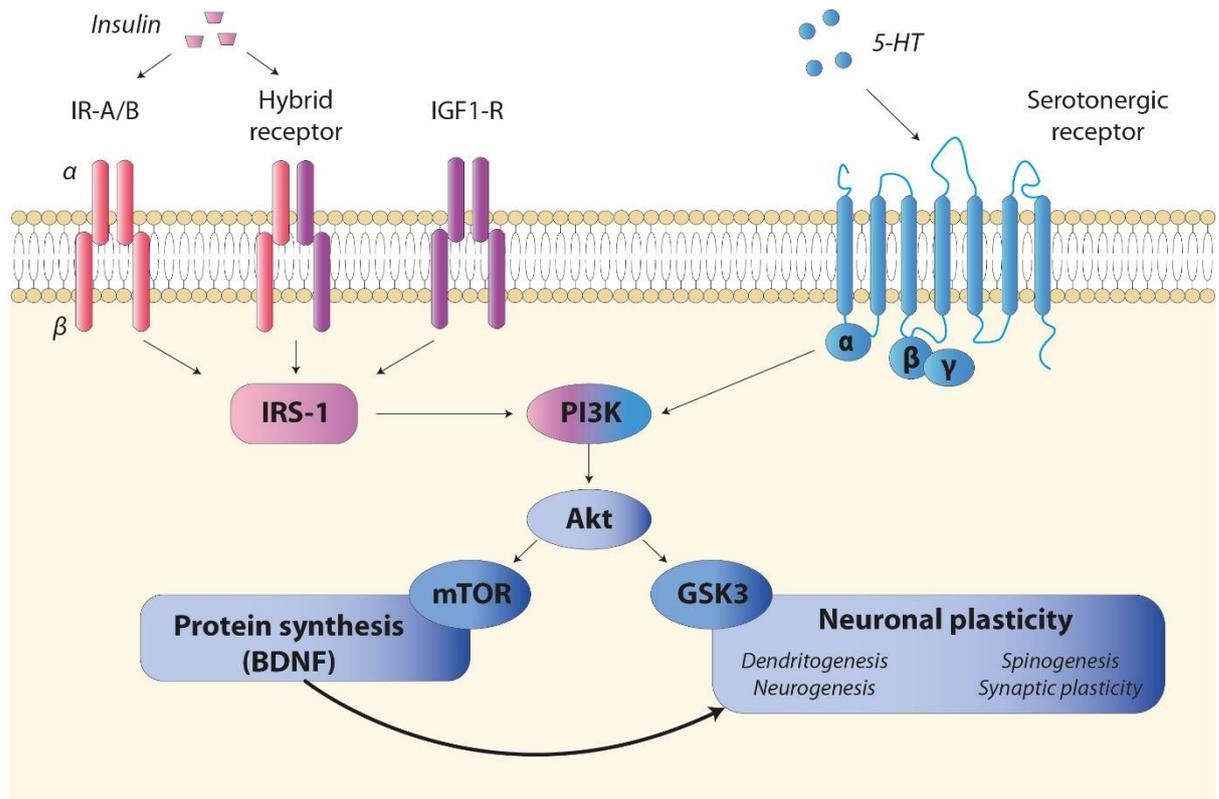


Figure 19: Convergence des voies de signalisation du récepteur à l'insuline et des récepteurs sérotoninergiques.

D'après Martin et al., 2021.

L'ensemble de ces résultats indique que l'insuline et la sérotonine partagent des voies de signalisation convergentes qui pourraient se potentialiser (**figure 19**). Par conséquent **l'insulino-résistance cérébrale peut causer une diminution de l'activation de voie de signalisation en réponse à la sérotonine**. Cette atténuation du signal peut réduire l'activité de neurogénèse ou de plasticité synaptique qui sont intimement liées à la régulation des émotions ou encore à la réponse antidépresseur.

3. Effets antidépresseurs des antidiabétiques et modulation du système sérotoninergique

Au cours de la partie 3, nous avons mentionné les effets antidépresseurs de plusieurs agents antidiabétiques à travers divers mécanismes d'actions. De manière intéressante, les effets antidépresseurs de ces molécules ont été, pour certaines, associés à des modulations du système sérotoninergique dans plusieurs modèles de dépression comorbide, ou non, à une insulino-résistance (**tableau 8**).

De cette manière la restauration de l'action de l'insuline par injection i.p chronique permet de reverser le comportement de résignation dans le modèle de DT1 induit par la STZ en réversant la diminution des taux de sérotonine, vraisemblablement via la diminution de l'activité de la MAO-A/B (Gupta et al., 2014). De la même manière, on observe que le traitement à l'insuline permet également de normaliser la libération de 5-HT dans le PFC en réponse à un stress aigu, alors même que celle-ci est altérée et associée à une augmentation du comportement de type « freezing » chez les animaux traités par STZ (Miyata et al., 2007).

D'autre part, un traitement subchronique par la metformine permet de prévenir la diminution des taux corticaux de sérotonine qui sont associés au comportement de résignation comorbide au DT1 induit par le traitement STZ (Shivavedi et al., 2017). Cet effet est également observé dans des modèles de troubles émotionnels comorbides au DT2 avec d'autres antidiabétiques. Ainsi, les effets de type antidépresseur du vildagliptin, de la pioglitazone et du glyburide sont associés à l'augmentation et la normalisation des taux de sérotonine corticaux et hippocampiques (Soliman et al., 2020). De manière intéressante, les modulations du système 5-HT associées aux effets de type antidépresseur des agents antidiabétiques ont également été observées dans des modèles de troubles émotionnels non comorbides à un DT1 ou de DT2. En effet, la pioglitazone permet de prévenir l'apparition d'un comportement de résignation et d'anhédonie dans un modèle de dépression induit par le LPS (Liao et al., 2017). Cet antidiabétique permet aussi de reverser ce comportement de type pseudo-dépressif dans un modèle de dépression induit par la réserpine (Soliman et al., 2020). Au cours de ces deux études, l'effet de type antidépresseur de la pioglitazone est associé à la prévention de la chute des taux de sérotonine corticaux et hippocampique ou de leur augmentation. Enfin, dans un modèle de stress chronique par administration de corticostérone, les effets de types antidépresseur de

l'adiponon sont associés à des modulations du métabolisme sérotoninergique dans le RD (Nicolas et al., 2018).

L'ensemble de ces données suggèrent que **l'amélioration de la sensibilité à l'insuline par les agents antidiabétiques ou insulino-sensibilisants permet de reverser ou d'améliorer le comportement de type anxio/dépressif au travers d'une normalisation du système sérotoninergique.**

Molecule	Class	Dose (mg/kg)	Treatment duration	Model	Main effects	Impact on 5-HT system	References
Glyburide	Sulphonylureas	5	28 days	HFD + STZ injection or reserpine-induced depressive-like behavior male Wistar rats	Antidepressants	Increased amount of hippocampal and cortical 5-HT	Soliman et al., 2020
Vildagliptin	Gliptine	10					
Pioglitazone	Thiazolidinedione	10					
Metformin	Biguanides	100					
Pioglitazone	Thiazolidinedione	20	Once before LPS icv injection	LPS male C57BL/6J	Antidepressants and anxiolytic	Reduced amount of hippocampal IDO1 and 5-HT _{1A}	Liao et al., 2017
Metformin	Biguanides	25	11 days	STZ + foot shock rats	Antidepressants	Increased amount of cortical 5-HT	Shivavedi et al., 2017
		300	28 days	HFD male C57Bl/6J	Antidepressants and anxiolytic	Increased 5-HT neuron excitability and increased amount of hippocampal 5-HT	Zemdegs et al., 2019
		200	28 days	UCMS male C57Bl/6J	Metformin potentialises fluoxetine antidepressant effect	Not studied	Poggini et al., 2019

Tableau 8: Modulations sérotoninergiques associées aux effets antidépresseurs de différents agents antidiabétiques.

D'après Martin et al., 2021.

OBJECTIFS:

L'action de l'insuline au sein du SNC a été particulièrement attribuée à un rôle relevant de la régulation du métabolisme énergétique. Toutefois, plusieurs preuves tendent à démontrer son implication dans d'autres processus centraux, dont notamment le comportement émotionnel. L'observation d'une forte incidence de DM chez des individus atteints de DT2, dont la résistance à l'insuline est une caractéristique majeure, suggère que certaines fonctions centrales de l'insuline en lien avec le comportement émotionnel, puissent être altérées en conditions physiopathologiques. Cependant, les mécanismes d'action par lesquelles l'insuline pourrait moduler le comportement émotionnel sont à ce jour inconnus. Le système sérotoninergique a été intensément étudié au regard de ses fonctions régulatrices de l'humeur, de son implication dans la DM et de la réponse antidépresseur. Par conséquent, il est un candidat probant par lequel l'insuline pourrait moduler le comportement émotionnel. Si tel est le cas, la diminution de l'efficacité de l'insuline sur ce système en condition d'insulino-résistance pourrait être responsable d'effets délétères sur le comportement émotionnel. C'est pourquoi nous émettons l'hypothèse que:

L'insulino-résistance spécifique du système sérotoninergique central est responsable du développement des troubles de l'humeur associés au diabète de type 2

Les travaux de recherche de cette thèse sont articulés autour de quatre axes principaux permettant de répondre à notre problématique:

1) Quel est l'effet de l'insuline au niveau central sur le comportement émotionnel et sur le système 5-HT ?

En utilisant plusieurs approches fonctionnelles complémentaires comme l'électrophysiologie et la microdialyse, nous avons pu déterminer dans quelles mesures l'insuline pouvait moduler le système sérotoninergique.

Pour évaluer l'impact de l'insuline sur le comportement émotionnel nous avons utilisé des paradigmes expérimentaux validés permettant de mesurer le comportement pseudo-anxieux et pseudo-dépressif de l'animal en réponse à l'injection intranasale d'insuline. L'intégration de ces deux résultats a été évaluée au cours de tests comportementaux visant à apprécier l'effet permissif du système 5-HT dans la réponse comportementale à l'injection intranasale d'insuline.

2) L'état de sensibilité à l'insuline modifie-t-il l'activité du système 5-HT et les comportements anxio/dépressifs qui y sont associés ?

Afin de tester notre hypothèse nécessitant un contexte physiopathologique, nous avons utilisé un modèle animal de troubles émotionnels comorbide à une insulino-résistance induite par un régime de type obésogène (HFD). Nous avons, dans un premier, évalué si les troubles émotionnels comorbides au DT2 étaient associés à une résistance à l'insuline des neurones 5-HT du Raphé dorsal. Dans un second temps, nous avons déterminé dans quelles mesures l'amélioration de la sensibilité à l'insuline des neurones 5-HT par un traitement pharmacologique était associée à une amélioration des troubles émotionnels comorbide au DT2.

3) Quelles sont les conséquences comportementales et fonctionnelles d'une résistance à l'insuline sélective des neurones 5-HT ?

De manière à déterminer le rôle de la signalisation de l'insuline sur la neurotransmission sérotoninergique dans la régulation du comportement émotionnel, nous avons créé un modèle murin triple transgénique présentant une invalidation spécifique du récepteur à l'insuline dans les neurones sérotoninergiques. Les souris SeIRKO (Serotonin Insulin Receptor Knock-Out) ont été soumises à une batterie de test comportementaux et nous avons également évalué l'état de fonctionnement du système sérotoninergique par différentes approches. Cet axe a permis d'évaluer dans quelle mesure un défaut de signalisation de l'insuline dans cette population neuronale altère le comportement émotionnel des souris.

4) L'action centrale de l'insuline peut-elle potentialiser la réponse à un traitement antidépresseur de type ISRS ?

Pour ce faire, nous avons évalué si l'injection intranasale d'insuline pouvait potentialiser l'effet de la fluoxétine dans des tests établis de criblage de molécules aux effets de type antidépresseur. Ces tests ont été menés sur des animaux naïfs mais également en utilisant un modèle de stress de contention chronique modélisant un état transitoire de type pseudo-dépressif.

MATERIELS

ET

METHODES

Cette section décrit uniquement les techniques que j'ai moi-même utilisé au cours de ce projet de thèse.

1. Autorisation à expérimenter

L'ensemble des expérimentations animales réalisé au cours de ce projet a été conduit dans le strict respect de la législation en vigueur concernant le bien-être animal (directive 86/609 de l'UE). Ces expériences ont été réalisées avec l'accord du comité d'éthique de Bordeaux (CEEA-050), ayant évalué et validé l'ensemble des procédures sous l'aval du ministère de l'Enseignement Supérieur, de la Recherche et de l'Innovation (APAFIS #2019101414486982 ; #2017122216179189 ; #2017021414531843 ; #2018092214479240).

2. Animaux

L'ensembles des expériences ont été réalisées sur des souris mâles adultes âgées de 10 à 18 semaines.

2.1 Hébergement

Les différentes lignées de souris utilisées au cours de ce projet de thèse ont été hébergées en cage collective ou cage individuelle lors de conditions particulières le nécessitant et en accord avec notre autorisation à expérimenter. Les conditions d'hébergement des animaux étaient maintenues à une température de $23 \pm 2^{\circ}\text{C}$, une humidité relative de 50 à 70% et un rythme circadien de 12h (début du cycle lumineux à 8h à une intensité de 200 lux) avec accès à l'eau de boisson et à la nourriture *ad libitum*.

2.2 Régimes alimentaires

Nous avons utilisé différents régimes alimentaires au cours de nos expériences. En effet, les animaux ont pu être nourris à un régime de type standard (STD) ou bien de type obésogène (High-Fat-Diet ; HFD). Le régime STD (A04 ; Safe Diets, Augy, France) fournit 8,4% des apports énergétiques par les lipides tandis que le régime HFD (#235HF ; Safe Diets, Augy, France) fournit 45% des apports énergétiques par les lipides (voir **tableau 9**).

Diet composition	STD	HFD
Proteins (kcal%)	26	25
Carbohydrates (kcal%)	60	35
Lipids (kcal%)	3	45
Tryptophan (g/kg)	1,9	2,1
Energy content (kcal/kg dry diet)	2790	4720

Tableau 9: Composition nutritionnelle des régimes standard (STD) et obésogène (HFD).

2.3 Souris sauvages

Les souris sauvages que nous avons utilisées sont des souris de la souche C57BL/6JRj obtenues auprès des laboratoires Janvier (Janvier Labs, Le Genest-Saint-Isle, France). Ces souris ont notamment été utilisées au cours des tests évaluant les effets de l'injection intranasale d'insuline, des études de microdialyse en réponse à l'insuline mais aussi dans l'étude évaluant l'impact du régime HFD et du traitement chronique à la metformine sur le comportement émotionnel et le système 5-HT.

2.4 Lignées transgéniques

2.4.1 Lignée Pet1-cre-mCherry

Au cours des expériences d'électrophysiologie *ex-vivo*, nous avons utilisé les souris Pet1-cre-mCherry dont le fond génétique est la souche C57BL/6JRj afin de pouvoir visualiser les neurones sérotoninergiques par fluorescence. En effet, ces souris expriment la protéine fluorescente mCherry sous contrôle du facteur de transcription Pet-1, spécifique des neurones 5-HT. Ces souris ont été obtenues par croisement des lignées des souris Pet1-cre (don généreux du Dr Patricia Gaspar, Institut du fer à Moulin, Paris ; [Kiyasova et al., 2011](#)) et des souris B6.Cg-Gt(ROSA)26Sortm9(CAG-tdTomato)Hze/J du laboratoire Jackson (The Jackson Laboratory, Bar Harbor, USA). Tous les animaux Pet1-cre-mcherry utilisés dans ces expériences sont issus de l'élevage de l'animalerie de notre laboratoire.

2.4.2 Lignée Insulin Receptor lox/lox (IR^{lox/lox})

Les souris IR^{lox/lox} (B6.129S4(FVB)-Insrtm1Khn/J) ont été acquises auprès du laboratoire Jackson (The Jackson Laboratory, Bar Harbor, USA). Ces souris présentent des sites loxP, reconnus spécifiquement par l'enzyme cre-recombinase, flanqués de part et d'autre de l'exon 4 du récepteur à l'insuline. Les animaux utilisés dans ces expériences sont issus de l'élevage de cette lignée dans l'animalerie de notre laboratoire.

2.4.3 Lignée SeIRKO (Serotonergic Insulin Receptor Knock-Out; Pet1-cre :: IR^{lox/lox} :: mCherry)

Les souris SeIRKO présentent une délétion génétique développementale du récepteur à l'insuline sélective des neurones sérotoninergiques. Cette lignée a été obtenue par croisement des lignées Pet1-cre-mCherry et IR^{lox/lox} puis produite au sein de l'élevage de l'animalerie de notre laboratoire (**figure 20**). Les souris KO pour l'IR (SeIRKO) présentent le génotype suivant:

Cre + :: Flox : +/+. Les contrôles « WT » que nous avons utilisés au cours des expériences sont leurs congénères exprimant la cre-recombinase et ayant le génotype suivant: Cre : + :: Flox : -/-. Lors des expériences d'électrophysiologie *ex-vivo* sur tranche de Raphé dorsal, nous avons utilisé des souris KO ou WT triple transgéniques, homozygotes ou hétérozygotes pour la protéine fluorescente mCherry.

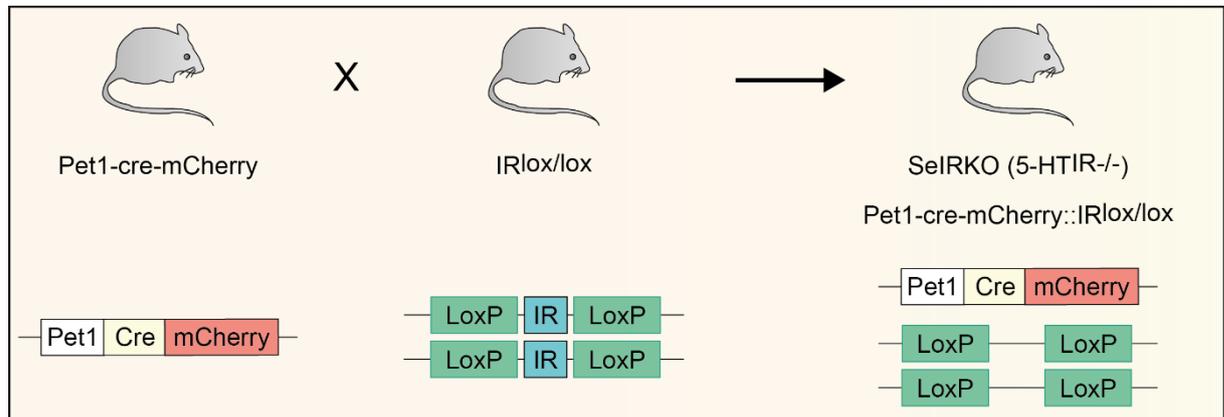


Figure 20: Schéma du croisement de la lignée SeIRKO.

3. Traitements pharmacologiques

Toutes les injections *in vivo* sur les souris ont été effectuées à un volume d'injection de masse corporelle de 10µl/g.

3.1 Traitement aiguë à la fluoxétine

La fluoxétine (0927, Tocris-Biotechne, Noyal Châtillon sur Seiche, France) a été diluée dans une solution de NaCl 0,9% à une concentration de 1,8 mg/ml avant d'être administrée par voie intrapéritonéale. L'injection d'une dose de 18 mg/kg a eu lieu 45 minutes avant le TST, excepté lors de la combinaison entre l'injection intranasale d'insuline et intrapéritonéale de fluoxétine qui s'est effectuée au même moment, soit 60 minutes avant le TST.

3.2 Traitement subchronique

3.2.1 Traitement PCPA

Au cours d'une expérience évaluant l'implication du système sérotoninergique dans le comportement émotionnel, nous avons utilisé un inhibiteur de l'enzyme TPH2 qui est la DL-P-chlorophenylalanine-methyl-ester-hydrochlorate (PCPA, C3635, Sigma, Saint Quentin Fallavier, France). La PCPA a été diluée dans une solution de NaCl 0,9% à une concentration de 12,5 mg/ml. Les animaux ont été traités à une dose de 125 mg/kg, administrée deux fois par jour (09h et 18h) pendant trois jours avant le test.

Le traitement des animaux au cours du stress de contention chronique sera détaillé au cours de la procédure en question.

3.3 Injection intranasale d'insuline

Nous avons utilisé l'injection intranasale afin d'évaluer spécifiquement l'action cérébrale de l'insuline au cours de tests comportementaux. Avant le jour du test, les animaux ont été habitués à l'injection intranasale d'une solution saline (0,9%) pendant 4 jours selon une procédure adaptée de Hanson et ses collaborateurs (Hanson et al., 2013). L'insuline humaine (I2643, Sigma, Saint Quentin Fallavier, France) a été diluée dans une solution de NaCl 0,9% afin d'obtenir une concentration de 7 mg/ml. Lors des expériences, les souris sont mises à jeun 18h avant l'injection intranasale d'un volume de 5µl par narine, correspondant à une dose de 2IU. Les expériences ont eu lieu 60 minutes après l'administration intranasale.

4. Tests métaboliques

4.1 Test de « fasting refeeding »

La prise alimentaire a été évaluée après une mise à jeun de 24h des animaux, placés en cage individuelle dans une pièce calme et faiblement éclairée (80 lux). Au temps t_0 , les animaux ont à nouveau eu accès à la nourriture standard A04 *ad libitum*. La prise alimentaire a été mesurée toutes les heures sur une durée totale de 3 heures.

4.2 Mesure de la glycémie à jeun

Après une mise à jeun de 5 heures des animaux en cage individuelle dans une pièce calme et faiblement éclairé (80 lux), nous avons évalué la glycémie des animaux. Pour ce faire nous avons utilisé des glycomètres à utilisation clinique (Accu-check, Roche, Bâle, Suisse) qui nous ont permis d'évaluer la glycémie des animaux aux temps t_0 , t_{15} , t_{30} , t_{45} et t_{60} minutes. Le prélèvement sanguin a été réalisé par une incision à la queue.

4.3 Test de tolérance au glucose

La tolérance au glucose des animaux a été évaluée en réponse à un bolus de glucose (2 g/kg), administré par voie intrapéritonéale. Le glucose a été dilué dans une solution de NaCl 0,9% à une concentration de 200 g/l. Les animaux ont été mis à jeun en cage individuelle dans une pièce calme et faiblement éclairée (80 lux) pendant 5 heures. La glycémie a ensuite été mesurée à l'aide d'un glycomètre (Accu-check, Roche, Bâle, Suisse) suite à l'incision de la queue des animaux au temps t_0 (juste avant l'injection du glucose), t_{15} , t_{30} , t_{45} , t_{60} , t_{90} et t_{120} minutes.

5. Tests comportementaux

Les animaux ont été soumis à une batterie de tests comportementaux, réalisés du moins stressant au plus stressant. Nous avons respecté un intervalle minimum de trois jours entre chaque test comportemental, excepté pour l'expérience de stress de contention chronique en raison de contraintes expérimentales dues à cette procédure. Les animaux ont été habitués à l'expérimentateur pendant trois jours de « handling » précédant les tests comportementaux.

5.1 Tests mesurant le comportement pseudo-anxieux

5.1.1 Test du champ ouvert (Open Field ; OF)

Le test de l'OF (**figure 21**) est un test basé sur le comportement éthologique des rongeurs à éviter les espaces ouverts non protégés pouvant représenter une menace (Walsh and Cummins, 1976). Ce test est notamment sensible à l'effet anxiolytique de multiples molécules (Prut and Belzung, 2003). Le dispositif consiste en une arène de 40 x 40 x 25 cm que les animaux explorent librement pendant 10 minutes qui est, dans nos conditions expérimentales, faiblement éclairée (30 lux). L'activité des animaux est enregistrée par vidéotracking à l'aide du logiciel Smart (PanLab, Barcelone, Espagne). De cette manière, nous pouvons entre autre, mesurer le temps que passe les animaux dans le centre de l'arène, un carré de 400 cm², paramètre reflétant l'anxiété de l'animal. L'activité locomotrice des animaux est également évaluée au cours de ce test.



Figure 21: Le champ ouvert.

5.1.2 Test du labyrinthe en croix surélevée (Elevated Plus Maze ; EPM)

L'EPM (**figure 22**) est un test basé sur un conflit-environnemental entre le comportement exploratoire de la souris et la peur du vide et des espaces ouverts (Walf and Frye, 2007). Le dispositif est composé d'un bras fermé et d'un bras ouvert, situé à 120 cm du sol. Un comportement de type anxieux se reflète dans le temps important que passe l'animal dans les bras fermés du dispositif en comparaison aux bras ouverts, qui sont anxiogènes. L'exploration de l'EPM est également analysée par vidéotracking au cours d'une période de 5 minutes durant laquelle nous mesurons le temps passé de l'animal dans les bras ouverts et les bras fermés. Le test est réalisé sous un éclairage de 30 lux également.

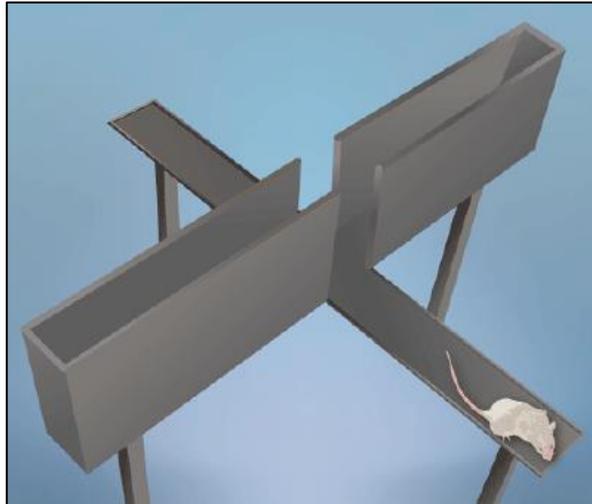


Figure 22: Le labyrinthe en croix surélevée.

5.1.3 Test de la boîte clair/obscur

La boîte clair/obscur (Light/Dark box test; L/D; **figure 23**) est un test basé sur un conflit environnemental classiquement utilisé pour évaluer le comportement anxieux des animaux (Belzung et al., 1987). Le dispositif comprend deux compartiments, l'un clos étant le compartiment obscur, l'autre ouvert étant le compartiment clair ou lumineux qui représente 2/3 de la surface totale du dispositif. La souris est placée dans ce dispositif éclairé à 120 lux qu'elle peut explorer librement pendant 8 minutes. Un comportement de type anxieux peut s'observer

chez des animaux passant un temps important dans le compartiment obscur où ils se sentent en sécurité. Le temps passé dans les deux compartiments est mesuré par vidéotracking et est utilisé comme paramètre de comparaison entre les groupes expérimentaux.



Figure 23: La boîte clair/obscur.

5.1.4 Alimentation supprimée par néophobie (Novelty Suppressed Feeding test; NSF)

Le NSF (**figure 24**) est également un test basé sur un conflit-environnemental permettant de mesurer l'anxiété de l'animal au travers du temps que l'animal met à se nourrir dans un nouvel environnement (Santarelli et al., 2001). Ainsi, ce conflit environnemental oppose la motivation de l'animal à se nourrir après un jeûne prolongé et la néophobie environnementale du dispositif de l'OF, fortement éclairé. Après une mise à jeun de 24h, les animaux sont placés dans l'arène de l'OF, recouverte de sciure, dans laquelle se trouve au centre deux croquettes placées sur un cercle de papier blanc. La latence à se nourrir est chronométrée avec un temps limite de 10 minutes au bout duquel le test se termine automatiquement. A la fin du test, l'animal est replacé dans sa cage avec accès *ad libitum* à la nourriture. Pour des raisons techniques liées aux conditions d'expérimentation, la prise alimentaire des animaux n'a pas été mesurée directement à la suite de ce test pendant 5 minutes mais au cours d'un test spécifiquement dédié à la mesure de ce paramètre. Le temps de latence est utilisé comme paramètre reflétant le comportement anxieux entre les différents groupes expérimentaux.



Figure 24: Alimentation supprimé par néophobie.

5.2 Test mesurant le comportement de résignation

5.2.1 Test de suspension par la queue (Tail Suspension Test; TST)

Le TST (**figure 25**) est un test mesurant le comportement de résignation, qui est un des symptômes de la dépression majeure, évalué au travers de l'approche par RDoC (Can et al., 2012). Le dispositif (BioSeb, Vitrolles, France) est composé de 3 compartiments séparés par une cloison et présentant un crochet par lequel la queue de l'animal est accrochée au moyen d'un scotch. Le temps d'immobilité totale de l'animal est automatiquement mesuré par le dispositif sur une période de 6 minutes. Plus un animal sera résigné et plus son temps d'immobilité au cours du test sera important.

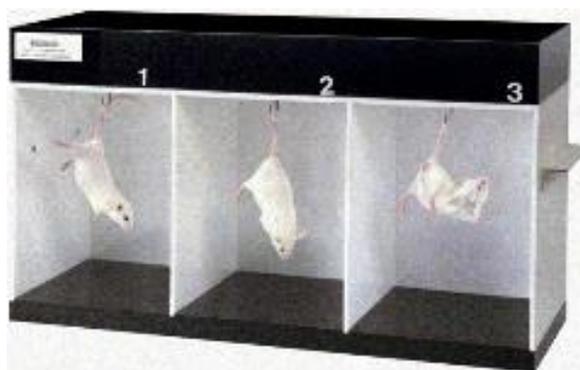


Figure 25: Test de suspension par la queue.

6. Modèle de stress de contention chronique

6.1 Procédure

Nous avons utilisé au cours de l'axe 4, le modèle de stress de contention chronique adapté du protocole de Son et ses collaborateurs (Son et al., 2019) afin de modéliser un phénotype anxio/dépressif chez la souris. La procédure expérimentale consiste en une contention quotidienne dans des tubes falcon de 50 ml, ventilés, pendant 2 heures (de 09h à 11h), et cela, sur une durée de 14 jours (**figure 26**). Au cours de la contention, le stress est accentué par l'exposition des souris à une lumière puissante (300 lux).

6.2 Traitements et groupe expérimentaux

Les animaux ont été répartis en quatre groupes expérimentaux selon leur traitement pharmacologique (**figure 26**):

- véhicule (NaCl 0,9%) i.p/ véhicule intranasale: Veh
- véhicule i.p / insuline intranasale 2IU: INI
- fluoxétine 18 mg/kg i.p / véhicule intranasale 2IU: FLX
- combinaison fluoxétine i.p / insuline intranasale 2IU: INI + FLX

Avant le début de la procédure de stress, les animaux ont été acclimatés et habitués à l'expérimentateur pendant 7 jours. Au cours des 7 premiers jours de la procédure, les animaux ont été habitués à l'injection intranasale d'une solution véhicule saline 0,9% pendant 7 jours consécutifs, les après-midi. Le début des traitements pharmacologiques a débuté 8 jours après le début de la procédure de stress de contention chronique. Enfin, les traitements ont duré 8 jours avant le premier test comportemental.

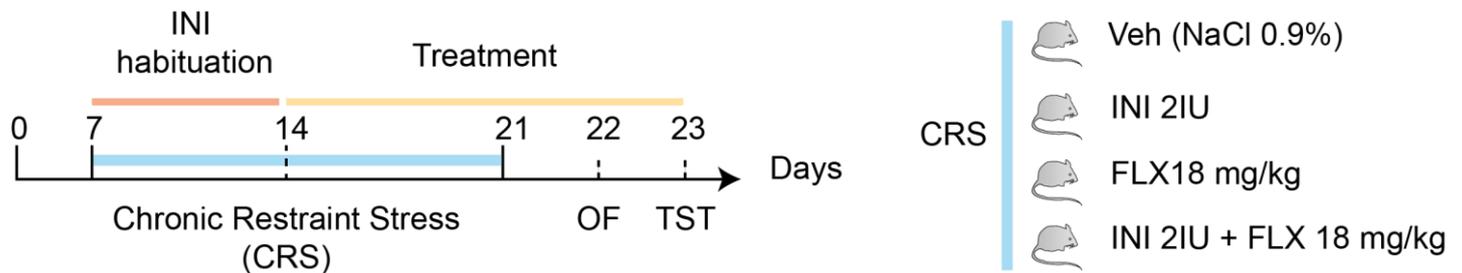


Figure 26: Procédure expérimentale du stress de contention chronique.

7. Electrophysiologie

7.1 Electrophysiologie *in vivo*

L'activité de fréquence de décharge des neurones 5-HT du RD a également été mesurée au travers d'enregistrements extracellulaires *in vivo*. Les souris ont été, dans un premier temps, anesthésiées à l'aide d'hydrate de chloral (400 mg/kg i.p) avant d'être placées dans un cadre stéréotaxique. Une micropipette en verre (Stoelting, UK) contenant une solution de NaCl (2M) et dont l'impédance moyenne était de 4-7 MW a été placée dans le RD (AP: 0 mm; L: 0 mm; V: -2,5 à -4mm). L'identification des neurones 5-HT a été réalisée selon les critères établis de la littérature scientifique, à savoir: une fréquence de décharge lente (0,5-2,5 Hz) et régulière (0,8-1,2 ms) ainsi qu'une forme bi- ou triphasique des potentiels d'action (Aghajanian & Vandermaelen 1982).

Au cours de l'expérience, après une baseline de 60 minutes, des doses cumulatives de 0,75 UI/kg d'insuline ont été injectées par voie i.p aux temps t0, t50 et t100 minutes. A partir du temps t0, les variations de l'activité de décharge des neurones 5-HT du RD ont été enregistrées pendant 150 min. Afin d'évaluer le rôle du récepteur 5-HT1A dans la réponse à l'insuline des neurones 5-HT, un groupe d'animaux a été prétraité avec le WAY100635, un antagoniste du

récepteur 5HT1A, par voie i.p 60 min avant la première injection i.p d'insuline (t0). Les enregistrements électrophysiologiques in vivo ont été réalisés à l'aide du logiciel Spike 2 (Spike 2 v6.09, Cambridge electronic design, UK).

7.2 Electrophysiologie ex vivo/patch clamp

7.2.1 Procédure

Les souris Pet1-cre-mCherry ont été anesthésiées à l'aide d'un mélange d'exagon/lidocaïne (300/30 mg/kg ; i.p) afin de réaliser une perfusion intracardiaque sur cœur battant d'une solution de NMDG à 4°C (**tableau 10**). Le cerveau a ensuite rapidement été disséqué pour obtenir des tranches de Raphé dorsal de 250 µm à l'aide d'un vibratome (VT1000S, Leica Biosystems, Wetzlar, Allemagne) dans cette même solution oxygénée au carbogène (5 % CO₂; 95% O₂). Les tranches de RD ont ensuite été transférées dans une solution d'aCSF oxygénée (**tableau 10**) à 34 °C pendant 14 minutes. Suite à cette étape de régénération, les tranches de RD ont été transférées dans un milieu de repos constitué d'aCSF oxygéné à température ambiante, au moins une heure avant d'être placées sur la plateforme d'enregistrement d'électrophysiologie *ex-vivo*.

7.2.2 Enregistrement des neurones 5-HT du RD

Suite à leur transfert sur la plateforme d'enregistrement, les neurones 5-HT sont perfusés de manière continue par une solution d'aCSF oxygénée à température ambiante dont le débit est de 2 à 3 ml/min. Ils sont visualisés à l'aide d'un microscope à épifluorescence (Nikon) permettant d'observer la protéine mCherry exprimée par les neurones 5-HT. Les pipettes de patch-clamp ont été formées à l'aide d'une étireuse (MODEL P1000 ; Sutter Instrument, Novato, USA) à partir de capillaire en borosilicate (Ø ext: 1,5 mm ; Ø int: 1,17 mm ; World Precision Instruments, Hertfordshire, UK) dont la résistance était de 4 à 6 MΩ. Les pipettes d'enregistrements ont été remplies d'une solution de Kgluconate (**tableau 11**) utilisées en mode

whole-cell pour enregistrer les paramètres intrinsèques des neurones ou bien les courants postsynaptiques excitateurs en présence d'antagoniste du récepteur GABA_A (gabazine / SR 95531 hydrobromide, 5 μM ; 1262, Tocris-Biotechne, Noyal Châtillon sur Seiche, France) . Lors des enregistrements des courants postsynaptiques inhibiteurs, les pipettes ont été remplies d'une solution de chlorure de césium (**tableau 11**) en présence d'antagonistes des récepteurs NMDA (DAP-5, 10 μM ; 0106, Tocris-Biotechne, Noyal Châtillon sur Seiche, France) et AMPA/kainate (CNQX, 10 μM ; 0190, Tocris-Biotechne, Noyal Châtillon sur Seiche, France). Enfin, lors des enregistrements en mode cell-attached, les pipettes d'enregistrement ont été remplies d'aCSF.

Les enregistrements ont été réalisés au travers d'un amplificateur Multiclamp 700B (Molecular devices, San José, USA), dont le signal digital a été acquis par une Digidata 1440A (Molecular devices, San José, USA) et filtré à une fréquence de 2 kHz à l'aide du logiciel pClamp 10.5 (Molecular devices, San José, USA). La capacitance cellulaire ainsi que celle des pipettes a été compensée, bien que ce ne soit pas le cas en ce qui concerne le potentiel de jonction. En raison de l'hétérogénéité électrophysiologique des neurones 5-HT, l'enregistrement de leurs propriétés intrinsèques a été réalisé en les maintenant à un potentiel membranaire de repos de -60 mV en mode Iclamp. Les courbes intensité-voltage ont été réalisées au travers de protocoles d'injection de courants hyperpolarisants de -80 à 110 pA par créneaux incrémentiels de 10 pA en mode whole-cell. La relation courant-potentiel d'action a été évaluée au travers d'un protocole d'injection de courants dépolarisants incrémentiels par créneaux de 100, 200 et 300 pA. En ce qui concerne l'analyse de la fréquence de décharge des neurones 5-HT, les enregistrements ont été réalisés en whole-cell au cours de l'axe 2 et en mode cell-attached au cours de l'axe 1. Au cours des études utilisant des outils pharmacologiques, l'analyse des paramètres électrophysiologiques a été réalisée au cours de la dernière minute d'une application de la drogue d'une durée de 10 minutes.

aCSF composition		NMDG composition	
pH: 7,3 -7,4		pH: 7,3 -7,4	
Osmolarity: 300 - 310 mOsM		Osmolarity: 300 - 310 mOsM	
<u>Molecule</u>	<u>Concentration (mM)</u>	<u>Molecule</u>	<u>Concentration (mM)</u>
NaCl	124	HEPES	20
KCl	2,5	NaH ₂ PO ₄	1,25
NaH ₂ PO ₄	1,25	MgCl ₂	7
MgCl ₂	2	CaCl ₂	0,5
CaCl ₂	2,5	NaHCO ₃	28
NaHCO ₃	25	D-Glucose	8
D-Glucose	2,5	L(+)-Ascorbate	5
		Na-Pyruvate	3
		Thiourea	2
		NMDG	93
		HCl	93

Tableau 10: Composition des solutions externes utilisées en électrophysiologie ex-vivo.

CsCl composition		K-gluconate composition	
pH: 7,3 -7,4		pH: 7,3 -7,4	
Osmolarity: 280 - 290 mOsM		Osmolarity: 280 - 290 mOsM	
<u>Molecule</u>	<u>Concentration (mM)</u>	<u>Molecule</u>	<u>Concentration (mM)</u>
NaCl	3,6	K-gluconate	138
CsCl	140	Na-gluconate	4
HEPES	10	HEPES	10
MgCl ₂	1	MgCl ₂	4
Na-EGTA	0,1	Na-EGTA	5
Na-GTP	0,4	Na-GTP	0,4
Na-ATP	2	Na-ATP	2

Tableau 11: Composition des solutions internes utilisées en électrophysiologie ex-vivo.

8. Statistiques

L'ensemble des résultats statistiques de cette étude, réalisé à l'aide du logiciel GraphPad Prism 8.0 (GraphPAD Software, San Diego, USA), est compilé dans l'**annexe I**. L'identification de valeurs aberrantes « outliers » a été réalisée avec le test de Rout ou de Grubb en fonction de l'hétérogénéité de la population d'individus étudiée.

8.1 Distribution Gaussienne

Dans un premier temps, la distribution Gaussienne des échantillons des différentes populations d'individus a été déterminée à l'aide du test de Shapiro-Wilk, en utilisant un intervalle de confiance de 95%. Ce même intervalle de confiance a également été utilisé pour l'ensemble des tests statistiques réalisés.

8.2 Test statistiques

Lors d'une comparaison entre deux populations dont la distribution des échantillons est Normale, nous avons utilisé le test paramétrique de Student (t-test). Lorsque ce n'était pas le cas, nous avons utilisé le test non paramétrique de Mann-Whitney. Dans le cas des études électrophysiologiques mesurant la fréquence de décharge des neurones sérotoninergiques avant et après perfusion d'une drogue, nous avons utilisé le test approprié de manière apparié. Pour certaines expériences, nous avons utilisé un test de Student par comparaison d'une valeur fixe. C'est notamment le cas des analyses de valeurs normalisées en pourcentage où la valeur de comparaison du test a été fixée à 100.

En ce qui concerne les expériences impliquant un seul facteur de variabilité et comparant au moins trois populations d'individus, nous avons utilisé une analyse de variance à un facteur (one-way ANOVA) en condition paramétrique et une analyse unidirectionnelle de la variance sur rang (test de Kruskal-Wallis) en condition non paramétrique.

Au cours d'expériences impliquant deux facteurs de variabilité et comprenant au moins trois populations d'individus, nous avons utilisé une analyse de variance à deux facteurs (two-way ANOVA), effectuée en mesures répétées si l'expérience le nécessitait.

8.3 Analyse Post-Hoc

Les comparaisons entre populations d'individus ont été réalisées à l'aide de test post-hoc lorsque le test ANOVA ou de Kruskal-Wallis était significativement statistique. Suite à une ANOVA, nous avons utilisé le test de Tuckey pour des comparaisons multiples entre toutes les populations d'individus. Le test de Sidack a quant à lui été utilisé lors de comparaisons au sein de populations ne partageant qu'un seul facteur de variabilité lors d'analyse de variance à deux facteurs de variabilité. Lors de l'analyse unidirectionnelle de la variance sur rang (test de Kruskal-Wallis), les comparaisons multiples entre chaque population d'individus ont été réalisées à l'aide du test de Dunn.

Résultats

Et

Interprétations Expérimentales

PARTIE I:

EFFET DE L'INSULINE AU NIVEAU CENTRAL

SUR LE COMPORTEMENT EMOTIONNEL

ET SUR LE SYSTEME 5-HT

Dans ce premier axe du projet, j'ai réalisé les expériences d'électrophysiologie par patch-clamp ainsi que toutes les expériences métaboliques et comportementales relatives à l'injection intranasale d'insuline. L'étude de microdialyse (Figure 28.A-C) a été effectuée par Bruno Guiard et Sébastien Bullich de l'université de Toulouse tandis que les dosages tissulaires de sérotonine (Figure 31.A-E) ont été réalisés par Philippe De Deurwaerdere de l'INCLIA (Bordeaux). Les expériences d'hybridation *in situ* du récepteur à l'insuline (Figure 27.A) ont été réalisées par Daniela Cota, Vincent Simon et Samantha James du Neurocentre Magendie (Bordeaux).

1. Modulation de l'activité des neurones 5-HT du Raphé dorsal par l'insuline

En premier lieu, nous avons évalué la présence du récepteur à l'insuline dans les neurones 5-HT du RD. En utilisant la technique d'hybridation *in situ*, nous avons pu ainsi observer la présence de l'ARNm du récepteur à l'insuline dans les neurones sérotoninergiques du RD, colocalisé par un marquage spécifique contre TPH2 (**figure 27.A**). Comme la littérature le suggère, nous avons également observé la présence de l'IR de façon non colocalisé avec TPH2, ce qui implique que d'autres populations neuronales ou gliales expriment également ce récepteur au sein du RD. Afin d'étudier la fonctionnalité de ce récepteur au sein de cette population neuronale, nous avons enregistré l'activité des neurones 5-HT en réponse à l'insuline par électrophysiologie *ex-vivo* sur tranche de RD chez la souris Pet1-cre-mCherry (**figure 27.B**). En réponse à une concentration de 300 nM d'insuline, la fréquence de décharge des neurones 5-HT du RD augmente significativement (**figure 27.F**), ce qui correspond à une augmentation significative de $163,7 \pm 21$ % par rapport à leur fréquence de décharge basale (**figure 27.C**).

Afin de réaliser un contrôle négatif de ce premier résultat, nous avons évalué la réponse à l'insuline des neurones 5-HT en présence d'un antagoniste de l'IR, S961. La pré-incubation des tranches de RD avec S961, à une concentration de 100 nM, empêche l'augmentation de la fréquence de décharge des neurones 5-HT (**figure 27.H**). On n'observe ainsi aucune différence de l'activité des neurones 5-HT en réponse à l'insuline par rapport à leur fréquence basale en présence de S961 (**figure 27.C**). Ces données mettent en évidence l'action nécessaire de

l'insuline au travers de son récepteur pour moduler positivement la fréquence de décharge des neurones 5-HT.

Etant donnée l'affinité de l'insuline pour le récepteur IGF-1, nous avons par ailleurs vérifié que l'effet observé en réponse à l'insuline n'était pas médié par ce récepteur. En présence de 0,5 μ M de PPP, un inhibiteur du récepteur à IGF-1, nous observons également une augmentation significative de la fréquence de décharge des neurones 5-HT en réponse à l'insuline (**figure 27.G**). Ce résultat correspond à une augmentation significative de $117,6 \pm 6\%$ par rapport à leur valeur basale (**figure 27.C**). De manière intéressante, on observe que l'augmentation de fréquence de décharge en réponse à l'insuline est significativement plus faible lors de la pré-incubation avec la PPP comparé à la condition contrôle aCSF (**figure 27.C**).

Nous avons évalué dans un second temps, les modifications éventuelles des courants postsynaptiques excitateurs (EPSC) ou inhibiteurs (IPSC) spontanés perçus par les neurones 5-HT en réponse à l'insuline. Aucune modification de la fréquence des EPSC (**figure 27.D**) ou des IPSC (**figure 27.E**) n'a été observé en réponse à l'insuline.

Collectivement, ces résultats suggèrent que l'augmentation de la fréquence de décharge des neurones 5-HT du RD en réponse à l'insuline est directement médiée par le récepteur à l'insuline, indépendamment de la modulation de partenaires présynaptiques GABAergiques ou glutamatergiques.

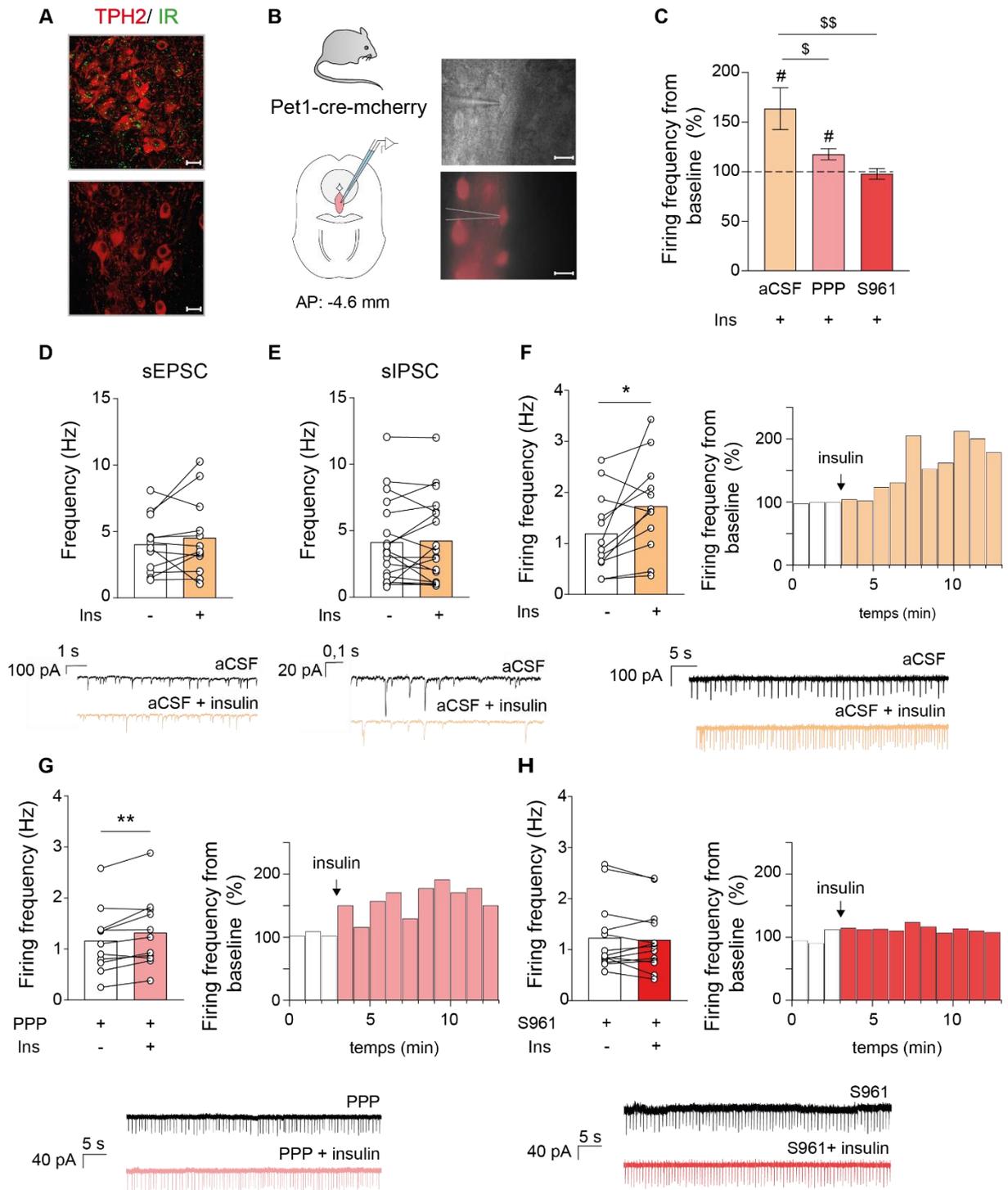


Figure 27: L'insuline module positivement l'activité des neurones sérotoninergiques du Raphé dorsal.

A. Images par microscopie confocale de l'hybridation *in situ* de l'ARNm du récepteur à l'insuline (IR; vert), colocalisé avec le marquage TPH2 (rouge), enzyme spécifique des neurones 5-HT, dans le RD. Panel haut: sonde ARNm antisens; panel bas: contrôle avec sonde ARNm sens. Echelle: 10 μ M. **B.** Electrophysiologie *ex-vivo* sur tranche de RD par patch-clamp. L'utilisation des souris Pet-1-cre-mCherry permet de visualiser les neurones 5-HT du RD par fluorescence. Echelle: 10 μ M. **C.** Fréquence de décharge des neurones 5-HT en réponse à l'insuline en présence de différents antagonistes. PPP, 0,5 μ M: antagoniste IGF1-R; S961, 100 nM: antagoniste IR. **D.** Mesure des courants postsynaptiques excitateurs spontanés en réponse à l'insuline (300 nM) avec trace représentative. **E.** Mesure des courants postsynaptiques inhibiteurs spontanés en réponse à l'insuline avec trace représentative. **F.** Fréquence de décharge des neurones 5-HT en réponse à l'insuline avec trace représentative. Panel de droite: représentation de la fréquence de décharge au cours du temps par intervalle de 1 min. **G.** Fréquence de décharge des neurones 5-HT en réponse à l'insuline en présence de l'antagoniste à IGF-1R, PPP (0,5 μ M), avec trace représentative. Panel de droite: représentation de la fréquence de décharge au cours du temps par intervalle de 1 min. **H.** Fréquence de décharge des neurones 5-HT en réponse à l'insuline en présence de l'antagoniste à l'IR, S961 (100 nM), avec trace représentative. Panel de droite: représentation de la fréquence de décharge au cours du temps par intervalle de 1 min. Statistiques: One-Way ANOVA; post-hoc: test de Tukey: $\$p < 0,05$; $\$\$p < 0,01$. One sample t-test vs 100: $\# < 0,05$. T-test apparié: $*p < 0,05$.

Par la suite, nous avons souhaité déterminer si de tels effets pouvaient être observés dans des conditions *in vivo*. Nous avons pour cela mesuré les concentrations extracellulaires de sérotonine ($[5\text{-HT}]_{\text{ext}}$) dans l'hippocampe ventral en réponse à l'injection intrapéritonéale d'insuline au cours d'une expérience de microdialyse dont la glycémie est maintenue à concentration fixe (**figure 28.A**). Ainsi, nous avons observé une diminution significative des taux de $[5\text{-HT}]_{\text{ext}}$ dans l'hippocampe ventral comparés aux taux basaux en réponse à des injections cumulées d'insuline (0,75 IU/kg < 0,75 IU/kg < 1,5 IU/kg) (**figure 28.B**). A l'inverse, la levée d'inhibition au travers du récepteur 5-HT_{1A} par son antagoniste, le WAY100635 (1 mg/kg), inhibe la diminution des taux de $[5\text{-HT}]_{\text{ext}}$ dans l'hippocampe ventral en réponse à l'injection cumulative d'insuline par voie i.p, en ayant même tendance à augmenter les taux de $[5\text{-HT}]_{\text{ext}}$ (**figure 28.B**). La comparaison des aires sous la courbe des taux de $[5\text{-HT}]_{\text{ext}}$ dans l'hippocampe ventral en réponse à l'insuline permet de mettre en évidence une

augmentation significative de celle-ci lors d'un pré-traitement avec le WAY100635 (**figure 28.C**). Cette expérience démontre que, *in vivo*, l'insuline diminue la libération de sérotonine dans l'hippocampe ventrale au travers d'un rétrocontrôle négatif médié par le récepteur 5-HT_{1A}.

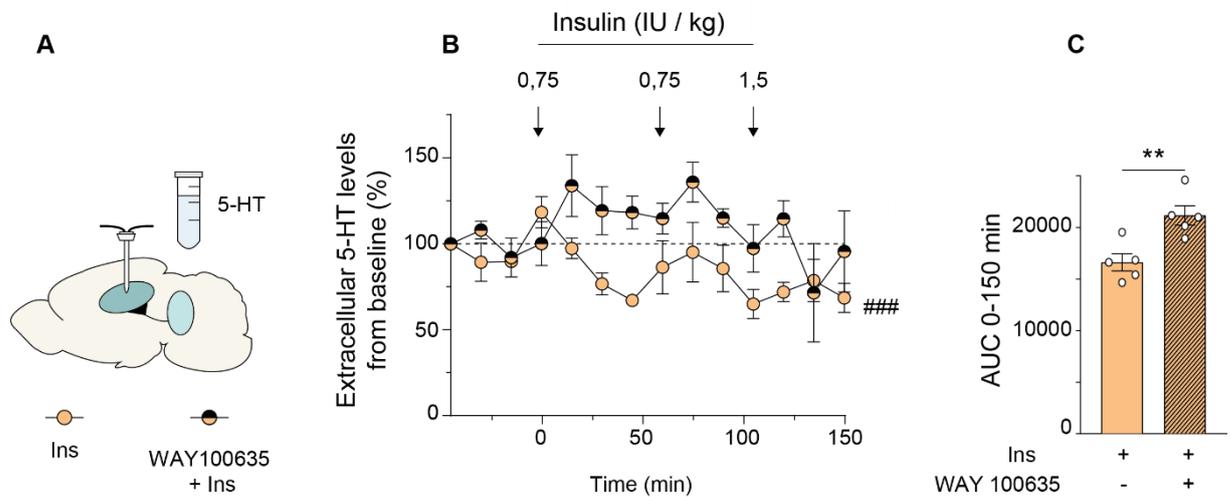


Figure 28: L'administration d'insuline périphérique diminue la libération de sérotonine dans l'hippocampe ventral *in vivo* au travers d'un mécanisme d'autoinhibition médié par le récepteur 5-HT_{1A}.

A. Mesure de la concentration extracellulaire de 5-HT dans l'hippocampe ventral par microdialyse. **B.** Modification de la concentration extracellulaire de 5-HT par rapport à sa valeur basale en réponse à des doses d'insuline cumulatives injectées par voie i.p au cours du temps. Expérience en condition contrôle ou en présence de l'antagoniste du récepteur 5-HT_{1A}, le WAY100635 (1 mg/kg). **C.** Mesure de l'aire sous la courbe des concentrations de 5-HT extracellulaire entre t₀ et t₁₅₀ minutes, en présence ou non de WAY100635. Statistiques: T-test: **p<0,01. One sample t-test vs 100: ###p<0,001.

Par ailleurs, nous avons également évalué le tonus inhibiteur du récepteur 5HT_{1A} sur l'activité des neurones 5-HT du RD par patch-clamp. Dans des conditions physiologiques d'enregistrement nous n'avons pas observé d'augmentation de la fréquence de décharge des neurones 5-HT en réponse au WAY100635 (200 nM) (**figure 29**). Nous pouvons donc en conclure qu'il n'y a pas de rétrocontrôle inhibiteur tonique du 5-HT_{1A}R au cours de nos enregistrements électrophysiologiques *ex-vivo*, puisque nous n'avons pas observé de levée d'inhibition au travers de l'augmentation de la fréquence de décharge des neurones 5-HT.

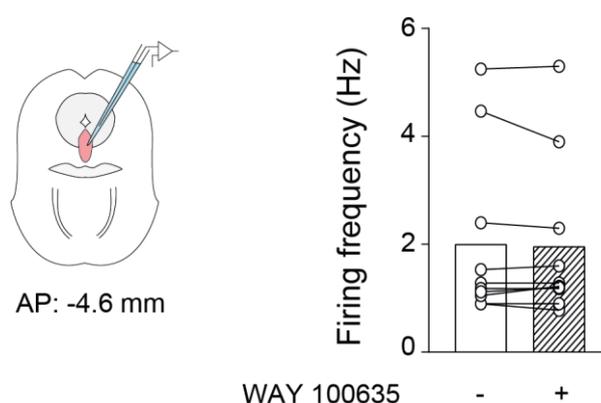


Figure 29: Mesure du tonus sérotoninergique autoinhibiteur du récepteur 5-HT_{1A} en patch-clamp.

Mesure de la fréquence de décharge des neurones 5-HT par électrophysiologie sur tranche de RD en réponse à l'application de WAY100635 (200 nM).

2. Conséquences de l'injection intranasale d'insuline sur le comportement émotionnel

2.1 Contrôle des effets de l'injection intranasale d'insuline sur le métabolisme

Au cours de ce projet de thèse nous avons utilisé l'injection d'insuline par voie intranasale qui, comme nous l'avons vu, est une technique non invasive avec un fort potentiel translationnel permettant de cibler uniquement le cerveau. En raison de l'abondante littérature mettant en évidence l'effet anorexigène de l'insuline au niveau central, nous avons déterminé l'effet de l'injection intranasale d'une dose de 4IU d'insuline sur la prise alimentaire. Après une déprivation en nourriture de 24 heures, nous n'observons aucune différence dans la prise alimentaire des souris traitées par une injection intranasale aigue d'insuline ou de véhicule (**figure 30.A**).

Nous avons par la suite vérifié que l'insuline ne modifiait pas l'homéostasie glucidique en raison de « fuites » vers la périphérie lors de l'injection intranasale. La mesure de la glycémie au cours du temps met en évidence que l'injection intranasale de 2IU d'insuline ne modifie pas les taux de glucose sanguin comparé à l'injection intranasale d'un véhicule (**figure 30.B**). Plus précisément, 60 min après l'injection intranasale, la modification de la glycémie en fonction de sa valeur basale n'est pas significativement différente entre le groupe traité à l'insuline et le groupe traité au véhicule (*non présenté*). Cette donnée est importante car les tests comportementaux et biochimiques ont été effectués 60 min après l'injection intranasale. Par conséquent l'interprétation des résultats de ces expériences ne peut être biaisée par une éventuelle hypoglycémie périphérique.

Ces deux expériences nous permettent de conclure d'une part, que la voie d'administration intranasale n'induit pas d'effet anorexigène de l'insuline au niveau central au cours d'un test de « fasting-refeeding ». D'autre part, nous avons pu confirmer les résultats cliniques et précliniques d'autres études démontrant que l'injection intranasale d'insuline ne modifie pas la glycémie périphérique. Ainsi, la distribution de l'insuline par voie intranasale est restreinte au compartiment central.

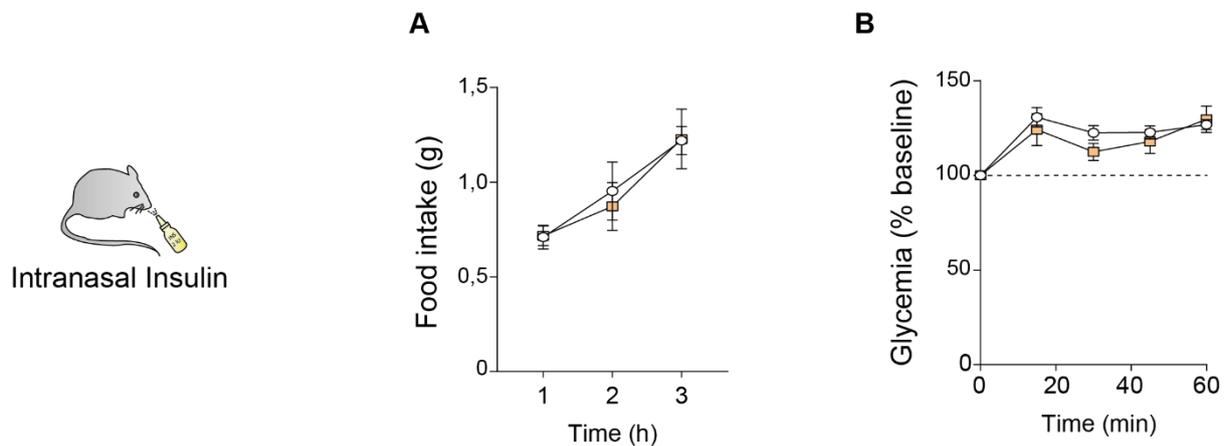


Figure 30: L'injection intranasale d'insuline ne modifie pas la glycémie périphérique ni la prise alimentaire après un jeûne de 24h.

A. Mesure de la prise alimentaire cumulée au cours du temps en réponse à l'injection intranasale d'une dose de 4IU d'insuline après un jeûne de 24h. **B.** Mesure de la modulation de la glycémie par rapport à sa valeur basale au cours du temps, en réponse à une injection intranasale d'une dose de 2IU d'insuline (orange) ou de NaCl 0,9% (blanc).

2.2 Modulation des taux de sérotonine en réponse à l'injection intranasale d'insuline

En réponse à l'injection intranasale d'insuline, nous avons pu observer une diminution significative des taux de sérotonine tissulaire dans l'amygdale (**figure 31.A**) et dans le noyaux accumbens (**figure 31.B**) en réponse à l'injection intranasale d'insuline comparé à l'injection intranasale de véhicule. Nous avons également pu observer une tendance à la diminution des taux de sérotonine en réponse à l'injection intranasale d'insuline dans l'hippocampe ventral (**figure 31.D**) et le Raphé dorsal (**figure 31.E**). Toutefois, aucune différence significative n'a été observée dans le cortex préfrontal (**figure 31.C**) qui est, au même titre que les aires cérébrales susmentionnées, une région cruciale dans la régulation des émotions.



Intranasal Insulin
2 IU

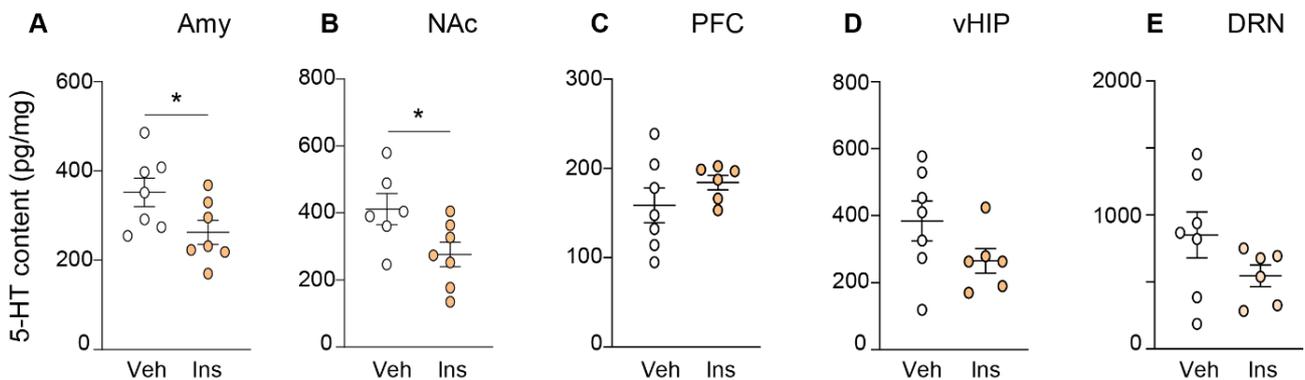


Figure 31: L'injection intranasale d'insuline diminue les taux de sérotonine dans des structures impliquées dans la régulation du comportement émotionnel.

Mesure par chromatographie en phase liquide à haute performance des concentrations tissulaires de sérotonine en réponse à l'injection intranasale d'une dose de 2IU d'insuline dans l'amygdale (**A**), le noyau accumbens (**B**), le cortex préfrontal (**C**), l'hippocampe ventral (**D**) et le raphé dorsal (**E**). Statistiques: T-test: * $p \leq 0,05$.

L'ensemble de ces résultats indique que l'action de l'insuline au niveau cérébral permet également de diminuer les taux de sérotonine dans différentes régions de projection des neurones 5-HT dont notamment l'amygdale et le noyau accumbens.

2.3 Effet de l'injection intranasale d'insuline sur le comportement émotionnel

Afin d'évaluer un possible effet de l'insuline au niveau central sur l'anxiété non conditionnée, nous avons effectué différents tests d'anxiété basés sur un conflit environnemental. Au cours du test de champ ouvert, nous avons pu observer que 60 minutes après l'injection intranasale d'une dose de 2IU d'insuline, les souris passaient significativement plus de temps dans le centre du dispositif en comparaison avec les souris traitées avec le véhicule (**figure 32.A**, panel de gauche). Cet effet n'est pas dû à une différence de locomotion induite par le traitement intranasal d'insuline car aucune différence significative sur la distance totale parcourue par les souris au cours du test n'a été observée entre les groupes (**figure 32.A**, panel de droite).

Dans un second temps, nous avons évalué l'implication fonctionnelle du système 5-HT dans cet effet anxiolytique de l'insuline. Pour ce faire, nous avons effectué une déplétion en sérotonine cérébrale des souris via l'administration de PCPA (125 mg/kg, 2x/jour, 3 jours de traitement), un inhibiteur de l'enzyme TPH2. Nous avons observé une augmentation significative du temps passé dans le bras ouvert du labyrinthe en croix surélevée en réponse à l'injection intranasale d'insuline comparé à l'injection intranasale de véhicule chez les souris contrôles injectées chroniquement au NaCl 0,9% (**figure 32.B**). Par la suite, nous avons observé que l'effet anxiolytique de l'insuline dans le labyrinthe en croix surélevée était abrogé par le traitement PCPA. En effet, nous n'observons dans ces conditions aucune différence

significative du temps passé dans le bras ouvert entre les souris injectées avec l'insuline ou le véhicule par voie intranasale (**figure 32.B**). Nous avons également vérifié que le traitement par la PCPA ne modifiait pas le comportement pseudo-anxieux basal des animaux. C'est n'est effectivement pas le cas, car nous n'avons observé aucune différence significative du temps passé dans les bras ouverts entre les souris traitées au véhicule ou par la PCPA en réponse à l'injection intranasale de véhicule.

Par conséquent, ces résultats mettent en évidence d'une part que l'action centrale de l'insuline induit un effet de type anxiolytique. D'autre part, nos expériences démontrent que cet effet anxiolytique requiert la fonctionnalité du système sérotoninergique, sans lequel cet effet ne peut être obtenu.

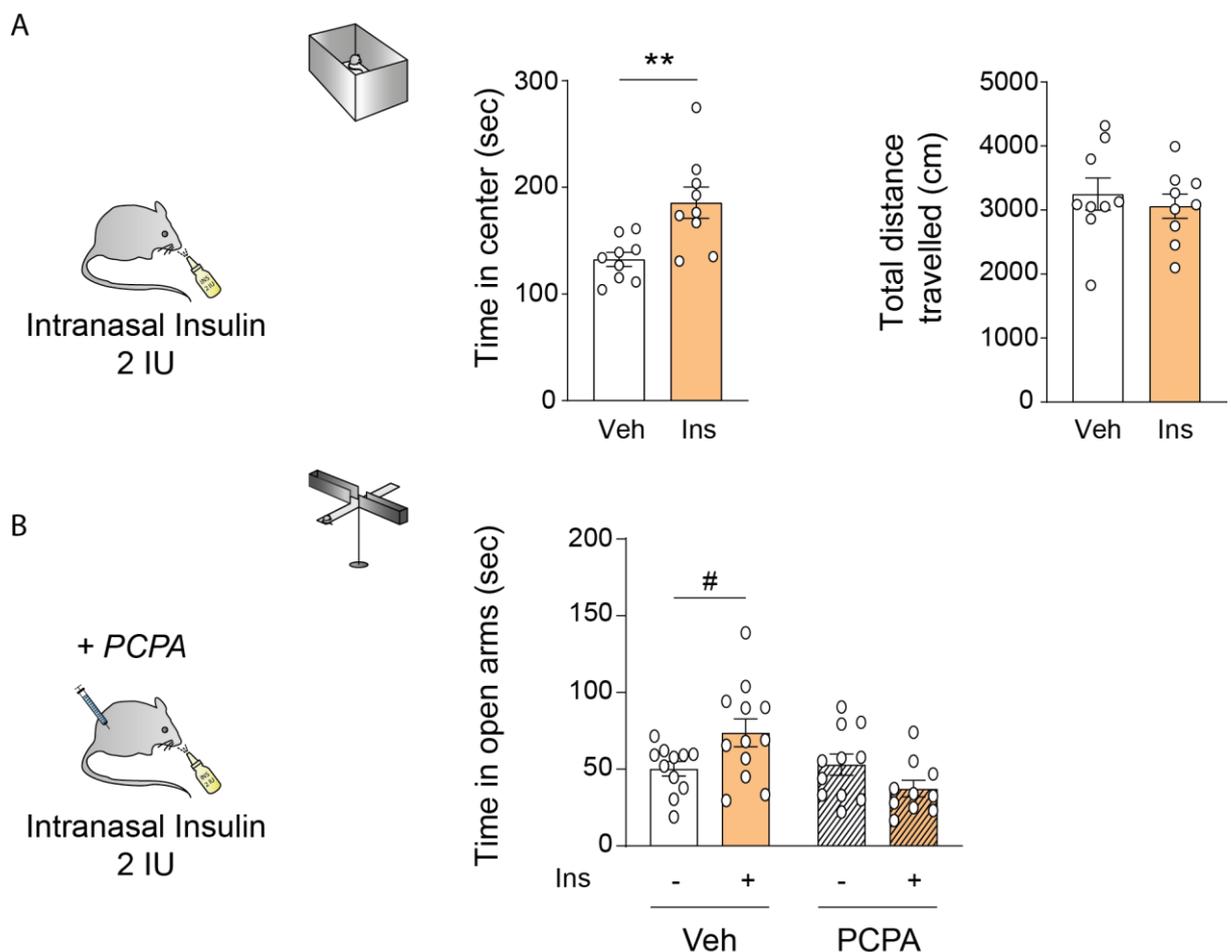


Figure 32: L'effet anxiolytique de l'injection intranasale d'insuline requiert l'implication du système sérotoninergique.

A. Mesure du temps passé dans le centre de l'OF (panel de gauche) et de l'activité locomotrice (panel de droite). **B.** Temps passé dans les bras ouverts de l'EPM pour les souris contrôles ou pour les souris déplétées en sérotonine via l'injection de PCPA (3 jours de traitements, 2 injections de 125 mg/kg/j). Statistiques: Two-way ANOVA, post-hoc: test de Sidack: #p<0,05. T-test: **p<0,01.

3. Interprétation expérimentale

3.1 Mécanisme d'action de l'insuline sur les neurones 5-HT du RD

Au cours du premier axe nous avons mis en évidence la présence de l'ARNm du récepteur à l'insuline dans les neurones 5-HT du RD par hybridation *in situ*. Cette technique a été choisie en raison des limites expérimentales de l'utilisation d'anticorps anti-IR en immunohistochimie, qui n'est pas optimale. Bien que la technique de l'hybridation *in situ* ne prouve pas définitivement la présence de l'IR sur les neurones 5-HT, les expériences de patch-clamp en présence de l'antagoniste de l'IR démontrent que ce récepteur est fonctionnel au sein de cette population neuronale.

Au cours des expériences d'électrophysiologie *ex-vivo*, nous avons observé que la fréquence de décharge maximale des neurones 5-HT induite par l'application d'insuline est significativement plus faible lors de la pré-incubation avec l'antagoniste du récepteur à IGF-1, PPP. Ce résultat suggère que la réponse à l'insuline observée en condition contrôle peut-être également médié par le récepteur IGF-1. En effet, des études de transcriptomique mettent en évidence la présence de IGF-1R dans les neurones 5-HT (Okaty et al., 2015). Etant donné la concentration d'insuline utilisée, 300 nM, il est en effet possible que l'insuline se fixe également sur le récepteur IGF-1 en ayant préalablement occupé tous les sites de fixation disponibles de l'IR. Ainsi, on observe *in vitro* que l'EC₅₀ de l'insuline pour le récepteur à IGF-1 est de 30 nM (Pandini et al., 2002). Toutefois, le fait que la réponse à l'insuline des neurones 5-HT soit totalement inhibée en présence de l'antagoniste de l'IR, S961, ou encore chez les souris SeIRKO, indique que l'action de l'insuline au travers de IGF-1R seul ne permet pas d'augmenter la fréquence de décharge des neurones. Par conséquent, l'insuline en se fixant sur son propre récepteur pourrait avoir un effet permissif sur l'activation de la voie de signalisation

de IGF-1R lors de la fixation de l'insuline sur celui-ci. Ainsi, nous pouvons émettre l'hypothèse d'une synergie entre les deux récepteurs sur la fréquence de décharge des neurones 5-HT en réponse à l'insuline sous le rôle permissif de l'IR. Une autre hypothèse découlant de la précédente peut considérer la présence de récepteur hybride IR/IGF-1R sur les neurones 5-HT. Une telle hypothèse nécessiterait toutefois que les antagonistes de l'IR et de IGF-1R utilisés soient tous les deux capables de bloquer la fixation de l'insuline sur les récepteurs hybrides, donnée qui n'est actuellement pas connue.

Au cours de ces expériences de patch-clamp, nous n'avons pas observé de modulation des courants postsynaptiques inhibiteurs ou excitateurs, suggérant que l'insuline augmente la fréquence de décharge des neurones 5-HT directement par l'IR exprimé par ces neurones. Bien que d'autres modulations indirectes hors des systèmes GABAergique et glutamatergique puissent entrer en jeu (neuropeptide, acides aminés, etc...), la non réponse à l'insuline des neurones 5-HT chez les souris *SeIRKO* indique que l'effet de l'insuline sur ces neurones est directement médié par l'IR exprimé par ces neurones (Partie III, **figure 40**). Par conséquent nous avons démontré que l'insuline modulait positivement l'activité des neurones 5-HT dans des conditions *ex-vivo*, par un effet direct n'impliquant pas de partenaires présynaptiques mais dont le récepteur à IGF-1 pourrait en potentialiser la réponse (**figure 33**).

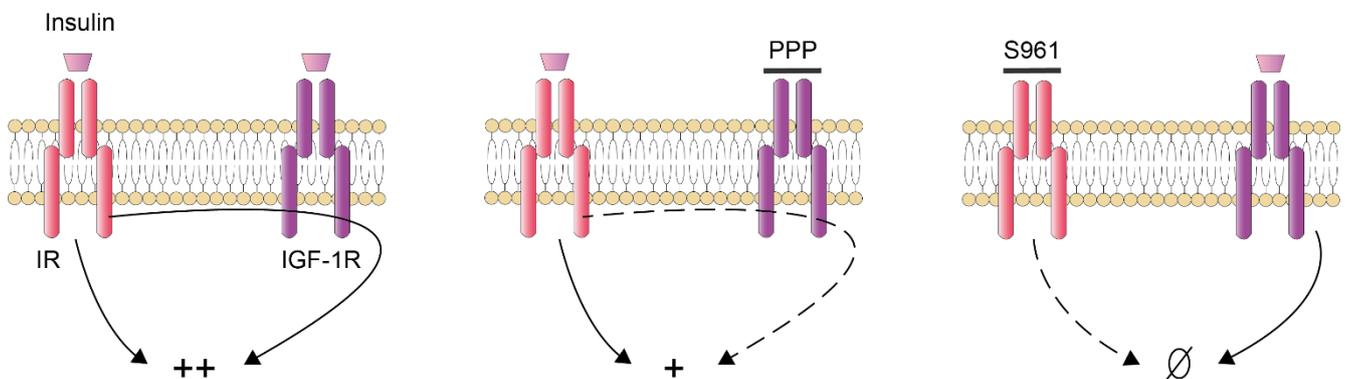


Figure 33: Mécanisme présumé de l'effet permissif de l'IR dans la synergie des voies de signalisation des récepteurs IR et IGF-1R en réponse à l'insuline.

L'étude de microdialyse *in vivo* a toutefois remis en question la véracité de cette conclusion. En effet, nous avons observé que l'injection périphérique d'insuline diminuait les taux de sérotonine extracellulaire dans l'hippocampe ventral. Les résultats de dosage tissulaire de sérotonine, dont on observe une diminution significative dans l'amygdale et dans le noyau accumbens en réponse à l'injection intranasale d'insuline abondent également en ce sens. Collectivement, ces résultats permettent de prime abord d'observer que l'action de l'insuline cérébrale par voie intranasale induit un effet similaire à celui observé en réponse à son administration périphérique. Par conséquent, nous pouvons très probablement exclure la responsabilité d'une éventuelle altération de l'homéostasie glucidique périphérique dans la diminution des taux de sérotonine observée par microdialyse.

Toutefois, en dehors d'une régulation de la libération de la sérotonine dans le compartiment synaptique, une telle diminution est souvent associée à la diminution de l'activité de décharge des neurones 5-HT, ce qui est opposé à nos résultats *ex-vivo*. Etant donné le rôle du récepteur 5-HT_{1A} dans la régulation de l'activité des neurones 5-HT nous avons donc évalué l'implication de ce récepteur dans la réponse à l'injection périphérique d'insuline. A cette occasion, nous avons observé que le prétraitement par le WAY100635, un antagoniste des récepteurs 5-HT_{1A}, inhibe la diminution des taux de [5-HT]_{ext} dans l'hippocampe ventral en réponse à l'insuline. De plus, des résultats préliminaires indiquent que lors de l'enregistrement de l'activité des neurones 5-HT du RD *in vivo*, l'insuline inhibe également leur activité et que le WAY100635 prévient une telle diminution (*communication personnelle du Pr. Bruno Guiard*). Ces résultats suggèrent donc que la diminution des taux de sérotonine extracellulaire dans l'hippocampe ventral résulte de l'autoinhibition du système 5-HT au travers du récepteur 5-HT_{1A}. Toutefois, l'injection du WAY100635 par voie intrapéritonéale ne nous permet pas, dans ces conditions, de déterminer l'implication dans cet effet des autorécepteurs et/ou des hétérorécepteurs 5-HT_{1A}. Afin de répondre à cette question, plusieurs expériences peuvent être envisagées: par exemple, l'injection de WAY100635 dans le RD pour confondre le rôle des autorécepteurs lors de l'injection périphérique d'insuline ou encore une approche génétique permettant l'invalidation de l'autorécepteur 5-HT_{1A} (Richardson-Jones et al., 2010).

Ces résultats *in vivo* semblent donc *a priori* en opposition avec nos résultats d'électrophysiologie *ex-vivo*. Cependant, l'évaluation du statut fonctionnel du rétrocontrôle inhibiteur médié par le récepteur 5-HT_{1A} sur le neurone sérotoninergique au cours d'enregistrements par patch-clamp sur des tranches de RD est un déterminant important dans

l'interprétation de nos résultats. Ainsi, nous avons observé que l'application de WAY100635 sur les tranches de RD n'augmentait pas l'activité des neurones 5-HT. Par conséquent, ce résultat suggère que dans des conditions *ex-vivo*, il n'y a pas de tonus autoinhibiteur du 5-HT_{1A}R sur les neurones sérotoninergiques. De plus, nous n'observons pas d'inhibition de la fréquence de décharge des neurones 5-HT du RD en réponse à un ISRS dans nos conditions d'enregistrement (*données préliminaires personnelles non présentées*). Or, l'augmentation des taux endogènes de sérotonine conséquents à l'inhibition du transporteur de la sérotonine devrait induire une diminution de la fréquence de décharge des neurones 5-HT au travers d'une sur-activation du 5-HT_{1A}-R. De cette manière, ces expériences confirment également ce que d'autres chercheurs ont déjà démontré. En effet, l'enregistrement *ex-vivo* des neurones sérotoninergiques par patch-clamp ne permet pas d'apprécier l'activation tonique du 5-HT_{1A}R et de l'autoinhibition qui en résulte (Craven et al., 1994; Fletcher et al., 1996; Johnson et al., 2002). L'épuisement rapide des stocks de sérotonine et de L-Trp pourrait expliquer ce phénomène (Liu et al., 2005). Par conséquent, l'absence d'une diminution de l'activité des neurones 5-HT en réponse à l'insuline lors d'expériences d'électrophysiologie *ex-vivo*, s'explique par le fait que cette augmentation de fréquence ne correspond pas à une augmentation de la libération du neurotransmetteur dans ces conditions particulières. De ce fait, la sur-activation du récepteur 5-HT_{1A} par une augmentation de libération de sérotonine endogène en réponse à l'insuline ne peut être observée, de même que, *in fine*, l'inhibition de l'activité du neurone 5-HT. D'autre part, il n'est pas étonnant que si un tel mécanisme supporte l'effet de l'insuline nous ne l'observons pas au cours des expériences de microdialyse, dont la résolution temporelle ne le permet pas. En effet, un tel mécanisme requiert une mise en place de l'ordre de la seconde, voire de la milliseconde, tandis que l'échantillonnage au cours de l'expérience de microdialyse évaluant l'effet de l'insuline est de l'ordre de la minute. L'utilisation de technique comme la voltamétrie en temps réel (Fast Scan Cyclic Voltametry ; FSCV) ou encore de détecteur spécifique de sérotonine produit par génie génétique (Wan et al., 2021), dont la résolution temporelle est plus sensible, permettrait de répondre à cette question.

Par conséquent nous émettons l'hypothèse que l'action de l'insuline produit un effet net inhibiteur sur le système sérotoninergique au travers du récepteur 5-HT_{1A}. En d'autres termes cette hypothèse considère que l'insuline va successivement i) activer les neurones 5-HT directement via l'IR exprimé à leur surface et augmenter ainsi la libération de sérotonine ii) l'augmentation des taux de sérotonine suractive l'autoinhibition du système 5-HT au travers du récepteur 5-HT_{1A} dans un temps d'action très court iii) l'inhibition de la fréquence de décharge

des neurones 5-HT induit une diminution de la libération de sérotonine dans les aires post-synaptiques au cours des minutes/heures suivant l'injection d'insuline (**figure 34**). Cet effet inhibiteur peut être médié soit directement par l'autorécepteur 5-HT_{1A} en réponse à la libération de sérotonine paracrine ou synaptique par des collatérales de fibres 5-HT projetant dans le RD. Il peut être également médié par un partenaire postsynaptique au travers des hétérorécepteurs 5-HT_{1A} qui, en réponse à l'augmentation des taux de 5-HT, inhiberait une transmission excitatrice régulant l'activité des neurones 5-HT du RD.

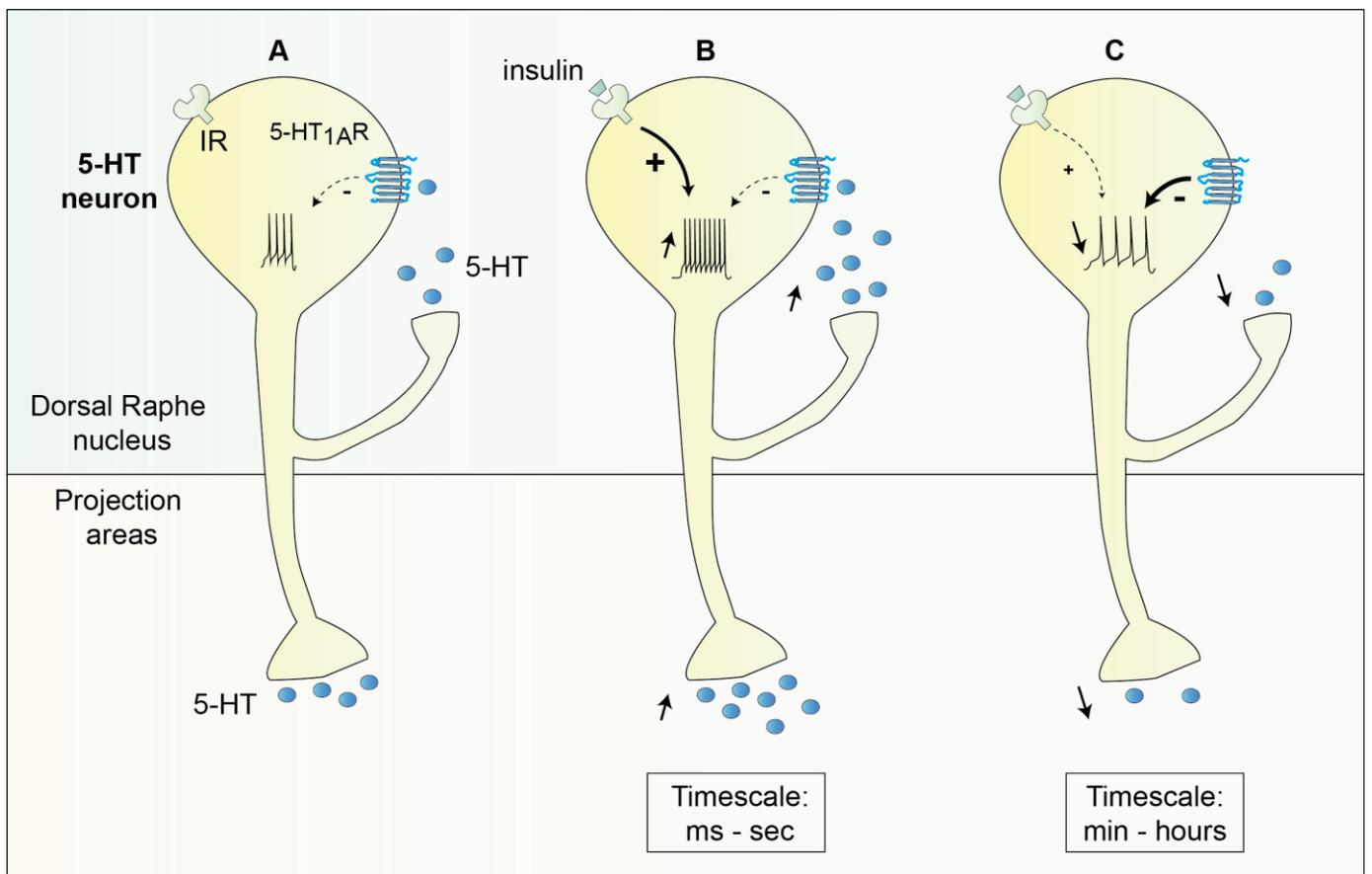


Figure 34: Hypothèse mécanistique de l'effet net inhibiteur de l'insuline sur les neurones 5-HT du Raphé dorsal.

A. Neurone 5-HT du RD à l'état basal avec une autoinhibition tonique faible de l'autorécepteur 5-HT_{1A}. **B.** La fixation de l'insuline sur son récepteur induit une augmentation de la fréquence de décharge du neurone et *in fine* une augmentation de la libération de sérotonine à la fois dans les aires postsynaptiques mais également dans le RD par des collatérales du neurone. L'augmentation des taux de sérotonine extracellulaire endogène active l'autorécepteur 5-HT_{1A} dans un interval de temps très court. **C.** L'augmentation du tonus autoinhibiteur de l'autorécepteur 5-HT_{1A} provoque une diminution de la fréquence de décharge du neurone qui est associée à une diminution de la libération de sérotonine dans les aires postsynaptiques dans un interval de temps allant de la minute à l'heure.

3.2 Effets comportementaux de l'insuline cérébrale et implication du système 5-HT

Un des points essentiels de ce projet était d'évaluer les effets de l'insuline cérébrale dans le comportement émotionnel. Nous avons tout d'abord mis en évidence un effet anxiolytique de l'injection intranasale d'insuline dans le test du champ ouvert et par la suite dans le test du labyrinthe en croix surélevée. Ces résultats sont en accord avec d'autres recherches mettant en évidence un même effet (Beirami et al., 2017; Marks et al., 2009). Toutefois, aucune études n'avaient jusqu'à présent identifié le substrat biologique par lequel l'insuline permettait cet effet. La diminution des taux de sérotonine dans l'amygdale en réponse à l'injection intranasale d'insuline est un argument tangible en faveur de l'implication de ce système dans les effets anxiolytiques de l'insuline. En effet, la diminution des taux de sérotonine dans cette structure est un mécanisme dont il a été démontré qu'il diminuait le comportement de type anxieux chez l'animal (Bocchio et al., 2015; Johnson et al., 2015). De manière intéressante, nous avons observé que la déplétion en sérotonine par la PCPA inhibe l'effet anxiolytique de l'injection intranasale d'insuline. Ces résultats suggèrent donc que la neurotransmission 5-HT serait le substrat biologique par lequel l'insuline promeut son effet anxiolytique. Afin de démontrer le rôle crucial du système 5-HT dans l'effet anxiolytique de l'insuline nous allons également évaluer la réponse à l'injection intranasale d'insuline de souris présentant une invalidation génétique de l'IR dans les neurones 5-HT dans des tests d'anxiété.

Au travers de l'ensemble de ces résultats nous avons démontré que dans des conditions de sensibilité à l'insuline physiologique, l'hormone provoque une autoinhibition du système sérotoninergique au travers du récepteur 5-HT_{1A}, permettant ainsi de diminuer les taux de sérotonine dans plusieurs structures impliquées dans la régulation de l'anxiété, dont l'amygdale, et permettant *in fine* de produire un effet anxiolytique aigu.

La spécificité éventuelle des neurones 5-HT impliqués dans l'effet anxiolytique de l'insuline prête toutefois à réflexion. S'agit-il de neurones 5-HT spécialisés projetant vers l'amygdale, régulant ainsi le comportement de type anxieux ? Il pourrait également s'agir d'un effet global impliquant plusieurs neurones 5-HT régulant le comportement de type anxieux dont le résultat net induirait une anxiolyse. Au cours des études d'électrophysiologie *ex-vivo* nous observons qu'environ 80% des neurones répondent à l'insuline et ce, sans pattern de localisation. Ainsi, il semblerait que la réponse à l'insuline des neurones 5-HT soit davantage la représentation de l'expression de l'IR au sein de cette population neuronale plutôt qu'une localisation topographique clairement définie des neurones 5-HT exprimant l'IR au sein du RD. Par ailleurs, contrairement aux neurones POMC dont la réponse à l'insuline peut varier, la réponse à l'insuline des neurones 5-HT du RD semble être uniforme, allant uniquement dans le sens d'une augmentation, d'après les études d'électrophysiologie *ex-vivo*. Toutefois, comme nous l'avons vu avec le récepteur 5-HT_{1A}, les conditions particulières du patch-clamp pourraient nous avoir soustrait à l'observation d'autres types de réponses de la part de ces neurones. D'autre part, nous n'avons pas pu déterminer les mécanismes sous-jacents à l'activation des neurones 5-HT du RD induit par l'IR. Il se peut qu'à l'instar des neurones POMC, des canaux de type TRPC-5 permettent d'activer et ainsi d'augmenter la fréquence de décharge des neurones 5-HT.

En considérant que l'expression de l'IR par la population sérotoninergique, qui est de 80%, soit répartie de manière homogène et aléatoire dans l'ensemble des sous-structures du RD, il est peu probable que tous les neurones 5-HT exprimant l'IR aient le même rôle et projettent tous vers une même structure. Par conséquent l'idée que l'IR soit exprimé par un sous-type de neurones 5-HT du RD spécialisé dans la régulation d'un comportement précis en modulant un circuit neuronal particulier paraît peu probable. A l'inverse, il est possible que l'insuline agisse comme un modulateur global dont l'action transitoire (dépendante du statut prandial) sur les neurones 5-HT permettrait d'affiner la régulation de plusieurs fonctions régies par le système

sérotoninergique, dont entre autres, le comportement de type anxieux. Ce point sera approfondi au cours de la discussion générale.

PARTIE II:

MODULATION DU SYSTEME 5-HT ET

DES COMPORTEMENTS

ANXIO/DEPRESSIFS ASSOCIES,

EN CONDITION PHYSIOPATHOLOGIQUE DE DT2

Dans ce second axe, ma contribution expérimentale concerne les expériences d'électrophysiologie par patch-clamp et l'étude comportementale en réponse à l'injection intranasale d'insuline. L'ensemble des études métaboliques et comportementales des figures 36 et 37 a été réalisé par Bruno Guiard et ses collaborateurs.

1. Altération de la sensibilité à l'insuline des neurones 5-HT et de la réponse anxiolytique à l'injection intranasale d'insuline par le régime obésogène HFD

Les résultats précédents ont mis en évidence que l'insuline pouvait moduler le système sérotoninergique et, à travers lui, le comportement de type pseudo-anxieux en condition de sensibilité à l'insuline physiologique. Nous nous sommes de ce fait questionnés sur les conséquences d'une diminution de la sensibilité à l'insuline sur ce système et les comportements qui y sont associés.

Pour ce faire, nous avons dans un premier temps évalué la sensibilité à l'insuline du système sérotoninergique en réponse au régime obésogène HFD au travers d'enregistrements électrophysiologiques de neurones 5-HT sur tranche de RD (**figure 35.A**). Chez les souris nourries à une diète de type obésogène HFD, nous n'observons aucune différence significative de la fréquence de décharge des neurones 5-HT en réponse à une concentration de 300 nM d'insuline (**figure 35.A**). Par conséquent, ce résultat indique que le régime de type HFD induit une résistance fonctionnelle à l'insuline au niveau des neurones sérotoninergiques du Raphé dorsal.

Etant donné le rôle apodictique de la neurotransmission 5-HT dans l'effet de type anxiolytique en réponse à l'injection intranasale d'insuline, nous avons également exploré les conséquences comportementales de l'insulino-résistance du système 5-HT en réponse à l'injection intranasale d'insuline chez les souris HFD. Ainsi, nous n'avons observé aucun effet de type anxiolytique chez les souris HFD en réponse à l'injection intranasale de 2IU d'insuline. En effet, le temps passé dans les bras ouverts du labyrinthe en croix surélevée n'est pas significativement différent entre les souris HFD injectées au véhicule ou à l'insuline par voie intranasale (**figure 35.B**). Ce même résultat est observé dans le test du champ ouvert où l'on

n'observe aucune différence significative du temps passé dans le centre du dispositif entre les souris HFD injectées au véhicule ou à l'insuline par voie intranasale (**figure 35.C**). Par ailleurs, aucune différence significative dans l'activité locomotrice des souris n'a été observée entre les groupes de traitement au cours de ce test (**figure 35.D**).

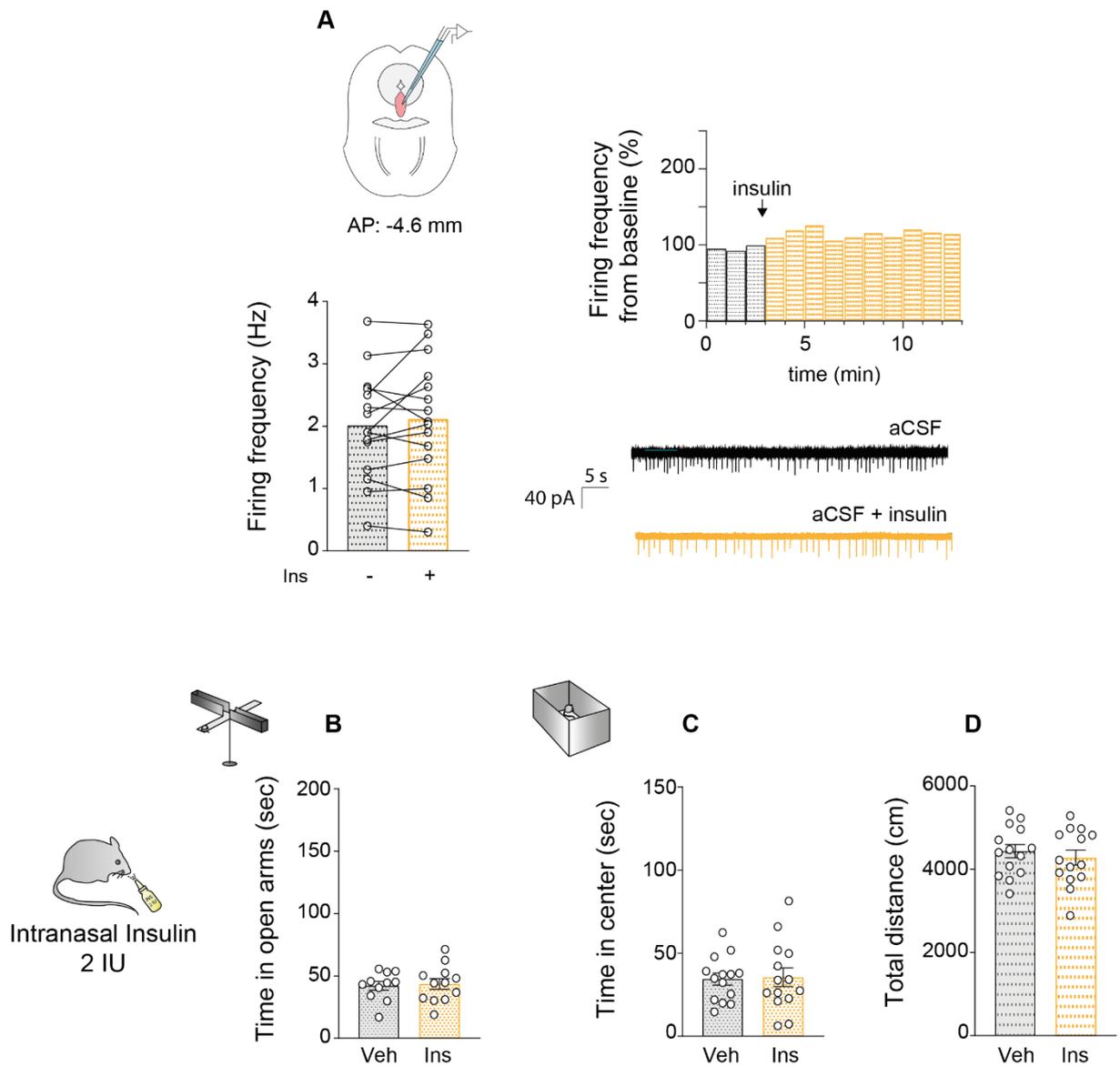


Figure 35: Le régime obésogène HFD induit une résistance à l'insuline des neurones 5-HT du RD qui est associée à la perte de l'effet anxiolytique en réponse à l'injection intranasale d'insuline.

A. Effet de l'insuline (300 nM) sur l'activité des neurones 5-HT chez des souris Pet-1-cre-mCherry nourries au régime HFD par électrophysiologie sur tranche de RD. Panel de droite: représentation de la fréquence de décharge au cours du temps par intervalle de 1 min et trace représentative. **B.** Mesure du temps passé dans les bras ouverts de l'EPM. **C.** Mesure du temps passé dans le centre de l'OF. **D.** Activité locomotrice évaluée au cours de l'OF.

L'ensemble de ces résultats indiquent que le régime obésogène HFD induit une résistance à l'insuline des neurones sérotoninergiques du RD se traduisant au niveau comportemental par une perte de l'effet anxiolytique en réponse à l'injection intranasale d'insuline.

2. Effets métaboliques du régime obésogène HFD et amélioration par un traitement chronique de metformine

Une étude récente de notre laboratoire en collaboration avec le Pr. Bruno Guiard, a mis en évidence que le régime HFD induisait un comportement de type anxio/dépressif qui était associé à des altérations du système 5-HT (Zemdegs et al., 2016). Dans ce second axe, nous avons caractérisé les conséquences du régime HFD sur les propriétés électrophysiologiques des neurones 5-HT qui sont associées à ce phénotype pseudo-anxio/dépressif. De plus, nous avons également évalué dans quelle mesure l'amélioration de la résistance à l'insuline par un agent antidiabétique insulino-sensibilisant, la metformine (MetF), permettait d'améliorer également le comportement émotionnel et la neurotransmission 5-HT.

Pour ce faire, nous avons dans un premier temps mesuré les altérations métaboliques conséquentes au régime HFD et validé l'effet insulino-sensibilisant d'un traitement de quatre semaines par la metformine (300 mg/kg/j) dans ce modèle de DT2 (**figure 36**). Les souris nourries au régime HFD présentent de nombreuses altérations métaboliques, similaires à celles observées chez les individus obèses atteints de DT2. En effet, on observe une augmentation significative de la masse corporelle des souris HFD comparé à celle des souris STD (**figure 36.C**). De manière intéressante, la metformine permet de reverser cet effet en diminuant de manière significative la masse corporelle des souris HFD-MetF (**figure 36.C**). Toutefois, la masse corporelle des souris HFD-MetF reste significativement supérieure à celle des souris STD (**figure 36.C**). De la même manière, nous observons que le régime HFD augmente

significativement la glycémie à jeun tandis que la metformine permet de reverser cet effet (**figure 36.D**). Concernant l'insulinémie à jeun, nous observons que le régime HFD induit une augmentation significative de ce paramètre (**figure 36.E**). Toutefois, les souris HFD traitées à la metformine ont toujours une insulinémie à jeun significativement plus élevée que les souris STD, qui de plus n'est pas statistiquement significative comparée à celle des souris HFD (**figure 36.E**). Enfin, un test de tolérance au glucose par voie intrapéritonéale sur une durée de 120 minutes a également été réalisé. Ce test a permis de mettre en évidence une augmentation significative de la glycémie au cours du temps en réponse à un bolus de glucose (2 g/kg) chez les souris HFD, comparée aux souris STD (**figure 36.F**). Le traitement insulino-sensibilisant par la metformine a permis de reverser l'effet délétère sur l'intolérance au glucose observée chez les souris HFD (**figure 36.F**). La mesure des aires sous la courbe de ce test permet également d'apprécier sous un autre angle les effets délétères du régime obésogène sur l'intolérance au glucose et leur amélioration significative par la metformine (**figure 36.G**).

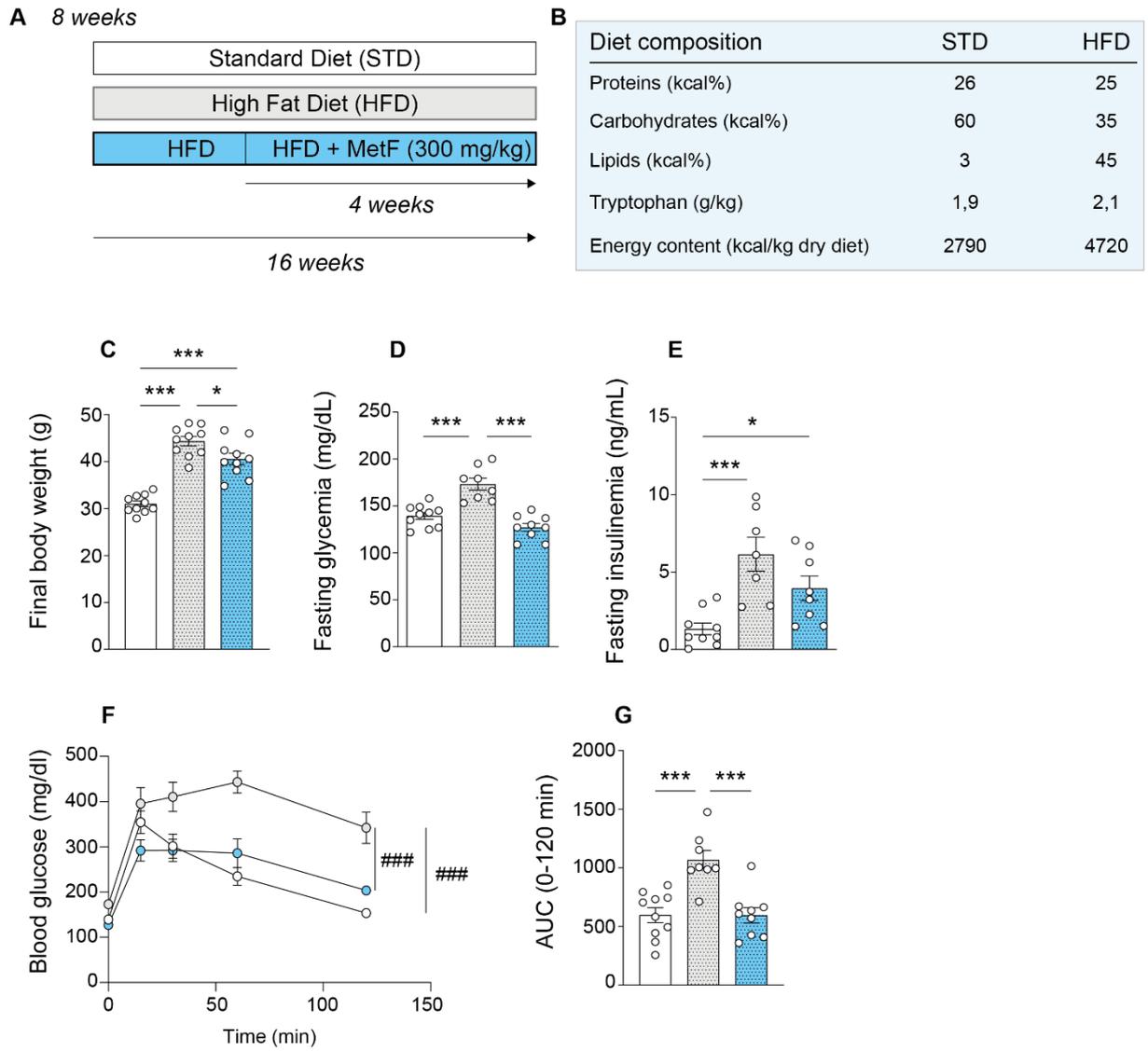


Figure 36: Le traitement chronique par la metformine permet de reverser les effets métaboliques délétères induit par le régime obésogène HFD.

A. A l'âge de 8 semaines, deux lots de souris ont été soumis à une diète obésogène d'une durée de 16 semaines. Au bout de la 12^{ème} semaine de régime HFD, un lot de souris est traité par l'antidiabétique metformine (300 mg/kg/j) pendant quatre semaines. **B.** Le régime obésogène HFD apporte 45% des valeurs énergétiques au travers des lipides. Le taux de l'acide aminé précurseur de la sérotonine, le tryptophane, est identique entre le régime HFD et le régime STD. **C.** Mesure de la masse corporelle finale des souris. **D.** Mesure de la glycémie à jeun. **E.** Mesure de l'insulinémie à jeun. **F.** Test de tolérance au glucose au cours du temps en réponse à un bolus de glucose (2 g/kg) injecté par voie intrapéritonéale. **G.** Mesure des aires sous la courbe du test de tolérance au glucose (**G**) entre t_0 et t_{120} min. Statistiques: One-way ANOVA, post-hoc: test de Tuckey: * $p \leq 0,05$; *** $p < 0,001$. Two-way ANOVA, post-hoc: test de Tuckey: ### $p < 0,001$.

L'ensemble de ces résultats permet d'une part de confirmer les effets métaboliques délétères, observés au cours de l'étude susmentionnée, dont notamment l'insulino-résistance induite par un régime HFD de 16 semaines. D'autre part, nous avons également observé que le traitement avec l'antidiabétique metformine permet de reverser l'ensemble de ces altérations métaboliques et plus particulièrement la résistance à l'insuline. De ce fait, le modèle HFD répond aux critères de validité de face et de validité prédictive du DT2.

3. Modulation du comportement émotionnel selon le statut de sensibilité à l'insuline

Dans un second temps nous nous sommes intéressés aux conséquences de l'amélioration de la sensibilité à l'insuline sur le comportement émotionnel. De cette manière une batterie de tests comportementaux a permis d'évaluer le comportement de type pseudo-anxieux et pseudo-dépressif dans les trois différents groupes expérimentaux.

Dans le test du champ ouvert, nous avons observé que les souris sous régime HFD passaient significativement moins de temps dans le centre du dispositif que les souris sous régime STD. Les souris HFD traitées à la metformine ont tendance à passer plus de temps dans le centre du dispositif que le groupe contrôle HFD, bien que cette différence ne soit pas

significative (**figure 37.A**). En outre, la différence de temps d'exploration dans le centre du champ ouvert entre les souris STD et les souris HFD n'est pas due à une différence d'activité locomotrice au cours de ce test (**figure 37.B**). Nous avons également évalué le comportement pseudo-anxieux des animaux dans le test du labyrinthe en croix surélevée où nous avons aussi observé un comportement de type anxieux chez les souris HFD. En effet, les souris HFD passent significativement moins de temps dans les bras ouverts que les souris STD. Comme observé dans le test du champ ouvert, le traitement à la metformine permet d'augmenter le temps passé dans les bras ouverts du dispositif, mais pas de manière significative (**figure 37.C**). Au cours du test d'alimentation supprimée par néophobie, les souris sous régime HFD ont une latence à se nourrir significativement plus élevée que les souris STD (**figure 37.D**). Le traitement à la metformine permet de reverser l'effet anxiogénique induit par le régime HFD en diminuant significativement le temps de latence à se nourrir (**figure 37.D**).

Nous avons d'autre part évalué le comportement de type pseudo-dépressif des animaux au cours du test d'éclaboussure au sucrose, mesurant l'incurie. On observe que les souris contrôles HFD ont un temps de toilettage cumulé significativement plus court comparées aux souris STD (**figure 37.E**). Au cours de ce test, le traitement par la metformine ne permet pas de reverser significativement le temps de toilettage chez les souris HFD (**figure 37.E**). Enfin, l'évaluation du comportement de résignation de ces trois groupes a été évalué dans le test de suspension par la queue. Nous n'avons pas observé de différence significative concernant le temps d'immobilité entre les souris STD et les souris HFD (**figure 37.F**). Toutefois, le temps d'immobilité est significativement réduit chez les souris HFD-MetF comparé aux souris STD, ce qui n'est pas le cas lorsqu'on les compare au groupe de souris HFD (**figure 37.F**).

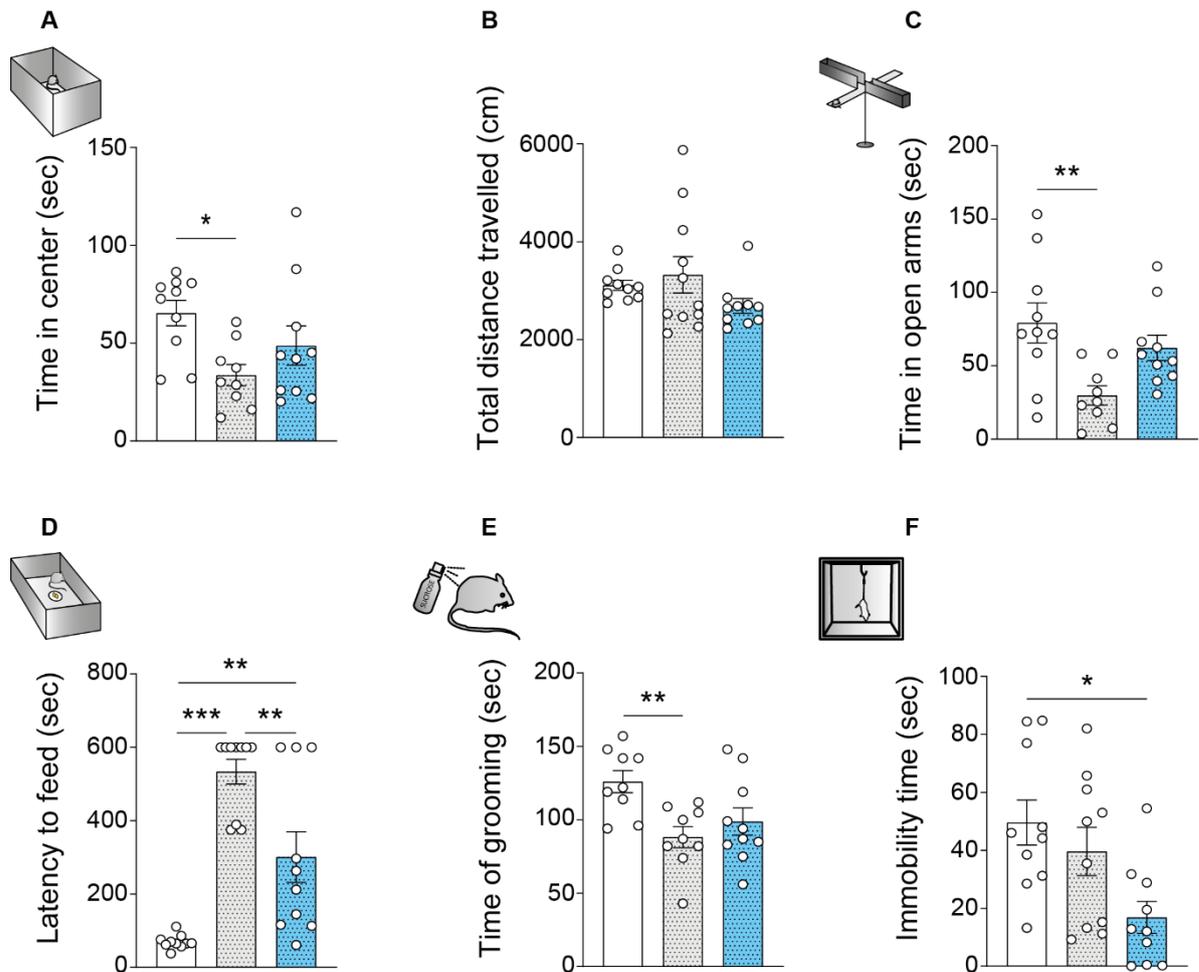


Figure 37: Le traitement par la metformine permet d'améliorer les troubles du comportement émotionnel induit par le régime obésogène HFD.

A. Mesure du temps passé dans le centre de l'OF. **B.** Mesure de l'activité locomotrice dans l'OF. **C.** Evaluation du temps passé dans les bras ouverts de l'EPM. **D.** Mesure de la latence à se nourrir dans le NSF. **E.** Temps cumulé de toilettage dans le ST. **F.** Mesure du temps d'immobilité totale au cours du TST. Statistiques: One-way ANOVA: post-hoc: test de Tuckey: * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$.

L'ensemble de ces résultats permet à nouveau, d'une part de confirmer les résultats obtenus par Zemdegs et ses collaborateurs (Zemdegs et al., 2016), à savoir que l'insulino-résistance induite par le régime HFD est associée à un comportement de type pseudo-anxio/dépressif. D'autre part, nous avons pu observer que le traitement par la metformine permet, pour certains tests, de reverser le comportement anxieux et de manière générale, d'améliorer le comportement anxio/dépressif des animaux soumis au régime HFD. De ce fait, nous pouvons en conclure que

l'amélioration de la résistance à l'insuline permet également d'améliorer les troubles émotionnels qui y sont associés.

4. Modifications des propriétés électrophysiologiques des neurones 5-HT du RD selon le statut de sensibilité à l'insuline

Etant donné les altérations du système 5-HT conséquentes au régime HFD précédemment observées (Zemdegs et al., 2016), nous nous sommes intéressés aux modifications du système 5-HT associées au comportement émotionnel des animaux, selon l'état de sensibilité à l'insuline.

Pour ce faire nous avons étudié les propriétés électrophysiologiques des neurones 5-HT sur des tranches de RD de souris Pet1-cre-mCherry sous régime STD, HFD et HFD traitées par metformine (300 mg/kg/j) (**figure 38.A**). Nous avons dans un premier temps étudié l'excitabilité des neurones 5-HT, ce qui nous a permis d'observer que le régime HFD induisait une diminution significative de la résistance membranaire des neurones en comparaison au groupe STD. De manière intéressante, le traitement chronique par la metformine permet d'augmenter significativement la résistance membranaire des neurones 5-HT du RD comparé au groupe STD et au groupe HFD (**figure 38.B**). On observe également une augmentation de l'excitabilité des neurones 5-HT du RD chez les souris HFD-MetF en réponse à des injections de courants hyperpolarisants par incrémentation comparée aux souris HFD et une tendance en ce sens également en comparaison aux souris STD (**figure 38.C**). De cette manière la metformine semble augmenter l'excitabilité des neurones 5-HT du RD en réponse à des courants hyperpolarisants. De surcroît, cette augmentation d'excitabilité des neurones 5-HT par la metformine est également observable en réponse à des courants incrémentiels dépolarisants en comparaison aux souris STD et HFD (**figure 38.E**).

Au vue de l'effet excitateur du système noradrénergique sur les neurones sérotoninergiques, nous avons également évalué la réponse des neurones 5-HT du RD à la phényléphrine (PHE, 5 μ M), un agoniste des récepteurs α 1. De manière intéressante, nous avons observé que la fréquence de décharge des neurones 5-HT des souris HFD en réponse à la phényléphrine est significativement plus faible que celle observée chez les souris STD

(**figure 38.D**). De plus, cette diminution est reversée par le traitement chronique à la metformine qui restaure la fréquence de décharge des neurones 5-HT du RD en réponse à la phényléphrine (**figure 38.D**).

D'autre part, l'étude des propriétés intrinsèques des paramètres du potentiel d'action (PA) ont également permis d'apprécier certaines altérations résultant du régime HFD. C'est notamment le cas de l'amplitude de l'hyperpolarisation post-potentiel d'action (AHP) qui est significativement diminuée chez les souris HFD, comparée aux souris STD. De même que pour la réponse à la phényléphrine, nous observons que le traitement chronique par la metformine permet de reverser les altérations induites par le régime HFD en augmentant significativement l'amplitude de l'AHP (**figure 38.F**). Ce même effet est également observable en ce qui concerne l'amplitude du PA dont le régime HFD diminue significativement l'amplitude alors que le traitement par la metformine permet de reverser cette altération (**figure 38.G**). Par ailleurs, nous observons que les paramètres cinétiques du PA, comme le temps d'ascension, est significativement diminué par le régime HFD, sans pour autant être corrigé par le traitement à la metformine, malgré une forte tendance en ce sens (**figure 38.H**). Tout comme pour le temps d'ascension du PA, nous avons également observé que le régime HFD diminuait significativement le temps de déclin, et que cet effet n'est pas reversé par le traitement chronique à la metformine (**figure 38.I**).

Enfin, nous avons aussi mesuré et comparé les EPSC et les IPSC perçus par les neurones 5-HT du RD entre les souris nourries au régime STD et les souris HFD. La mesure des EPSC n'a pas mis en évidence de différences significatives entre les groupes en ce qui concerne leur fréquence (**figure 38.J**) ou leur amplitude (**figure 38.K**). Le même constat a été observé en ce qui concerne les IPSC. En effet, aucune différence significative n'a été observée entre les groupes concernant leur fréquence (**figure 38.L**) ou encore leur amplitude (**figure 38.M**). En dépit de la présence d'altérations de ces paramètres par le régime obésogène HFD, nous n'avons pas évalué les caractéristiques des EPSC et IPSC en réponse à un traitement chronique par la metformine.

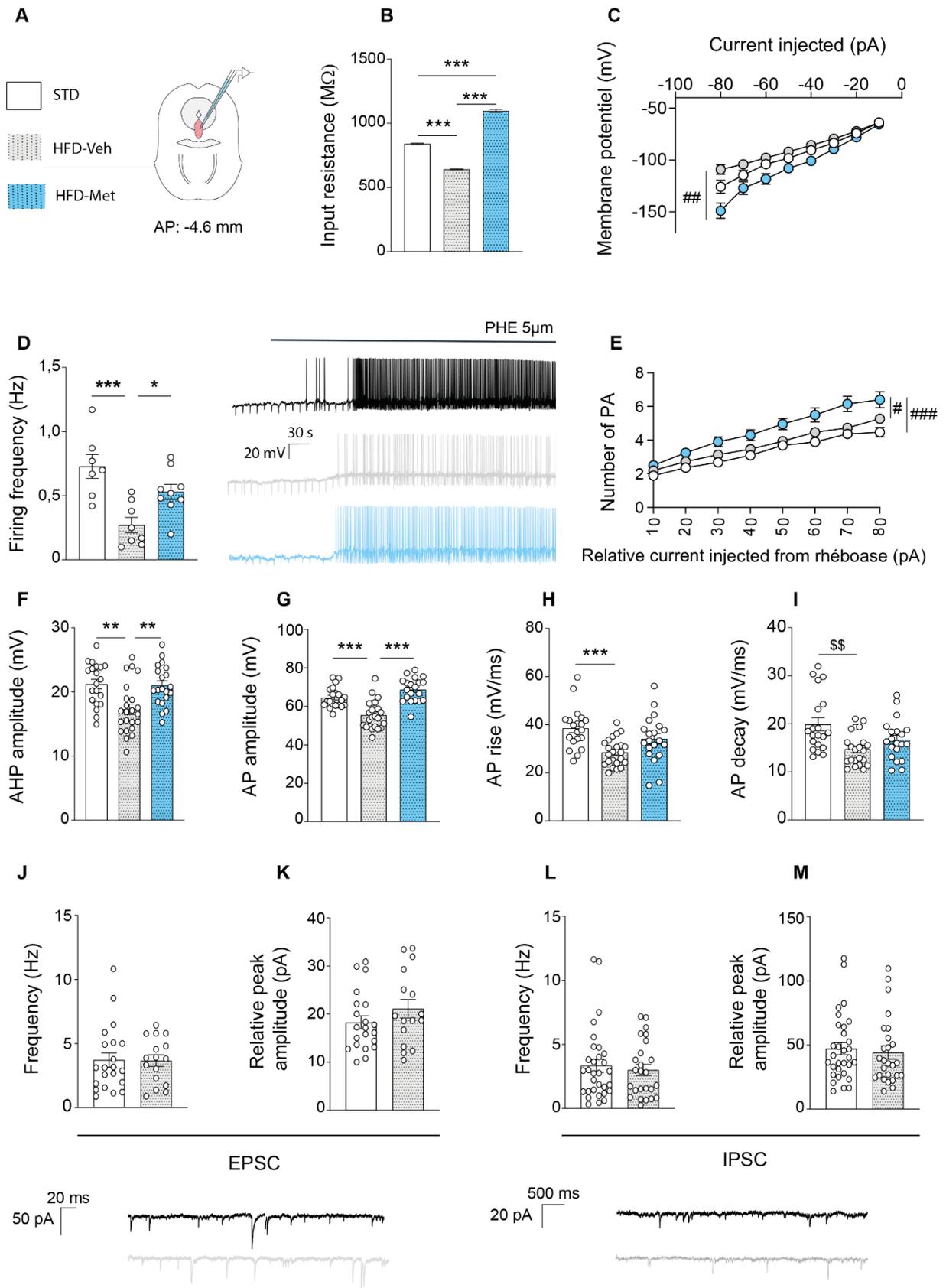


Figure 38: Le traitement par la metformine permet de reverser les altérations des propriétés intrinsèques et d'excitabilité des neurones 5-HT du RD induites par le régime obésogène HFD.

A. Etudes des propriétés intrinsèques et d'excitabilité des neurones 5-HT par électrophysiologie sur tranche de RD de souris Pet-1-cre-mCherry de différents groupes expérimentaux. **B.** Mesure de la résistance membranaire des neurones 5-HT. **C.** Modulation du potentiel de membrane en réponse à des créneaux hyperpolarisants incrémentiels. **D.** Fréquence de décharge des neurones 5-HT en réponse à l'application de PHE 5 μ M et trace représentative. **E.** Nombre de PA en réponse à des courants dépolarisants incrémentiels. **F.** Amplitude de l'AHP. **G.** Amplitude du PA. **H.** Temps d'ascension du PA. **I.** Temps de déclin du PA. **J.** Fréquence des courants postsynaptiques excitateurs spontanés. **K.** Amplitude des courants postsynaptiques excitateurs spontanés. **L.** Fréquence des courants postsynaptiques inhibiteurs spontanés. **M.** Amplitude des courants postsynaptiques inhibiteurs spontanés. Statistiques: Two-way RM ANOVA, post-hoc: test de Tuckey: #p<0,05; ##p<0,01; ###p<0,001. One-way ANOVA, post-hoc: test de Tuckey: *p<0,05; **p<0,01; ***p<0,001. Kruskal-Wallis, post-hoc: test de Dunn: \$\$p<0,01.

Les résultats de cette étude électrophysiologique ont tout d'abord permis de mettre en évidence que le régime HFD provoque à la fois des altérations des propriétés intrinsèques et de l'excitabilité des neurones 5-HT du RD. De plus, nous observons que le régime HFD diminue la fréquence de décharge de ces neurones en réponse à un agoniste α_1 , modélisant le tonus noradrénergique observé *in vivo*. De manière intéressante, le traitement par la metformine permet de reverser la plupart des altérations induites par le régime HFD. Cela suggère que l'amélioration de la sensibilité à l'insuline permet également de reverser les altérations électrophysiologiques des neurones 5-HT du RD conséquentes au régime HFD.

5. Interprétation expérimentale

5.1 Implication du système 5-HT dans les troubles émotionnels comorbides au DT2 modélisé par le régime HFD

Nous avons tout d'abord observé l'apparition d'altérations métaboliques chez les souris nourries au régime HFD. En effet, on constate ainsi chez ces souris, une augmentation de la masse corporelle, de la glycémie à jeun, de l'insulinémie à jeun ainsi qu'une résistance à l'insuline périphérique. Par conséquent, nous avons mis en évidence et reproduit l'altération de l'homéostasie glucidique et du métabolisme énergétique en réponse au régime HFD. En ce sens, le modèle de DT2 environnemental par apport d'une diète obésogène présente les marqueurs biologiques caractéristiques de la pathologie, respectant ainsi le critère de validité de face.

Par ailleurs, nous avons également reproduit le développement de troubles émotionnels associés aux troubles métaboliques mis en évidence dans une étude précédente des équipes de Bruno Guiard et de Xavier Fioramonti (Zemdegs et al., 2016). En effet, on observe que les souris nourries au régime HFD présentent un phénotype comportemental pseudo-anxieux et pseudo-dépressif, sans toutefois qu'il ne soit observé d'augmentation du comportement de résignation. Dans la précédente étude susmentionnée, les auteurs ont mis en évidence l'apparition de troubles métaboliques dès la 12^{ème} semaine de régime, qui sont significativement corrélés aux troubles émotionnels. Toutefois, on observe que la significativité de cette corrélation est d'autant plus robuste après 16 semaines de régime. Ce résultat suggère que les troubles métaboliques précèdent les troubles émotionnels. Par conséquent, nous pouvons en conclure que dans ce modèle, les troubles métaboliques induits par le régime HFD entraînent le développement et l'apparition de troubles du comportement émotionnel chez la souris. En ce sens, ce modèle permet de reproduire l'apparition de troubles de l'humeur qui sont précédés de troubles métaboliques observés chez les patients atteints de DT2.

Au cours de la première caractérisation du modèle, les auteurs ont mis en évidence des altérations de la neurotransmission sérotoninergique chez les souris nourries au régime HFD (Zemdegs et al., 2016). Etant donné l'implication du système sérotoninergique dans la régulation du comportement émotionnel, nous avons au cours de cette étude approfondi les

conséquences du régime HFD sur ce système et son implication possible dans les troubles émotionnels comorbides observés.

Tout d'abord, l'étude électrophysiologique *ex-vivo* a permis de mettre en évidence la résistance à l'insuline des neurones 5-HT du RD chez les souris HFD. Par conséquent, ces résultats suggèrent que les troubles émotionnels comorbides au DT2 chez les souris HFD sont associés à une insulino-résistance des neurones 5-HT. En outre, de nombreuses altérations des propriétés intrinsèques des neurones 5-HT du RD ont été observées. Ainsi, la diminution de l'amplitude du PA suggère un influx calcique plus faible au bouton synaptique et donc une diminution de la libération de sérotonine par exocytose, comme observé lors de l'étude de microdialyse dans l'hippocampe ventral chez les souris HFD (Zemdegs et al., 2016).

En outre, on observe chez les souris HFD une diminution de l'excitabilité des neurones 5-HT en réponse à des courants hyperpolarisants lorsque le potentiel membranaire est inférieur au potentiel d'inversion de l'ion potassium K^+ (-102,7 mV dans nos conditions expérimentales d'après l'équation de Nernst). Ce résultat suggère une augmentation de la conductance potassique au travers des canaux potassiques rectifiant entrant (K_{ir}). Ainsi, l'entrée de potassium est favorisée par les K_{ir} lorsque le potentiel de membrane est inférieur au potentiel d'équilibre de l'ion K^+ ce qui a donc pour conséquence de dépolariser le neurone. Les canaux K_{ir} peuvent être couplés à une protéine G, dont l'activation par un ligand va également activer ces canaux ioniques, on les nomme alors les GIRK (*G-protein coupled inwardly rectifying potassium channel*). Le récepteur 5-HT_{1A} peut être couplé à des canaux K_{ir} et en ce sens activer le canal GIRK2 en réponse à la fixation d'un agoniste (Albert and Vahid-Ansari, 2019). Or, d'après la caractérisation initiale du système 5-HT des souris HFD (Zemdegs et al., 2016), le récepteur 5-HT_{1A} est significativement plus sensible chez ces animaux que chez les souris STD. Par conséquent, il est possible que les souris HFD exhibent une activité du canal GIRK2 plus importante, en raison de la sensibilité accrue de leurs récepteurs 5-HT_{1A}. Etant donné l'absence de sérotonine endogène ou d'un agoniste lors des expériences de patch-clamp, il serait intéressant d'évaluer l'activité constitutive du récepteur 5-HT_{1A} chez les animaux HFD. En effet l'activité constitutive du récepteur 5-HT_{1A} a été observée lors d'études *in vitro* (Albert et al., 1999; De Deurwaerdère et al., 2020; Newman-Tancredi et al., 1997) et pourrait expliquer la sur-activation potentielle du canal GIRK2 dans nos conditions de patch-clamp, dépourvues de sérotonine endogène. Supportant cette hypothèse, une étude de patch-clamp indique que la déplétion en sérotonine par l'inactivation de l'enzyme TPH2 augmente le couplage fonctionnel

entre le 5-HT_{1A} et les canaux GIRK (Mlinar et al., 2017). De ce fait, il est possible que la diminution des taux de sérotonine augmente d'une part la sensibilité du récepteur 5-HT_{1A} comme cela a déjà été démontré (Araragi et al., 2013; Gutknecht et al., 2012) mais provoque également une activation constitutive plus importante du récepteur 5-HT_{1A} et de son couplage fonctionnel avec les Kir que dans des conditions *in vivo*. En outre, la modification de la conductance potassique des GIRK peut avoir de réelles implications dans le phénotype pseudo-anxieux comorbide aux troubles métaboliques observé chez les souris nourries au régime HFD. En effet, on observe que l'inactivation génétique des canaux GIRK1 et GIRK2 permet de diminuer le comportement de type anxieux (Mett et al., 2021; Pravetoni and Wickman, 2008). Par conséquent, il est possible qu'une augmentation de leur activité puisse participer à l'augmentation du comportement de type anxieux observé chez les souris HFD. D'autre part, les effets thérapeutiques de certains antidépresseurs sont médiés par l'inhibition de GIRK2 (Kobayashi et al., 2004; Takahashi et al., 2006). Par conséquent une suractivation de ces canaux pourrait favoriser la non réponse à ces traitements antidépresseurs.

Enfin, nous avons observé que la fréquence de décharge des neurones 5-HT du RD en réponse à la phényléphrine est significativement réduite chez les souris nourries au régime HFD, suggérant une diminution de l'expression du récepteur $\alpha 1$ ou bien une diminution de l'efficacité de son signal de transduction. D'autre part, les neurones GABA du RD expriment également le récepteur $\alpha 1$ (Day et al., 2004). Il est également possible que le régime HFD ait augmenté l'expression de ce récepteur, ou de son signal de transduction, au sein des neurones GABA ayant conduit à l'augmentation de l'activité de ces neurones et *in fine* à l'augmentation des courants postsynaptiques inhibiteurs projetant sur les neurones 5-HT du RD, diminuant ainsi leur activité. Nous n'avons pas vérifié cette hypothèse, car l'enregistrement des EPSC et IPSC ont été réalisés en condition basale en l'absence de phényléphrine. En somme, ce résultat suggère que les neurones 5-HT du RD des souris HFD bénéficient *in vivo* d'un tonus net excitateur noradrénergique réduit ce qui pourrait également expliquer la diminution des taux de sérotonine extracellulaire observé dans l'hippocampe ventrale (Zemdegs et al., 2016).

En conclusion, nous avons démontré que la résistance à l'insuline des neurones 5-HT du RD et de que l'altération du système 5-HT était associées à des troubles du comportement émotionnel comorbide au DT2 dans notre modèle murin. Nous avons, dans un second temps, tenté une approche de restauration, permettant d'évaluer dans quelle mesure la sensibilité à l'insuline modulait le comportement émotionnel et notamment les troubles de type

anxio/dépressif observés chez les souris nourries au régime HFD. Pour ce faire, nous avons utilisé un agent insulino-sensibilisant, la metformine, qui est un antidiabétique utilisé en traitement de première intention dans le DT2.

5.2 Mécanismes impliqués dans l'amélioration du comportement émotionnel par la restauration d'un état de sensibilité à l'insuline

Tout d'abord, nous avons observé que la metformine permettait de reverser l'ensemble des altérations métaboliques induites par le régime obésogène et notamment le score de résistance à l'insuline. Par conséquent, ces résultats permettent également de mettre en évidence le critère de validité prédictive de notre modèle HFD. Au cours du phénotypage comportemental, nous avons observé une amélioration des altérations du comportement émotionnel chez les souris nourries au régime HFD et traitées de manière chronique par la metformine. Bien que ne reversant pas toutes les altérations induites par le régime obésogène, la metformine permet d'améliorer le comportement émotionnel des souris et ce, particulièrement au cours des tests évaluant l'anxiété. Ensemble, ces données montrent que l'amélioration de la sensibilité à l'insuline par la metformine améliore également le comportement émotionnel des souris. Or, comme démontré dans une première étude, les troubles métaboliques précèdent probablement les troubles émotionnels dans le modèle HFD (Zemdegs et al., 2016). Par conséquent, il est fort probable que la restauration de la sensibilité à l'insuline chez les souris nourries au régime HFD permettent par la suite d'améliorer le comportement émotionnel.

En nous intéressant à l'effet de la metformine sur le système sérotoninergique, nous avons pu observer l'implication hautement probable de cette neurotransmission dans la physiopathologie des troubles émotionnels induits par le régime obésogène. En effet, nous avons constaté de manière générale que la metformine reverse la majorité des altérations des propriétés intrinsèques et d'excitabilité des neurones 5-HT du RD provoquées par le régime HFD. Le traitement chronique par la metformine permet de restaurer l'excitabilité des neurones 5-HT en réponse à des courant hyperpolarisants mais également dépolarisants. De manière similaire, la metformine restaure l'amplitude du potentiel d'action ainsi que la fréquence de décharge des neurones 5-HT en réponse à l'application de phényléphrine. Par conséquent,

l'amélioration de l'ensemble de ces paramètres participe très probablement à la restauration des taux de sérotonine extracellulaire observée dans l'hippocampe ventrale en réponse à un traitement chronique par la metformine (Zemdegs et al., 2019). Collectivement, ces données suggèrent donc que la restauration de l'état fonctionnel du système 5-HT par la metformine sous-tend l'amélioration comportementale observée chez les souris HFD traitées par cette molécule.

Il est cependant difficile de déterminer si l'insulino-résistance des neurones 5-HT induite par le régime HFD provoque leurs altérations électrophysiologiques intrinsèques ou bien si ces phénomènes accompagnent l'insulino-résistance. En d'autres termes, la diminution du signal intracellulaire de l'IR en réponse à l'insuline sur les neurones 5-HT engendre-t-elle directement des modifications de leurs propriétés intrinsèques? Affirmer cette hypothèse supposerait que l'insuline puisse alors directement moduler les canaux ioniques qui régissent ces paramètres. Or, la modulation de canaux ioniques par l'insuline est peu détaillée dans la littérature, outre son action sur les K_{ATP} et les TRPC-5 précédemment citée (Parton et al., 2007; Qiu et al., 2014). Alternativement, le maintien de l'homéostasie électrophysiologique des neurones sérotoninergiques par l'insuline pourrait être assuré par la régulation de l'expression de certains canaux ioniques au travers d'une action transcriptomique de l'insuline dans ces neurones. Cette hypothèse est hautement probable en raison du large spectre de gènes dont l'insuline module la transcription, notamment au travers des récepteurs hybrides IR/IGF1-R (Cai et al., 2017).

Infirmier ces phénomènes directs de l'insuline impliquerait à l'inverse que la résistance à l'insuline des neurones 5-HT ne soit pas le mécanisme d'action responsable de l'altération de leurs propriétés intrinsèques. Par conséquent il est possible que d'autres facteurs physiopathologiques associés à la résistance à l'insuline comme le stress oxydant ou encore l'inflammation altèrent les propriétés intrinsèques des neurones 5-HT. Nos résultats pourraient également supporter cette hypothèse puisque la résolution de l'insulino-résistance par la metformine diminuerait également les processus de stress oxydant et d'inflammation en stoppant ainsi leurs actions délétères sur les neurones 5-HT. De la même manière, l'amélioration de ces processus accompagnant la résolution de la résistance à l'insuline pourrait également expliquer l'amélioration du comportement émotionnel après le traitement par la metformine. En effet, le stress oxydant et l'inflammation sont également deux processus physiopathologiques impliqués dans la DM (Beurel et al., 2020; Black et al., 2015).

Les effets bénéfiques indirects de l'amélioration de la sensibilité à l'insuline sur le comportement émotionnel et la restauration des propriétés intrinsèques des neurones 5-HT peut également provenir de l'augmentation du transport du L-Trp au travers de la BHE. En effet, l'amélioration de la résistance à l'insuline est associée à une diminution des taux plasmatiques de BCAA en réponse à la metformine (Zemdegs et al., 2019). Or, les BCAA entrent en compétition avec le transporteur LAT1, également utilisé par le L-Trp, pour traverser la barrière hématoencéphalique. Par conséquent, la diminution des taux plasmatiques de BCAA par l'amélioration de la sensibilité à l'insuline permet une augmentation du transport du L-Trp vers le cerveau au travers de LAT1. De ce fait, nous pouvons supposer qu'un stock d'acide aminé précurseur de la sérotonine plus important permet d'augmenter la synthèse du neurotransmetteur.

Enfin, la restauration des propriétés intrinsèques et d'excitabilité des neurones 5-HT par la metformine pourrait également résulter de mécanismes indépendants de l'amélioration de la sensibilité à l'insuline. En effet, la cible majeure de la metformine est l'AMPK (Rena et al., 2017) et il est possible que moduler cette protéine dans les neurones 5-HT permettent intrinsèquement de restaurer leurs propriétés électrophysiologiques, indépendamment d'une amélioration de la sensibilité à l'insuline. De plus, bien que la metformine cible l'AMPK, d'autres mécanismes d'actions potentiels de ce biguanide sont susceptibles d'exister (Rena et al., 2017). Par conséquent, il est également possible que la metformine restaure l'excitabilité et les propriétés intrinsèques des neurones 5-HT du RD par un mécanisme « off-target » confondant qui nous soit inconnu. Afin de discerner l'implication de l'amélioration de la sensibilité à l'insuline et celui de l'effet intrinsèque de la metformine, il serait intéressant d'évaluer également l'effet de l'antidiabétique chez des souris nourries à un régime STD.

En conclusion, nous ne sommes pas en mesure de mettre en évidence des liens de causalité entre la résistance à l'insuline des neurones 5-HT et l'altération de cette neurotransmission en relation avec les troubles émotionnels associés au régime HFD. Nous avons toutefois démontré que l'amélioration de la sensibilité à l'insuline permettait de restaurer les altérations du système 5-HT induit par le régime HFD et ainsi d'améliorer le comportement émotionnel des souris. Ces résultats représentent un argument de plus en faveur de la responsabilité de l'altération du système sérotoninergique dans les troubles émotionnels comorbide au régime HFD

5.3 Rôle de la résistance à l'insuline des neurones 5-HT dans le développement des troubles émotionnels

Par ailleurs, il est intéressant d'observer la variabilité des souris à développer des troubles métaboliques et émotionnels en réponse à la diète obésogène HFD. En effet, toutes les souris nourries au régime HFD ne développent pas de troubles métaboliques très marqués (King, 2012). De la même manière, comme nous avons pu l'observer au cours de nos expériences, certaines souris présentant des altérations métaboliques ne développent pas de troubles émotionnels prépondérants. Ce même phénomène s'observe également au niveau de la réponse à l'insuline des neurones 5-HT des souris HFD au cours d'enregistrements électrophysiologiques *ex-vivo*. En effet, certains neurones 5-HT sont insulino-résistant tandis que d'autres augmentent leur activité en réponse à l'insuline sur les différentes tranches du même cerveau d'un animal nourri au régime HFD. Par conséquent, tous les neurones 5-HT d'un animal nourri au régime HFD ne sont pas insulino-résistant. Cette différence pourrait s'expliquer par la localisation rostro-caudale et/ou dorso-ventrale des neurones 5-HT qui pourrait conférer une vulnérabilité différente à la résistance à l'insuline. Nous n'avons toutefois pas pu analyser ce paramètre et il est possible qu'au contraire, la résistance à l'insuline des neurones 5-HT soit répartie aléatoirement au sein du RD. Ainsi, nous pouvons nous demander dans quelles mesures et dans quelles proportions la résistance à l'insuline des neurones 5-HT induit-elle des troubles émotionnels ? Existe-t-il un seuil à partir duquel le nombre de neurones 5-HT résistants à l'insuline précipite l'apparition de troubles émotionnels ? Aussi, l'apparition d'un épisode dépressif caractérisé chez l'Humain est une réponse pathologique entre l'interaction de différents facteurs génétiques et environnementaux. Dès lors, nous pouvons nous demander si la résistance à l'insuline des neurones 5-HT serait suffisante à induire des troubles émotionnels ou bien si elle n'est qu'un facteur de vulnérabilité précipitant leurs apparitions dans un contexte environnemental défavorable. Afin de répondre à ces questions, nous avons créé la lignée de souris triple transgénique SeIRKO.

PARTIE III:

CONSEQUENCES COMPORTEMENTALES

ET FONCTIONNELLES D'UNE RESISTANCE

A L'INSULINE SPECIFIQUE DES NEURONES 5-HT

Dans cet axe, j'ai contribué à la réalisation de l'ensemble des expériences excepté la dissociation des cellules β (figure 41.A) qui a été réalisée par Camille Allard de l'équipe de Daniela Cota du Neurocentre Magendie (Bordeaux) ainsi que les expériences de PCR (figure 40.B-E), effectuées par Mathilde Chataignier, doctorante au sein du laboratoire NutriNeuro. Par ailleurs, les études d'électrophysiologie in vivo ont été réalisées par Bruno Guiard et Sébastien Bullich (figure 42.A).

1. Création et validation de la lignée triple transgénique SeIRKO

Les souris SeIRKO ont été obtenues par croisement des souris IR^{lox/lox} et des souris Pet1-cre-mCherry (**figure 40.A**; pour plus de détails voir Matériels & Méthodes). Cette lignée triple transgénique nous permet d'étudier les conséquences comportementales et fonctionnelles d'un défaut d'activation de la voie de signalisation de l'IR dans les neurones sérotoninergiques. Cette approche ne modélise pas une insulino-résistance physiologique à proprement parler mais permet néanmoins d'appréhender le rôle de l'insuline sur cette population neuronale dans un système artificiel où la résistance à l'insuline est à son paroxysme.

Tout d'abord nous avons vérifié l'expression de l'ARNm de l'IR dans le RD chez les souris SeIRKO et leurs congénères contrôles par RT-qPCR. Nous avons ainsi observé une diminution significative de l'expression de l'ARNm de l'IR dans le RD (**figure 40.B**), ce qui n'est pas le cas dans notre structure contrôle, l'hypothalamus, où aucune différence significative n'a été observée (**figure 40.C**). Toutefois, nous observons une expression résiduelle de 50% de l'ARNm de l'IR dans le RD. Ce constat peut s'expliquer par le fait que d'autres neurones de cette structure expriment également l'IR. C'est notamment le cas des neurones GABAergiques (Okaty et al., 2015) qui représentent 40 à 50% des neurones du RD.

D'autre part, en raison de l'affinité de l'insuline pour le récepteur à IGF-1 nous avons également mesuré l'expression de l'ARNm de ce récepteur afin de contrôler un éventuel phénomène de compensation. Cependant, nous n'avons observé aucune différence significative de l'expression de l'ARNm de IGF1-R dans le RD (**figure 40.D**) et dans l'hypothalamus (**figure 40.E**). Au vue de ces résultats, la diminution significative de l'expression de l'ARNm de l'IR dans le RD n'est pas accompagnée de phénomènes compensatoires au travers d'une modification de l'expression du récepteur IGF-1.

Afin de vérifier que la délétion de l'IR chez les souris SeIRKO est fonctionnelle, nous avons étudié la réponse à l'insuline des neurones 5-HT du RD par électrophysiologie patch-clamp. De cette manière, nous avons observé une augmentation significative de la fréquence de décharge chez 88,9 % des neurones 5-HT en réponse à l'insuline (300 nM) chez les souris contrôles 5-HT^{IR-WT} (**figure 40.F**), correspondant à une augmentation significative de $144,0 \pm 7,8$ % par rapport à leur fréquence de décharge basale (**figure 40.H**). A l'inverse nous n'avons pas observé de différence significative de l'activité de décharge des neurones 5-HT en réponse à l'insuline chez les souris 5-HT^{IR-KO} (**figure 40.G; 40.H**). La perfusion d'insuline sur les tranches de RD des animaux 5-HT^{IR-KO} a engendré une augmentation de la fréquence de décharge chez seulement un neurone 5-HT sur les 10 enregistrés. Par conséquent, ces résultats confirment l'absence du récepteur à l'insuline sur les neurones 5-HT chez les souris 5-HT^{IR-KO}, permettant ainsi de valider notre modèle. Par ailleurs, ces données confirment également les résultats obtenus dans le premier axe indiquant un effet direct de l'insuline sur les neurones 5-HT au cours d'expériences d'électrophysiologie *ex-vivo*. En effet, nous observons au cours de cette expérience que la délétion de l'IR abroge l'effet de l'insuline sur ces neurones.

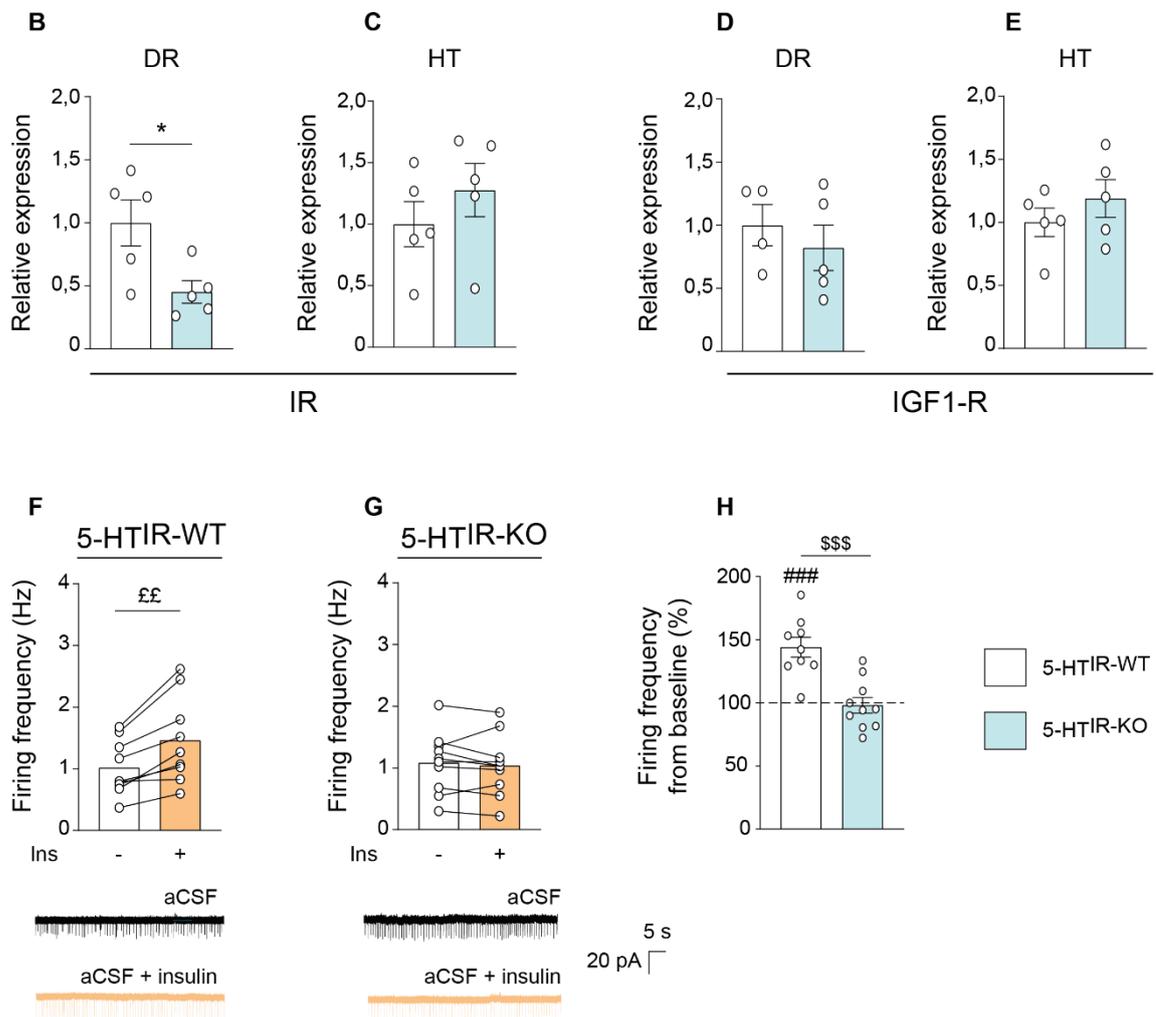
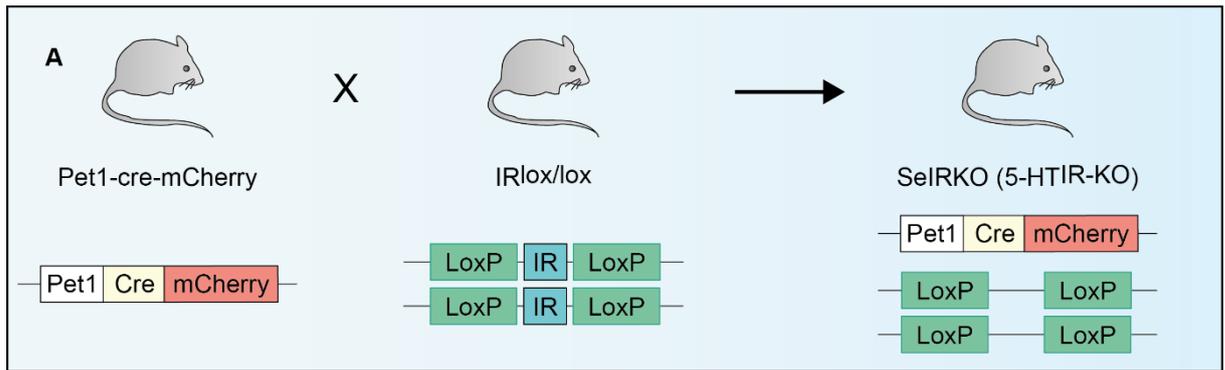


Figure 40: Les souris de la lignée *SeIRKO* présentent une délétion du récepteur à l'insuline dans les neurones 5-HT qui est observable sur le plan moléculaire et fonctionnel.

A. La souris SeIRKO a été obtenue par croisement des lignées Pet-1-cre-mCherry et IR^{lox/lox}. **B-C.** Mesure de l'expression relative de l'ARNm du récepteur à l'insuline dans le Raphé dorsal (**B**) et dans l'hypothalamus (**C**). **D-E.** Mesure de l'expression relative de l'ARNm du récepteur à IGF-1 dans le Raphé dorsal (**D**) et dans l'hypothalamus (**E**). **F-G.** Modulation de la fréquence de décharge des neurones 5-HT du RD par patch-clamp des souris 5-HT^{IR-WT} (**F**) et 5-HT^{IR-KO} (**G**) en réponse à l'application d'insuline (300 nM). Panel bas: traces représentatives respectives. **H.** Modification de la fréquence de décharge des neurones 5-HT par rapport à leur activité basale, en réponse à l'insuline. Statistiques: T-test: *p<0,05. T-test apparié: ££p<0,01. One sample t-test vs 100: ###p<0,001. One-way ANOVA, post-hoc: test de Tuckey: \$\$\$p<0,001.

2. Conséquence de la délétion du récepteur à l'insuline des neurones 5-HT sur le métabolisme énergétique et l'homéostasie glucidique

Dans l'introduction, nous avons vu que la délétion génétique de l'IR cérébrale pouvait induire des altérations du métabolisme énergétique et de l'homéostasie glucidique. Plus particulièrement, la délétion de l'IR dans les neurones dopaminergiques induit de tels effets (Könner et al., 2007). De ce fait, nous avons évalué les conséquences métaboliques de la délétion de l'IR dans les neurones sérotoninergiques. En outre, le facteur de transcription Pet-1, utilisé comme gène rapporteur dans la souris Pet-1-cre-mCherry, est également exprimé par les cellules β des îlots de Langerhans. Par conséquent, la création de la souris SeIRKO est susceptible d'engendrer un phénotype métabolique similaire à la souris BIRKO (Beta cell Insulin Receptor Knock-Out ; Kulkarni et al., 1999). On observe dans cette lignée transgénique une hyperinsulinémie à jeun associée à des défauts de sécrétion et une intolérance au glucose. De cette manière, il est nécessaire de vérifier l'état de l'homéostasie glucidique et du métabolisme énergétique des souris 5-HT^{IR-KO}.

Premièrement, nous n'avons observé aucune différence dans la masse corporelle des souris en fonction de leur génotype (**figure 41.A**). Au cours d'un test de fasting-refeeding, nous n'avons pas non plus observé de différence significative dans la prise alimentaire entre les deux

groupes (**figure 41.B**). Afin d'observer d'éventuelles altérations de l'homéostasie glucidique, nous avons mesuré la glycémie à jeun des animaux. Toutefois, aucune différence significative n'a pu être observée entre les deux génotypes (**figure 41.C**). Le test de tolérance au glucose par injection intrapéritonéale d'un bolus de glucose (2g/kg) permet d'observer une légère diminution de l'efficacité de la tolérance au glucose chez les souris 5-HT^{IR-KO}, bien qu'elle ne soit pas significative (**figure 41.D**). En revanche, les mesures des aires sous la courbe de ce test entre t₀ et t₁₂₀ min permet de mettre en évidence une augmentation significative de ce paramètre chez les souris 5-HT^{IR-KO} (**figure 41.E**). Ces données suggèrent une légère altération de l'homéostasie glucidique chez la souris SEIRKO, malgré, le faible nombre d'animaux utilisé au cours de ces expériences.

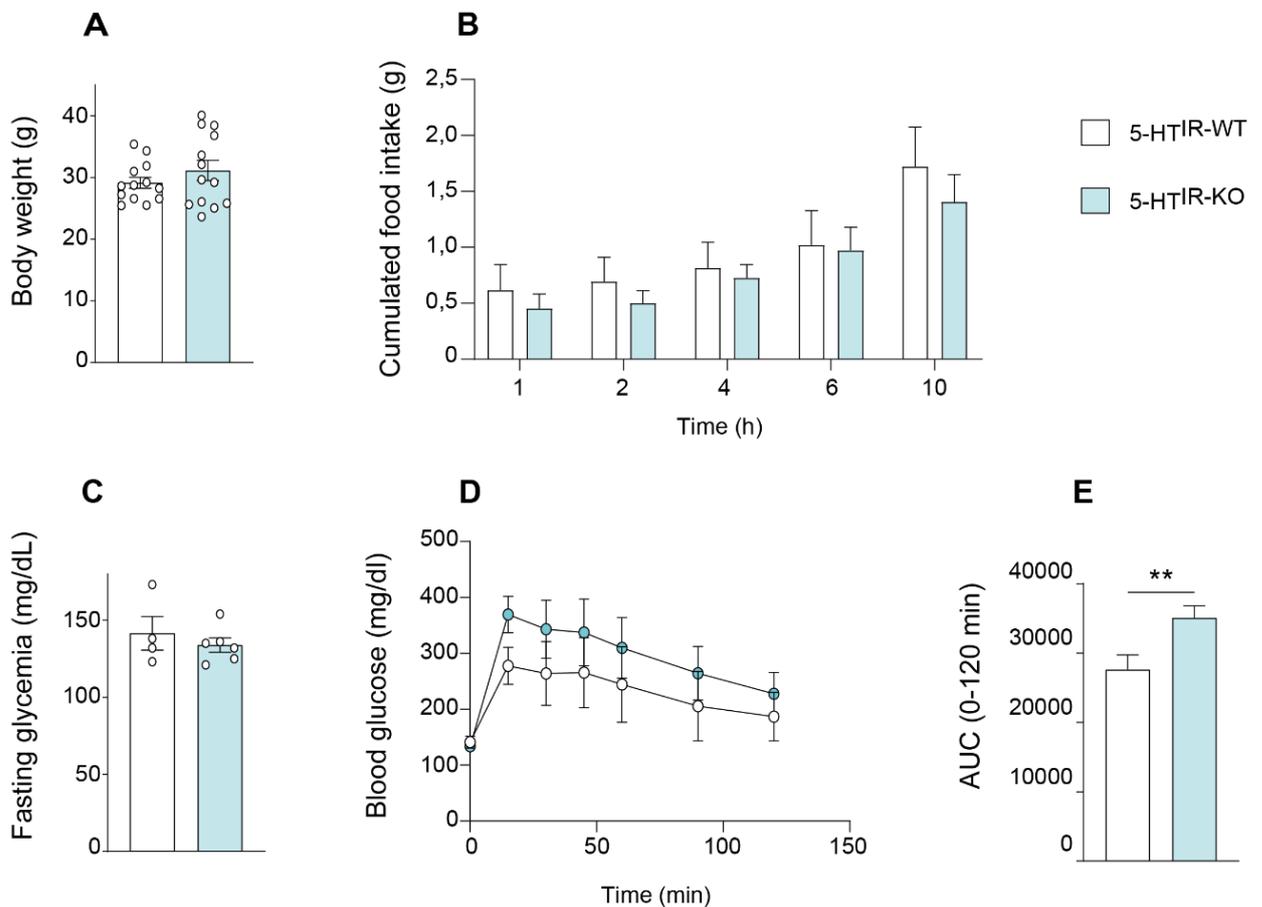


Figure 41: Evaluation de différents paramètres métaboliques chez la souris SeIRKO.

A. Mesure de la masse corporelle. **B.** Evaluation de la prise alimentaire cumulée au cours du temps après une mise à jeun de 24h. **C.** Glycémie à jeun. **D.** Test de tolérance au glucose au cours du temps en réponse à un bolus de glucose (2 g/kg) injecté par voie intrapéritonéale. **E.** Mesure des aires sous la courbe du test de tolérance au glucose (**D**) entre t_0 et t_{120} min. Statistiques: T-test: $**p < 0,01$.

3. Caractérisation électrophysiologique des neurones 5-HT du RD des souris SeIRKO

Au cours de cette étude, nous avons combiné des approches par électrophysiologie *in vivo* et *ex-vivo* sur tranches de RD. L'étude *in vivo* a permis de mettre en évidence une diminution significative de la fréquence de décharge des neurones 5-HT du RD chez les souris SeIRKO comparé à leurs congénères contrôles (**figure 42.A**).

Nous avons, dans un second temps, étudié les propriétés intrinsèques d'excitabilité des neurones 5-HT du RD par patch-clamp (**figure 42.B**). Les protocoles d'injection de courants hyperpolarisants par incrémentation n'ont pas permis de mettre en évidence de différence significative entre les deux groupes de souris (**figure 42.C; 42.D**). De la même manière, aucune différence significative du nombre de PA en réponse à de forts courants dépolarisants (100, 200, 300 pA) n'a été observée (**figure 42.E; 42.F**).

Nous nous sommes par la suite intéressés aux conséquences de la délétion de l'IR sur les propriétés intrinsèques du PA des neurones 5-HT du RD (**figure 42.I**). Nos résultats indiquent une tendance à la diminution de la rhéobase sans significativité statistique pour les souris SeIRKO (**figure 42.G**), ce qui est également le cas concernant l'intervalle d'activation des neurones (**figure 42.H**). En revanche, nous avons constaté une augmentation significative de la durée du PA chez les animaux SeIRKO comparé à leurs congénères contrôles (**figure 42.J**). Par ailleurs, nous avons aussi observé une diminution significative du temps d'ascension du PA (**figure 42.K**) et du temps de déclin du PA chez les animaux SeIRKO (**figure 42.L**). Toujours concernant les propriétés intrinsèques du PA, nous n'avons observé aucune différence significative de son amplitude entre les groupes (**figure 42.M**). L'AHP est une phase essentielle du PA modulant notamment son activité et sa fréquence de décharge à travers différents canaux ioniques. Nous n'avons observé aucune différence significative en ce qui concerne l'amplitude

de l'AHP entre les groupes (**figure 42.N**). Cependant, nous avons constaté que le temps pour atteindre le pic d'amplitude maximale de l'AHP était significativement plus élevé chez les souris SeIRKO comparé à leurs congénères contrôles (**figure 42.O**). Cette diminution du temps pour atteindre le pic d'amplitude de l'AHP s'apprécie également au travers de la vitesse requise pour atteindre ce pic, qui n'est pas compensée. De cette façon, les animaux SeIRKO ont une vitesse pour atteindre le pic de l'AHP significativement plus faible que leurs congénères contrôles (**figure 42.P**).

L'ensemble de la caractérisation électrophysiologique des souris SeIRKO a permis de mettre en évidence plusieurs altérations des propriétés des neurones 5-HT du RD. Nous avons notamment observé que leur fréquence de décharge était significativement plus faible chez ces animaux. Cette diminution pourrait s'expliquer par l'augmentation de la durée du PA mais aussi par l'augmentation de la durée de l'AHP, allongeant la période réfractaire avant le prochain PA. Ainsi, l'invalidation génétique de l'IR au sein du système 5-HT provoque des altérations électrophysiologiques multiples au sein des neurones 5-HT du RD se traduisant par une activité plus faible de ces neurones. Au vue de l'implication du système 5-HT dans la régulation du comportement émotionnel, de telles altérations pourraient avoir des répercussions comportementales chez les animaux SeIRKO.

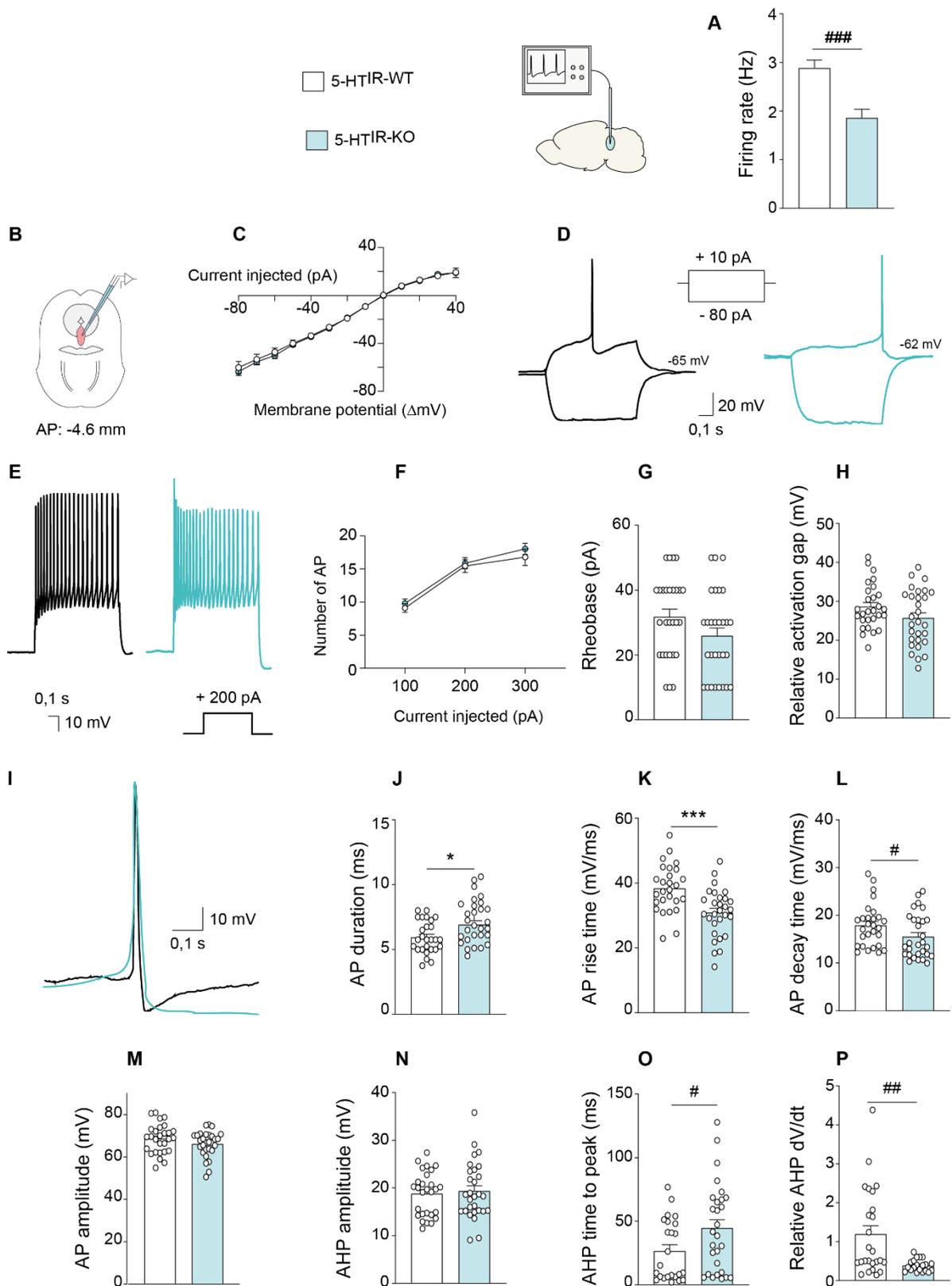


Figure 42: Les souris *SeIRKO* présentent une diminution de l'activité des neurones 5-HT du Raphé dorsal associée à des altérations de leurs propriétés intrinsèques.

A. Activité de décharge des neurones 5-HT du RD mesurée par électrophysiologie *in vivo*. **B.** Utilisation de souris triple transgénique 5-HT^{IR-WT} et 5-HT^{IR-KO} exprimant la mCherry sous le contrôle du facteur de transcription Pet-1, permettant la visualisation des neurones 5-HT par fluorescence lors d'expériences d'électrophysiologie sur tranche de RD. **C.** Modulation du potentiel de membrane en réponse à des créneaux hyperpolarisants incrémentiels. **D.** Traces représentatives au cours du protocole appliqué en **C**, visualisant l'injection du premier courant hyperpolarisant et du courant appliqué pour obtenir la rhéobase. **E.** Trace représentative du nombre de potentiel d'action observé en réponse à l'injection d'un courant de 200 pA. **F.** Nombre de PA en réponse à des injections de courants dépolarisants incrémentiels. **G.** Mesure de la rhéobase. **H.** Mesure de l'intervalle d'activation des neurones. **I.** Trace représentative d'un PA observé à la rhéobase. **J.** Durée du PA. **K.** Temps d'ascension du PA. **L.** Temps de déclin du PA. **M.** Amplitude du PA. **N.** Amplitude de l'AHP. **O.** Temps pour atteindre le pic d'amplitude maximale de l'AHP. **P.** Vitesse pour atteindre le pic d'amplitude maximale de l'AHP. Statistiques: Mann-Whitney: #p<0,05; ##p<0,01; ###p<0,001. T-test: *p<0,05; ***p<0,001.

4. Conséquence de la délétion du récepteur à l'insuline des neurones 5-HT sur le comportement émotionnel

Dans un second temps nous avons effectué une batterie de tests visant à phénotyper le comportement émotionnel des souris SeIRKO. Ces tests ont pour objectif d'évaluer les conséquences de la délétion de l'IR dans les neurones 5-HT sur le comportement pseudo-anxieux et pseudo-dépressif, selon notre hypothèse de recherche. Au cours du test du labyrinthe en croix surélevée, nous avons observé une augmentation significative du temps passé dans les bras ouverts chez les souris 5-HT^{IR-KO} comparé à leurs congénères sauvages (**figure 43.A**). Dans le test de la boîte clair/obscur, nous observons une diminution significative du temps passé dans le compartiment obscur pour les souris 5-HT^{IR-KO} comparé aux souris 5-HT^{IR-WT} (**figure 43.B**). D'autre part, nous n'avons pas observé de différence significative du temps passé dans le centre du champ ouvert entre les groupes (**figure 43.C**). La mesure de l'activité locomotrice des souris au cours de ce test n'a pas permis de mettre en évidence de différence significative relative à ce paramètre entre les deux génotypes (**figure 43.D**). Enfin, les résultats du test

d'alimentation supprimée par néophobie indiquent que les souris SeIRKO ont une latence à se nourrir significativement plus faible que leurs congénères sauvages, comme représenté par la courbe de survie de Kaplan-Meier (**figure 43.E**). Nous avons également mesuré le comportement de résignation des souris de cette lignée à travers le test de suspension par la queue. Nos résultats indiquent que les souris SeIRKO ont un temps d'immobilité significativement plus faible que leurs congénères contrôles (**figure 43.F**).

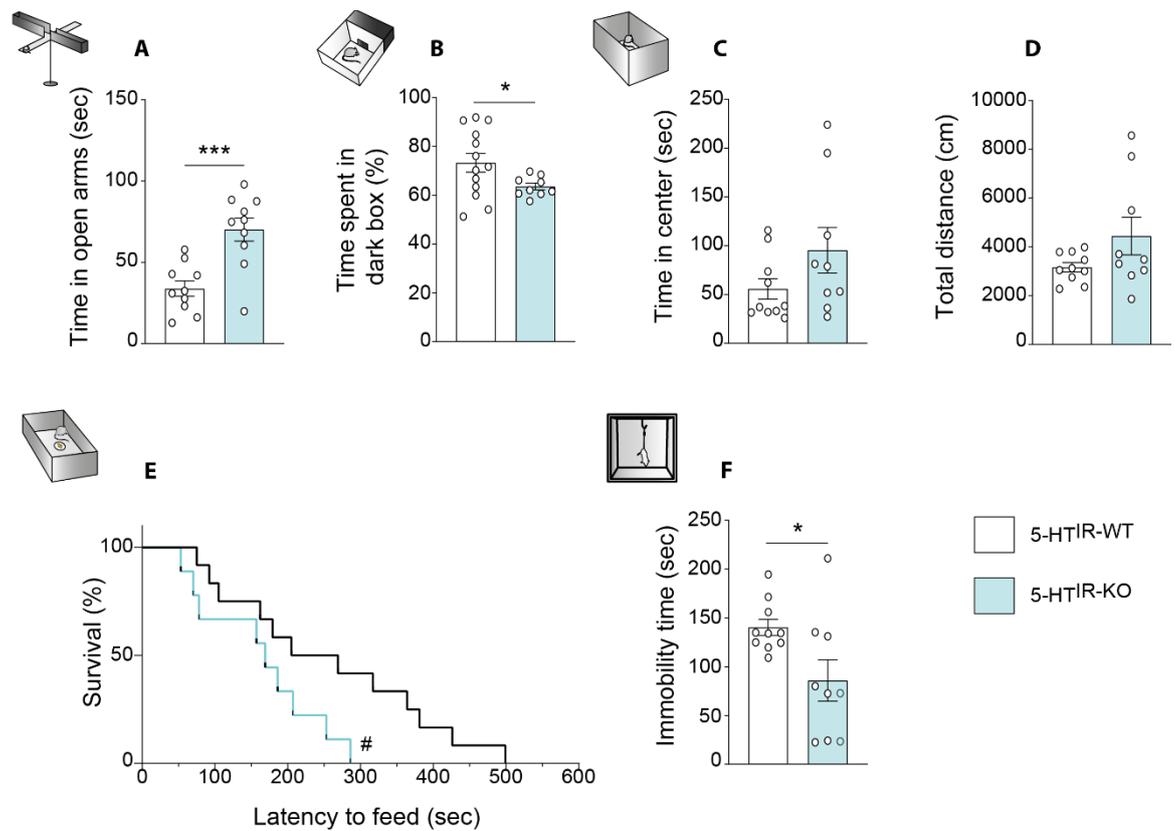


Figure 43: La délétion du récepteur à l'insuline dans les neurones 5-HT diminue le comportement de type anxieux et de résignation des souris.

A. Temps passé dans les bras ouverts de l'EPM. **B.** Temps passé (%) dans le compartiment sombre du light/dark box. **C.** Temps passé dans le centre de l'OF. **D.** Activité locomotrice au cours de l'OF. **E.** Courbe de survie en fonction de la latence à se nourrir dans le NSF. **F.** Temps d'immobilité totale dans le TST. Statistiques: T-test: * $p \leq 0,05$; *** $p < 0,001$. Test de Mantel-Cox: # $p < 0,05$.

En somme, cette caractérisation comportementale nous permet d’observer que la délétion de l’IR conditionnel des neurones 5-HT diminue le comportement de type pseudo-anxieux et de résignation chez la souris. Ces résultats sont opposés à notre hypothèse et nécessitent par conséquent d’approfondir les mécanismes qui pourraient expliquer ce phénotype comportemental.

Metabolism	Emotional behavior	DR 5-HT neurons
↓ Glucose tolerance	↓ Unconditioned-anxiety (EPM, NSF, L/D)	↓ Firing activity
	↓ Despair (TST)	↑ AP duration
		↑ AHP duration

Tableau 12: Récapitulatif de la caractérisation métabolique, comportementale et électrophysiologique des souris *SeIRKO*

5. Interprétation expérimentale

5.1 Homéostasie glucidique des souris SeIRKO

La potentielle intolérance au glucose des souris SeIRKO est intéressante car on observe ce même phénomène chez les souris BIRKO. Par conséquent il est probable que la recombinaison par l'enzyme cre ait également invalidé le récepteur à l'IR au travers du gène rapporteur Pet-1 exprimé par la cellule β . D'autre part, nous n'avons pas pu à ce jour évaluer la sécrétion pancréatique d'insuline chez ces souris, un paramètre qui nous renseignerait davantage sur le statut métabolique de ces souris. Enfin, l'analyse de l'expression de l'IR dans les cellules β des animaux SeIRKO permettrait de déterminer de manière claire l'invalidation ou non de ce récepteur dans ces cellules.

5.2 Relation entre l'état du système sérotoninergique et le phénotype comportemental des souris SeIRKO

L'objectif de cette étude était d'évaluer les conséquences comportementales d'un défaut d'action de l'insuline sur les neurones 5-HT, modélisant une résistance à l'insuline paroxystique de ces neurones. Contrairement à notre hypothèse, nous avons observé que les souris SeIRKO présentent un phénotype comportemental de type anxieux et de résignation réduit comparé à leurs congénères contrôles. Ce phénotype comportemental est également accompagné d'une diminution de l'activité des neurones 5-HT du RD pouvant être expliquée par l'altération de certaines de leurs propriétés intrinsèques. La construction génétique de ce modèle confère une invalidation développementale du récepteur à l'insuline dans les neurones 5-HT. Or, comme nous l'avons vu, l'insuline joue également le rôle de facteur neurotrophique et neuroprotecteur dont l'implication est cruciale au cours du développement (Brüning et al., 2000). Par conséquent, il est probable que le développement du système sérotoninergique de la souris SeIRKO ait été perturbé par l'invalidation génétique de l'IR au sein de cette population neuronale. Etant donné le rôle neuroprotecteur de l'insuline au cours du développement nous pouvons ainsi émettre l'hypothèse que la délétion de l'IR a engendré une diminution de la survie des neurones 5-HT et par conséquent de leur nombre final.

Dès lors, un phénotype hyposérotoninergique cérébrale de la souris SeIRKO, soutenu notamment par l'activité réduite des neurones 5-HT du RD, permettrait d'expliquer le phénotype comportemental observé chez ces souris (**tableau 13**). En effet, on observe également une diminution du comportement anxieux chez les souris présentant un KO développemental de *Pet-1* ou de *Lmx1b* (Dai et al., 2008; Kiyasova et al., 2011; Liu et al., 2010) dont la diminution de la population des neurones 5-HT est respectivement de 80% et 100% (Ding et al., 2003; Hendricks et al., 1999). La diminution des taux de sérotonine extracellulaire au moyen de la surexpression de SERT ou de l'inactivation de VMAT2 induit également une diminution du comportement de type anxieux chez la souris (Jennings et al., 2006; Narboux-Nême et al., 2011). D'autre part, l'inactivation génétique de l'enzyme TPH2 entraîne également une diminution du comportement pseudo-anxieux (Maddaloni et al., 2018; Waider et al., 2017, 2019). Enfin, le comportement de résignation est significativement diminué dans différents modèles d'hyposérotoninergisme développemental (Maddaloni et al., 2018; Savelieva et al., 2008).

La diminution de l'activité de décharge des neurones 5-HT du RD pourrait aussi être le résultat de la sensibilité accrue, ou de la surexpression du récepteur 5-HT_{1A}, augmentant de ce fait l'autonhibition tonique de ce récepteur sur le système sérotoninergique. En effet, au cours d'une expérience préliminaire, nous avons observé une tendance de l'expression de ce récepteur plus importante chez les souris SeIRKO comparée aux souris WT. Or, la littérature met en évidence que le KO développemental du récepteur 5-HT_{1A} chez la souris, augmente le comportement de type anxieux (Heisler et al., 1998). En accord avec ce phénotype hypersérotoninergique, la diminution de l'expression de l'autorécepteur 5-HT_{1A} par génie génétique est associée à l'augmentation de la fréquence de décharge des neurones 5-HT du RD (Richardson-Jones et al., 2010). De plus, l'augmentation du comportement de type anxieux chez la souris en réponse à l'inactivation génétique du récepteur 5-HT_{1A} semble être dépendant de la fenêtre temporelle du KO. En effet, l'inactivation génétique du récepteur 5-HT_{1A} jusqu'à P21 est suffisant pour augmenter le comportement de type anxieux à l'âge adulte, ce qui n'est plus le cas lors d'un KO à l'âge adulte (P80) (Gross et al., 2002). Par conséquent, l'absence du récepteur 5-HT_{1A} au cours de la 3^{ème}/4^{ème} semaine postnatale est cruciale dans le développement normal du comportement de type anxieux chez la souris. De manière similaire, un phénotype hypersérotoninergique au cours du développement, de P4 à P21, modélisé via l'inhibition de la recapture de la sérotonine par la fluoxétine, provoque des résultats opposés à ceux observés lors du traitement chez l'adulte. En effet, on observe que l'inhibition du SERT pendant cette période

augmente le comportement de type anxieux à l'âge adulte (Ansorge et al., 2004; Soiza-Reilly et al., 2019) à l'instar des modèles présentant une délétion constitutive du SERT (Ansorge et al., 2004; Lira et al., 2003).

Collectivement l'ensemble des données de la littérature indique que l'altération de la neurotransmission sérotoninergique via la modulation de ses éléments de régulation au cours du développement perturbe la mise en place du comportement de type anxieux. Plus précisément, la fenêtre développementale de P15 à P21 semble être cruciale dans la maturation des réseaux neuronaux régulant le comportement de type anxieux par la sérotonine. De ce fait, une dérégulation du système 5-HT au cours de cette période par l'inactivation constitutive de l'IR au sein de cette neurotransmission pourrait expliquer les modifications du comportement anxieux des souris SeIRKO observées à l'âge adulte. Plus précisément, la diminution de l'activité de décharge des neurones 5-HT du RD suggère un phénotype hyposérotoninergique cérébral chez les souris SeIRKO. La diminution du comportement anxieux constamment reportée dans les études de modèles hyposérotoninergiques constitutifs, qui est également observée chez les souris SeIRKO, renforce d'autant plus cette hypothèse.

Genetic model	Unconditionned anxiety	Conditionned anxiety	Depressive-like behaviours (immobility)	References
Lmx1b ^{lox/lox::ePet1^{cre}}	↓ EPM, NSF	↑ contextual FC		Zhao et al., 2006 Dai et al., 2003
Pet1 -/-	↑ EPM, OF ↓ EPM, NSF	↑ contextual and cued FC	Normal FST	Hendricks et al., 2003 Schaefer et al., 2009 Kiyasova et al., 2011
Pet1 ^{lox/-::ePet1^{creERT2}}	↑ EPM, OF			Liu et al., 2010
Tph2 -/-	Normal, OF ↓ EPM	Normal cued FC ↑ contextual and cued FC	↓ FST ↑ FST, TST	Savelieva., 2003 Lesh et al., 2012
Tph2 R439H <i>variant</i>	↑ light/dark box		↑ FST, TST	Beaulieu et al., 2008
Vmat2 +/-	Normal: OF, NSF, light/dark box, zero maze		↑ FST, TST	Fukui et al., 2007
Vmat2 ^{lox/lox::Sert^{cre}}	↓ NSF		↓ TST	Narboux-Nème et al., 2011
Sert-overexpressing	↓ EPM			Jennings et al., 2006
Pet1-Tox	↓ OF	↑ contextual FC		Kim et al., 2009
En1/Pet1-Tox	↓ OF	Normal contextual FC		Kim et al., 2009

Tableau 13: Conséquences comportementales d'un hyposérotoninergisme central dans différents modèles murins.

D'après (Fernandez and Gaspar, 2012).

Par ailleurs, les études comportementales mettent également en évidence qu'un phénotype hyposérotoninergique développemental confère une vulnérabilité accrue au développement de troubles émotionnels dans le modèle de défaite sociale chronique (Sachs et al., 2015) ainsi que l'exacerbation de la réponse de peur conditionnée (Dai et al., 2008; Hendricks et al., 2003; Zhao et al., 2006). A cette heure, nous n'avons pas soumis les animaux SeIRKO à ce genre de

paradigme. Néanmoins, en extrapolant ces données il est possible que l'inactivation de l'IR dans les neurones 5-HT ayant conduit à un phénotype hyposérotoninergique, provoque une susceptibilité accrue des souris SeIRKO à développer des troubles du comportement émotionnel en réponse à un stress chronique.

A la lumière des données de la littérature, l'interprétation des résultats concernant les souris SeIRKO relatifs à notre hypothèse de recherche semble limitée par le biais développemental de notre modèle. L'observation d'un phénotype pseudo-anxieux et pseudo-dépressif chez les souris GIRKO ou NIRKO dont l'inactivation génétique de l'IR est aussi développementale peut s'expliquer par le fait que plusieurs structures sont impliquées. Par conséquent, le phénotype comportemental observé lors de ces études résulte probablement d'altérations de plusieurs neurotransmissions. Enfin, en ce qui concerne les souris NIRKO, le gène rapporteur (la nestine) n'est pas spécifique aux populations neuronales puisqu'il est également exprimé par les cellules β du pancréas, certaines cellules cardiaques ou encore certaines cellules de la moelle osseuse (Bernal and Arranz, 2018). Toutefois, ce modèle triple transgénique a permis de mettre en évidence l'importance de la signalisation de la voie de l'IR dans les neurones 5-HT au cours du développement. De ce fait, le récepteur à l'insuline contribue-t-il au maintien de l'homéostasie des neurones 5-HT au cours du développement, permettant ainsi la maturation des réseaux neuronaux impliqués dans le comportement de type anxieux ? La mise en perspective d'un tel phénomène chez l'Humain soulève également la question suivante: Peut-on envisager que l'altération du système sérotoninergique sous-tendant une susceptibilité accrue à la DM soit le résultat d'une anomalie de l'action neurotrophique de l'insuline sur les neurones 5-HT au cours d'une période critique du développement ?

L'altération du système sérotoninergique lors de périodes critiques du développement a été proposée à de multiples reprises comme étant un facteur de vulnérabilité à la DM et aux troubles anxieux. Comme nous l'avons vu, un nombre important d'éléments de la régulation du système sérotoninergique a été mis en cause dans cette possible dérégulation au cours du développement (transporteur de la sérotonine SERT, enzyme limitante de synthèse TPH2, récepteur 5-HT_{1A}). Toutefois, l'étude d'éléments « non-sérotoninergiques » comme ce fut notamment le cas avec les facteurs de transcriptions comme Pet-1, Lmx1-b ou récemment STAT3 (Reisinger et al., 2020) pourrait également ouvrir de nouvelles perspectives dans la compréhension de ces processus. Par conséquent, l'étude de polymorphismes génétiques de gènes impliqués dans la

résistance à l'insuline et exprimés par les neurones 5-HT pourrait apporter de nouveaux éléments de réponse quant à une éventuelle altération de la maturation des réseaux neuronaux impliqués dans le comportement de type anxieux au cours du développement.

PARTIE IV:

MODULATION DE LA SENSIBILITE CEREBRALE

A L'INSULINE DANS LA REPONSE AU

TRAITEMENT ANTIDEPRESSEUR DE TYPE ISRS.

Dans ce dernier axe de mon projet de thèse, j'ai réalisé l'ensemble des expériences comportementales.

1. Etude de la réponse antidépresseur à un ISRS des souris

SeIRKO

Les données de la littérature indiquent que les patients DT2 présentent une prévalence de non-réponse aux traitements antidépresseurs significativement plus élevée que les individus sains (Woo et al., 2016). Etant donné que les propriétés des neurones 5-HT du RD des animaux SeIRKO sont altérés, et que la neurotransmission 5-HT est ciblée par les antidépresseurs de type ISRS, nous nous sommes intéressés à la réponse antidépresseur de cette lignée murine.

Ainsi la première étude de cet axe a consisté à étudier la réponse aigüe des souris SeIRKO à un antidépresseur de type ISRS, en l'occurrence, la fluoxétine. Pour ce faire, nous avons évalué le temps d'immobilité des souris 5-HT^{IR-WT} et 5-HT^{IR-KO} en réponse à l'injection d'un véhicule ou de fluoxétine (18 mg/kg) dans le test de suspension par la queue. Tout d'abord, de la même manière que lors de la caractérisation comportementale, nous avons observé que les souris SeIRKO ont un temps d'immobilité significativement plus faible que leurs congénères contrôles (**figure 44**). Par ailleurs, nous observons que chez les souris 5-HT^{IR-WT}, la fluoxétine induit une diminution significative du temps d'immobilité, ce qui est notre contrôle positif. Enfin, de manière intéressante, nous n'observons pas de diminution significative du temps d'immobilité chez les souris SeIRKO en réponse à la fluoxétine (**figure 44**). Bien que ces données soient pour le moment préliminaires, il semblerait que les souris SeIRKO ne répondent pas aux traitements ISRS dans ce test.

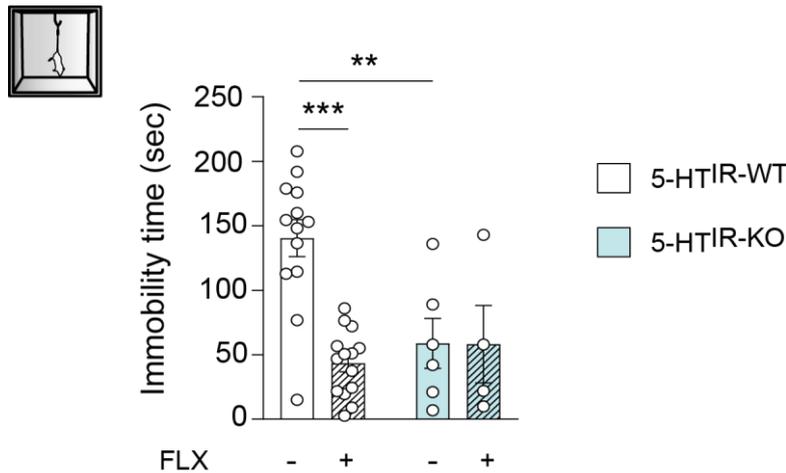


Figure 44: La délétion du récepteur à l'insuline dans les neurones 5-HT altère la réponse à la fluoxétine au cours du TST.

Mesure du temps total d'immobilité des souris KO pour l'IR ou de leurs congénères WT en réponse à l'injection d'une solution saline ou de fluoxétine i.p (18 mg/kg) dans le TST. Statistiques: Two-way ANOVA, post-hoc: test de Tuckey: **p<0,01; ***p<0,001.

2. Etude de la combinaison de l'injection intranasale d'insuline et de la fluoxétine dans la réponse antidépresseur aigue

Si les données préliminaires de la non-réponse à la FLX chez les animaux SeIRKO suggèrent que la voie de signalisation de l'IR des neurones 5-HT est importante dans l'efficacité des antidépresseurs ISRS, est-il possible qu'à l'inverse, augmenter la transduction de son signal intracellulaire permette d'améliorer la réponse aux antidépresseurs ?

Comme nous l'avons vu précédemment, l'activation de l'IR stimule la voie de signalisation de l'élément mTOR, dont nous avons vu l'implication dans la réponse antidépresseur. De plus, l'insuline favorise la neurogénèse et possède des propriétés neuroplastiques, d'autres processus clefs de la réponse antidépresseur. Enfin, d'après les résultats de l'axe 1, l'insuline inhibe la libération de sérotonine au travers de l'activation du récepteur 5-HT_{1A}. Or, ce même phénomène est observé au cours de l'administration aigue d'un ISRS. De cette manière, l'ensemble de ces éléments nous ont poussé à émettre l'hypothèse que la stimulation de la voie de signalisation

de l'IR cérébral peut potentialiser les effets thérapeutiques des ISRS. Nous avons donc évalué les effets de la combinaison de l'injection intranasale d'insuline (2IU) et de la fluoxétine (18 mg/kg) par voie intrapéritonéale sur le comportement de résignation des souris, selon plusieurs paradigmes.

Nous avons ainsi dans un premier temps évalué l'efficacité de cette combinaison de traitement dans le test de suspension par la queue au cours d'une administration aigue sur des souris naïves nourries à un régime STD. Tout d'abord, nous avons observé une diminution significative du temps d'immobilité des souris dans le test de suspension par la queue en réponse à l'administration aigue de fluoxétine (**figure 45.A**). Ce premier groupe de traitement correspond à notre contrôle positif. Par ailleurs, nous constatons que l'injection intranasale d'insuline n'induit pas de réponse de type antidépresseur car nous n'observons aucune différence significative du temps d'immobilité comparé aux souris véhicules (**figure 45.A**). Enfin, le résultat le plus intéressant ici, est que la combinaison entre l'INI et la FLX permet de diminuer significativement le temps d'immobilité comparé aux souris traitées avec la FLX seule (**figure 45.A**). Cette première expérience indique que l'injection intranasale d'insuline permet de potentialiser l'effet antidépresseur de la fluoxétine au cours d'une administration aigue sur des souris naïves.

Nous avons souhaité, dans un second temps, évaluer l'effet potentialisateur de l'injection intranasale d'insuline sur la fluoxétine chez des souris présentant une insulino-résistance des neurones 5-HT du RD, en l'occurrence des souris nourries au régime HFD. En utilisant le même test, nous avons tout d'abord observé qu'une injection aigue de fluoxétine permettait également de diminuer significativement le temps d'immobilité de ces souris dans le test de suspension par la queue (**figure 45.B**). De manière similaire aux souris nourries au régime STD, nous n'avons observé aucune différence significative en réponse à l'injection intranasale d'insuline (**figure 45.B**). Enfin, au contraire, nous avons observé que chez les souris nourries au régime HFD, l'adjonction de l'INI à la FLX ne permettait pas de potentialiser l'effet de l'ISRS. En effet, nous n'avons observé aucune différence significative du temps d'immobilité entre ces deux groupes (**figure 45.B**). Cette seconde expérience indique que, chez des souris présentant des troubles émotionnels associés à une insulino-résistance des neurones sérotoninergiques, l'injection intranasale d'insuline ne permet pas de potentialiser l'effet d'un ISRS.

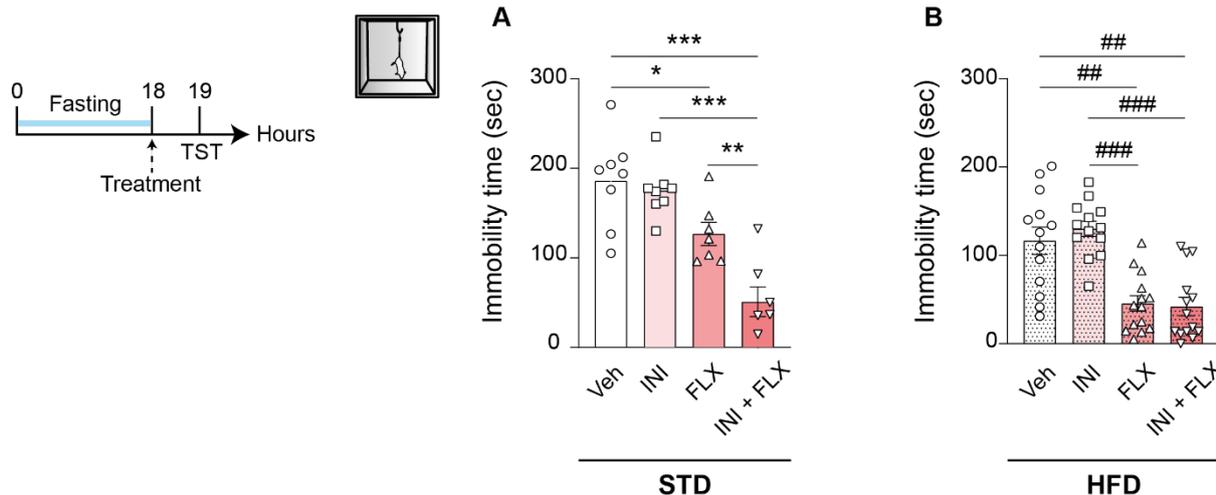


Figure 45: L'injection intranasale d'insuline potentialise l'effet antidépresseur de la fluoxétine dans le TST tandis que cet effet est abrogé par un régime de type obésogène HFD.

A-B. Mesure du temps total d'immobilité dans le TST chez des souris nourries au régime STD (**A**) ou HFD (**B**) en réponse à l'injection d'insuline (2IU) par voie intranasale ou de fluoxétine (18 mg/kg) par voie intrapéritonéale ainsi que de leur combinaison. Statistiques: One-way ANOVA, post-hoc: test de Tuckey: * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$. Kruskal-Wallis, post-hoc: test de Dunn: ## $p < 0,01$; ### $p < 0,001$.

Le test de suspension par la queue ne présente que le critère de validité prédictive d'un modèle de dépression, il nous paraissait donc intéressant d'évaluer les effets de la combinaison entre l'injection intranasale d'insuline et la fluoxétine dans un modèle de dépression présentant des critères de validité de face, de validité de construction et de validité prédictive.

3. Etude de la combinaison de l'injection intranasale d'insuline et de la fluoxétine dans la réponse antidépresseur au cours d'un stress de contention chronique

Suite à l'observation de l'effet potentialisateur de l'injection intranasale d'insuline sur l'effet antidépresseur de la fluoxétine au cours d'une administration aiguë, nous nous sommes questionnés sur la pérennité de ce phénomène dans des conditions physiopathologiques. De ce fait, nous avons évalué l'efficacité de la combinaison INI + FLX au cours d'une administration subchronique dans un modèle de stress de contention chronique (**figure 46.A**). Au terme de cette procédure, nous avons évalué le comportement de résignation des souris dans le test de suspension par la queue.

De la même manière que lors d'une administration aiguë sur des souris non stressées, l'injection intranasale d'insuline ne modifie pas significativement le temps d'immobilité dans ce test (**figure 46.B**). Dans ces conditions expérimentales, nous n'avons pas non plus observé de diminution significative du temps d'immobilité chez les animaux traités à la fluoxétine, en comparaison aux animaux traités au véhicule (**figure 46.B**). A l'inverse, nous avons constaté que la combinaison INI + FLX permet de diminuer significativement le temps d'immobilité des souris dans le FST comparé aux souris traitées avec le véhicule ou l'INI seule (**figure 46.B**). Toutefois, aucune différence significative n'a été relevée entre le groupe FLX et le groupe INI + FLX (**figure 46.B**). De cette manière, dans le modèle de stress de contention chronique, l'injection intranasale d'insuline combinée à la fluoxétine permet de mettre en évidence un effet antidépresseur de l'ISRS, ce qui n'est pas le cas lors son administration subchronique seule.

Nous avons également mesuré le comportement de type anxieux des animaux au cours de l'exploration du test de champ ouvert. Au cours de ce test, aucune différence significative n'a été observée entre les groupes (**figure 46.C**). Toutefois, cette expérience met en évidence que dans des conditions de stress chronique et de traitement subchronique, l'injection intranasale d'insuline n'est plus en mesure d'induire une réponse anxiolytique. Par ailleurs, les résultats indiquent que les souris traitées à la combinaison INI + FLX ont une activité locomotrice significativement réduite comparée aux souris du groupe INI (**figure 46.D**). Toutefois, cette

observation ne peut biaiser l'interprétation du test de suspension par la queue. En effet, la diminution de l'activité locomotrice des souris INI + FLX dans l'OF ne rend pas compte de leur augmentation d'activité dans le FST, car ces résultats sont opposés. Par conséquent, la diminution du temps d'immobilité des souris INI + FLX dans le test de suspension par la queue ne peut être imputée à une différence d'activité locomotrice.

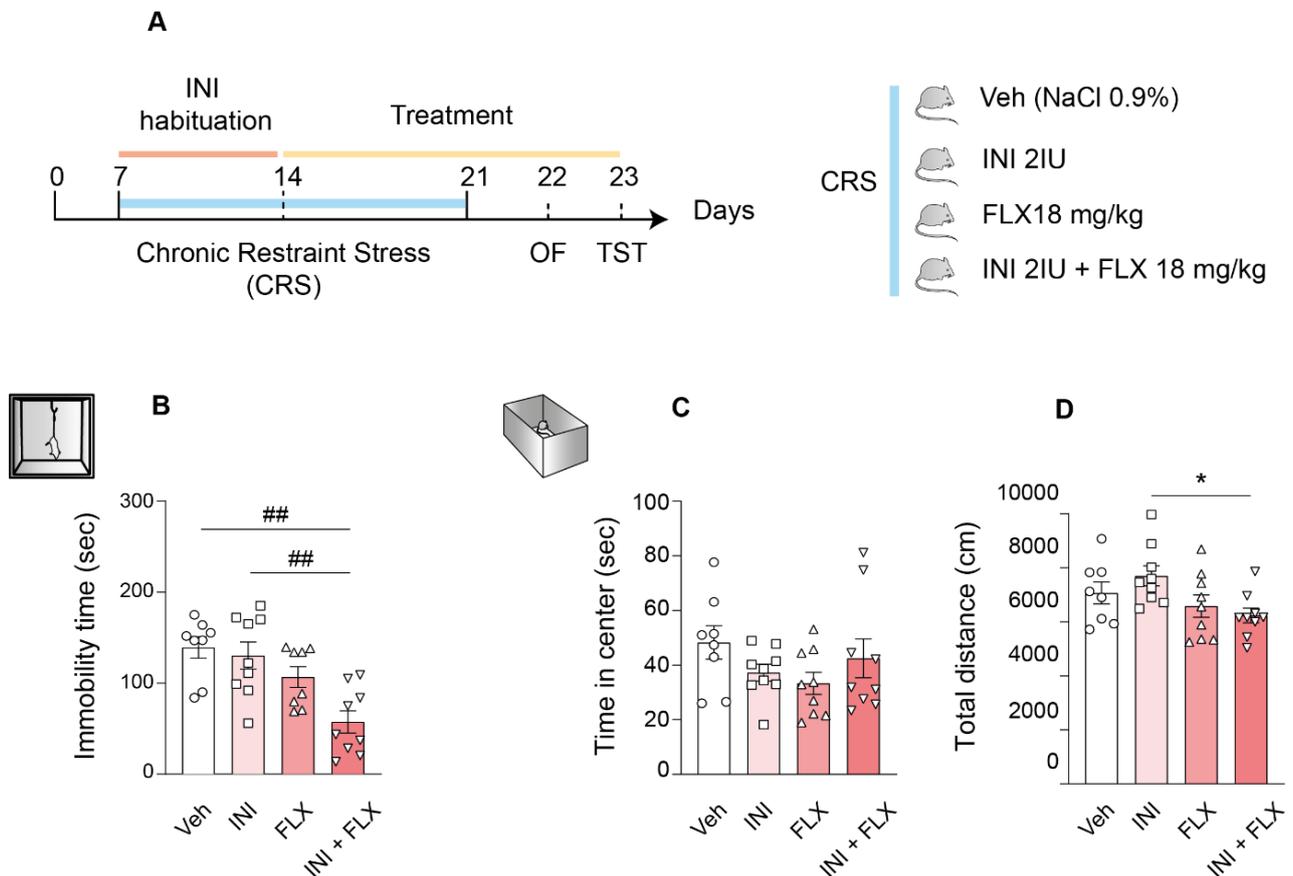


Figure 46: L'injection intranasale d'insuline potentialise l'effet antidépresseur de la fluoxétine dans un modèle de stress de contention chronique.

A. Différents lots de souris avec différents traitements (véhicule; INI 2IU; FLX 18 mg/kg; ou combinaison INI + FLX) ont été soumis à un stress de contention de 2 heures par jour, répété pendant 14 jours. Au bout du 7^{ème} jour de contention, les traitements pharmacologiques respectifs des souris ont débuté. Les tests comportementaux ont été effectués après au moins 9 jours de traitement. **B.** Temps d'immobilité totale dans le TST. **C-D.** Temps passé dans le centre de l'OF (**C**) et mesure de l'activité locomotrice au cours de ce test (**D**). Statistiques: Kruskal-Wallis, post-hoc: test de Dunn: ## $p < 0,01$. One-way ANOVA, post-hoc: test de Tuckey: * $p < 0,05$.

4. Interprétation expérimentale

4.1 Non réponse à l'effet antidépresseur de la fluoxétine chez les souris SeIRKO

Conclure que les animaux SeIRKO sont résistants à la fluoxétine semble précipité au vu de l'unique expérience que nous avons fait, qui de plus fait état d'une administration aigue. La non réponse à la fluoxétine lors d'une administration unique dans le TST pourrait aussi refléter la présence d'un effet plancher chez ces animaux, ce qui en biaiserait notre interprétation. Toutefois, un temps d'immobilité nul dans le TST a déjà été constaté au cours de nos expériences. Par conséquent, les données préliminaires de non réponse à la fluoxétine que nous avons obtenues chez les souris SeIRKO ne reflètent probablement pas un effet plancher. Dans un premier temps, le nombre d'animaux SeIRKO traité doit être augmenté pour pouvoir tirer une conclusion de cette expérience. Si la non réponse à la fluoxétine au cours d'une administration unique dans le TST se confirme, il serait alors intéressant d'évaluer la réponse des souris SeIRKO à un traitement chronique antidépresseur dans un modèle de dépression établi.

Si dans ces conditions, la non réponse à la fluoxétine des animaux SeIRKO se confirme également, il serait intéressant de déterminer si l'invalidation génétique développementale de l'IR au sein des neurones sérotoninergiques n'a pas perturbé l'expression d'éléments sérotoninergiques clefs de la réponse antidépresseur, comme le transporteur SERT et le récepteur 5-HT_{1A}. Nous avons de plus constaté une diminution de l'activité des neurones 5-HT chez les souris SeIRKO, ce qui pourrait favoriser la non réponse à la fluoxétine au cours d'une administration unique dans le TST. En outre, une éventuelle modification de l'expression du récepteur 5-HT_{1A} peut également modifier l'activité des canaux GIRK2 auxquels ils sont couplés. Or, comme nous l'avons vu précédemment, ces canaux participent également aux effets antidépresseur des ISRS (Kobayashi et al., 2004; Takahashi et al., 2006). Ainsi, un défaut d'action de l'insuline sur le système sérotoninergique pourrait altérer la maturation des circuits régulant l'anxiété mais également ceux impliqués dans la réponse antidépresseur. Par conséquent, peut-on également envisager que l'altération du système sérotoninergique consécutive à une anomalie de l'action neurotrophique de l'insuline sur les neurones 5-HT au

cours du développement confère une vulnérabilité à une diminution de la réponse aux traitements antidépresseurs de type ISRS ?

4.2 Evaluation de la stratégie de combinaison de l'insuline intranasale et de la fluoxétine en vue d'une potentialisation de l'effet antidépresseur

Au cours de cette étude nous avons mis en évidence que l'administration d'insuline (2IU) par voie intranasale permet de potentialiser l'effet antidépresseur de la fluoxétine (18 mg/kg) sur des souris naïves au cours d'une injection aigue. En outre, l'effet potentialisateur de l'injection intranasale d'insuline sur la fluoxétine est abrogé par le régime HFD. Etant donné la résistance à l'insuline des neurones 5-HT du RD induite par le régime HFD, ces résultats suggèrent que les neurones 5-HT pourraient être impliqués dans l'effet potentialisateur de la fluoxétine par l'injection intranasale d'insuline. Enfin, dans un modèle de stress de contention chronique nous avons observé un effet antidépresseur de la combinaison INI + FLX, ce qui n'est pas le cas de la FLX seule. Malgré les conditions expérimentales qui ne permettent pas de conclure définitivement sur un quelconque effet, ces résultats suggèrent que l'injection intranasale d'insuline pourrait diminuer le délai d'action de la fluoxétine en condition de stress chronique. En effet, la non réponse à la fluoxétine seule pourrait s'expliquer par le temps de traitement court (9 jours) au vu du délai d'action long pour obtenir une réponse thérapeutique (14-21 jours dans les études précliniques). Par ailleurs, la résistance à cet antidépresseur dans ce modèle semble peu probable étant donné que les effets antidépresseurs de la fluoxétine ont été observés dans un modèle de stress de contention chronique (Seo et al., 2017). Par conséquent, il est possible que dans un modèle de stress de contention chronique, l'injection intranasale d'insuline diminue le délai d'action de la fluoxétine.

4.3 Hypothèse mécanistique

D'après nos résultats, l'insuline diminue les taux de sérotonine à travers l'autoinhibition médiée par les récepteurs 5-HT_{1A}. Par conséquent, un état transitoire suppose que les taux de sérotonine soient d'abord augmentés en réponse à l'insuline avant de suractiver les récepteurs 5-HT_{1A} et de diminuer la libération de sérotonine. Par conséquent l'administration aigue d'un ISRS et de l'insuline pourrait potentialiser l'augmentation transitoire des taux de [5HT]_{ext} dans

le RD et par conséquent potentialiser l'inhibition de l'activité des neurones 5-HT via le récepteur 5-HT_{1A}. Enfin, l'augmentation des taux de [5HT]_{ext} dans le RD pourrait accélérer la désensibilisation de l'autorécepteur 5-HT_{1A} par sur-activation et ainsi diminuer le délai d'apparition de l'effet antidépresseur de la fluoxétine. L'absence de la potentialisation de la fluoxétine par l'injection intranasale d'insuline chez les souris HFD ayant une résistance à l'insuline des neurones 5-HT, apporte un élément de plus en faveur de ce mécanisme. De plus, l'hypothèse d'une potentialisation de la neurotransmission sérotoninergique est également soutenue par l'implication du système 5-HT dans l'effet antidépresseur de IGF-1, administré par voie intracérébroventriculaire (icv). En effet, Hoshaw et ses collaborateurs ont mis en évidence que l'effet antidépresseur de IGF-1 par voie icv est abrogé par la déplétion en sérotonine au travers de la PCPA (Hoshaw et al., 2008). De plus, cette étude indique que l'injection icv de IGF-1 permet d'augmenter les taux de sérotonine extracellulaire dans l'hippocampe ventral. Etant donné les voies de signalisation convergente de IGF-1R et de l'IR, et au vu de l'action de l'insuline sur les neurones 5-HT, il est probable que l'insuline potentialise l'effet antidépresseur de la fluoxétine au travers de leur action synergique sur le système 5-HT.

SYNTHESE DES RESULTATS

Au cours de ce projet de thèse, nous avons pu apporter de nouveaux éléments de réponse quant au rôle de l'action centrale de l'insuline sur le comportement émotionnel et de son interaction avec le système 5-HT (**tableau 14**). Dans un contexte physiologique, nous avons démontré que l'insuline inhibe le système sérotoninergique ce qui a pour conséquence de diminuer le comportement de type anxieux des souris. En condition d'insulino-résistance, nous avons mis en évidence que la résistance à l'insuline des neurones 5-HT est associée à des dysfonctionnements du système sérotoninergique et de troubles émotionnels accompagnant les altérations métaboliques du modèle de DT2 que nous avons utilisé. Bien que nous n'ayons pu formellement le démontrer de manière causale, l'ensemble de ces résultats suggère que l'altération du système sérotoninergique consécutive à son insulino-résistance est responsable du développement de ces troubles émotionnels comorbides. De manière intéressante, l'implication de l'insuline dans le comportement émotionnel semble davantage concerner le comportement pseudo-anxieux que celui de résignation. En effet, l'action de l'insuline cérébrale n'entraîne pas de diminution du comportement de résignation et nous n'observons pas d'exacerbation de ce type de comportement chez les animaux ayant une insulino-résistance du système 5-HT. Nous pouvons de ce fait supposer que les effets de l'insuline centrale sur les neurones 5-HT sont suffisants pour moduler la régulation du comportement de type anxieux mais pas assez pour agir sur le comportement de résignation. Cette hypothèse est soutenue par le fait que l'action cérébrale de l'insuline permet de potentialiser l'effet antidépresseur de la fluoxétine. Par conséquent cette potentialisation pourrait résulter d'une action de l'insuline sur le comportement de résignation au travers du système 5-HT qui, masquée ou insuffisante à l'état basal, serait révélée et efficace dans des conditions particulières, comme l'administration d'un ISRS.

Brain effects of insulin

Outcome	Insulin-sensitive state	Insulin-resistance
5-HT system	↓	- (ex-vivo) <i>in-vivo?</i>
Anxiety-like behavior	↓*	↑
Depressive-like behavior	-	↑
SSRI antidepressant response	↑	-

Tableau 14: Synthèse des effets centraux de l'insuline en relation avec le système sérotoninergique

*non-observé en condition de stress chronique

PERSPECTIVES EXPERIMENTALES

L'ensemble des résultats de ce projet de thèse ont permis, pour certains, de mettre en évidence de manière claire les effets de l'insuline sur le comportement émotionnel. C'est notamment le cas de l'étude de l'injection intranasale d'insuline dans le comportement anxieux au travers du système sérotoninergique, bien qu'une expérience contrôle chez les animaux SeIRKO renforcerait d'autant plus ce résultat.

La principale surprise expérimentale au cours de notre projet est relative au phénotypage comportemental de notre modèle SeIRKO. Toutefois, en raison des limitations développementales inhérentes à notre modèle d'inactivation génétique, nous ne sommes pas en mesure d'évaluer l'impact du défaut d'action du récepteur à l'insuline non développemental sur le comportement émotionnel. Une autre approche possible pourrait être l'utilisation d'un modèle génétique dont l'inactivation du récepteur à l'insuline serait inductible, sous régulation du tamoxifène par exemple. De cette manière, nous contournerions la limite développementale au travers d'une délétion de l'IR induite à l'âge adulte. Une autre approche pourrait également être l'utilisation d'une stratégie virale au moyen d'un adéno-virus AAV-DIO-cre-shIR que nous injecterions dans le RD de souris Pet-cre-mCherry lors de chirurgies stéréotaxiques. De cette manière, les animaux pourraient être opérés vers 12 semaines pour que nous en évaluons leur phénotype comportemental à l'aide d'une batterie de tests à l'âge de 16 semaines. En utilisant cette approche, nous pourrions également évaluer la réponse de ces animaux présentant une délétion non développementale du récepteur à l'insuline dans les neurones 5-HT à un stress chronique et à un régime obésogène HFD. Nous pourrions ainsi déterminer si l'inactivation du récepteur à l'insuline dans les neurones sérotoninergiques à l'âge adulte confère une vulnérabilité accrue au développement de troubles émotionnels en réponse à ces deux types de facteurs environnementaux. Ce serait également l'occasion d'évaluer la réponse antidépresseur de ces animaux.

Par ailleurs, nous avons exploré de manière très préliminaire les effets de la combinaison de l'injection intranasale d'insuline avec l'antidépresseur fluoxétine. Afin de conclure sur une éventuelle diminution du délai d'action de la fluoxétine lors de sa combinaison avec l'injection

intranasale d'insuline, il faudrait traiter les animaux plus longtemps afin de mettre en évidence l'effet de la fluoxétine à plus long terme. En outre, le modèle de contention chronique ne semble pas le plus adapté à cette question, notamment en raison du court intervalle pendant lequel nous observons un comportement émotionnel altéré (chose que nous n'avons pas pu observer en raison du mauvais choix des contrôles non stressés). Les modèles de stress chronique modéré imprédictible ou de défaite sociale pourraient être une bonne alternative au modèle de contention chronique. Nous pourrions ainsi tester l'effet de la combinaison de l'injection intranasale d'insuline et de la fluoxétine sur l'efficacité et le délai d'action de la réponse antidépresseur. Enfin, l'utilisation d'autres antidépresseurs de type ISRS mais aussi d'autres classes pourrait être envisagée lors de la combinaison avec l'injection intranasale d'insuline. En ce sens, l'implication des neurones sérotoninergiques dans l'effet potentialisateur de l'insuline pourrait être évaluée dans une nouvelle approche non développementale des souris SeIRKO, dans la mesure où ces animaux ne présenteraient pas de différence significative du comportement de résignation en basale.

Discussion Générale

1. Rôle de l'insuline sur le comportement émotionnel en période postprandiale

Afin de saisir l'enjeu de l'insuline sur le comportement émotionnel, les différents effets de l'action cérébrale de l'insuline observés au cours de nos expériences se doivent d'être intégrés dans un contexte éthologique. En s'appuyant sur nos résultats expérimentaux et les données de la littérature, je vous propose ici un modèle mécanistique initié par le questionnement suivant: Pourquoi l'insuline, dont la libération est rythmée par la prise alimentaire, inhiberait le système sérotoninergique pour promouvoir une anxiolyse postprandiale ?

Chez l'Humain, l'insulinémie, dans des conditions basales, est de 20 à 30 pmol/L et atteint un pic de 250 à 300 pmol/L en 30 minutes en réponse à l'ingestion de 75 g de glucose. En effet, lors de la prise d'un repas, l'insuline est rapidement sécrétée au cours d'une première phase qui ne dure que 10 à 15 minutes, puis elle est ensuite libérée de manière pulsatile lors d'une seconde phase durant 1 à 2h (Cerasi and Luft, 1967). La libération d'insuline postprandiale dans la circulation sanguine permet ainsi l'absorption du glucose dans les tissus cibles. Grâce à son transporteur au sein de la barrière hématoencéphalique, l'insuline va également pouvoir atteindre le compartiment central et y exercer différentes actions. D'après nos résultats, elle permettrait ainsi, au travers de l'inhibition du système sérotoninergique, de diminuer le comportement de type anxieux et donc la vigilance.

Comme nous l'avons vu au cours de l'introduction, le système sérotoninergique permet d'adapter la réponse de peur selon l'intensité de la menace environnementale (Seo et al., 2019). Toutefois, l'initiation d'une réponse comportementale pour la survie de l'individu est régie principalement selon le concept de « fight or flight », décrit par Walter Bradford Cannon. Cette réponse est orchestrée par l'activation du système sympathique qui permet une mise en condition de l'organisme pour combattre ou fuir, en augmentant notamment le rythme cardiaque et la pression artérielle sous l'action des catécholamines. A l'inverse, le système autonome parasympathique favorise quant à lui, entre autre, la bradycardie et la péristaltie du système digestif sous l'influence de l'acétylcholine. De manière intéressante, le prix Nobel de Physiologie ou Médecine suisse, Walter Rudolph Hess, décrit au travers de ces deux systèmes, deux types d'états physiologiques. L'ergotropie relate l'activation du système autonome

sympathique, ce qui a pour conséquence un état de vigilance et d'attention élevé. Cet état est celui de l'action et d'un point de vue éthologique, il est par exemple particulièrement propice à l'activité de la chasse. La trophotropie est à l'inverse un état qui permet à l'organisme de se reposer et de se régénérer, notamment lors du sommeil ou bien après un repas, et repose sur l'activation du système autonome parasympathique. Le système parasympathique, en libérant de l'acétylcholine, module l'activité du système gastrointestinal et par conséquent régule finement les processus impliqués dans la digestion. Le système parasympathique innerve notamment l'estomac, l'intestin grêle et le colon proximal au travers du nerf vague, formé de neurones préganglioniques du noyau moteur dorsal vagal (DMV), localisé dans le tronc cérébral (Feng et al., 1990). L'innervation parasympathique dans l'intestin grêle, au travers du nerf vague, permet la stimulation de la motilité et de la contraction gastrique (Travagli and Anselmi, 2016). Par conséquent, lors de la période postprandiale, on observe une activité prépondérante du système parasympathique par rapport au système sympathique. Ce réajustement du tonus du système nerveux autonome est également associé à une diminution de l'état de vigilance et d'alerte.

La libération de l'insuline postprandiale est synchronisée à l'activation du système parasympathique au cours de la digestion. En effet, en terme de cinétique, la libération de l'insuline après la prise d'un repas dure environ 2h, coïncidant de ce fait avec la digestion. Par conséquent, l'insuline contribue-t-elle à l'état trophotropique en modulant la balance des systèmes sympathique/parasympathique au cours de sa libération postprandiale ? Si tel est le cas, quels sont les circuits neuronaux modulés par l'insuline qui sont impliqués dans cet effet ?

L'activité des neurones du DMV régulant l'activité du nerf vague peut être modulée par des afférences GABAergique, glutamatergique ou encore noradrénergique (Travagli and Anselmi, 2016). Ainsi, plusieurs circuits neuronaux peuvent indirectement influencer l'activité du système gastro-intestinal. C'est notamment le cas des neurones sérotoninergiques du Raphe Pallidus et du Raphe Obscurus qui, par la stimulation des neurones du complexe vagal dorsal, augmentent l'activité sécrétoire et contractile gastrique par le nerf vague (Taché et al., 1995). Toutefois, une action de l'insuline sur ces neurones semble peu probable en raison de l'expression particulièrement faible de l'IR dans le bulbe rachidien, structure où sont localisés ces noyaux du Raphé (Fernandez and Torres-Alemán, 2012; Kleinriders et al., 2014). Par conséquent, la libération d'insuline postprandiale ne semble pas être en capacité de moduler l'activité gastrique parasympathique au travers des neurones sérotoninergiques des groupes B1,

B2 et B3. Ces neurones sérotoninergiques étant les seuls de cette population neuronale projetant directement vers le DMV, il est par conséquent probable que si l'insuline module les neurones du DMV au travers des neurones 5-HT du Raphé dorsal, cette action implique l'engagement d'un réseau neuronal polysynaptique.

D'après nos résultats, l'action cérébrale de l'insuline inhibe les neurones sérotoninergiques du RD et diminue ainsi la libération de sérotonine dans l'amygdale. L'amygdale est une structure limbique impliquée dans le processus d'apprentissage de peur et composée de plusieurs noyaux interconnectés (Janak and Tye, 2015). L'activation de l'amygdale est associée à un comportement anxieux en réponse à des stimuli de valence négative (Whalen et al., 1998). Les études cliniques mettent ainsi en évidence une suractivation de l'amygdale chez des individus souffrant de troubles anxieux en réponse à ce type de stimuli (Liberzon and Sripada, 2008), ce qui est également le cas chez des animaux soumis à un stress chronique (Rosenkranz et al., 2010). Au travers de leurs projections, les neurones 5-HT du RD sont capables de dépolariser les neurones de l'amygdale (Yamamoto et al., 2014). De plus, l'augmentation du tonus sérotoninergique dans certains noyaux amygdaliens augmente le comportement de type anxieux (Bocchio et al., 2016), ce qui se vérifie également par l'administration intra-amygdale d'antidépresseurs de type ISRS (Quah et al., 2020). De cette manière, la diminution aiguë du tonus sérotoninergique dans l'amygdale est associée à une diminution de son activité anxiogénique, comme nous l'avons démontré expérimentalement. Ces effets se traduisent notamment par une diminution de l'état de vigilance mesuré au cours de test d'anxiété.

Il est particulièrement intéressant de noter que l'amygdale peut moduler le système gastro-intestinal au travers du nerf vague. En effet, l'amygdale projette de nombreuses efférences GABAergiques vers les neurones du DMV (Krettek and Price, 1978; Saha et al., 2000; Schwaber et al., 1982). On observe ainsi que la stimulation de l'amygdale centrale engendre une augmentation de la sécrétion d'acide gastrique (Sen and Anand, 1957; Zawoiski, 1967). De cette manière, la stimulation électrique de cette structure cérébrale provoque l'apparition d'ulcères gastriques, qui peuvent être prévenus par vagotomie (Innes and Tansy, 1980). A l'inverse, la lésion bilatérale des noyaux centraux de l'amygdale permet de prévenir l'apparition d'ulcères gastriques induit par une contention (Henke, 1980). L'ensemble de ces données supporte la fonction délétère de l'activation de l'amygdale sur le système gastro-intestinal au travers du nerf vague.

En diminuant les taux de sérotonine dans l'amygdale, l'insuline permet ainsi de diminuer son activité. Au vue du rôle de l'amygdale dans les troubles digestifs, ce mécanisme permet de prévenir l'apparition de troubles d'hyper-sécrétion gastrique, au travers du nerf vague. Par conséquent, l'insuline en diminuant l'activité de l'amygdale au travers du système sérotoninergique, prévient l'apparition de troubles gastrointestinaux au cours de la digestion. Ce modèle mécanistique propose que la libération postprandiale d'insuline favorise l'état trophotropique en diminuant l'activité de l'amygdale au travers de mécanismes polysynaptiques initiés par l'inhibition des neurones sérotoninergiques du Raphé dorsal. De cette manière, l'insuline favorise également l'absorption des nutriments et le bon déroulement de la digestion en diminuant l'état de vigilance. Par ailleurs, ce modèle mécanistique peut aussi se vérifier en conditions d'insulino-résistance. Il permet alors d'expliquer comment la résistance à l'insuline du système sérotoninergique favorise le développement des troubles du comportement émotionnel.

La diminution de l'efficacité de l'insuline sur les neurones sérotoninergiques résulte en l'incapacité d'inhiber la libération de sérotonine dans l'amygdale en période postprandiale. L'activité de l'amygdale ne sera alors pas diminuée, favorisant les troubles gastriques susmentionnés. De manière concomitante, l'activité de l'amygdale soutiendra un état de vigilance et d'alerte, au détriment du système parasympathique et des processus digestifs. Ces états comportementaux faisant état d'un stress, sont associés à une augmentation de la perméabilité intestinale et engendre un phénomène nociceptif favorisant l'hypersensibilité viscérale (Ait-Belgnaoui et al., 2005). De plus, l'augmentation de la perméabilité de la muqueuse intestinale permet l'infiltration d'endotoxines induisant une réponse inflammatoire, qui va également potentialiser l'action nociceptive et favoriser l'hypersensibilité viscérale (Farré et al., 2020). Enfin, l'état de stress a pour conséquence d'augmenter la libération de glucocorticoïde qui, au même titre que l'inflammation, active l'enzyme IDO (indoléamine 2, 3-dioxygénase) et favorise la synthèse de kynurénine au détriment de la sérotonine (O'Mahony et al., 2015). Ces altérations du système sérotoninergique périphérique par les glucocorticoïdes et l'inflammation sont également responsables du développement de troubles gastro-intestinaux (O'Mahony et al., 2015). Ainsi, l'ensemble de ces phénomènes a pour conséquences des altérations du système gastro-intestinal.

Les dysfonctionnements du système gastro-intestinal sont intégrés par les structures cognitives supérieures au moyen de rétrocontrôles intéroceptifs de l'axe intestin-cerveau

(Bonaz et al., 2018). Le traitement de ces signaux aversifs aura notamment pour conséquences leur encodage dans l'amygdale qui suscitera l'apparition d'un comportement anxieux. Or, l'anxiété et le stress ont pour conséquence d'accentuer d'autant plus les troubles gastro-intestinaux (Konturek et al., 2011). En effet, on observe que les patients souffrant d'anxiété et de dépression souffrent également de significativement plus de pathologies digestives fonctionnelles comme le syndrome de l'intestin irritable (Fond et al., 2014).

L'ensemble des mécanismes modifiant la perméabilité intestinale et favorisant l'inflammation peuvent également favoriser l'apparition d'une dysbiose intestinale (Zeng et al., 2017). Or, il est maintenant clairement établi que le microbiote intestinal influe sur nos émotions et pourrait être impliqué dans la physiopathologie des troubles de l'humeur et des troubles anxieux (Foster and McVey Neufeld, 2013). Par conséquent, l'activation de l'amygdale en période postprandiale favoriserait l'apparition de troubles digestifs au travers du nerf vague, qui pourraient également altérer le microbiote intestinal. De cette manière, l'altération du microbiote favoriserait l'apparition de comportements de type anxieux qui sont associés à une suractivité de l'amygdale, formant ainsi un cercle vicieux. La perte de l'inhibition transitoire de l'amygdale par les neurones 5-HT du Raphé dorsal en réponse à l'insuline en période postprandiale est à double tranchant. En effet, d'une part l'activation de l'amygdale va favoriser l'apparition de troubles digestifs via le nerf vague. D'autre part, son activation entraînera l'apparition d'un état anxieux. Ces deux mécanismes s'alimenteront l'un et l'autre formant alors un cercle vicieux au travers de l'axe microbiote-intestin-cerveau car les troubles gastro-intestinaux favorisent l'anxiété, et l'anxiété favorise les troubles gastro-intestinaux (Holtmann et al., 2017). Enfin, la chronicité de ces mécanismes peut s'inscrire dans le développement de troubles anxieux et de troubles de l'humeur, mettant en évidence la façon dont la résistance à l'insuline du système sérotoninergique pourrait être impliquée dans la physiopathologie de ces troubles psychiatriques.

Ce modèle mécanistique, illustré dans la **figure 47**, permet donc d'apprécier de manière intégrée le rôle de l'insuline sur le comportement émotionnel au travers du système sérotoninergique et d'acteurs périphériques et centraux. Il permet également de mettre en évidence la façon dont un phénomène temporellement défini pourrait entraîner l'apparition de troubles anxio/dépressifs au travers d'une dérégulation chronique entraînant de multiples réponses physiopathologiques s'amplifiant mutuellement (**figure 48**).

Ce modèle est uniquement centré sur un circuit neuronal impliquant l'amygdale et sa modulation par le système sérotoninergique. La diminution de l'activité des neurones 5-HT du Raphé dorsal peut également moduler l'activité de neurones dans d'autres structures de projection (noyaux accumbens, hippocampe ventral, etc...). En outre, en période postprandiale l'insuline va agir sur différentes structures cérébrales et ainsi agir sur différents circuits neuronaux susceptibles d'inter-agir entre eux. De plus, l'insuline est capable de moduler directement le système nerveux autonome, sans recruter le système 5-HT. Enfin, ce modèle ne prend pas en compte la sécrétion centrale d'insuline potentielle, qui pourrait également agir sur le système 5-HT, ou d'autres circuits neuronaux et jouer ainsi un rôle dans le comportement émotionnel. Par conséquent, le modèle présenté est simplifié et n'est pas exclusif. Il permet d'approcher une potentielle action discrète de l'insuline sur un circuit neuronal particulier qui participerait à la réponse physiologique globale de l'hormone dans un organisme vivant.

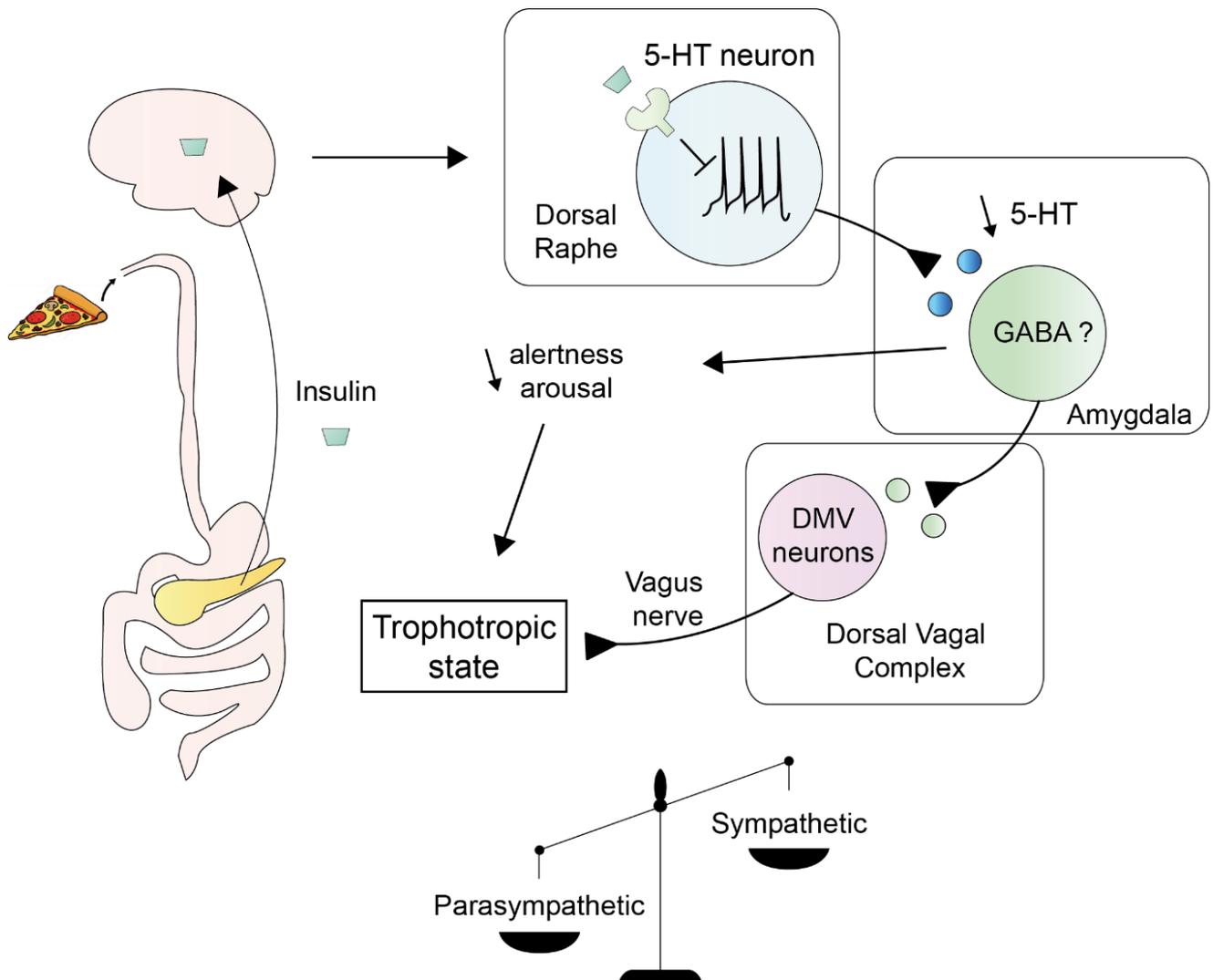


Figure 47: Modèle mécanistique de l'action postprandiale de l'insuline sur le système sérotoninergique favorisant l'état trophotrope au travers d'un circuit neuronal polysynaptique particulier impliquant l'amygdale

L'ingestion d'une pizza double pepperoni provoque la libération postprandiale d'insuline qui va agir sur différents tissus cibles dont le cerveau, après avoir franchi la BHE. Au sein du Raphé dorsal, l'insuline inhibe les neurones 5-HT ce qui a pour conséquence, entre autre, de diminuer les taux de sérotonine dans l'amygdale. L'inhibition des neurones de cette structure promeut une anxiolyse et diminue la vigilance. L'inhibition des neurones de l'amygdale projetant sur les neurones DMV du complexe dorsal vagal prévient également la stimulation du nerf vague par l'amygdale, dont les effets sont délétères sur le système gastro-intestinal. De cette manière, au travers de l'inhibition de l'amygdale, l'insuline, au travers du système sérotoninergique, permet une diminution de la vigilance et la prévention de dysfonctionnements intestinaux. L'ensemble de ces phénomènes favorise l'état trophotropique permettant une digestion optimale et la bonne assimilation des nutriments.

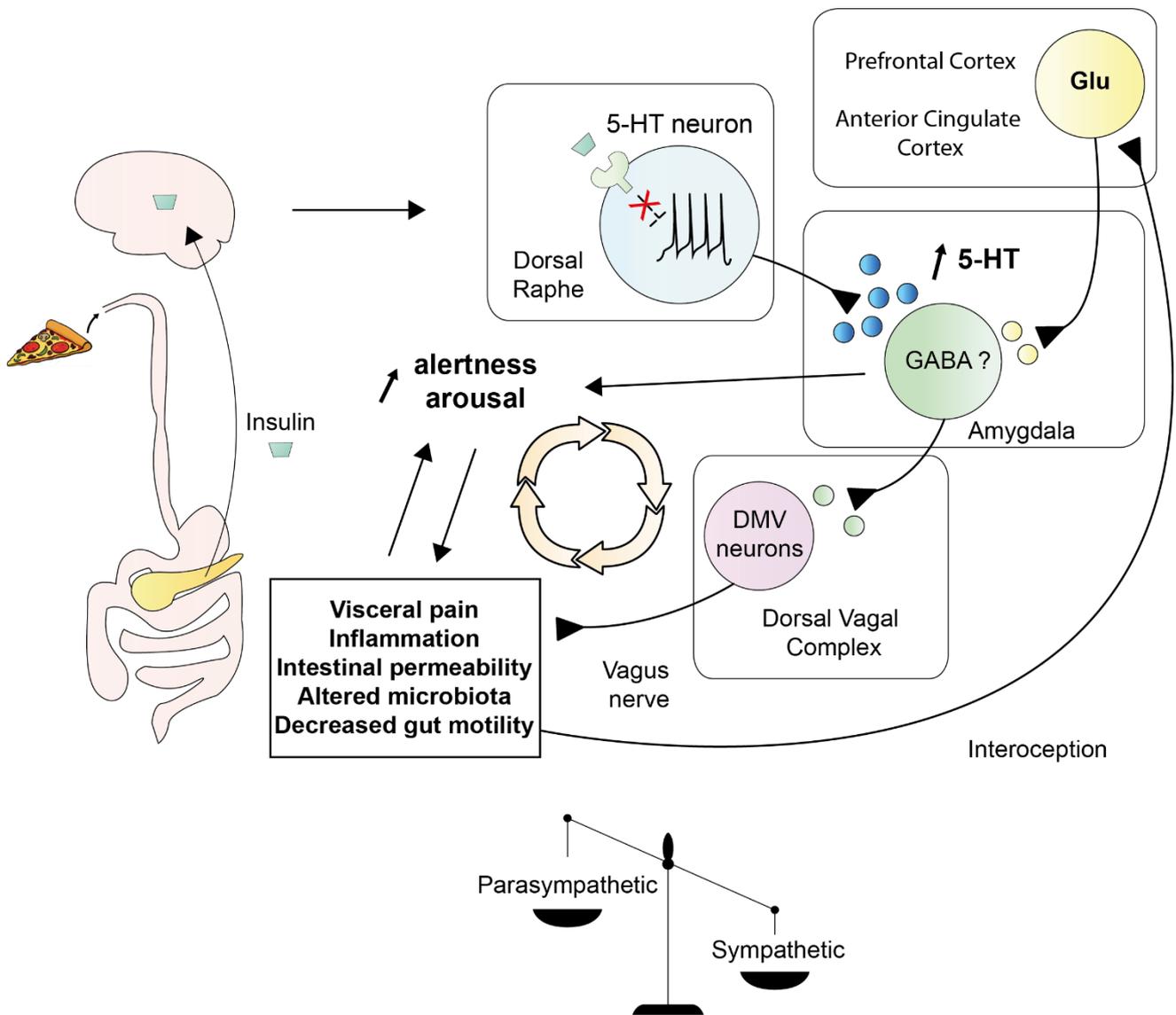


Figure 48: Conséquence de la résistance à l'insuline du système sérotoninergique en condition postprandiale au travers d'un circuit neuronal polysynaptique particulier impliquant l'amygdale

En condition d'insulino-résistance du système sérotoninergique, l'insuline ne permet plus l'inhibition des neurones 5-HT du RD en période postprandiale. Par conséquent durant cette fenêtre temporelle, l'activité des neurones amygdaliens n'est pas inhibée. Ainsi, l'état de vigilance reste soutenu et ne diminue pas pendant la digestion. De manière coïncidente, les neurones de l'amygdale projetant sur les neurones DMV vont stimuler le nerf vague, provoquant ainsi des troubles gastro-intestinaux. Ces processus vont induire plusieurs altérations du système gastro-intestinal dont l'augmentation de la nociception viscérale, une augmentation de la perméabilité intestinale et une diminution de la motilité intestinale. L'ensemble de ces dysfonctionnements peut également favoriser des altérations du microbiote ainsi qu'une réponse inflammatoire. Ces phénomènes physiopathologiques sont ensuite intégrés au travers du nerf vague par le système nerveux central par intéroception au niveau du cortex préfrontal et du cortex antérieur cingulaire. L'intégration de ces stimuli intéroceptifs aversifs peut également entraîner une activation de l'amygdale et entraîner une augmentation de la vigilance voire un état d'anxiété, alimentant ainsi ce cercle vicieux. L'installation chronique de ces mécanismes physiopathologiques pourrait avoir comme conséquence le développement de troubles émotionnels comorbides à une insulino-résistance primaire.

2. Implication physiopathologique: Peut-on traiter la dépression majeure en améliorant la sensibilité à l'insuline ?

Par différentes approches, l'objectif principal de ce projet de thèse était de comprendre le rôle que joue la résistance à l'insuline des neurones sérotoninergiques dans les troubles émotionnels comorbides au DT2. En tentant de répondre à cette question nous avons ainsi pu étudier de prime abord le rôle de l'insuline sur ce système dans des conditions physiologiques et aboutir au modèle mécanistique précédemment développé. Néanmoins, notre hypothèse de recherche est basée sur un mécanisme physiopathologique. De ce fait, il est intéressant de mettre en perspective nos résultats expérimentaux de manière translationnelle en nous interrogeant sur l'implication clinique de la sensibilité à l'insuline dans les troubles de l'humeur et dans les troubles anxieux. Améliorer la sensibilité à l'insuline pourrait-elle permettre d'améliorer la trajectoire thérapeutique des patients atteints de ces troubles psychiatriques ? Si oui, dans quelles populations d'individu ? De quelle manière ? C'est au travers de ces questions que nous discuterons de l'utilité et de l'intérêt de prendre en compte la résistance à l'insuline dans la prise en charge et le traitement des troubles de l'humeur et de l'anxiété (**figure 49**).

2.1 Dépression majeure comorbide au diabète de type 2

Les données épidémiologiques indiquant que les individus atteints de DT2 ont deux fois plus de risque de souffrir de DM, nous ont poussé à explorer le rôle de l'insulino-résistance du système 5-HT dans l'étiologie de ces troubles émotionnels comorbide. Nous avons ainsi observé que la résistance à l'insuline du système sérotoninergique est associée au développement de troubles de l'humeur chez des souris nourries à un régime obésogène. De la même manière, la restauration de la sensibilité à l'insuline par la metformine chez ces souris, permet de rétablir une fonction normale du système sérotoninergique qui est également associée à l'amélioration du comportement émotionnel. Nous en avons ainsi conclu qu'il était fortement probable que la résistance à l'insuline des neurones 5-HT sous-tende le développement des troubles émotionnels comorbides au DT2. Chez l'Humain, il n'est toutefois pas possible d'évaluer la résistance à l'insuline du système sérotoninergique. Au vue de nos résultats expérimentaux sur les souris HFD, nous admettons ici par extension, qu'une résistance à l'insuline périphérique est *de facto* associée à la résistance à l'insuline des neurones 5-HT. D'un

point de vue translationnel, ces données suggèrent qu'améliorer la sensibilité des patients DT2 atteints de DM permettrait ainsi de diminuer leurs symptômes anxio/dépressifs. Toutefois, cette potentielle approche thérapeutique nécessite à nouveau de distinguer des sous-populations d'individus susceptibles d'y répondre. Nous pourrions alors considérer une première population de patients souffrant de DM en condition de prédiabète de type 2, présentant une insulino-résistance périphérique mineure, ne nécessitant pas encore la prise d'agents antidiabétiques (American Diabetes Association, 2018). Cette population d'individus maintient son homéostasie glucidique au travers d'interventions environnementales comme la mise en place d'un plan de nutrition adapté et de la pratique d'une activité physique régulière (American Diabetes Association, 2018). En considérant que l'insulino-résistance de ces patients prédiabétiques favorise le développement de troubles émotionnels, alors une intervention pharmacologique au moyen d'un insulino-sensibilisant pourrait s'avérer suffisante dans l'amélioration des symptômes dépressifs. Bien entendu, cette prise en charge thérapeutique dépend du degré de sévérité de la DM. Dans le cas d'une dépression sévère, un traitement antidépresseur sera nécessaire, bien qu'il puisse également être utilisé en synergie avec un agent insulino-sensibilisant.

Ce cas de figure nous pousse également à nous intéresser à la population d'individus atteints de DT2 et de DM comorbides, modélisée dans nos études à l'aide de l'administration chronique du régime obésogène HFD. Le diagnostic du DT2 entraîne sa prise en charge thérapeutique au travers d'un traitement antidiabétique ou insulino-sensibilisant (American Diabetes Association, 2018). Par conséquent, les patients DT2 souffrant de DM se voient déjà traités par une molécule permettant l'amélioration de la sensibilité à l'insuline. De ce fait, au cours d'un épisode dépressif caractérisé cette population de patients se verra prescrire un traitement antidépresseur. Or, les données de la littérature indiquent que les patients atteints de DM comorbide au DT2 présentent une non-réponse aux antidépresseurs significativement plus élevée (Woo et al., 2016). De cette manière, le traitement antidiabétique peut être choisi en fonction de son efficacité avérée à diminuer les symptômes dépressifs, comme c'est le cas de la metformine. En effet, cet agent insulino-sensibilisant améliore les troubles émotionnels comorbides au DT2 dans des études précliniques (Shivavedi et al., 2017; Soliman et al., 2020; Zemdegs et al., 2019) mais aussi chez l'Humain (Ackermann et al., 2009; Guo et al., 2014). Par conséquent, pour les individus traités par un antidiabétique dont l'effet bénéfique sur le comportement émotionnel n'est pas soutenu par la littérature scientifique, il peut être intéressant de changer de traitement et de choisir la metformine, dont les effets anxiolytiques et

antidépresseurs ont été démontrés à maintes reprises. De plus, une étude préclinique indique également que la metformine potentialise l'effet antidépresseur de la fluoxétine (Poggini et al., 2019). Au vu de cette observation, mais également de nos résultats indiquant les effets bénéfiques de la metformine dans la restauration du système sérotoninergique chez les souris HFD, il peut être intéressant de combiner la metformine avec un antidépresseur de type ISRS. Cette stratégie pourrait ainsi permettre d'améliorer la réponse aux antidépresseurs des individus atteints de DM comorbide au DT2. L'administration chronique d'insuline au sein de cette population de patients ne semble pas présenter d'avantages thérapeutiques dans l'amélioration du comportement émotionnel. En effet, les études précliniques mettent en évidence un effet anxiolytique et/ou antidépresseur de l'insuline majoritairement dans des modèles de troubles émotionnels associés au DT1, insulino-dépendant (Gupta et al., 2014; Ho et al., 2012; Miyata et al., 2007). De plus, à notre connaissance, aucune étude clinique n'a mis en évidence une amélioration de symptômes anxio/dépressifs par l'administration chronique d'insuline chez des individus atteints de DM comorbide au DT2.

En conclusion, la prise en charge de la DM chez les patients atteints de DT2 pourrait potentiellement être améliorée par le choix d'un traitement antidiabétique dont les effets bénéfiques sur les symptômes anxio/dépressifs ont été rigoureusement évalués par la communauté scientifique, comme la metformine. En outre, l'utilisation d'un antidépresseur de type ISRS combiné à la metformine pourrait également permettre d'améliorer la réponse antidépresseur. Le choix de l'antidépresseur lors du traitement de la population d'individus atteints de DM comorbide au DT2 est essentiel. En effet, certains antidépresseurs altèrent l'homéostasie glucidique, c'est notamment le cas des antidépresseurs tricycliques (Chen et al., 2007). Malgré des résultats parfois conflictuels, il semblerait que les antidépresseurs de type ISRS permettent dans certains cas d'améliorer l'homéostasie glucidique (Brieler et al., 2016; M. Hennings et al., 2012; McIntyre et al., 2006). De cette manière, la fluoxétine permet d'améliorer la sensibilité à l'insuline chez des patients atteints de DT2 (Potter van Loon et al., 1992), indépendamment de la diminution du poids corporel (Maheux et al., 1997). Enfin, l'utilisation des antidépresseurs tricycliques et des antidépresseurs inhibant la recapture de noradrénaline présentent également des effets secondaires sur le système cardiovasculaire (Mago et al., 2014), dont les pathologies associées ont une forte prévalence chez les patients atteints de DT2 (Einarson et al., 2018). L'ensemble de ces données supporte ainsi l'utilisation préférentielle des ISRS dans le traitement de la DM chez les individus atteints de DT2.

L'amélioration de la sensibilité à l'insuline chez les individus atteints de DT2 est aussi une limite intrinsèque à leur pathologie métabolique. En effet, l'utilisation d'un agent insulino-sensibilisant peut permettre de maintenir une homéostasie glucidique physiologique, mais un effet plafond pourrait minorer l'amélioration de la sensibilité à l'insuline au regard de l'amélioration des troubles émotionnels. Par conséquent, selon notre hypothèse, dans les cas où la marge thérapeutique d'amélioration de la sensibilité à l'insuline est faible, les succès concernant la diminution des symptômes dépressifs le sont également, de manière intrinsèque à cette stratégie. Toutefois, augmenter le signal de transduction de la voie de signalisation de l'insuline pourrait s'avérer particulièrement bénéfique sur d'autres populations de patients.

2.2 Dépression majeure non comorbide à un trouble métabolique primaire.

La stratégie de l'amélioration de l'insuline pourrait aussi être évaluée chez des patients atteints de DM sans comorbidités métaboliques. La dépression majeure est une pathologie particulièrement hétérogène dont les avancées en recherche métabolomique ont permis de mettre en évidence plusieurs endophénotypes de la pathologie. Ainsi, dans un contexte de psychiatrie personnalisée, la détection de l'insulino-résistance pourrait être un criblage permettant d'orienter le traitement et la prise en charge du patient. Plusieurs cas de figure peuvent alors se présenter. Ce criblage permettrait par exemple de mettre en évidence une insulino-résistance précoce sans troubles métaboliques marqués, un phénomène qui s'observera principalement chez des sujets atteints d'obésité (Kahn and Flier, 2000). Or, ces individus ne nécessitent pour la plupart pas encore de traitement antidiabétique ou insulino-sensibilisant (González-Muniesa et al., 2017). Par conséquent, améliorer la résistance à l'insuline de ces individus pourrait *in fine* améliorer les troubles émotionnels qui y sont associés, possiblement au travers d'un lien causal. De cette manière, la détection de cet endophénotype permettrait de mettre en place un traitement insulino-sensibilisant, par la metformine par exemple, qui permettrait potentiellement une rémission de la DM en améliorant notamment la sensibilité à l'insuline du système 5-HT possiblement altéré. Si toutefois, aucune amélioration n'est observée, un traitement antidépresseur pourra être prescrit en monothérapie ou en combinaison dans le but d'obtenir un effet synergique. A nouveau, une bithérapie associant la metformine à un ISRS pourrait s'avérer particulièrement adaptée pour cette population de patients, d'autant

plus que le choix d'un ISRS limitera les altérations métaboliques qui pourraient être précipitées par d'autres classes d'antidépresseurs.

Hors considérations économiques, logistiques et administratives, la mise en place de la détection systématique de l'insulino-résistance des individus atteints de DM semble facile à mettre en œuvre au travers de la mesure du score de HOMA-IR. Toutefois, la résistance à l'insuline des neurones 5-HT semble être particulièrement difficile à mettre en évidence. L'injection d'insuline intranasale couplée à de l'imagerie fonctionnelle pourrait être une méthode adéquate pour évaluer ce paramètre, comme c'est déjà le cas pour d'autres structures (Kullmann et al., 2015). Envisageable dans un contexte de recherche clinique, cette technique n'est toutefois pas adaptée à une démarche de médecine personnalisée destinée à la médecine générale.

Une autre stratégie pourrait consister à étudier la présence de polymorphismes génétiques de protéines impliquées dans la résistance à l'insuline. En effet, certains polymorphismes génétiques pourraient conférer une insulino-résistance discrète de certaines populations neuronales impliquées dans la régulation des émotions. Il pourrait s'agir de mutations gain de fonction de phosphatase comme PTEN, dont l'inactivation génétique dans les neurones 5-HT du RD diminue le comportement de résignation chez l'animal et qui est associée à l'augmentation du tonus sérotoninergique (Chen et al., 2021). La détection de ces types de polymorphismes génétiques pourrait ainsi permettre la mise en place d'une action prophylactique chez ces individus tant au niveau de la santé mentale que des troubles métaboliques.

2.3 Traitement antidépresseur ISRS combiné à l'injection intranasale

Au travers de l'axe 4 de ce projet de thèse, nous avons mis en évidence que l'injection intranasale d'insuline potentialise l'effet antidépresseur de la fluoxétine. Plus particulièrement, nos résultats suggèrent que l'injection intranasale d'insuline diminue le délai d'action de la fluoxétine, qui est une limite importante de son utilisation actuelle (Machado-Vieira et al., 2010). L'extrapolation de ces résultats dans un contexte clinique pourrait permettre d'utiliser l'injection intranasale d'insuline comme un catalyseur de la fluoxétine, ainsi que peut-être pour d'autres ISRS.

Augmenter uniquement la signalisation de l'insuline cérébrale pour améliorer les symptômes dépressifs ne semble pas être une stratégie thérapeutique suffisante. En effet, une étude clinique rapporte que l'injection intranasale d'insuline utilisée en monothérapie n'a aucun effet significatif sur la diminution du score de symptômes dépressifs chez des patients atteints de DM (Cha et al., 2017). Toutefois, ce résultat peut être nuancé par le fait que la population de cet essai clinique est composée de patients résistants aux traitements antidépresseurs. De la même manière, nous n'avons pas observé d'effet antidépresseur en réponse à l'injection intranasale d'insuline au cours de nos expériences mesurant le comportement de résignation des souris. De plus, nous avons constaté que l'effet anxiolytique induit par l'action cérébrale de l'insuline est abrogé en condition de stress chronique. Au vu de ces résultats, l'injection intranasale d'insuline ne semble pas, en première intention, présenter une efficacité dans le traitement de la DM. Cependant, plusieurs études ont démontré l'effet bénéfique de l'injection intranasale d'insuline sur le domaine cognitif (Benedict et al., 2007; Claxton et al., 2015; Hallschmid et al., 2004). Or, d'après le DSM-V, les déficits cognitifs sont un symptôme que l'on retrouve dans la DM. Toutefois, malgré son implication dans la physiopathologie de la DM, la dimension cognitive n'est pas la cible thérapeutique majeure du traitement de la pathologie (McIntyre et al., 2015) bien que certains antidépresseurs puissent toutefois l'améliorer (Al-Sukhni et al., 2015; Rosenblat et al., 2015). De plus, certaines altérations cognitives résiduelles subsistent même après la rémission des patients (Conradi et al., 2011; Huang, 2009). Par conséquent, les propriétés pro-cognitives de l'injection intranasale d'insuline pourraient potentiellement bénéficier aux patients souffrant de DM dont la dimension cognitive est significativement altérée.

En plus de l'intérêt potentiel que pourrait avoir l'injection intranasale d'insuline sur le domaine cognitif en monothérapie, son effet potentialisateur sur l'effet antidépresseur de la fluoxétine pourrait être particulièrement intéressant. Au cours de ce projet, nous avons mis en évidence que l'effet potentialisateur de l'injection intranasale d'insuline n'était possible qu'en condition d'insulino-sensibilité des neurones 5-HT. Par conséquent, le criblage évoqué précédemment pour détecter la résistance à l'insuline des neurones 5-HT, ou par défaut d'une insulino-résistance périphérique, pourra ici s'avérer utile afin d'inclure des patients atteints de DM sans insulino-résistance du système 5-HT. Dès lors, nous pourrions envisager chez ces patients un traitement combinant l'administration intranasale d'insuline et la prise de fluoxétine par voie *per os* pour diminuer le délai d'action de l'ISRS. Bien que le *design* expérimental de

notre expérience ne puisse répondre à cette question, il est possible que l'injection intranasale chronique d'insuline entraîne une insulino-résistance des neurones 5-HT. Par conséquent, initier cette bithérapie pourrait peut-être compromettre l'efficacité à long terme du traitement antidépresseur. L'état préliminaire de nos résultats nous permet seulement d'extrapoler leur mise en perspective. Un nombre important de paramètres se doivent d'être évalués avant de pouvoir conclure sur un effet convaincant, tout comme sur la prise en compte des limites que pourraient présenter cette combinaison thérapeutique.

La résistance à l'insuline est fortement associée à une inflammation chronique à bas bruit (Matulewicz and Karczewska-Kupczewska, 2016). Or, plusieurs études ont mis en évidence un endophénotype inflammatoire dans une sous-population d'individus atteints de DM (Beurel et al., 2020). Est-il possible que dans cette population d'individus, l'inflammation à bas bruit puisse induire une diminution de la sensibilité à l'insuline du système sérotoninergique ? L'état inflammatoire des patients se mesure biologiquement, de façon rapide et peu invasive. Peut-on envisager de traiter les patients de cet endophénotype de la DM à l'aide d'agents insulino-sensibilisants ? Des études précliniques mettent en évidence l'effet antidépresseur d'agents insulino-sensibilisants au travers de mécanismes anti-inflammatoires dans des modèles de stress chronique (Du and Bu, 2020; Liao et al., 2017). Ces données pourraient ainsi permettre une autre perspective de l'utilisation d'agents insulino-sensibilisants dans le traitement antidépresseur personnalisé d'individus atteints de DM avec un endophénotype inflammatoire.

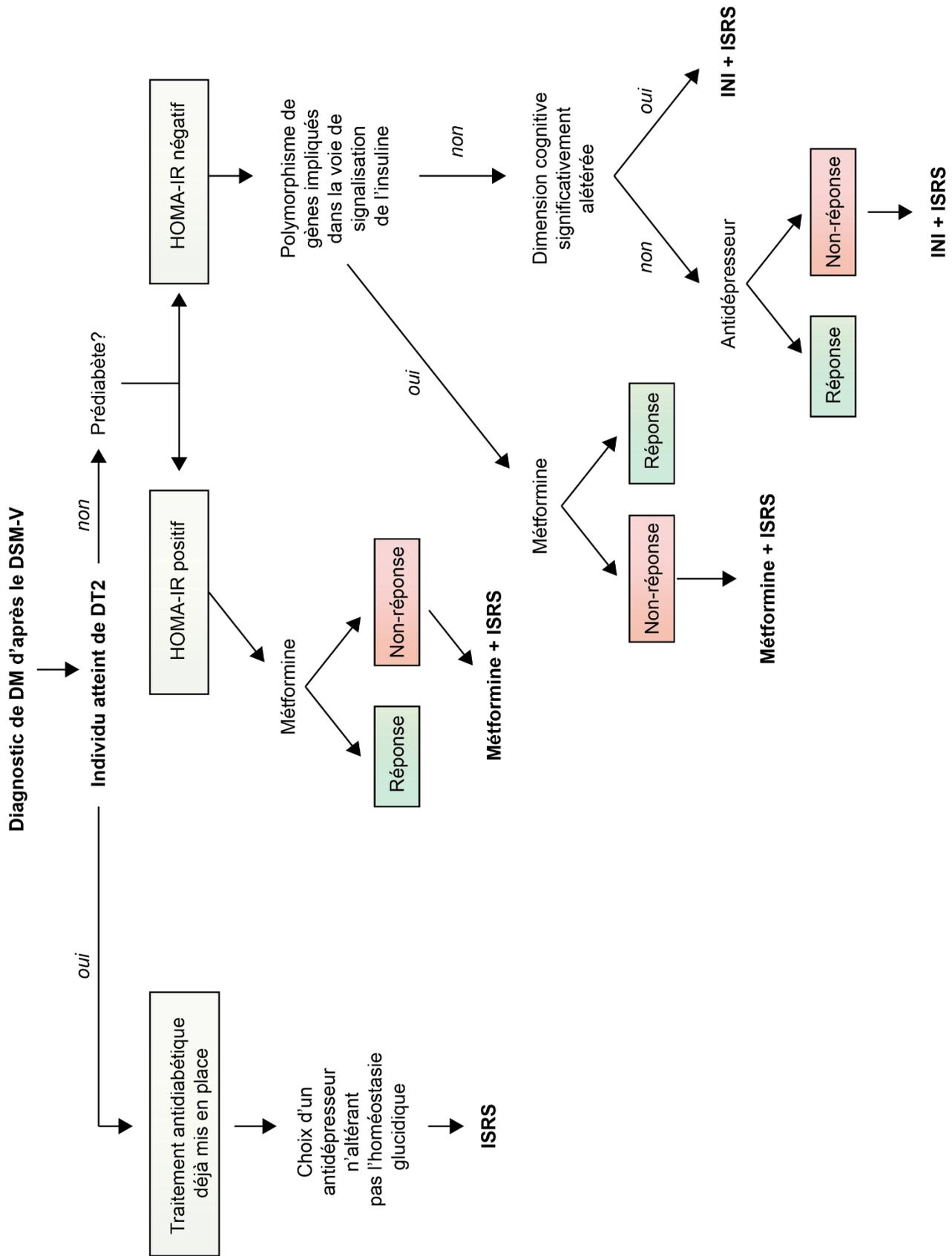


Figure 49: Arbre décisionnel de la prise en charge thérapeutique de la DM en considérant la résistance à l'insuline.

CONCLUSION

Au cours de ce projet de thèse nous avons démontré que l'insuline module le système sérotoninergique et à travers lui, le comportement émotionnel. Au travers des différents états de sensibilité à l'insuline que nous avons étudiés, l'hormone semble être principalement impliquée dans le comportement de type anxieux. Nous avons en effet observé son action anxiolytique en condition de sensibilité physiologique à l'insuline du système sérotoninergique, tandis que la résistance à l'insuline de cette neurotransmission est associée à une augmentation du comportement de type anxieux. D'autre part, l'action cérébrale de l'insuline pourrait possiblement potentialiser l'effet antidépresseur de la fluoxétine en augmentant son efficacité et/ou en diminuant son délai d'action, d'après nos études chez l'animal.

L'ensemble de ces résultats pourrait permettre d'une part de mieux comprendre l'impact délétère que peut avoir la résistance à l'insuline dans certains troubles mentaux mais également de prendre en compte ce paramètre lors de la mise en place du traitement antidépresseur chez les patients atteints de dépression majeure, dont l'étiologie est hétérogène.

RÉFÉRENCES

- Abbott, M.A., Wells, D.G., and Fallon, J.R. (1999). The insulin receptor tyrosine kinase substrate p58/53 and the insulin receptor are components of CNS synapses. *J. Neurosci. Off. J. Soc. Neurosci.* *19*, 7300–7308.
- Abela, A.R., Browne, C.J., Sargin, D., Prevot, T.D., Ji, X.D., Li, Z., Lambe, E.K., and Fletcher, P.J. (2020). Median raphe serotonin neurons promote anxiety-like behavior via inputs to the dorsal hippocampus. *Neuropharmacology* *168*, 107985.
- Aberg, M.A.I., Aberg, N.D., Palmer, T.D., Alborn, A.-M., Carlsson-Skwirut, C., Bang, P., Rosengren, L.E., Olsson, T., Gage, F.H., and Eriksson, P.S. (2003). IGF-I has a direct proliferative effect in adult hippocampal progenitor cells. *Mol. Cell. Neurosci.* *24*, 23–40.
- Abildgaard, A., Solskov, L., Volke, V., Harvey, B.H., Lund, S., and Wegener, G. (2011). A high-fat diet exacerbates depressive-like behavior in the Flinders Sensitive Line (FSL) rat, a genetic model of depression. *Psychoneuroendocrinology* *36*, 623–633.
- Accili, D., Drago, J., Lee, E.J., Johnson, M.D., Cool, M.H., Salvatore, P., Asico, L.D., José, P.A., Taylor, S.I., and Westphal, H. (1996). Early neonatal death in mice homozygous for a null allele of the insulin receptor gene. *Nat. Genet.* *12*, 106–109.
- Ackermann, R.T., Edelstein, S.L., Narayan, K.M.V., Zhang, P., Engelgau, M.M., Herman, W.H., Marrero, D.G., and Diabetes Prevention Program Research Group (2009). Changes in Health State Utilities With Changes in Body Mass in the Diabetes Prevention Program. *Obesity* *17*, 2176–2181.
- Adams, M.J., Blundell, T.L., Dodson, E.J., Dodson, G.G., Vijayan, M., Baker, E.N., Harding, M.M., Hodgkin, D.C., Rimmer, B., and Sheat, S. (1969). Structure of Rhombohedral 2 Zinc Insulin Crystals. *Nature* *224*, 491–495.
- Adell, A., Carceller, A., and Artigas, F. (1993). In vivo brain dialysis study of the somatodendritic release of serotonin in the Raphe nuclei of the rat: effects of 8-hydroxy-2-(di-n-propylamino)tetralin. *J. Neurochem.* *60*, 1673–1681.
- Adell, A., Celada, P., Abellán, M.T., and Artigas, F. (2002). Origin and functional role of the extracellular serotonin in the midbrain raphe nuclei. *Brain Res. Brain Res. Rev.* *39*, 154–180.
- Aghajanian, G.K. (1985). Modulation of a transient outward current in serotonergic neurones by alpha 1-adrenoceptors. *Nature* *315*, 501–503.
- Aghajanian, G.K., and Lakoski, J.M. (1984). Hyperpolarization of serotonergic neurons by serotonin and LSD: studies in brain slices showing increased K⁺ conductance. *Brain Res.* *305*, 181–185.
- Aghajanian, G.K., Graham, A.W., and Sheard, M.H. (1970). Serotonin-containing neurons in brain: depression of firing by monoamine oxidase inhibitors. *Science* *169*, 1100–1102.
- Agnati, L.F., Zoli, M., Strömberg, I., and Fuxe, K. (1995). Intercellular communication in the brain: wiring versus volume transmission. *Neuroscience* *69*, 711–726.
- Agostinone, J., Alarcon-Martinez, L., Gamlin, C., Yu, W.-Q., Wong, R.O.L., and Di Polo, A. (2018). Insulin signalling promotes dendrite and synapse regeneration and restores circuit function after axonal injury. *Brain* *141*, 1963–1980.
- Aguirre, V., Werner, E.D., Giraud, J., Lee, Y.H., Shoelson, S.E., and White, M.F. (2002). Phosphorylation of Ser307 in Insulin Receptor Substrate-1 Blocks Interactions with the Insulin Receptor and Inhibits Insulin Action*. *J. Biol. Chem.* *277*, 1531–1537.
- Ahmad, A., Rasheed, N., Banu, N., and Palit, G. (2010). Alterations in monoamine levels and oxidative systems in frontal cortex, striatum, and hippocampus of the rat brain during chronic unpredictable stress. *Stress* *13*, 356–365.
- Ahmadian, M., Duncan, R.E., Varady, K.A., Frasson, D., Hellerstein, M.K., Birkenfeld, A.L., Samuel, V.T., Shulman, G.I., Wang, Y., Kang, C., et al. (2009). Adipose overexpression of desnutrin promotes fatty acid use and attenuates diet-induced obesity. *Diabetes* *58*, 855–866.

- Ai, H., Fang, W., Hu, H., Hu, X., and Lu, W. (2020). Antidiabetic Drug Metformin Ameliorates Depressive-Like Behavior in Mice with Chronic Restraint Stress via Activation of AMP-Activated Protein Kinase. *Aging Dis.* *11*, 31–43.
- Ait-Belgnaoui, A., Bradesi, S., Fioramonti, J., Theodorou, V., and Bueno, L. (2005). Acute stress-induced hypersensitivity to colonic distension depends upon increase in paracellular permeability: role of myosin light chain kinase. *Pain* *113*, 141–147.
- Akinlade, A.T., Ogbera, A.O., Fasanmade, O.A., and Olamoyegun, M.A. (2014). Serum C-peptide assay of patients with hyperglycemic emergencies at the Lagos State University Teaching Hospital (LASUTH), Ikeja. *Int. Arch. Med.* *7*, 50.
- Albert, P.R. (2012). Transcriptional regulation of the 5-HT_{1A} receptor: implications for mental illness. *Philos. Trans. R. Soc. B Biol. Sci.* *367*, 2402–2415.
- Albert, P.R., and Vahid-Ansari, F. (2019). The 5-HT_{1A} receptor: Signaling to behavior. *Biochimie* *161*, 34–45.
- Albert, P.R., Zhou, Q.Y., Van Tol, H.H., Bunzow, J.R., and Civelli, O. (1990). Cloning, functional expression, and mRNA tissue distribution of the rat 5-hydroxytryptamine_{1A} receptor gene. *J. Biol. Chem.* *265*, 5825–5832.
- Albert, P.R., Sajedi, N., Lemonde, S., and Ghahremani, M.H. (1999). Constitutive Gi₂-dependent Activation of Adenylyl Cyclase Type II by the 5-HT_{1A} Receptor: INHIBITION BY ANXIOLYTIC PARTIAL AGONISTS *. *J. Biol. Chem.* *274*, 35469–35474.
- Alenina, N., and Klempin, F. (2015). The role of serotonin in adult hippocampal neurogenesis. *Behav. Brain Res.* *277*, 49–57.
- Allers, K.A., and Sharp, T. (2003). Neurochemical and anatomical identification of fast- and slow-firing neurones in the rat dorsal raphe nucleus using juxtacellular labelling methods in vivo. *Neuroscience* *122*, 193–204.
- Almind, K., Inoue, G., Pedersen, O., and Kahn, C.R. (1996). A common amino acid polymorphism in insulin receptor substrate-1 causes impaired insulin signaling. Evidence from transfection studies. *J. Clin. Invest.* *97*, 2569–2575.
- Al-Ozairi, E., Al Ozairi, A., Blythe, C., Taghadom, E., and Ismail, K. (2020). The Epidemiology of Depression and Diabetes Distress in Type 2 Diabetes in Kuwait. *J. Diabetes Res.* *2020*, 7414050.
- Al-Sukhni, M., Maruschak, N.A., and McIntyre, R.S. (2015). Vortioxetine : a review of efficacy, safety and tolerability with a focus on cognitive symptoms in major depressive disorder. *Expert Opin. Drug Saf.* *14*, 1291–1304.
- Aman, T.K., Shen, R.-Y., and Haj-Dahmane, S. (2007). D₂-like dopamine receptors depolarize dorsal raphe serotonin neurons through the activation of nonselective cationic conductance. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* *320*, 376–385.
- Amat, J., Matus-Amat, P., Watkins, L.R., and Maier, S.F. (1998). Escapable and inescapable stress differentially alter extracellular levels of 5-HT in the basolateral amygdala of the rat. *Brain Res.* *812*, 113–120.
- American Diabetes Association (2018). Diabetes guidelines.
- American Psychiatric Association (2015). Diagnostic and Statistical Manual of Mental Disorders: DSM-V.
- Amidfar, M., Kim, Y.-K., Colic, L., Arbabi, M., Mobaraki, G., Hassanzadeh, G., and Walter, M. (2017). Increased levels of 5HT_{2A} receptor mRNA expression in peripheral blood mononuclear cells of patients with major depression: correlations with severity and duration of illness. *Nord. J. Psychiatry* *71*, 282–288.
- Anderberg, R.H., Richard, J.E., Hansson, C., Nissbrandt, H., Bergquist, F., and Skibicka, K.P. (2016). GLP-1 is both anxiogenic and antidepressant; divergent effects of acute and chronic GLP-1 on emotionality. *Psychoneuroendocrinology* *65*, 54–66.
- Anderson, R.J., Freedland, K.E., Clouse, R.E., and Lustman, P.J. (2001). The prevalence of comorbid depression in adults with diabetes: a meta-analysis. *Diabetes Care* *24*, 1069–1078.
- André, C., Dinel, A.-L., Ferreira, G., Layé, S., and Castanon, N. (2014). Diet-induced obesity progressively alters cognition, anxiety-like behavior and lipopolysaccharide-induced depressive-like behavior: Focus on brain indoleamine 2,3-dioxygenase activation. *Brain. Behav. Immun.* *41*, 10–21.

- Andrews, N., Hogg, S., Gonzalez, L.E., and File, S.E. (1994). 5-HT_{1A} receptors in the median raphe nucleus and dorsal hippocampus may mediate anxiolytic and anxiogenic behaviours respectively. *Eur. J. Pharmacol.* *264*, 259–264.
- Angst, J., Angst, F., and Stassen, H.H. (1999). Suicide risk in patients with major depressive disorder. *J. Clin. Psychiatry* *60 Suppl 2*, 57–62; discussion 75–76, 113–116.
- Ansorge, M.S., Zhou, M., Lira, A., Hen, R., and Gingrich, J.A. (2004). Early-life blockade of the 5-HT transporter alters emotional behavior in adult mice. *Science* *306*, 879–881.
- Araragi, N., Mlinar, B., Baccini, G., Gutknecht, L., Lesch, K.-P., and Corradetti, R. (2013). Conservation of 5-HT_{1A} receptor-mediated autoinhibition of serotonin (5-HT) neurons in mice with altered 5-HT homeostasis. *Front. Pharmacol.* *4*, 97.
- Arnold, S.E., Lucki, I., Brookshire, B.R., Carlson, G.C., Browne, C.A., Kazi, H., Bang, S., Choi, B.-R., Chen, Y., McMullen, M.F., et al. (2014). High fat diet produces brain insulin resistance, synaptodendritic abnormalities and altered behavior in mice. *Neurobiol. Dis.* *67*, 79–87.
- Asberg, M., Bertilsson, L., Mårtensson, B., Scalia-Tomba, G.P., Thorén, P., and Träskman-Bendz, L. (1984). CSF monoamine metabolites in melancholia. *Acta Psychiatr. Scand.* *69*, 201–219.
- Association, A.D. (2018). 2. Classification and Diagnosis of Diabetes: Standards of Medical Care in Diabetes—2018. *Diabetes Care* *41*, S13–S27.
- Atkinson, M.A., Eisenbarth, G.S., and Michels, A.W. (2014). Type 1 diabetes. *Lancet* *383*, 69–82.
- Azmitia, E.C., and Segal, M. (1978). An autoradiographic analysis of the differential ascending projections of the dorsal and median raphe nuclei in the rat. *J. Comp. Neurol.* *179*, 641–667.
- Bach-Mizrachi, H., Underwood, M.D., Kassir, S.A., Bakalian, M.J., Sibille, E., Tamir, H., Mann, J.J., and Arango, V. (2006). Neuronal tryptophan hydroxylase mRNA expression in the human dorsal and median raphe nuclei: major depression and suicide. *Neuropsychopharmacol. Off. Publ. Am. Coll. Neuropsychopharmacol.* *31*, 814–824.
- Bach-Mizrachi, H., Underwood, M.D., Tin, A., Ellis, S.P., Mann, J.J., and Arango, V. (2008). Elevated expression of tryptophan hydroxylase-2 mRNA at the neuronal level in the dorsal and median raphe nuclei of depressed suicides. *Mol. Psychiatry* *13*, 507–513, 465.
- Badcock, P.B., Davey, C.G., Whittle, S., Allen, N.B., and Friston, K.J. (2017). The Depressed Brain: An Evolutionary Systems Theory. *Trends Cogn. Sci.* *21*, 182–194.
- Baier, L.J., Wiedrich, C., Hanson, R.L., and Bogardus, C. (1998). Variant in the regulatory subunit of phosphatidylinositol 3-kinase (p85alpha): preliminary evidence indicates a potential role of this variant in the acute insulin response and type 2 diabetes in Pima women. *Diabetes* *47*, 973–975.
- Bąk, E., Marcisz-Dyla, E., Młynarska, A., Sternal, D., Kadłubowska, M., and Marcisz, C. (2020). Prevalence of Depressive Symptoms in Patients with Type 1 and 2 Diabetes Mellitus. *Patient Prefer. Adherence* *14*, 443–454.
- Bakan, E., Yildirim, A., Kurtul, N., Polat, M.F., Dursun, H., and Cayir, K. (2006). Effects of type 2 diabetes mellitus on plasma fatty acid composition and cholesterol content of erythrocyte and leukocyte membranes. *Acta Diabetol.* *43*, 109–113.
- Balali Dehkordi, S., Sajedianfard, J., and Owji, A.A. (2019). The effect of intra-cerebroventricular injection of insulin on the levels of monoamines on the raphe magnus nucleus of non-diabetic and short-term diabetic rats in the formalin test. *Iran. J. Basic Med. Sci.* *22*, 915–921.
- Bali, A., and Jaggi, A.S. (2016). An Integrative Review on Role and Mechanisms of Ghrelin in Stress, Anxiety and Depression. *Curr. Drug Targets* *17*, 495–507.
- Banks, W.A., and Kastin, A.J. (1998). Differential permeability of the blood-brain barrier to two pancreatic peptides: insulin and amylin. *Peptides* *19*, 883–889.
- Banks, W.A., Jaspan, J.B., Huang, W., and Kastin, A.J. (1997). Transport of insulin across the blood-brain barrier: saturability at euglycemic doses of insulin. *Peptides* *18*, 1423–1429.
- Banks, W.A., Kastin, A.J., and Pan, W. (1999). Uptake and degradation of blood-borne insulin by the olfactory bulb. *Peptides* *20*, 373–378.
- Banks, W.A., Owen, J.B., and Erickson, M.A. (2012). Insulin in the brain: There and back again. *Pharmacol. Ther.* *136*, 82–93.

- Baraban, J.M., and Aghajanian, G.K. (1980). Suppression of serotonergic neuronal firing by alpha-adrenoceptor antagonists: evidence against GABA mediation. *Eur. J. Pharmacol.* *66*, 287–294.
- Barbas, D., DesGroseillers, L., Castellucci, V.F., Carew, T.J., and Marinesco, S. (2003). Multiple serotonergic mechanisms contributing to sensitization in aplysia: evidence of diverse serotonin receptor subtypes. *Learn. Mem. Cold Spring Harb. N 10*, 373–386.
- Barnes, N.M., and Sharp, T. (1999). A review of central 5-HT receptors and their function. *Neuropharmacology* *38*, 1083–1152.
- Barton, D.A., Esler, M.D., Dawood, T., Lambert, E.A., Haikerwal, D., Brenchley, C., Socratous, F., Hastings, J., Guo, L., Wiesner, G., et al. (2008). Elevated brain serotonin turnover in patients with depression: effect of genotype and therapy. *Arch. Gen. Psychiatry* *65*, 38–46.
- Baune, B. (2019). *Personalized Psychiatry*, 1st Edition (Academic Press).
- Baura, G.D., Foster, D.M., Porte, D., Kahn, S.E., Bergman, R.N., Cobelli, C., and Schwartz, M.W. (1993). Saturable transport of insulin from plasma into the central nervous system of dogs in vivo. A mechanism for regulated insulin delivery to the brain. *J. Clin. Invest.* *92*, 1824–1830.
- Beattie, E.C., Carroll, R.C., Yu, X., Morishita, W., Yasuda, H., von Zastrow, M., and Malenka, R.C. (2000). Regulation of AMPA receptor endocytosis by a signaling mechanism shared with LTD. *Nat. Neurosci.* *3*, 1291–1300.
- Beck, S.G., Pan, Y.-Z., Akanwa, A.C., and Kirby, L.G. (2004). Median and Dorsal Raphe Neurons Are Not Electrophysiologically Identical. *J. Neurophysiol.* *91*, 994–1005.
- Becquet, D., Faudon, M., and Hery, F. (1990). The role of serotonin release and autoreceptors in the dorsalis raphe nucleus in the control of serotonin release in the cat caudate nucleus. *Neuroscience* *39*, 639–647.
- Beirami, E., Oryan, S., Seyedhosseini Tamijani, S.M., Ahmadiani, A., and Dargahi, L. (2017). Intranasal insulin treatment alleviates methamphetamine induced anxiety-like behavior and neuroinflammation. *Neurosci. Lett.* *660*, 122–129.
- Bel, N., and Artigas, F. (1992). Fluvoxamine preferentially increases extracellular 5-hydroxytryptamine in the raphe nuclei: an in vivo microdialysis study. *Eur. J. Pharmacol.* *229*, 101–103.
- Bel, N., and Artigas, F. (1993). Chronic treatment with fluvoxamine increases extracellular serotonin in frontal cortex but not in raphe nuclei. *Synap. N. Y. N 15*, 243–245.
- Belfiore, A., Malaguarnera, R., Vella, V., Lawrence, M.C., Sciacca, L., Frasca, F., Morrione, A., and Vigneri, R. (2017). Insulin Receptor Isoforms in Physiology and Disease: An Updated View. *Endocr. Rev.* *38*, 379–431.
- Belin, M.F., Aguera, M., Tappaz, M., McRae-Degueurce, A., Bobillier, P., and Pujol, J.F. (1979). GABA-accumulating neurons in the nucleus raphe dorsalis and periaqueductal gray in the rat: a biochemical and radioautographic study. *Brain Res.* *170*, 279–297.
- Bell, G.I., Pictet, R.L., Rutter, W.J., Cordell, B., Tischer, E., and Goodman, H.M. (1980). Sequence of the human insulin gene. *Nature* *284*, 26–32.
- Belmaker, R.H., and Agam, G. (2008). Major depressive disorder. *N. Engl. J. Med.* *358*, 55–68.
- Belmer, A., Quentin, E., Diaz, S.L., Guiard, B.P., Fernandez, S.P., Doly, S., Banas, S.M., Pitychoutis, P.M., Moutkine, I., Muzerelle, A., et al. (2018). Positive regulation of raphe serotonin neurons by serotonin 2B receptors. *Neuropsychopharmacol. Off. Publ. Am. Coll. Neuropsychopharmacol.* *43*, 1623–1632.
- Belsher, G., and Costello, C.G. (1988). Relapse after recovery from unipolar depression: a critical review. *Psychol. Bull.* *104*, 84–96.
- Belzung, C., and Lemoine, M. (2011). Criteria of validity for animal models of psychiatric disorders: focus on anxiety disorders and depression. *Biol. Mood Anxiety Disord.* *1*, 9.
- Belzung, C., Misslin, R., Vogel, E., Dodd, R.H., and Chapouthier, G. (1987). Anxiogenic effects of methyl-beta-carboline-3-carboxylate in a light/dark choice situation. *Pharmacol. Biochem. Behav.* *28*, 29–33.
- Ben-Daniel, R., Deuther-Conrad, W., Scheunemann, M., Steinbach, J., Brust, P., and Mishani, E. (2008). Carbon-11 labeled indolylpropylamine analog as a new potential PET agent for imaging of the serotonin transporter. *Bioorg. Med. Chem.* *16*, 6364–6370.

- Benedict, C. (2004). Intranasal insulin improves memory in humans. *Psychoneuroendocrinology* 29, 1326–1334.
- Benedict, C., Hallschmid, M., Schmitz, K., Schultes, B., Ratter, F., Fehm, H.L., Born, J., and Kern, W. (2007). Intranasal insulin improves memory in humans: superiority of insulin aspart. *Neuropsychopharmacol. Off. Publ. Am. Coll. Neuropsychopharmacol.* 32, 239–243.
- Bengel, D., Jöhren, O., Andrews, A.M., Heils, A., Mössner, R., Sanvitto, G.L., Saavedra, J.M., Lesch, K.P., and Murphy, D.L. (1997). Cellular localization and expression of the serotonin transporter in mouse brain. *Brain Res.* 778, 338–345.
- Benkelfat, C., Ellenbogen, M.A., Dean, P., Palmour, R.M., and Young, S.N. (1994). Mood-lowering effect of tryptophan depletion. Enhanced susceptibility in young men at genetic risk for major affective disorders. *Arch. Gen. Psychiatry* 51, 687–697.
- Benoit, S.C., Air, E.L., Coolen, L.M., Strauss, R., Jackman, A., Clegg, D.J., Seeley, R.J., and Woods, S.C. (2002). The catabolic action of insulin in the brain is mediated by melanocortins. *J. Neurosci. Off. J. Soc. Neurosci.* 22, 9048–9052.
- Bernabe, C.S., Caliman, I.F., Truitt, W.A., Molosh, A.I., Lowry, C.A., Hay-Schmidt, A., Shekhar, A., and Johnson, P.L. (2020). Using loss- and gain-of-function approaches to target amygdala-projecting serotonergic neurons in the dorsal raphe nucleus that enhance anxiety-related and conditioned fear behaviors. *J. Psychopharmacol. Oxf. Engl.* 34, 400–411.
- Bernal, A., and Arranz, L. (2018). Nestin-expressing progenitor cells: function, identity and therapeutic implications. *Cell. Mol. Life Sci. CMLS* 75, 2177–2195.
- Berson, S.A., Yalow, R.S., Bauman, A., Rothschild, M.A., and Newerly, K. (1956). INSULIN-I131 METABOLISM IN HUMAN SUBJECTS: DEMONSTRATION OF INSULIN BINDING GLOBULIN IN THE CIRCULATION OF INSULIN TREATED SUBJECTS 1. *J. Clin. Invest.* 35, 170–190.
- Berton, O., McClung, C.A., Dileone, R.J., Krishnan, V., Renthal, W., Russo, S.J., Graham, D., Tsankova, N.M., Bolanos, C.A., Rios, M., et al. (2006). Essential role of BDNF in the mesolimbic dopamine pathway in social defeat stress. *Science* 311, 864–868.
- Beurel, E., Toups, M., and Nemeroff, C.B. (2020). The Bidirectional Relationship of Depression and Inflammation: Double Trouble. *Neuron* 107, 234–256.
- Bhagwagar, Z., Rabiner, E.A., Sargent, P.A., Grasby, P.M., and Cowen, P.J. (2004). Persistent reduction in brain serotonin_{1A} receptor binding in recovered depressed men measured by positron emission tomography with [¹¹C]WAY-100635. *Mol. Psychiatry* 9, 386–392.
- Black, C.N., Bot, M., Scheffer, P.G., Cuijpers, P., and Penninx, B.W.J.H. (2015). Is depression associated with increased oxidative stress? A systematic review and meta-analysis. *Psychoneuroendocrinology* 51, 164–175.
- Bland, S.T., Twining, C., Watkins, L.R., and Maier, S.F. (2003). Stressor controllability modulates stress-induced serotonin but not dopamine efflux in the nucleus accumbens shell. *Synap. N. Y. N* 49, 206–208.
- Blier, P., and de Montigny, C. (1987). Modification of 5-HT neuron properties by sustained administration of the 5-HT_{1A} agonist gepirone: electrophysiological studies in the rat brain. *Synap. N. Y. N* 1, 470–480.
- Blundell, T.L., Cutfield, J.F., Cutfield, S.M., Dodson, E.J., Dodson, G.G., Hodgkin, D.C., Mercola, D.A., and Vijayan, M. (1971). Atomic positions in rhombohedral 2-zinc insulin crystals. *Nature* 231, 506–511.
- Bocchio, M., Fucina, G., Oikonomidis, L., McHugh, S.B., Bannerman, D.M., Sharp, T., and Capogna, M. (2015). Increased Serotonin Transporter Expression Reduces Fear and Recruitment of Parvalbumin Interneurons of the Amygdala. *Neuropsychopharmacol. Off. Publ. Am. Coll. Neuropsychopharmacol.* 40, 3015–3026.
- Bocchio, M., McHugh, S.B., Bannerman, D.M., Sharp, T., and Capogna, M. (2016). Serotonin, Amygdala and Fear: Assembling the Puzzle. *Front. Neural Circuits* 10, 24.
- Bocher, R., Hefez, S., Leboyer, M., Moro, M.-R., and Fleury, C. (2020). Covid-19: “La troisième vague est là.”
- Boghossian, S., Lemmon, K., Park, M., and York, D.A. (2009). High-fat diets induce a rapid loss of the insulin anorectic response in the amygdala. *Am. J. Physiol. Regul. Integr. Comp. Physiol.* 297, R1302–1311.
- Bohringer, A., Schwabe, L., Richter, S., and Schachinger, H. (2008). Intranasal insulin attenuates the hypothalamic-pituitary-adrenal axis response to psychosocial stress. *Psychoneuroendocrinology* 33, 1394–1400.

- Boldrini, M., Underwood, M.D., Hen, R., Rosoklija, G.B., Dwork, A.J., John Mann, J., and Arango, V. (2009). Antidepressants increase neural progenitor cells in the human hippocampus. *Neuropsychopharmacol. Off. Publ. Am. Coll. Neuropsychopharmacol.* *34*, 2376–2389.
- Bonaz, B., Bazin, T., and Pellissier, S. (2018). The Vagus Nerve at the Interface of the Microbiota-Gut-Brain Axis. *Front. Neurosci.* *12*, 49.
- Boon, J., Hoy, A.J., Stark, R., Brown, R.D., Meex, R.C., Henstridge, D.C., Schenk, S., Meikle, P.J., Horowitz, J.F., Kingwell, B.A., et al. (2013). Ceramides contained in LDL are elevated in type 2 diabetes and promote inflammation and skeletal muscle insulin resistance. *Diabetes* *62*, 401–410.
- Bortolotto, C.F., Jesse, C.R., Wilhelm, E.A., and Nogueira, C.W. (2010). Involvement of potassium channels in the antidepressant-like effect of venlafaxine in mice. *Life Sci.* *86*, 372–376.
- Bortolozzi, A., Castañé, A., Semakova, J., Santana, N., Alvarado, G., Cortés, R., Ferrés-Coy, A., Fernández, G., Carmona, M.C., Toth, M., et al. (2012). Selective siRNA-mediated suppression of 5-HT_{1A} autoreceptors evokes strong anti-depressant-like effects. *Mol. Psychiatry* *17*, 612–623.
- Boucher, J., Kleinridders, A., and Kahn, C.R. (2014). Insulin receptor signaling in normal and insulin-resistant states. *Cold Spring Harb. Perspect. Biol.* *6*.
- Bouyakdan, K., Martin, H., Liénard, F., Budry, L., Taib, B., Rodaros, D., Chrétien, C., Biron, É., Husson, Z., Cota, D., et al. (2019). The gliotransmitter ACBP controls feeding and energy homeostasis via the melanocortin system. *J. Clin. Invest.* *129*, 2417–2430.
- Bravo, D.A., Gleason, J.B., Sanchez, R.I., Roth, R.A., and Fuller, R.S. (1994). Accurate and efficient cleavage of the human insulin proreceptor by the human proprotein-processing protease furin. Characterization and kinetic parameters using the purified, secreted soluble protease expressed by a recombinant baculovirus. *J. Biol. Chem.* *269*, 25830–25837.
- Brief, D.J., and Davis, J.D. (1984). Reduction of food intake and body weight by chronic intraventricular insulin infusion. *Brain Res. Bull.* *12*, 571–575.
- Brieler, J.A., Lustman, P.J., Scherrer, J.F., Salas, J., and Schneider, F.D. (2016). Antidepressant medication use and glycaemic control in co-morbid type 2 diabetes and depression. *Fam. Pract.* *33*, 30–36.
- Brüning, J.C., Winnay, J., Bonner-Weir, S., Taylor, S.I., Accili, D., and Kahn, C.R. (1997). Development of a novel polygenic model of NIDDM in mice heterozygous for IR and IRS-1 null alleles. *Cell* *88*, 561–572.
- Brüning, J.C., Gautam, D., Burks, D.J., Gillette, J., Schubert, M., Orban, P.C., Klein, R., Krone, W., Müller-Wieland, D., and Kahn, C.R. (2000). Role of brain insulin receptor in control of body weight and reproduction. *Science* *289*, 2122–2125.
- Brynildsen, J.K., Lee, B.G., Perron, I.J., Jin, S., Kim, S.F., and Blendy, J.A. (2018). Activation of AMPK by metformin improves withdrawal signs precipitated by nicotine withdrawal. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *115*, 4282–4287.
- Budd, G.C., and Pansky, B. (1987). Synthesis of Insulin or a Similar Peptide in the Pituitary Gland and in Retinal Muller Cells. In *Insulin, Insulin-like Growth Factors, and Their Receptors in the Central Nervous System*, M.K. Raizada, M.I. Phillips, and D. LeRoith, eds. (Boston, MA: Springer US), pp. 139–149.
- Buettner, C., and Camacho, R.C. (2008). Hypothalamic control of hepatic glucose production and its potential role in insulin resistance. *Endocrinol. Metab. Clin. North Am.* *37*, 825–840.
- Bunin, M.A., and Wightman, R.M. (1998). Quantitative evaluation of 5-hydroxytryptamine (serotonin) neuronal release and uptake: an investigation of extrasynaptic transmission. *J. Neurosci. Off. J. Soc. Neurosci.* *18*, 4854–4860.
- Burcelin, R., Crivelli, V., Dacosta, A., Roy-Tirelli, A., and Thorens, B. (2002). Heterogeneous metabolic adaptation of C57BL/6J mice to high-fat diet. *Am. J. Physiol. Endocrinol. Metab.* *282*, E834–842.
- Burgoyne, R.D., and Morgan, A. (1998). Calcium sensors in regulated exocytosis. *Cell Calcium* *24*, 367–376.
- Burguete-Garcia, A.I., Cruz-Lopez, M., Madrid-Marina, V., Lopez-Ridaura, R., Hernández-Avila, M., Cortina, B., Gómez, R.E., and Velasco-Mondragón, E. (2010). Association of Gly972Arg polymorphism of IRS1 gene with type 2 diabetes mellitus in lean participants of a national health survey in Mexico: a candidate gene study. *Metabolism.* *59*, 38–45.

- Burlhis, T.M., and Aghajanian, G.K. (1987). Pacemaker potentials of serotonergic dorsal raphe neurons: contribution of a low-threshold Ca²⁺ conductance. *Synap. N. Y. N 1*, 582–588.
- Busquets-Garcia, A., Oliveira da Cruz, J.F., Terral, G., Pagano Zottola, A.C., Soria-Gómez, E., Contini, A., Martin, H., Redon, B., Varilh, M., Ioannidou, C., et al. (2018). Hippocampal CB1 Receptors Control Incidental Associations. *Neuron* 99, 1247-1259.e7.
- Cai, W., Sakaguchi, M., Kleinridders, A., Gonzalez-Del Pino, G., Dreyfuss, J.M., O'Neill, B.T., Ramirez, A.K., Pan, H., Winnay, J.N., Boucher, J., et al. (2017). Domain-dependent effects of insulin and IGF-1 receptors on signalling and gene expression. *Nat. Commun.* 8.
- Cai, W., Xue, C., Sakaguchi, M., Konishi, M., Shirazian, A., Ferris, H.A., Li, M.E., Yu, R., Kleinridders, A., Pothos, E.N., et al. (2018). Insulin regulates astrocyte gliotransmission and modulates behavior. *J. Clin. Invest.* 128, 2914–2926.
- Çakici, N., Bot, M., Lamers, F., Janssen, T., van der Spek, P.J., de Haan, L., Bahn, S., Penninx, B.W.J.H., and van Beveren, N.J.M. (2019). Increased serum levels of leptin and insulin in both schizophrenia and major depressive disorder: A cross-disorder proteomics analysis. *Eur. Neuropsychopharmacol.* 29, 835–846.
- Calizo, L.H., Akanwa, A., Ma, X., Pan, Y., Lemos, J.C., Craige, C., Heemstra, L.A., and Beck, S.G. (2011). Raphe serotonin neurons are not homogenous: Electrophysiological, morphological and neurochemical evidence. *Neuropharmacology* 61, 524–543.
- Campana, M., Bellini, L., Rouch, C., Rachdi, L., Coant, N., Butin, N., Bandet, C.L., Philippe, E., Meneyrol, K., Kassis, N., et al. (2018). Inhibition of central de novo ceramide synthesis restores insulin signaling in hypothalamus and enhances β -cell function of obese Zucker rats. *Mol. Metab.* 8, 23–36.
- Can, A., Dao, D.T., Terrillion, C.E., Piantadosi, S.C., Bhat, S., and Gould, T.D. (2012). The tail suspension test. *J. Vis. Exp. JoVE* e3769.
- Cantley, L.C., and Neel, B.G. (1999). New insights into tumor suppression: PTEN suppresses tumor formation by restraining the phosphoinositide 3-kinase/AKT pathway. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 96, 4240–4245.
- Carabelli, B., Delattre, A.M., Waltrick, A.P.F., Araújo, G., Suchecki, D., Machado, R.B., de Souza, L.E.R., Zanata, S.M., Zanoveli, J.M., and Ferraz, A.C. (2020). Fish-oil supplementation decreases Indoleamine-2,3-Dioxygenase expression and increases hippocampal serotonin levels in the LPS depression model. *Behav. Brain Res.* 390, 112675.
- Carracedo, A., and Pandolfi, P.P. (2008). The PTEN–PI3K pathway: of feedbacks and cross-talks. *Oncogene* 27, 5527–5541.
- Cashion, M.F., Banks, W.A., and Kastin, A.J. (1996). Sequestration of Centrally Administered Insulin by the Brain: Effects of Starvation, Aluminum, and TNF- α . *Horm. Behav.* 30, 280–286.
- Cassese, A., Esposito, I., Fiory, F., Barbagallo, A.P.M., Paturzo, F., Mirra, P., Ulianich, L., Giacco, F., Iadicicco, C., Lombardi, A., et al. (2008). In skeletal muscle advanced glycation end products (AGEs) inhibit insulin action and induce the formation of multimolecular complexes including the receptor for AGEs. *J. Biol. Chem.* 283, 36088–36099.
- Castrén, E. (2014). Neurotrophins and psychiatric disorders. *Handb. Exp. Pharmacol.* 220, 461–479.
- Celada, P., Siuciak, J.A., Tran, T.M., Altar, C.A., and Tepper, J.M. (1996). Local infusion of brain-derived neurotrophic factor modifies the firing pattern of dorsal raphe serotonergic neurons. *Brain Res.* 712, 293–298.
- Celada, P., Puig, M.V., Casanovas, J.M., Guillazo, G., and Artigas, F. (2001). Control of dorsal raphe serotonergic neurons by the medial prefrontal cortex: Involvement of serotonin-1A, GABA(A), and glutamate receptors. *J. Neurosci. Off. J. Soc. Neurosci.* 21, 9917–9929.
- Celada, P., Bortolozzi, A., and Artigas, F. (2013). Serotonin 5-HT_{1A} receptors as targets for agents to treat psychiatric disorders: rationale and current status of research. *CNS Drugs* 27, 703–716.
- Cerasi, E., and Luft, R. (1967). The plasma insulin response to glucose infusion in healthy subjects and in diabetes mellitus. *Acta Endocrinol. (Copenh.)* 55, 278–304.
- Cha, D.S., Best, M.W., Bowie, C.R., Gallagher, L.A., Woldeyohannes, H.O., Soczynska, J.K., Lewis, G., MacQueen, G., Sahakian, B.J., Kennedy, S.H., et al. (2017). A randomized, double-blind, placebo-controlled, crossover trial evaluating the effect of intranasal insulin on cognition and mood in individuals with treatment-resistant major depressive disorder. *J. Affect. Disord.* 210, 57–65.

- Challis, C., Boulden, J., Veerakumar, A., Espallergues, J., Vassoler, F.M., Pierce, R.C., Beck, S.G., and Berton, O. (2013). Raphe GABAergic Neurons Mediate the Acquisition of Avoidance after Social Defeat. *J. Neurosci.* *33*, 13978–13988.
- Chan, J.C.N., Malik, V., Jia, W., Kadowaki, T., Yajnik, C.S., Yoon, K.-H., and Hu, F.B. (2009). Diabetes in Asia: epidemiology, risk factors, and pathophysiology. *JAMA* *301*, 2129–2140.
- Chan, J.M., Rimm, E.B., Colditz, G.A., Stampfer, M.J., and Willett, W.C. (1994). Obesity, fat distribution, and weight gain as risk factors for clinical diabetes in men. *Diabetes Care* *17*, 961–969.
- Chang, A.S., and Lam, D.M.-K. (1998). Mechanistic analyses of ion dependences in a high-affinity human serotonin transport system in transfected murine fibroblast cells. *J. Physiol.* *510*, 903–913.
- Chang, Y.-C., and Chuang, L.-M. (2010). The role of oxidative stress in the pathogenesis of type 2 diabetes: from molecular mechanism to clinical implication. *Am. J. Transl. Res.* *2*, 316–331.
- Chaput, Y., de Montigny, C., and Blier, P. (1986). Effects of a selective 5-HT reuptake blocker, citalopram, on the sensitivity of 5-HT autoreceptors: electrophysiological studies in the rat brain. *Naunyn. Schmiedebergs Arch. Pharmacol.* *333*, 342–348.
- Chen, L., Gong, W.-K., Yang, C.-P., Shao, C.-C., Song, N.-N., Chen, J.-Y., Zhou, L.-Q., Zhang, K.-S., Li, S., Huang, Z., et al. (2021). Pten is a key intrinsic factor regulating raphe 5-HT neuronal plasticity and depressive behaviors in mice. *Transl. Psychiatry* *11*, 186.
- Chen, Y., Liu, Z., Zhang, J., Xu, K., Zhang, S., Wei, D., and Zhang, Z. (2014). Altered brain activation patterns under different working memory loads in patients with type 2 diabetes. *Diabetes Care* *37*, 3157–3163.
- Chen, Y.-C., Shen, Y.-C., Hung, Y.-J., Chao-Ha, C., Yeh, C.-B., and Perng, C.-H. (2007). Comparisons of glucose–insulin homeostasis following maprotiline and fluoxetine treatment in depressed males. *J. Affect. Disord.* *103*, 257–261.
- Chen, Y.-C., Seyedsayamdost, M.R., and Ringstad, N. (2020). A microbial metabolite synergizes with endogenous serotonin to trigger *C. elegans* reproductive behavior. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *117*, 30589–30598.
- Cherrington, A.D., Moore, M.C., Sindelar, D.K., and Edgerton, D.S. (2007). Insulin action on the liver in vivo. *Biochem. Soc. Trans.* *35*, 1171–1174.
- Chiang, J.L., Kirkman, M.S., Laffel, L.M.B., and Peters, A.L. (2014). Type 1 Diabetes Through the Life Span: A Position Statement of the American Diabetes Association. *Diabetes Care* *37*, 2034–2054.
- Chiba, M., Suzuki, S., Hinokio, Y., Hirai, M., Satoh, Y., Tashiro, A., Utsumi, A., Awata, T., Hongo, M., and Toyota, T. (2000). Tyrosine hydroxylase gene microsatellite polymorphism associated with insulin resistance in depressive disorder. *Metabolism.* *49*, 1145–1149.
- Chiba, S., Numakawa, T., Ninomiya, M., Richards, M.C., Wakabayashi, C., and Kunugi, H. (2012). Chronic restraint stress causes anxiety- and depression-like behaviors, downregulates glucocorticoid receptor expression, and attenuates glutamate release induced by brain-derived neurotrophic factor in the prefrontal cortex. *Prog. Neuropsychopharmacol. Biol. Psychiatry* *39*, 112–119.
- Chiu, S.-L., Chen, C.-M., and Cline, H.T. (2008). Insulin Receptor Signaling Regulates Synapse Number, Dendritic Plasticity and Circuit Function in Vivo. *Neuron* *58*, 708–719.
- Chiucciariello, L., Houle, S., Miler, L., Cooke, R.G., Rusjan, P.M., Rajkowska, G., Levitan, R.D., Kish, S.J., Kolla, N.J., Ou, X., et al. (2014). Elevated Monoamine Oxidase A Binding During Major Depressive Episodes Is Associated with Greater Severity and Reversed Neurovegetative Symptoms. *Neuropsychopharmacology* *39*, 973–980.
- Choi, K.S., Shin, J.-S., Lee, J.-J., Kim, Y.S., Kim, S.-B., and Kim, C.-W. (2005). In vitro trans-differentiation of rat mesenchymal cells into insulin-producing cells by rat pancreatic extract. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* *330*, 1299–1305.
- Ciechanowski, P.S., Katon, W.J., Russo, J.E., and Hirsch, I.B. (2003). The relationship of depressive symptoms to symptom reporting, self-care and glucose control in diabetes. *Gen. Hosp. Psychiatry* *25*, 246–252.
- Clarke, D.W., Mudd, L., Boyd, F.T., Fields, M., and Raizada, M.K. (1986). Insulin is released from rat brain neuronal cells in culture. *J. Neurochem.* *47*, 831–836.

- Clarke, W.P., Yocca, F.D., and Maayani, S. (1996). Lack of 5-hydroxytryptamine_{1A}-mediated inhibition of adenylyl cyclase in dorsal raphe of male and female rats. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* *277*, 1259–1266.
- Claxton, A., Baker, L.D., Hanson, A., Trittschuh, E.H., Cholerton, B., Morgan, A., Callaghan, M., Arbuckle, M., Behl, C., and Craft, S. (2015). Long-acting intranasal insulin detemir improves cognition for adults with mild cognitive impairment or early-stage Alzheimer's disease dementia. *J. Alzheimers Dis. JAD* *44*, 897–906.
- Cline, B.H., Steinbusch, H.W.M., Malin, D., Revishchin, A.V., Pavlova, G.V., Cespuglio, R., and Strekalova, T. (2012). The neuronal insulin sensitizer dicholine succinate reduces stress-induced depressive traits and memory deficit: possible role of insulin-like growth factor 2. *BMC Neurosci.* *13*, 110.
- Cline, B.H., Costa-Nunes, J.P., Cespuglio, R., Markova, N., Santos, A.I., Bukhman, Y.V., Kubatiev, A., Steinbusch, H.W.M., Lesch, K.-P., and Strekalova, T. (2015). Dicholine succinate, the neuronal insulin sensitizer, normalizes behavior, REM sleep, hippocampal pGSK3 beta and mRNAs of NMDA receptor subunits in mouse models of depression. *Front. Behav. Neurosci.* *9*.
- Coba, M.P., Muñoz, M.C., Dominici, F.P., Toblli, J.E., Peña, C., Bartke, A., and Turyn, D. (2004). Increased in vivo phosphorylation of insulin receptor at serine 994 in the liver of obese insulin-resistant Zucker rats. *J. Endocrinol.* *182*, 433–444.
- Colditz, G.A., Willett, W.C., Rotnitzky, A., and Manson, J.E. (1995). Weight gain as a risk factor for clinical diabetes mellitus in women. *Ann. Intern. Med.* *122*, 481–486.
- Coll, A.P., and Yeo, G.S.H. (2013). The hypothalamus and metabolism: integrating signals to control energy and glucose homeostasis. *Curr. Opin. Pharmacol.* *13*, 970–976.
- Conradi, H.J., Ormel, J., and de Jonge, P. (2011). Presence of individual (residual) symptoms during depressive episodes and periods of remission: a 3-year prospective study. *Psychol. Med.* *41*, 1165–1174.
- Coppen, A. (1967). The biochemistry of affective disorders. *Br. J. Psychiatry J. Ment. Sci.* *113*, 1237–1264.
- Cordell, B., Bell, G., Tischer, E., DeNoto, F.M., Ullrich, A., Pictet, R., Rutter, W.J., and Goodman, H.M. (1979). Isolation and characterization of a cloned rat insulin gene. *Cell* *18*, 533–543.
- Corp, E.S., Woods, S.C., Porte, D., Dorsa, D.M., Figlewicz, D.P., and Baskin, D.G. (1986). Localization of 125I-insulin binding sites in the rat hypothalamus by quantitative autoradiography. *Neurosci. Lett.* *70*, 17–22.
- Cotero, V.E., and Routh, V.H. (2009). Insulin blunts the response of glucose-excited neurons in the ventrolateral-ventromedial hypothalamic nucleus to decreased glucose. *Am. J. Physiol. Endocrinol. Metab.* *296*, E1101-1109.
- Cotero, V.E., Zhang, B.B., and Routh, V.H. (2010). The response of glucose-excited neurones in the ventromedial hypothalamus to decreased glucose is enhanced in a murine model of type 2 diabetes mellitus. *J. Neuroendocrinol.* *22*, 65–74.
- Cowen, D.S., Takase, L.F., Fornal, C.A., and Jacobs, B.L. (2008). Age-dependent decline in hippocampal neurogenesis is not altered by chronic treatment with fluoxetine. *Brain Res.* *1228*, 14–19.
- Crane, J.D., Palanivel, R., Mottillo, E.P., Bujak, A.L., Wang, H., Ford, R.J., Collins, A., Blümer, R.M., Fullerton, M.D., Yabut, J.M., et al. (2015). Inhibiting peripheral serotonin synthesis reduces obesity and metabolic dysfunction by promoting brown adipose tissue thermogenesis. *Nat. Med.* *21*, 166–172.
- Craven, R., Grahame-Smith, D., and Newberry, N. (1994). WAY-100635 and GR127935: effects on 5-hydroxytryptamine-containing neurones. *Eur. J. Pharmacol.* *271*, R1-3.
- Crawford, L.K., Craige, C.P., and Beck, S.G. (2010). Increased intrinsic excitability of lateral wing serotonin neurons of the dorsal raphe: a mechanism for selective activation in stress circuits. *J. Neurophysiol.* *103*, 2652–2663.
- Crawford, L.K., Rahman, S.F., and Beck, S.G. (2013). Social Stress Alters Inhibitory Synaptic Input to Distinct Subpopulations of Raphe Serotonin Neurons. *ACS Chem. Neurosci.* *4*, 200–209.
- Cusi, K., Maezono, K., Osman, A., Pendergrass, M., Patti, M.E., Pratipanawatr, T., DeFronzo, R.A., Kahn, C.R., and Mandarino, L.J. (2000). Insulin resistance differentially affects the PI 3-kinase- and MAP kinase-mediated signaling in human muscle. *J. Clin. Invest.* *105*, 311–320.
- Czachura, J.F., and Rasmussen, K. (2000). Effects of acute and chronic administration of fluoxetine on the activity of serotonergic neurons in the dorsal raphe nucleus of the rat. *Naunyn. Schmiedebergs Arch. Pharmacol.* *362*, 266–275.

- Czéh, B., Fuchs, E., Wiborg, O., and Simon, M. (2016). Animal models of major depression and their clinical implications. *Prog. Neuropsychopharmacol. Biol. Psychiatry* *64*, 293–310.
- Dahlstroem, A., and Fuxe, K. (1964). EVIDENCE FOR THE EXISTENCE OF MONOAMINE-CONTAINING NEURONS IN THE CENTRAL NERVOUS SYSTEM. I. DEMONSTRATION OF MONOAMINES IN THE CELL BODIES OF BRAIN STEM NEURONS. *Acta Physiol. Scand. Suppl. SUPPL 232*:1-55.
- Dai, J.-X., Han, H.-L., Tian, M., Cao, J., Xiu, J.-B., Song, N.-N., Huang, Y., Xu, T.-L., Ding, Y.-Q., and Xu, L. (2008). Enhanced contextual fear memory in central serotonin-deficient mice. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *105*, 11981–11986.
- Danguir, J., Elghozi, J.L., and Laude, D. (1984). Increased dopamine and serotonin metabolites in CSF during severe insulin-induced hypoglycemia in freely moving rats. *Neurochem. Int.* *6*, 71–75.
- Dash, S., Xiao, C., Morgantini, C., Koulajian, K., and Lewis, G.F. (2015). Intranasal insulin suppresses endogenous glucose production in humans compared with placebo in the presence of similar venous insulin concentrations. *Diabetes* *64*, 766–774.
- David, D.J., and Gardier, A.M. (2016). [The pharmacological basis of the serotonin system: Application to antidepressant response]. *L'Encephale* *42*, 255–263.
- 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., et al. (2009). Neurogenesis-dependent and -independent effects of fluoxetine in an animal model of anxiety/depression. *Neuron* *62*, 479–493.
- Daws, L.C., Gould, G.G., Teicher, S.D., Gerhardt, G.A., and Frazer, A. (2000). 5-HT(1B) receptor-mediated regulation of serotonin clearance in rat hippocampus in vivo. *J. Neurochem.* *75*, 2113–2122.
- Day, H.E.W., Greenwood, B.N., Hammack, S.E., Watkins, L.R., Fleshner, M., Maier, S.F., and Campeau, S. (2004). Differential expression of 5HT-1A, β 1b adrenergic, CRF-R1, and CRF-R2 receptor mRNA in serotonergic, γ -aminobutyric acidergic, and catecholaminergic cells of the rat dorsal raphe nucleus. *J. Comp. Neurol.* *474*, 364–378.
- De Deurwaerdère, P., Bharatiya, R., Chagraoui, A., and Di Giovanni, G. (2020). Constitutive activity of 5-HT receptors: Factual analysis. *Neuropharmacology* *168*, 107967.
- DE Montigny, C., Pineyro, G., Chaput, Y., and Blier, P. (1992). Electrophysiological studies on the effect of long-term 5-HT reuptake inhibition on the function of 5-HT neurons. *Clin. Neuropharmacol.* *15 Suppl 1 Pt A*, 440A-441A.
- Deakin, J.F., and Graeff, F.G. (1991). 5-HT and mechanisms of defence. *J. Psychopharmacol. Oxf. Engl.* *5*, 305–315.
- DeFronzo, R.A. (1997). Insulin resistance: a multifaceted syndrome responsible for NIDDM, obesity, hypertension, dyslipidaemia and atherosclerosis. *Neth. J. Med.* *50*, 191–197.
- DeFronzo, R.A., and Tripathy, D. (2009). Skeletal muscle insulin resistance is the primary defect in type 2 diabetes. *Diabetes Care* *32 Suppl 2*, S157-163.
- DeFronzo, R.A., Ferrannini, E., Groop, L., Henry, R.R., Herman, W.H., Holst, J.J., Hu, F.B., Kahn, C.R., Raz, I., Shulman, G.I., et al. (2015). Type 2 diabetes mellitus. *Nat. Rev. Dis. Primer* *1*, 1–22.
- Delanogare, E., de Souza, R.M., Rosa, G.K., Guanabara, F.G., Rafacho, A., and Moreira, E.L.G. (2020). Enriched environment ameliorates dexamethasone effects on emotional reactivity and metabolic parameters in mice. *Stress Amst. Neth.* *23*, 466–473.
- Delgado, P.L. (2000). Depression: the case for a monoamine deficiency. *J. Clin. Psychiatry* *61 Suppl 6*, 7–11.
- Delgado, P.L., Price, L.H., Miller, H.L., Salomon, R.M., Aghajanian, G.K., Heninger, G.R., and Charney, D.S. (1994). Serotonin and the neurobiology of depression. Effects of tryptophan depletion in drug-free depressed patients. *Arch. Gen. Psychiatry* *51*, 865–874.
- Demirkan, A., Isaacs, A., Ugocsai, P., Liebisch, G., Struchalin, M., Rudan, I., Wilson, J.F., Pramstaller, P.P., Gyllenstein, U., Campbell, H., et al. (2013). Plasma phosphatidylcholine and sphingomyelin concentrations are associated with depression and anxiety symptoms in a Dutch family-based lipidomics study. *J. Psychiatr. Res.* *47*, 357–362.

- Dencker, S.J., Malm, U., Roos, B.E., and Werdinus, B. (1966). Acid monoamine metabolites of cerebrospinal fluid in mental depression and mania. *J. Neurochem.* *13*, 1545–1548.
- Depue, R.A., and Spoont, M.R. (1986). A Behavioral Dimension of Constraint. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* *487*, 47–62.
- Derewenda, U., Derewenda, Z., Dodson, E.J., Dodson, G.G., Bing, X., and Markussen, J. (1991). X-ray analysis of the single chain B29-A1 peptide-linked insulin molecule. A completely inactive analogue. *J. Mol. Biol.* *220*, 425–433.
- Deryabina, I.B., Andrianov, V.V., Muranova, L.N., Bogodvid, T.K., and Gainutdinov, K.L. (2020). Effects of Thryptophan Hydroxylase Blockade by P-Chlorophenylalanine on Contextual Memory Reconsolidation after Training of Different Intensity. *Int. J. Mol. Sci.* *21*.
- Descarries, L., Watkins, K.C., Garcia, S., and Beaudet, A. (1982). The serotonin neurons in nucleus raphe dorsalis of adult rat: A light and electron microscope radioautographic study. *J. Comp. Neurol.* *207*, 239–254.
- Devaskar, S.U., Giddings, S.J., Rajakumar, P.A., Carnaghi, L.R., Menon, R.K., and Zahm, D.S. (1994). Insulin gene expression and insulin synthesis in mammalian neuronal cells. *J. Biol. Chem.* *269*, 8445–8454.
- Dewar, K.M., Reader, T.A., Grondin, L., and Descarries, L. (1991). [3H]paroxetine binding and serotonin content of rat and rabbit cortical areas, hippocampus, neostriatum, ventral mesencephalic tegmentum, and midbrain raphe nuclei region. *Synap. N. Y. N* *9*, 14–26.
- Dhuria, S.V., Hanson, L.R., and Frey, W.H. (2010). Intranasal delivery to the central nervous system: mechanisms and experimental considerations. *J. Pharm. Sci.* *99*, 1654–1673.
- Dimitriadis, G., Mitrou, P., Lambadiari, V., Maratou, E., and Raptis, S.A. (2011). Insulin effects in muscle and adipose tissue. *Diabetes Res. Clin. Pract.* *93 Suppl 1*, S52-59.
- Dinel, A.-L., André, C., Aubert, A., Ferreira, G., Layé, S., and Castanon, N. (2011). Cognitive and emotional alterations are related to hippocampal inflammation in a mouse model of metabolic syndrome. *PloS One* *6*, e24325.
- Ding, Y.-Q., Marklund, U., Yuan, W., Yin, J., Wegman, L., Ericson, J., Deneris, E., Johnson, R.L., and Chen, Z.-F. (2003). *Lmx1b* is essential for the development of serotonergic neurons. *Nat. Neurosci.* *6*, 933–938.
- Disner, S.G., Beevers, C.G., Haigh, E.A.P., and Beck, A.T. (2011). Neural mechanisms of the cognitive model of depression. *Nat. Rev. Neurosci.* *12*, 467–477.
- Docherty, K., Rhodes, C.J., Taylor, N.A., Shennan, K.I., and Hutton, J.C. (1989). Proinsulin endopeptidase substrate specificities defined by site-directed mutagenesis of proinsulin. *J. Biol. Chem.* *264*, 18335–18339.
- Dodd, G.T., Michael, N.J., Lee-Young, R.S., Mangiafico, S.P., Pryor, J.T., Munder, A.C., Simonds, S.E., Brüning, J.C., Zhang, Z.-Y., Cowley, M.A., et al. (2018). Insulin regulates POMC neuronal plasticity to control glucose metabolism (eLife Sciences Publications Limited).
- Dokken, B.B., Saengsirisuwan, V., Kim, J.S., Teachey, M.K., and Henriksen, E.J. (2008). Oxidative stress-induced insulin resistance in rat skeletal muscle: role of glycogen synthase kinase-3. *Am. J. Physiol. Endocrinol. Metab.* *294*, E615-621.
- van Donkelaar, E.L., Vaessen, K.R.D., Pawluski, J.L., Sierksma, A.S., Blokland, A., Cañete, R., and Steinbusch, H.W.M. (2014). Long-Term Corticosterone Exposure Decreases Insulin Sensitivity and Induces Depressive-Like Behaviour in the C57BL/6NCrl Mouse. *PLoS ONE* *9*, e106960.
- Donner, N.C., Johnson, P.L., Fitz, S.D., Kellen, K.E., Shekhar, A., and Lowry, C.A. (2012). Elevated tph2 mRNA expression in a rat model of chronic anxiety. *Depress. Anxiety* *29*, 307–319.
- Dorn, A., Bernstein, H.-G., Rinne, A., Ziegler, M., Hahn, H.-J., and Ansorge, S. (1983). Insulin- and glucagonlike peptides in the brain. *Anat. Rec.* *207*, 69–77.
- Dreshfield, L.J., Wong, D.T., Perry, K.W., and Engleman, E.A. (1996). Enhancement of fluoxetine-dependent increase of extracellular serotonin (5-HT) levels by (-)-pindolol, an antagonist at 5-HT_{1A} receptors. *Neurochem. Res.* *21*, 557–562.
- Dreyer, M., Matthaei, S., Kühnau, J., and Rüdiger, H.W. (1986). Prolonged plasma half-life of insulin in patients with a genetic defect of high affinity binding sites. *Horm. Metab. Res. Horm. Stoffwechselforschung Horm. Metab.* *18*, 247–249.
- Du, R.-W., and Bu, W.-G. (2020). Metformin improves depressive-like symptoms in mice via inhibition of peripheral and central NF- κ B-NLRP3 inflammation activation. *Exp. Brain Res.* *238*, 2549–2556.

- Ducat, L., Philipson, L.H., and Anderson, B.J. (2014). The Mental Health Comorbidities of Diabetes. *JAMA* 312, 691–692.
- Duckworth, W.C. (1988). Insulin degradation: mechanisms, products, and significance. *Endocr. Rev.* 9, 319–345.
- Duman, R.S., Aghajanian, G.K., Sanacora, G., and Krystal, J.H. (2016). Synaptic plasticity and depression: new insights from stress and rapid-acting antidepressants. *Nat. Med.* 22, 238–249.
- Duman, R.S., Sanacora, G., and Krystal, J.H. (2019). Altered connectivity in depression: GABA and glutamate neurotransmitter deficits and reversal by novel treatments. *Neuron* 102, 75–90.
- Duncan, B.B., Schmidt, M.I., Pankow, J.S., Ballantyne, C.M., Couper, D., Vigo, A., Hoogeveen, R., Folsom, A.R., Heiss, G., and Atherosclerosis Risk in Communities Study (2003). Low-grade systemic inflammation and the development of type 2 diabetes: the atherosclerosis risk in communities study. *Diabetes* 52, 1799–1805.
- Dutheil, S., Ota, K.T., Wohleb, E.S., Rasmussen, K., and Duman, R.S. (2016). High-fat diet induced anxiety and anhedonia: impact on brain homeostasis and inflammation. *Neuropsychopharmacology* 41, 1874–1887.
- Eaton, W.W., Shao, H., Nestadt, G., Lee, H.B., Lee, B.H., Bienvenu, O.J., and Zandi, P. (2008). Population-based study of first onset and chronicity in major depressive disorder. *Arch. Gen. Psychiatry* 65, 513–520.
- Ebina, Y., Ellis, L., Jarnagin, K., Edery, M., Graf, L., Clauser, E., Ou, J.H., Masiarz, F., Kan, Y.W., and Goldfine, I.D. (1985). The human insulin receptor cDNA: the structural basis for hormone-activated transmembrane signalling. *Cell* 40, 747–758.
- Eck, M.J., Dhe-Paganon, S., Trüb, T., Nolte, R.T., and Shoelson, S.E. (1996). Structure of the IRS-1 PTB domain bound to the juxtamembrane region of the insulin receptor. *Cell* 85, 695–705.
- Edwin Thanarajah, S., Iglesias, S., Kuzmanovic, B., Rigoux, L., Stephan, K.E., Brüning, J.C., and Tittgemeyer, M. (2019). Modulation of midbrain neurocircuitry by intranasal insulin. *NeuroImage* 194, 120–127.
- Ehrensgruber, M.U., Doupnik, C.A., Xu, Y., Garvey, J., Jasek, M.C., Lester, H.A., and Davidson, N. (1997). Activation of heteromeric G protein-gated inward rectifier K⁺ channels overexpressed by adenovirus gene transfer inhibits the excitability of hippocampal neurons. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 94, 7070–7075.
- Einarson, T.R., Acs, A., Ludwig, C., and Panton, U.H. (2018). Prevalence of cardiovascular disease in type 2 diabetes: a systematic literature review of scientific evidence from across the world in 2007-2017. *Cardiovasc. Diabetol.* 17, 83.
- El Mansari, M., Sánchez, C., Chouvet, G., Renaud, B., and Haddjeri, N. (2005). Effects of acute and long-term administration of escitalopram and citalopram on serotonin neurotransmission: an in vivo electrophysiological study in rat brain. *Neuropsychopharmacol. Off. Publ. Am. Coll. Neuropsychopharmacol.* 30, 1269–1277.
- El Yacoubi, M., Bouali, S., Popa, D., Naudon, L., Leroux-Nicollet, I., Hamon, M., Costentin, J., Adrien, J., and Vaugeois, J.-M. (2003). Behavioral, neurochemical, and electrophysiological characterization of a genetic mouse model of depression. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 100, 6227–6232.
- Elchebly, M., Payette, P., Michaliszyn, E., Cromlish, W., Collins, S., Loy, A.L., Normandin, D., Cheng, A., Himms-Hagen, J., Chan, C.C., et al. (1999). Increased insulin sensitivity and obesity resistance in mice lacking the protein tyrosine phosphatase-1B gene. *Science* 283, 1544–1548.
- El-Mir, M.-Y., Daille, D., R-Villanueva, G., Delgado-Esteban, M., Guigas, B., Attia, S., Fontaine, E., Almeida, A., and Lèverve, X. (2008). Neuroprotective role of antidiabetic drug metformin against apoptotic cell death in primary cortical neurons. *J. Mol. Neurosci.* MN 34, 77–87.
- Emanuelli, B., Peraldi, P., Filloux, C., Sawka-Verhelle, D., Hilton, D., and Van Obberghen, E. (2000). SOCS-3 is an insulin-induced negative regulator of insulin signaling. *J. Biol. Chem.* 275, 15985–15991.
- Engel, K., Zhou, M., and Wang, J. (2004). Identification and characterization of a novel monoamine transporter in the human brain. *J. Biol. Chem.* 279, 50042–50049.
- Enoch, M.A., Goldman, D., Barnett, R., Sher, L., Mazzanti, C.M., and Rosenthal, N.E. (1999). Association between seasonal affective disorder and the 5-HT_{2A} promoter polymorphism, -1438G/A. *Mol. Psychiatry* 4, 89–92.
- Eom, T.-Y., and Jope, R.S. (2009a). Blocked inhibitory serine-phosphorylation of glycogen synthase kinase-3 α / β impairs in vivo neural precursor cell proliferation. *Biol. Psychiatry* 66, 494–502.

- Eom, T.-Y., and Jope, R.S. (2009b). Blocked inhibitory serine-phosphorylation of glycogen synthase kinase-3 α/β impairs in vivo neural precursor cell proliferation. *Biol. Psychiatry* 66, 494–502.
- Erspamer, V., and Asero, B. (1952). Identification of enteramine, the specific hormone of the enterochromaffin cell system, as 5-hydroxytryptamine. *Nature* 169, 800–801.
- Escribano, O., Beneit, N., Rubio-Longás, C., López-Pastor, A.R., and Gómez-Hernández, A. (2017). The Role of Insulin Receptor Isoforms in Diabetes and Its Metabolic and Vascular Complications. *J. Diabetes Res.* 2017, 1403206.
- Eskridge, E.M., and Shields, D. (1983). Cell-free processing and segregation of insulin precursors. *J. Biol. Chem.* 258, 11487–11491.
- Esmaeili, M.H., Bahari, B., and Salari, A.-A. (2018). ATP-sensitive potassium-channel inhibitor glibenclamide attenuates HPA axis hyperactivity, depression- and anxiety-related symptoms in a rat model of Alzheimer's disease. *Brain Res. Bull.* 137, 265–276.
- Evans, J.L., Maddux, B.A., and Goldfine, I.D. (2005). The molecular basis for oxidative stress-induced insulin resistance. *Antioxid. Redox Signal.* 7, 1040–1052.
- Evans, M.C., Kumar, N.S., Inglis, M.A., and Anderson, G.M. (2018). Leptin and insulin do not exert redundant control of metabolic or emotive function via dopamine neurons. *Horm. Behav.* 106, 93–104.
- Everson-Rose, S.A., Meyer, P.M., Powell, L.H., Pandey, D., Torrén, J.I., Kravitz, H.M., Bromberger, J.T., and Matthews, K.A. (2004). Depressive symptoms, insulin resistance, and risk of diabetes in women at midlife. *Diabetes Care* 27, 2856–2862.
- Fakra, E., Hyde, L.W., Gorka, A., Fisher, P.M., Muñoz, K.E., Kimak, M., Halder, I., Ferrell, R.E., Manuck, S.B., and Hariri, A.R. (2009). Effects of HTR1A C(-1019)G on amygdala reactivity and trait anxiety. *Arch. Gen. Psychiatry* 66, 33–40.
- Fan, L.-W., Carter, K., Bhatt, A., and Pang, Y. (2019). Rapid transport of insulin to the brain following intranasal administration in rats. *Neural Regen. Res.* 14, 1046–1051.
- Fang, W., Zhang, J., Hong, L., Huang, W., Dai, X., Ye, Q., and Chen, X. (2020). Metformin ameliorates stress-induced depression-like behaviors via enhancing the expression of BDNF by activating AMPK/CREB-mediated histone acetylation. *J. Affect. Disord.* 260, 302–313.
- Fargin, A., Raymond, J.R., Regan, J.W., Cotecchia, S., Lefkowitz, R.J., and Caron, M.G. (1989). Effector coupling mechanisms of the cloned 5-HT_{1A} receptor. *J. Biol. Chem.* 264, 14848–14852.
- Farré, R., Fiorani, M., Abdu Rahiman, S., and Matteoli, G. (2020). Intestinal Permeability, Inflammation and the Role of Nutrients. *Nutrients* 12.
- Farrelly, L.A., Thompson, R.E., Zhao, S., Lepack, A.E., Lyu, Y., Bhanu, N.V., Zhang, B., Loh, Y.-H.E., Ramakrishnan, A., Vadodaria, K.C., et al. (2019). Histone serotonylation is a permissive modification that enhances TFIID binding to H3K4me3. *Nature* 567, 535–539.
- Federico, L.M., Naples, M., Taylor, D., and Adeli, K. (2006). Intestinal insulin resistance and aberrant production of apolipoprotein B48 lipoproteins in an animal model of insulin resistance and metabolic dyslipidemia: evidence for activation of protein tyrosine phosphatase-1B, extracellular signal-related kinase, and sterol regulatory element-binding protein-1c in the fructose-fed hamster intestine. *Diabetes* 55, 1316–1326.
- Feng, H.S., Lynn, R.B., Han, J., and Brooks, F.P. (1990). Gastric effects of TRH analogue and bicuculline injected into dorsal motor vagal nucleus in cats. *Am. J. Physiol.* 259, G321-326.
- Fernandez, A.M., and Torres-Alemán, I. (2012). The many faces of insulin-like peptide signalling in the brain. *Nat. Rev. Neurosci.* 13, 225–239.
- Fernandez, S.P., and Gaspar, P. (2012). Investigating anxiety and depressive-like phenotypes in genetic mouse models of serotonin depletion. *Neuropharmacology* 62, 144–154.
- Fernstrom, J.D. (2013). Large neutral amino acids: dietary effects on brain neurochemistry and function. *Amino Acids* 45, 419–430.
- Fernstrom, J.D., and Wurtman, R.J. (1972). Brain serotonin content: physiological regulation by plasma neutral amino acids. *Science* 178, 414–416.
- Ferrannini, E., and Cushman, W.C. (2012). Diabetes and hypertension: the bad companions. *Lancet Lond. Engl.* 380, 601–610.

- Ferrannini, E., Gastaldelli, A., and Iozzo, P. (2011). Pathophysiology of prediabetes. *Med. Clin. North Am.* 95, 327–339, vii–viii.
- Ferrario, C.R., and Reagan, L.P. (2018). Insulin-mediated synaptic plasticity in the CNS: Anatomical, functional and temporal contexts. *Neuropharmacology* 136, 182–191.
- Ferreira de Sá, D.S., Römer, S., Brückner, A.H., Issler, T., Hauck, A., and Michael, T. (2020). Effects of intranasal insulin as an enhancer of fear extinction: a randomized, double-blind, placebo-controlled experimental study. *Neuropsychopharmacol. Off. Publ. Am. Coll. Neuropsychopharmacol.* 45, 753–760.
- Fetterly, T.L., Oginsky, M.F., Nieto, A.M., Alonso-Caraballo, Y., Santana-Rodriguez, Z., and Ferrario, C.R. (2021). Insulin Bidirectionally Alters NAc Glutamatergic Transmission: Interactions between Insulin Receptor Activation, Endogenous Opioids, and Glutamate Release. *J. Neurosci. Off. J. Soc. Neurosci.* 41, 2360–2372.
- Field, C.J., Ryan, E.A., Thomson, A.B., and Clandinin, M.T. (1990). Diet fat composition alters membrane phospholipid composition, insulin binding, and glucose metabolism in adipocytes from control and diabetic animals. *J. Biol. Chem.* 265, 11143–11150.
- Figlewicz, D.P., and Sipols, A.J. (2010). ENERGY REGULATORY SIGNALS AND FOOD REWARD. *Pharmacol. Biochem. Behav.* 97, 15–24.
- Figlewicz, D.P., Patterson, T.A., Johnson, L.B., Zavosh, A., Israel, P.A., and Szot, P. (1998). Dopamine transporter mRNA is increased in the CNS of Zucker fatty (fa/fa) rats. *Brain Res. Bull.* 46, 199–202.
- Figlewicz, D.P., Evans, S.B., Murphy, J., Hoen, M., and Baskin, D.G. (2003). Expression of receptors for insulin and leptin in the ventral tegmental area/substantia nigra (VTA/SN) of the rat. *Brain Res.* 964, 107–115.
- Finetti, F., Savino, M.T., and Baldari, C.T. (2009). Positive and negative regulation of antigen receptor signaling by the Shc family of protein adapters. *Immunol. Rev.* 232, 115–134.
- Fletcher, A., Forster, E.A., Bill, D.J., Brown, G., Cliffe, I.A., Hartley, J.E., Jones, D.E., McLenachan, A., Stanhope, K.J., Critchley, D.J., et al. (1996). Electrophysiological, biochemical, neurohormonal and behavioural studies with WAY-100635, a potent, selective and silent 5-HT_{1A} receptor antagonist. *Behav. Brain Res.* 73, 337–353.
- Florant, G.L., Singer, L., Scheurink, A.J., Park, C.R., Richardson, R.D., and Woods, S.C. (1991). Intraventricular insulin reduces food intake and body weight of marmots during the summer feeding period. *Physiol. Behav.* 49, 335–338.
- Flowers, J.B., Oler, A.T., Nadler, S.T., Choi, Y., Schueler, K.L., Yandell, B.S., Kendziorski, C.M., and Attie, A.D. (2007). Abdominal obesity in BTBR male mice is associated with peripheral but not hepatic insulin resistance. *Am. J. Physiol. Endocrinol. Metab.* 292, E936-945.
- Fon, E.A., Pothos, E.N., Sun, B.-C., Killeen, N., Sulzer, D., and Edwards, R.H. (1997). Vesicular Transport Regulates Monoamine Storage and Release but Is Not Essential for Amphetamine Action. *Neuron* 19, 1271–1283.
- Fond, G., Loundou, A., Hamdani, N., Boukouaci, W., Dargel, A., Oliveira, J., Roger, M., Tamouza, R., Leboyer, M., and Boyer, L. (2014). Anxiety and depression comorbidities in irritable bowel syndrome (IBS): a systematic review and meta-analysis. *Eur. Arch. Psychiatry Clin. Neurosci.* 264, 651–660.
- Formolo, D.A., Lee, T.H.-Y., and Yau, S.-Y. (2019). Increasing Adiponergic System Activity as a Potential Treatment for Depressive Disorders. *Mol. Neurobiol.* 56, 7966–7976.
- Fornal, C.A., Litto, W.J., Morilak, D.A., and Jacobs, B.L. (1989). Single-unit responses of serotonergic neurons to glucose and insulin administration in behaving cats. *Am. J. Physiol.* 257, R1345-1353.
- Foster, J.A., and McVey Neufeld, K.-A. (2013). Gut-brain axis: how the microbiome influences anxiety and depression. *Trends Neurosci.* 36, 305–312.
- Frank, H.J., Jankovic-Vokes, T., Pardridge, W.M., and Morris, W.L. (1985). Enhanced insulin binding to blood-brain barrier in vivo and to brain microvessels in vitro in newborn rabbits. *Diabetes* 34, 728–733.
- Frasca, F., Pandini, G., Scalia, P., Sciacca, L., Mineo, R., Costantino, A., Goldfine, I.D., Belfiore, A., and Vigneri, R. (1999). Insulin Receptor Isoform A, a Newly Recognized, High-Affinity Insulin-Like Growth Factor II Receptor in Fetal and Cancer Cells. *Mol. Cell. Biol.* 19, 3278–3288.
- Freland, L., and Beaulieu, J.-M. (2012). Inhibition of GSK3 by lithium, from single molecules to signaling networks. *Front. Mol. Neurosci.* 5.

- Freychet, P., Roth, J., and Neville, D.M. (1971). Insulin receptors in the liver: specific binding of (¹²⁵I)insulin to the plasma membrane and its relation to insulin bioactivity. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *68*, 1833–1837.
- Fu, Y., Kaneko, K., Lin, H.-Y., Mo, Q., Xu, Y., Suganami, T., Ravn, P., and Fukuda, M. (2020). Gut Hormone GIP Induces Inflammation and Insulin Resistance in the Hypothalamus. *Endocrinology* *161*.
- Fu, Z., Wu, J., Nesil, T., Li, M.D., Aylor, K.W., and Liu, Z. (2017). Long-term high-fat diet induces hippocampal microvascular insulin resistance and cognitive dysfunction. *Am. J. Physiol. - Endocrinol. Metab.* *312*, E89–E97.
- Furmark, T., Tillfors, M., Garpenstrand, H., Marteinsdottir, I., Långström, B., Orelund, L., and Fredrikson, M. (2004). Serotonin transporter polymorphism related to amygdala excitability and symptom severity in patients with social phobia. *Neurosci. Lett.* *362*, 189–192.
- Fuxe, K., Agnati, L.F., Marcoli, M., and Borroto-Escuela, D.O. (2015). Volume Transmission in Central Dopamine and Noradrenaline Neurons and Its Astroglial Targets. *Neurochem. Res.* *40*, 2600–2614.
- Galic, S., Klingler-Hoffmann, M., Fodero-Tavoletti, M.T., Puryer, M.A., Meng, T.-C., Tonks, N.K., and Tiganis, T. (2003). Regulation of Insulin Receptor Signaling by the Protein Tyrosine Phosphatase TCPTP. *Mol. Cell. Biol.* *23*, 2096–2108.
- García-Cáceres, C., Quarta, C., Varela, L., Gao, Y., Gruber, T., Legutko, B., Jastroch, M., Johansson, P., Ninkovic, J., Yi, C.-X., et al. (2016). Astrocytic Insulin Signaling Couples Brain Glucose Uptake with Nutrient Availability. *Cell* *166*, 867–880.
- Gardier, A.M., David, D.J., Jego, G., Przybylski, C., Jacquot, C., Durier, S., Gruwez, B., Douvier, E., Beauverie, P., Poisson, N., et al. (2003). Effects of chronic paroxetine treatment on dialysate serotonin in 5-HT1B receptor knockout mice. *J. Neurochem.* *86*, 13–24.
- Gartside, S.E., Hajós-Korcok, E., Bagdy, E., Hársing, L.G., Sharp, T., and Hajós, M. (2000). Neurochemical and electrophysiological studies on the functional significance of burst firing in serotonergic neurons. *Neuroscience* *98*, 295–300.
- Garwood, C.J., Ratcliffe, L.E., Morgan, S.V., Simpson, J.E., Owens, H., Vazquez-Villaseñor, I., Heath, P.R., Romero, I.A., Ince, P.G., and Wharton, S.B. (2015). Insulin and IGF1 signalling pathways in human astrocytes in vitro and in vivo; characterisation, subcellular localisation and modulation of the receptors. *Mol. Brain* *8*, 51.
- Gassaway, B.M., Petersen, M.C., Surovtseva, Y.V., Barber, K.W., Sheetz, J.B., Aerni, H.R., Merkel, J.S., Samuel, V.T., Shulman, G.I., and Rinehart, J. (2018). PKC ϵ contributes to lipid-induced insulin resistance through cross talk with p70S6K and through previously unknown regulators of insulin signaling. *Proc. Natl. Acad. Sci.* *115*, E8996–E9005.
- GBD 2016 Disease and Injury Incidence and Prevalence Collaborators (2017). Global, regional, and national incidence, prevalence, and years lived with disability for 328 diseases and injuries for 195 countries, 1990–2016: a systematic analysis for the Global Burden of Disease Study 2016. *Lancet Lond. Engl.* *390*, 1211–1259.
- van der Geer, P., Hunter, T., and Lindberg, R.A. (1994). Receptor protein-tyrosine kinases and their signal transduction pathways. *Annu. Rev. Cell Biol.* *10*, 251–337.
- George, S., Rochford, J.J., Wolfrum, C., Gray, S.L., Schinner, S., Wilson, J.C., Soos, M.A., Murgatroyd, P.R., Williams, R.M., Acerini, C.L., et al. (2004). A family with severe insulin resistance and diabetes due to a mutation in AKT2. *Science* *304*, 1325–1328.
- Gerhard, D.M., Wohleb, E.S., and Duman, R.S. (2016). Emerging treatment mechanisms for depression: focus on glutamate and synaptic plasticity. *Drug Discov. Today* *21*, 454–464.
- Gold, P.W. (2015). The organization of the stress system and its dysregulation in depressive illness. *Mol. Psychiatry* *20*, 32–47.
- Goldberg, L.R. (1993). The structure of phenotypic personality traits. *Am. Psychol.* *48*, 26–34.
- Goldstein, B.J. (1993). Regulation of insulin receptor signaling by protein-tyrosine dephosphorylation. *Receptor* *3*, 1–15.
- Goldstein, B.J., Bittner-Kowalczyk, A., White, M.F., and Harbeck, M. (2000). Tyrosine dephosphorylation and deactivation of insulin receptor substrate-1 by protein-tyrosine phosphatase 1B. Possible facilitation by the formation of a ternary complex with the Grb2 adaptor protein. *J. Biol. Chem.* *275*, 4283–4289.

- Golomb, B.A., Tenkanen, L., Alikoski, T., Niskanen, T., Manninen, V., Huttunen, M., and Mednick, S.A. (2002). Insulin sensitivity markers: Predictors of accidents and suicides in Helsinki Heart Study screenees. *J. Clin. Epidemiol.* *55*, 767–773.
- González-Muniesa, P., Martínez-González, M.-A., Hu, F.B., Després, J.-P., Matsuzawa, Y., Loos, R.J.F., Moreno, L.A., Bray, G.A., and Martínez, J.A. (2017). Obesity. *Nat. Rev. Dis. Primer* *3*, 1–18.
- Grahn, R.E., Will, M.J., Hammack, S.E., Maswood, S., McQueen, M.B., Watkins, L.R., and Maier, S.F. (1999). Activation of serotonin-immunoreactive cells in the dorsal raphe nucleus in rats exposed to an uncontrollable stressor. *Brain Res.* *826*, 35–43.
- Gray, S.M., Aylor, K.W., and Barrett, E.J. (2017). Unravelling the regulation of insulin transport across the brain endothelial cell. *Diabetologia* *60*, 1512–1521.
- Greg, G.J.L. (1986). First american cyclist to win Le Tour de France.
- Grillo, C.A., Piroli, G.G., Kaigler, K.F., Wilson, S.P., Wilson, M.A., and Reagan, L.P. (2011). Downregulation of hypothalamic insulin receptor expression elicits depressive-like behaviors in rats. *Behav. Brain Res.* *222*, 230–235.
- Grillo, C.A., Piroli, G.G., Lawrence, R.C., Wrihten, S.A., Green, A.J., Wilson, S.P., Sakai, R.R., Kelly, S.J., Wilson, M.A., Mott, D.D., et al. (2015). Hippocampal Insulin Resistance Impairs Spatial Learning and Synaptic Plasticity. *Diabetes* *64*, 3927–3936.
- Grøntved, A., and Hu, F.B. (2011). Television viewing and risk of type 2 diabetes, cardiovascular disease, and all-cause mortality: a meta-analysis. *JAMA* *305*, 2448–2455.
- de Groot, M., Crick, K.A., Long, M., Saha, C., and Shubrook, J.H. (2016). Lifetime Duration of Depressive Disorders in Patients With Type 2 Diabetes. *Diabetes Care* *39*, 2174–2181.
- Gross, C., Zhuang, X., Stark, K., Ramboz, S., Oosting, R., Kirby, L., Santarelli, L., Beck, S., and Hen, R. (2002). Serotonin1A receptor acts during development to establish normal anxiety-like behaviour in the adult. *Nature* *416*, 396–400.
- Guiard, B.P., El Mansari, M., Merali, Z., and Blier, P. (2008a). Functional interactions between dopamine, serotonin and norepinephrine neurons: an in-vivo electrophysiological study in rats with monoaminergic lesions. *Int. J. Neuropsychopharmacol.* *11*, 625–639.
- Guiard, B.P., David, D.J.P., Deltheil, T., Chenu, F., Le Maître, E., Renoir, T., Leroux-Nicollet, I., Sokoloff, P., Lanfumey, L., Hamon, M., et al. (2008b). Brain-derived neurotrophic factor-deficient mice exhibit a hippocampal hyperserotonergic phenotype. *Int. J. Neuropsychopharmacol.* *11*, 79–92.
- Guillam, M.T., Dupraz, P., and Thorens, B. (2000). Glucose uptake, utilization, and signaling in GLUT2-null islets. *Diabetes* *49*, 1485–1491.
- Guilloux, J.-P., David, D.J.P., Guiard, B.P., Chenu, F., Repérant, C., Toth, M., Bourin, M., and 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. *Neuropsychopharmacol. Off. Publ. Am. Coll. Neuropsychopharmacol.* *31*, 2162–2172.
- Gulbins, E., Palmada, M., Reichel, M., Lüth, A., Böhmer, C., Amato, D., Müller, C.P., Tischbirek, C.H., Groemer, T.W., Tabatabai, G., et al. (2013). Acid sphingomyelinase-ceramide system mediates effects of antidepressant drugs. *Nat. Med.* *19*, 934–938.
- Guo, M., Mi, J., Jiang, Q.-M., Xu, J.-M., Tang, Y.-Y., Tian, G., and Wang, B. (2014). Metformin may produce antidepressant effects through improvement of cognitive function among depressed patients with diabetes mellitus. *Clin. Exp. Pharmacol. Physiol.* n/a-n/a.
- Gupta, D., Kurhe, Y., and Radhakrishnan, M. (2014). Antidepressant effects of insulin in streptozotocin induced diabetic mice: Modulation of brain serotonin system. *Physiol. Behav.* *129*, 73–78.
- Gutknecht, L., Araragi, N., Merker, S., Waider, J., Sommerlandt, F.M.J., Mlinar, B., Baccini, G., Mayer, U., Proft, F., Hamon, M., et al. (2012). Impacts of brain serotonin deficiency following Tph2 inactivation on development and raphe neuron serotonergic specification. *PLoS One* *7*, e43157.
- Hachiya, H.L., Halban, P.A., and King, G.L. (1988). Intracellular pathways of insulin transport across vascular endothelial cells. *Am. J. Physiol.* *255*, C459–464.

- Haddjeri, N., Lavoie, N., and Blier, P. (2004). Electrophysiological evidence for the tonic activation of 5-HT(1A) autoreceptors in the rat dorsal raphe nucleus. *Neuropsychopharmacol. Off. Publ. Am. Coll. Neuropsychopharmacol.* 29, 1800–1806.
- Hagan, C.E., McDevitt, R.A., Liu, Y., Furay, A.R., and Neumaier, J.F. (2012). 5-HT1B autoreceptor regulation of serotonin transporter activity in synaptosomes. *Synap. N. Y. N* 66, 1024–1034.
- Hager, S.R., Jochen, A.L., and Kalkhoff, R.K. (1991). Insulin resistance in normal rats infused with glucose for 72 h. *Am. J. Physiol.* 260, E353–362.
- Haj-Dahmane, S., Hamon, M., and Lanfumey, L. (1991). K⁺ channel and 5-hydroxytryptamine1A autoreceptor interactions in the rat dorsal raphe nucleus: An in vitro electrophysiological study. *Neuroscience* 41, 495–505.
- Hajós, M., Hajós-Korcsok, E., and Sharp, T. (1999). Role of the medial prefrontal cortex in 5-HT1A receptor-induced inhibition of 5-HT neuronal activity in the rat. *Br. J. Pharmacol.* 126, 1741–1750.
- Hajós, M., Allers, K.A., Jennings, K., Sharp, T., Charette, G., Sík, A., and Kocsis, B. (2007). Neurochemical identification of stereotypic burst-firing neurons in the rat dorsal raphe nucleus using juxtacellular labelling methods. *Eur. J. Neurosci.* 25, 119–126.
- Hallschmid, M., Benedict, C., Schultes, B., Fehm, H.-L., Born, J., and Kern, W. (2004). Intranasal insulin reduces body fat in men but not in women. *Diabetes* 53, 3024–3029.
- Hammoud, H., Netsyk, O., Tafreshiha, A.S., Korol, S.V., Jin, Z., Li, J.-P., and Birnir, B. (2021). Insulin differentially modulates GABA signalling in hippocampal neurons and, in an age-dependent manner, normalizes GABA-activated currents in the tg-APP^{Swe} mouse model of Alzheimer's disease. *Acta Physiol. Oxf. Engl.* e13623.
- Hamon, M., and Blier, P. (2013). Monoamine neurocircuitry in depression and strategies for new treatments. *Prog. Neuropsychopharmacol. Biol. Psychiatry* 45, 54–63.
- Hancock, M.L., Meyer, R.C., Mistry, M., Khetani, R.S., Wagschal, A., Shin, T., Ho Sui, S.J., Näär, A.M., and Flanagan, J.G. (2019). Insulin Receptor Associates with Promoters Genome-wide and Regulates Gene Expression. *Cell* 177, 722-736.e22.
- Hanson, L.R., Fine, J.M., Svitak, A.L., and Faltsek, K.A. (2013). Intranasal administration of CNS therapeutics to awake mice. *J. Vis. Exp. JoVE*.
- Hanson, N.D., Nemeroff, C.B., and Owens, M.J. (2011). Lithium, but not fluoxetine or the corticotropin-releasing factor receptor 1 receptor antagonist R121919, increases cell proliferation in the adult dentate gyrus. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 337, 180–186.
- Harkin, A., Kelly, J.P., and Leonard, B.E. (2003). A review of the relevance and validity of olfactory bulbectomy as a model of depression. *Clin. Neurosci. Res.* 3, 253–262.
- Harper, M.E., Ullrich, A., and Saunders, G.F. (1981). Localization of the human insulin gene to the distal end of the short arm of chromosome 11. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 78, 4458–4460.
- Haruta, T., Imamura, T., Iwanishi, M., Egawa, K., Goji, K., and Kobayashi, M. (1995). Amplification and analysis of promoter region of insulin receptor gene in a patient with leprechaunism associated with severe insulin resistance. *Metabolism.* 44, 430–437.
- Haus, J.M., Kashyap, S.R., Kasumov, T., Zhang, R., Kelly, K.R., DeFronzo, R.A., and Kirwan, J.P. (2009). Plasma Ceramides Are Elevated in Obese Subjects With Type 2 Diabetes and Correlate With the Severity of Insulin Resistance. *Diabetes* 58, 337–343.
- Havrankova, J., Roth, J., and Brownstein, M. (1978). Insulin receptors are widely distributed in the central nervous system of the rat. *Nature* 272, 827–829.
- Havrankova, J., Roth, J., and Brownstein, M.J. (1979). Concentrations of insulin and insulin receptors in the brain are independent of peripheral insulin levels. Studies of obese and streptozotocin-treated rodents. *J. Clin. Invest.* 64, 636–642.
- Heils, A., Teufel, A., Petri, S., Stöber, G., Riederer, P., Bengel, D., and Lesch, K.P. (1996). Allelic variation of human serotonin transporter gene expression. *J. Neurochem.* 66, 2621–2624.

- Heisler, L.K., Chu, H.M., Brennan, T.J., Danao, J.A., Bajwa, P., Parsons, L.H., and Tecott, L.H. (1998). Elevated anxiety and antidepressant-like responses in serotonin 5-HT_{1A} receptor mutant mice. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *95*, 15049–15054.
- Hendricks, T., Francis, N., Fyodorov, D., and Deneris, E.S. (1999). The ETS domain factor Pet-1 is an early and precise marker of central serotonin neurons and interacts with a conserved element in serotonergic genes. *J. Neurosci. Off. J. Soc. Neurosci.* *19*, 10348–10356.
- Hendricks, T.J., Fyodorov, D.V., Wegman, L.J., Lelutiu, N.B., Pehek, E.A., Yamamoto, B., Silver, J., Weeber, E.J., Sweatt, J.D., and Deneris, E.S. (2003). Pet-1 ETS gene plays a critical role in 5-HT neuron development and is required for normal anxiety-like and aggressive behavior. *Neuron* *37*, 233–247.
- Heni, M., Hennige, A.M., Peter, A., Siegel-Axel, D., Ordelheide, A.-M., Krebs, N., Machicao, F., Fritsche, A., Häring, H.-U., and Staiger, H. (2011). Insulin promotes glycogen storage and cell proliferation in primary human astrocytes. *PloS One* *6*, e21594.
- Heni, M., Wagner, R., Kullmann, S., Veit, R., Mat Husin, H., Linder, K., Benkendorff, C., Peter, A., Stefan, N., Häring, H.-U., et al. (2014). Central insulin administration improves whole-body insulin sensitivity via hypothalamus and parasympathetic outputs in men. *Diabetes* *63*, 4083–4088.
- Heni, M., Wagner, R., Willmann, C., Jaghutriz, B.A., Vosseler, A., Kübler, C., Hund, V., Scheffler, K., Peter, A., Häring, H.-U., et al. (2020). Insulin Action in the Hypothalamus Increases Second-Phase Insulin Secretion in Humans. *Neuroendocrinology* *110*, 929–937.
- Henje Blom, E., Duncan, L.G., Ho, T.C., Connolly, C.G., LeWinn, K.Z., Chesney, M., Hecht, F.M., and Yang, T.T. (2014). The development of an RDoC-based treatment program for adolescent depression: “Training for Awareness, Resilience, and Action” (TARA). *Front. Hum. Neurosci.* *8*.
- Henke, P.G. (1980). The amygdala and restraint ulcers in rats. *J. Comp. Physiol. Psychol.* *94*, 313–323.
- Herder, C., Schmitt, A., Budden, F., Reimer, A., Kulzer, B., Roden, M., Haak, T., and Hermanns, N. (2018). Association between pro- and anti-inflammatory cytokines and depressive symptoms in patients with diabetes-potential differences by diabetes type and depression scores. *Transl. Psychiatry* *7*, 1.
- Hernández-Vázquez, F., Garduño, J., and Hernández-López, S. (2019). GABAergic modulation of serotonergic neurons in the dorsal raphe nucleus. *Rev. Neurosci.* *30*, 289–303.
- Hersom, M., Helms, H.C., Schmalz, C., Pedersen, T.Å., Buckley, S.T., and Brodin, B. (2018). The insulin receptor is expressed and functional in cultured blood-brain barrier endothelial cells but does not mediate insulin entry from blood to brain. *Am. J. Physiol. Endocrinol. Metab.* *315*, E531–E542.
- Hertel, P., Lindblom, N., Nomikos, G.G., and Svensson, T.H. (1998). Modulation of central serotonergic neurotransmission by risperidone: underlying mechanism(s) and significance of action. *Prog. Neuropsychopharmacol. Biol. Psychiatry* *22*, 815–834.
- Hervás, I., and Artigas, F. (1998). Effect of fluoxetine on extracellular 5-hydroxytryptamine in rat brain. Role of 5-HT autoreceptors. *Eur. J. Pharmacol.* *358*, 9–18.
- Hirosumi, J., Tuncman, G., Chang, L., Görgün, C.Z., Uysal, K.T., Maeda, K., Karin, M., and Hotamisligil, G.S. (2002). A central role for JNK in obesity and insulin resistance. *Nature* *420*, 333–336.
- Hirvonen, J., Karlsson, H., Kajander, J., Lepola, A., Markkula, J., Rasi-Hakala, H., Någren, K., Salminen, J.K., and Hietala, J. (2008). Decreased brain serotonin 5-HT_{1A} receptor availability in medication-naïve patients with major depressive disorder: an in-vivo imaging study using PET and [carbonyl-¹¹C]WAY-100635. *Int. J. Neuropsychopharmacol.* *11*, 465–476.
- Hjorth, S., and Tao, R. (1991). The putative 5-HT_{1B} receptor agonist CP-93,129 suppresses rat hippocampal 5-HT release in vivo: comparison with RU 24969. *Eur. J. Pharmacol.* *209*, 249–252.
- Hjorth, S., Suchowski, C.S., and Galloway, M.P. (1995). Evidence for 5-HT autoreceptor-mediated, nerve impulse-independent, control of 5-HT synthesis in the rat brain. *Synap. N. Y. N* *19*, 170–176.
- Ho, N., Balu, D.T., Hilario, M.R.F., Blendy, J.A., and Lucki, I. (2012). Depressive phenotypes evoked by experimental diabetes are reversed by insulin. *Physiol. Behav.* *105*, 702–708.
- Hogg, S., Andrews, N., and File, S.E. (1994). Contrasting behavioural effects of 8-OH DPAT in the dorsal raphe nucleus and ventral hippocampus. *Neuropharmacology* *33*, 343–348.

- Holland, W.L., Brozinick, J.T., Wang, L.-P., Hawkins, E.D., Sargent, K.M., Liu, Y., Narra, K., Hoehn, K.L., Knotts, T.A., Siesky, A., et al. (2007). Inhibition of ceramide synthesis ameliorates glucocorticoid-, saturated-fat-, and obesity-induced insulin resistance. *Cell Metab.* *5*, 167–179.
- Holman, G.D., and Kasuga, M. (1997). From receptor to transporter: insulin signalling to glucose transport. *Diabetologia* *40*, 991–1003.
- Holt, L.J., and Siddle, K. (2005). Grb10 and Grb14: enigmatic regulators of insulin action – and more? *Biochem. J.* *388*, 393–406.
- Holtmann, G., Shah, A., and Morrison, M. (2017). Pathophysiology of Functional Gastrointestinal Disorders: A Holistic Overview. *Dig. Dis. Basel Switz.* *35 Suppl 1*, 5–13.
- Holzenberger, M., Dupont, J., Ducos, B., Leneuve, P., Géløën, A., Even, P.C., Cervera, P., and Le Bouc, Y. (2003). IGF-1 receptor regulates lifespan and resistance to oxidative stress in mice. *Nature* *421*, 182–187.
- Hoshaw, B.A., Hill, T.I., Crowley, J.J., Malberg, J.E., Khawaja, X., Rosenzweig-Lipson, S., Schechter, L.E., and Lucki, I. (2008). Antidepressant-like behavioral effects of IGF-I produced by enhanced serotonin transmission. *Eur. J. Pharmacol.* *594*, 109–116.
- Hotamisligil, G.S. (2010). Endoplasmic reticulum stress and the inflammatory basis of metabolic disease. *Cell* *140*, 900–917.
- van Houten, M., and Posner, B.I. (1979). Insulin binds to brain blood vessels in vivo. *Nature* *282*, 623–625.
- Hribal, M.L., Tornei, F., Pujol, A., Menghini, R., Barcaroli, D., Lauro, D., Amoroso, R., Lauro, R., Bosch, F., Sesti, G., et al. (2008). Transgenic mice overexpressing human G972R IRS-1 show impaired insulin action and insulin secretion. *J. Cell. Mol. Med.* *12*, 2096–2106.
- Hu, F.B., Manson, J.E., Stampfer, M.J., Colditz, G., Liu, S., Solomon, C.G., and Willett, W.C. (2001). Diet, lifestyle, and the risk of type 2 diabetes mellitus in women. *N. Engl. J. Med.* *345*, 790–797.
- Huang, C.L.-C. (2009). Residual Cognitive Deficit in Adults with Depression who Recovered after 6-month Treatment: Stable versus State-Dependent Markers. *J. Clin. Med. Res.* *1*, 202–206.
- Huang, C.-C., You, J.-L., Lee, C.-C., and Hsu, K.-S. (2003). Insulin induces a novel form of postsynaptic mossy fiber long-term depression in the hippocampus. *Mol. Cell. Neurosci.* *24*, 831–841.
- Huang, C.-J., Hsieh, H.-M., Tu, H.-P., Jiang, H.-J., Wang, P.-W., and Lin, C.-H. (2020). Generalized anxiety disorder in type 2 diabetes mellitus: prevalence and clinical characteristics. *Braz. J. Psychiatry* *42*, 621–629.
- Huang, C.-W., Hong, T.-W., Wang, Y.-J., Chen, K.-C., Pei, J.-C., Chuang, T.-Y., Lai, W.-S., Tsai, S.-H., Chu, R., Chen, W.-C., et al. (2016). *Ophiocordyceps formosana* improves hyperglycemia and depression-like behavior in an STZ-induced diabetic mouse model. *BMC Complement. Altern. Med.* *16*, 310.
- Huang, K.W., Ochandarena, N.E., Philson, A.C., Hyun, M., Birnbaum, J.E., Cicconet, M., and Sabatini, B.L. (2019). Molecular and anatomical organization of the dorsal raphe nucleus. *ELife* *8*.
- Huvers, F.C., Popa, C., Netea, M.G., van den Hoogen, F.H.J., and Tack, C.J. (2007). Improved insulin sensitivity by anti-TNF α antibody treatment in patients with rheumatic diseases. *Ann. Rheum. Dis.* *66*, 558–559.
- Ignácio, Z.M., Réus, G.Z., Arent, C.O., Abelaira, H.M., Pitcher, M.R., and Quevedo, J. (2016). New perspectives on the involvement of mTOR in depression as well as in the action of antidepressant drugs. *Br. J. Clin. Pharmacol.* *82*, 1280–1290.
- Inazu, M., Takeda, H., Ikoshi, H., Sugisawa, M., Uchida, Y., and Matsumiya, T. (2001). Pharmacological characterization and visualization of the glial serotonin transporter. *Neurochem. Int.* *39*, 39–49.
- Ingle, P. (2018). Current Trends in Pharmacological Treatment of Type II Diabetes Mellitus.
- Innes, D.L., and Tansy, M.F. (1980). Gastric mucosal ulceration associated with electrochemical stimulation of the limbic brain. *Brain Res. Bull.* *5 Suppl 1*, 33–36.
- Insel, T., Cuthbert, B., Garvey, M., Heinssen, R., Pine, D.S., Quinn, K., Sanislow, C., and Wang, P. (2010). Research domain criteria (RDoC): toward a new classification framework for research on mental disorders. *Am. J. Psychiatry* *167*, 748–751.

- Invernizzi, R., Bramante, M., and Samanin, R. (1994). Chronic treatment with citalopram facilitates the effect of a challenge dose on cortical serotonin output: role of presynaptic 5-HT_{1A} receptors. *Eur. J. Pharmacol.* *260*, 243–246.
- Ishihara, A., Hashimoto, Y., Tanaka, C., Dubouzet, J.G., Nakao, T., Matsuda, F., Nishioka, T., Miyagawa, H., and Wakasa, K. (2008). The tryptophan pathway is involved in the defense responses of rice against pathogenic infection via serotonin production. *Plant J. Cell Mol. Biol.* *54*, 481–495.
- Ishimura, K., Takeuchi, Y., Fujiwara, K., Tominaga, M., Yoshioka, H., and Sawada, T. (1988). Quantitative analysis of the distribution of serotonin-immunoreactive cell bodies in the mouse brain. *Neurosci. Lett.* *91*, 265–270.
- Ishizuka, T., Kajita, K., Natsume, Y., Kawai, Y., Kanoh, Y., Miura, A., Ishizawa, M., Uno, Y., Morita, H., and Yasuda, K. (2004). Protein kinase C (PKC) beta modulates serine phosphorylation of insulin receptor substrate-1 (IRS-1)--effect of overexpression of PKCbeta on insulin signal transduction. *Endocr. Res.* *30*, 287–299.
- J. Katon, Wayne. (2011). Epidemiology and treatment of depression in patients with chronic medical illness. *Dialogues Clin. Neurosci.* *13*, 7–23.
- Jacobs, B.L., and Azmitia, E.C. (1992). Structure and function of the brain serotonin system. *Physiol. Rev.* *72*, 165–229.
- Janak, P.H., and Tye, K.M. (2015). From circuits to behaviour in the amygdala. *Nature* *517*, 284–292.
- Jangra, A., Dwivedi, S., Sriram, C.S., Gurjar, S.S., Kwatra, M., Sulakhiya, K., Baruah, C.C., and Lahkar, M. (2016). Honokiol abrogates chronic restraint stress-induced cognitive impairment and depressive-like behaviour by blocking endoplasmic reticulum stress in the hippocampus of mice. *Eur. J. Pharmacol.* *770*, 25–32.
- Jauch-Chara, K., Friedrich, A., Rezmer, M., Melchert, U.H., G Scholand-Engler, H., Hallschmid, M., and Oltmanns, K.M. (2012). Intranasal insulin suppresses food intake via enhancement of brain energy levels in humans. *Diabetes* *61*, 2261–2268.
- Jennings, K.A., Loder, M.K., Sheward, W.J., Pei, Q., Deacon, R.M.J., Benson, M.A., Olverman, H.J., Hastie, N.D., Harmar, A.J., Shen, S., et al. (2006). Increased expression of the 5-HT transporter confers a low-anxiety phenotype linked to decreased 5-HT transmission. *J. Neurosci. Off. J. Soc. Neurosci.* *26*, 8955–8964.
- Jin Chan, S., and Steiner, D.F. (2000). Insulin Through the Ages: Phylogeny of a Growth Promoting and Metabolic Regulatory Hormone I. *Am. Zool.* *40*, 213–222.
- Johnson, M.D. (1994). Synaptic glutamate release by postnatal rat serotonergic neurons in microculture. *Neuron* *12*, 433–442.
- Johnson, D.A., Gartside, S.E., and Ingram, C.D. (2002). 5-HT_{1A} receptor-mediated autoinhibition does not function at physiological firing rates: evidence from in vitro electrophysiological studies in the rat dorsal raphe nucleus. *Neuropharmacology* *43*, 959–965.
- Johnson, P.L., Molosh, A., Fitz, S.D., Arendt, D., Deehan, G.A., Federici, L.M., Bernabe, C., Engleman, E.A., Rodd, Z.A., Lowry, C.A., et al. (2015). Pharmacological depletion of serotonin in the basolateral amygdala complex reduces anxiety and disrupts fear conditioning. *Pharmacol. Biochem. Behav.* *138*, 174–179.
- Jones, K.A., Srivastava, D.P., Allen, J.A., Strachan, R.T., Roth, B.L., and Penzes, P. (2009). Rapid modulation of spine morphology by the 5-HT_{2A} serotonin receptor through kalirin-7 signaling. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *106*, 19575–19580.
- de Jonghe, F., Kool, S., van Aalst, G., Dekker, J., and Peen, J. (2001). Combining psychotherapy and antidepressants in the treatment of depression. *J. Affect. Disord.* *64*, 217–229.
- Joost, H.G. (1995). Structural and functional heterogeneity of insulin receptors. *Cell. Signal.* *7*, 85–91.
- Jørgensen, T.N., Christensen, P.M., and Gether, U. (2014). Serotonin-induced down-regulation of cell surface serotonin transporter. *Neurochem. Int.* *73*, 107–112.
- Jung, S., Lee, Y., Kim, G., Son, H., Lee, D.H., Roh, G.S., Kang, S.S., Cho, G.J., Choi, W.S., and Kim, H.J. (2012). Decreased expression of extracellular matrix proteins and trophic factors in the amygdala complex of depressed mice after chronic immobilization stress. *BMC Neurosci.* *13*, 58.
- Juszkiewicz, M. (1985). The effect of insulin on the central serotonergic system of the rat. *Pol. J. Pharmacol. Pharm.* *37*, 591–600.

- Kahn, B.B., and Flier, J.S. (2000). Obesity and insulin resistance. *J. Clin. Invest.* 106, 473–481.
- Kahn, C.R., Vicent, D., and Doria, A. (1996). Genetics of non-insulin-dependent (type-II) diabetes mellitus. *Annu. Rev. Med.* 47, 509–531.
- Kan, C., Silva, N., Golden, S.H., Rajala, U., Timonen, M., Stahl, D., and Ismail, K. (2013). A systematic review and meta-analysis of the association between depression and insulin resistance. *Diabetes Care* 36, 480–489.
- Kaneko, T., Akiyama, H., Nagatsu, I., and Mizuno, N. (1990). Immunohistochemical demonstration of glutaminase in catecholaminergic and serotonergic neurons of rat brain. *Brain Res.* 507, 151–154.
- Kasuga, A., Maruyama, T., Nakamoto, S., Ozawa, Y., Suzuki, Y., and Saruta, T. (1999). High-titer autoantibodies against glutamic acid decarboxylase plus autoantibodies against insulin and IA-2 predicts insulin requirement in adult diabetic patients. *J. Autoimmun.* 12, 131–135.
- Kasuga, M., Zick, Y., Blithe, D.L., Crettaz, M., and Kahn, C.R. (1982). Insulin stimulates tyrosine phosphorylation of the insulin receptor in a cell-free system. *Nature* 298, 667–669.
- Kautzky, A., James, G.M., Philippe, C., Baldinger-Melich, P., Kraus, C., Kranz, G.S., Vanicek, T., Gryglewski, G., Wadsak, W., Mitterhauser, M., et al. (2017). The influence of the rs6295 gene polymorphism on serotonin-1A receptor distribution investigated with PET in patients with major depression applying machine learning. *Transl. Psychiatry* 7, e1150.
- Keeney, A., Jessop, D.S., Harbuz, M.S., Marsden, C.A., Hogg, S., and Blackburn-Munro, R.E. (2006). Differential effects of acute and chronic social defeat stress on hypothalamic-pituitary-adrenal axis function and hippocampal serotonin release in mice. *J. Neuroendocrinol.* 18, 330–338.
- Keller, M.B., Gelenberg, A.J., Hirschfeld, R.M., Rush, A.J., Thase, M.E., Kocsis, J.H., Markowitz, J.C., Fawcett, J.A., Koran, L.M., Klein, D.N., et al. (1998). The treatment of chronic depression, part 2: a double-blind, randomized trial of sertraline and imipramine. *J. Clin. Psychiatry* 59, 598–607.
- Keller, M.B., McCullough, J.P., Klein, D.N., Arnow, B., Dunner, D.L., Gelenberg, A.J., Markowitz, J.C., Nemeroff, C.B., Russell, J.M., Thase, M.E., et al. (2000). A Comparison of Nefazodone, the Cognitive Behavioral-Analysis System of Psychotherapy, and Their Combination for the Treatment of Chronic Depression. *N. Engl. J. Med.* 342, 1462–1470.
- Kenyon, C., Chang, J., Gensch, E., Rudner, A., and Tabtiang, R. (1993). A *C. elegans* mutant that lives twice as long as wild type. *Nature* 366, 461–464.
- Kessler, R.C., and Bromet, E.J. (2013). The epidemiology of depression across cultures. *Annu. Rev. Public Health* 34, 119–138.
- Kessler, R.C., Berglund, P., Demler, O., Jin, R., Koretz, D., Merikangas, K.R., Rush, A.J., Walters, E.E., Wang, P.S., and National Comorbidity Survey Replication (2003). The epidemiology of major depressive disorder: results from the National Comorbidity Survey Replication (NCS-R). *JAMA* 289, 3095–3105.
- Kim, K.-S., and Han, P.-L. (2006). Optimization of chronic stress paradigms using anxiety- and depression-like behavioral parameters. *J. Neurosci. Res.* 83, 497–507.
- Kim, B., Cheng, H.-L., Margolis, B., and Feldman, E.L. (1998). Insulin Receptor Substrate 2 And Shc Play Different Roles In Insulin-like Growth Factor I Signaling *. *J. Biol. Chem.* 273, 34543–34550.
- Kim, B., Sullivan, K.A., Backus, C., and Feldman, E.L. (2011). Cortical neurons develop insulin resistance and blunted Akt signaling: a potential mechanism contributing to enhanced ischemic injury in diabetes. *Antioxid. Redox Signal.* 14, 1829–1839.
- Kim, B.-H., Kelschenbach, J., Borjabad, A., Hadas, E., He, H., Potash, M.J., Nedelcovych, M.T., Rais, R., Haughey, N.J., McArthur, J.C., et al. (2019). Intranasal insulin therapy reverses hippocampal dendritic injury and cognitive impairment in a model of HIV-associated neurocognitive disorders in EcoHIV-infected mice. *AIDS Lond. Engl.* 33, 973–984.
- King, A.J. (2012). The use of animal models in diabetes research. *Br. J. Pharmacol.* 166, 877–894.
- King, G.L., and Johnson, S.M. (1985). Receptor-mediated transport of insulin across endothelial cells. *Science* 227, 1583–1586.

- Kirby, L.G., Pernar, L., Valentino, R.J., and Beck, S.G. (2003). Distinguishing characteristics of serotonin and non-serotonin-containing cells in the dorsal raphe nucleus: electrophysiological and immunohistochemical studies. *Neuroscience* *116*, 669–683.
- Kisoh, K., Hayashi, H., Itoh, T., Asada, M., Arai, M., Yuan, B., Tanonaka, K., and Takagi, N. (2017). Involvement of GSK-3 β Phosphorylation Through PI3-K/Akt in Cerebral Ischemia-Induced Neurogenesis in Rats. *Mol. Neurobiol.* *54*, 7917–7927.
- Kiyasova, V., Fernandez, S.P., Laine, J., Stankovski, L., Muzerelle, A., Doly, S., and Gaspar, P. (2011). A genetically defined morphologically and functionally unique subset of 5-HT neurons in the mouse raphe nuclei. *J. Neurosci. Off. J. Soc. Neurosci.* *31*, 2756–2768.
- Klaman, L.D., Boss, O., Peroni, O.D., Kim, J.K., Martino, J.L., Zabolotny, J.M., Moghal, N., Lubkin, M., Kim, Y.B., Sharpe, A.H., et al. (2000). Increased energy expenditure, decreased adiposity, and tissue-specific insulin sensitivity in protein-tyrosine phosphatase 1B-deficient mice. *Mol. Cell. Biol.* *20*, 5479–5489.
- Kleinridders, A., Ferris, H.A., Cai, W., and Kahn, C.R. (2014). Insulin Action in Brain Regulates Systemic Metabolism and Brain Function. *Diabetes* *63*, 2232–2243.
- Kleinridders, A., Cai, W., Cappellucci, L., Ghazarian, A., Collins, W.R., Vienberg, S.G., Pothos, E.N., and Kahn, C.R. (2015). Insulin resistance in brain alters dopamine turnover and causes behavioral disorders. *Proc. Natl. Acad. Sci.* *112*, 3463–3468.
- Klöppel, G., Löhr, M., Habich, K., Oberholzer, M., and Heitz, P.U. (1985). Islet pathology and the pathogenesis of type 1 and type 2 diabetes mellitus revisited. *Surv. Synth. Pathol. Res.* *4*, 110–125.
- Knudsen, L., De Meyts, P., and Kiselyov, V.V. (2011). Insight into the molecular basis for the kinetic differences between the two insulin receptor isoforms. *Biochem. J.* *440*, 397–403.
- Kobayashi, T., Washiyama, K., and Ikeda, K. (2004). Inhibition of G protein-activated inwardly rectifying K⁺ channels by various antidepressant drugs. *Neuropsychopharmacol. Off. Publ. Am. Coll. Neuropsychopharmacol.* *29*, 1841–1851.
- Koepsell, H., and Vallon, V. (2020). A special issue on glucose transporters in health and disease. *Pflüg. Arch. - Eur. J. Physiol.* *472*, 1107–1109.
- Koh, E.H., Lee, W.J., Kim, M.-S., Park, J.-Y., Lee, I.K., and Lee, K.-U. (2005). Intracellular fatty acid metabolism in skeletal muscle and insulin resistance. *Curr. Diabetes Rev.* *1*, 331–336.
- Komsuoglu Celikyurt, I., Mutlu, O., Ulak, G., Uyar, E., Bektaş, E., Yildiz Akar, F., Erden, F., and Tarkun, I. (2014). Exenatide treatment exerts anxiolytic- and antidepressant-like effects and reverses neuropathy in a mouse model of type-2 diabetes. *Med. Sci. Monit. Basic Res.* *20*, 112–117.
- Könner, A.C., Janoschek, R., Plum, L., Jordan, S.D., Rother, E., Ma, X., Xu, C., Enriori, P., Hampel, B., Barsh, G.S., et al. (2007). Insulin action in AgRP-expressing neurons is required for suppression of hepatic glucose production. *Cell Metab.* *5*, 438–449.
- Konturek, P.C., Brzozowski, T., and Konturek, S.J. (2011). Stress and the gut: pathophysiology, clinical consequences, diagnostic approach and treatment options. *J. Physiol. Pharmacol. Off. J. Pol. Physiol. Soc.* *62*, 591–599.
- Koranyi, L., James, D.E., Kraegen, E.W., and Permutt, M.A. (1992). Feedback inhibition of insulin gene expression by insulin. *J. Clin. Invest.* *89*, 432–436.
- Koren, S., and Fantus, I.G. (2007). Inhibition of the protein tyrosine phosphatase PTP1B: potential therapy for obesity, insulin resistance and type-2 diabetes mellitus. *Best Pract. Res. Clin. Endocrinol. Metab.* *21*, 621–640.
- Kornhuber, J., Medlin, A., Bleich, S., Jendrossek, V., Henkel, A.W., Wiltfang, J., and Gulbins, E. (2005). High activity of acid sphingomyelinase in major depression. *J. Neural Transm. Vienna Austria 1996* *112*, 1583–1590.
- Kotani, K., Wilden, P., and Pillay, T.S. (1998). SH2-B α is an insulin-receptor adapter protein and substrate that interacts with the activation loop of the insulin-receptor kinase. *Biochem. J.* *335 (Pt 1)*, 103–109.
- Kothari, V., Luo, Y., Tornabene, T., O'Neill, A.M., Greene, M.W., Geetha, T., and Babu, J.R. (2017). High fat diet induces brain insulin resistance and cognitive impairment in mice. *Biochim. Biophys. Acta Mol. Basis Dis.* *1863*, 499–508.

Krasil'nikova, I., Surin, A., Sorokina, E., Fisenko, A., Boyarkin, D., Balyasin, M., Demchenko, A., Pomytkin, I., and Pinelis, V. (2019). Insulin Protects Cortical Neurons Against Glutamate Excitotoxicity. *Front. Neurosci.* *13*, 1027.

Krettek, J.E., and Price, J.L. (1978). Amygdaloid projections to subcortical structures within the basal forebrain and brainstem in the rat and cat. *J. Comp. Neurol.* *178*, 225–254.

Krishnan, V., and Nestler, E.J. (2011). Animal models of depression: molecular perspectives. *Curr. Top. Behav. Neurosci.* *7*, 121–147.

Krook, A., Björnholm, M., Galuska, D., Jiang, X.J., Fahlman, R., Myers, M.G., Wallberg-Henriksson, H., and Zierath, J.R. (2000). Characterization of signal transduction and glucose transport in skeletal muscle from type 2 diabetic patients. *Diabetes* *49*, 284–292.

Kulkarni, R.N., Brüning, J.C., Winnay, J.N., Postic, C., Magnuson, M.A., and Kahn, C.R. (1999). Tissue-specific knockout of the insulin receptor in pancreatic beta cells creates an insulin secretory defect similar to that in type 2 diabetes. *Cell* *96*, 329–339.

Kullmann, S., Frank, S., Heni, M., Ketterer, C., Veit, R., Häring, H.-U., Fritsche, A., and Preissl, H. (2013). Intranasal insulin modulates intrinsic reward and prefrontal circuitry of the human brain in lean women. *Neuroendocrinology* *97*, 176–182.

Kullmann, S., Heni, M., Veit, R., Scheffler, K., Machann, J., Häring, H.-U., Fritsche, A., and Preissl, H. (2015). Selective insulin resistance in homeostatic and cognitive control brain areas in overweight and obese adults. *Diabetes Care* *38*, 1044–1050.

Kurlawalla-Martinez, C., Stiles, B., Wang, Y., Devaskar, S.U., Kahn, B.B., and Wu, H. (2005). Insulin Hypersensitivity and Resistance to Streptozotocin-Induced Diabetes in Mice Lacking PTEN in Adipose Tissue. *Mol. Cell. Biol.* *25*, 2498–2510.

Kuwabara, T., Kagalwala, M.N., Onuma, Y., Ito, Y., Warashina, M., Terashima, K., Sanosaka, T., Nakashima, K., Gage, F.H., and Asashima, M. (2011). Insulin biosynthesis in neuronal progenitors derived from adult hippocampus and the olfactory bulb. *EMBO Mol. Med.* *3*, 742–754.

Labouèbe, G., Liu, S., Dias, C., Zou, H., Wong, J.C.Y., Karunakaran, S., Clee, S.M., Phillips, A., Boutrel, B., and Borgland, S.L. (2013). Insulin induces long-term depression of VTA dopamine neurons via an endocannabinoid-mediated mechanism. *Nat. Neurosci.* *16*, 300–308.

Lacroix, M.-C., Badonnel, K., Meunier, N., Tan, F., Schlegel-Le Poupon, C., Durieux, D., Monnerie, R., Baly, C., Congar, P., Salesse, R., et al. (2008). Expression of insulin system in the olfactory epithelium: first approaches to its role and regulation. *J. Neuroendocrinol.* *20*, 1176–1190.

Lambert, G., Johansson, M., Agren, H., and Friberg, P. (2000). Reduced brain norepinephrine and dopamine release in treatment-refractory depressive illness: evidence in support of the catecholamine hypothesis of mood disorders. *Arch. Gen. Psychiatry* *57*, 787–793.

Lamers, F., van Oppen, P., Comijs, H.C., Smit, J.H., Spinhoven, P., van Balkom, A.J.L.M., Nolen, W.A., Zitman, F.G., Beekman, A.T.F., and Penninx, B.W.J.H. (2011). Comorbidity patterns of anxiety and depressive disorders in a large cohort study: the Netherlands Study of Depression and Anxiety (NESDA). *J. Clin. Psychiatry* *72*, 341–348.

Lau, T., Schneidt, T., Heimann, F., Gundelfinger, E.D., and Schloss, P. (2010). Somatodendritic serotonin release and re-uptake in mouse embryonic stem cell-derived serotonergic neurons. *Neurochem. Int.* *57*, 969–978.

Leahy, J.L., Cooper, H.E., Deal, D.A., and Weir, G.C. (1986). Chronic hyperglycemia is associated with impaired glucose influence on insulin secretion. A study in normal rats using chronic in vivo glucose infusions. *J. Clin. Invest.* *77*, 908–915.

Lee, C.-C., Huang, C.-C., Wu, M.-Y., and Hsu, K.-S. (2005). Insulin stimulates postsynaptic density-95 protein translation via the phosphoinositide 3-kinase-Akt-mammalian target of rapamycin signaling pathway. *J. Biol. Chem.* *280*, 18543–18550.

Lee, J.-H., Park, S.K., Ryoo, J.-H., Oh, C.-M., Mansur, R.B., Alfonsi, J.E., Cha, D.S., Lee, Y., McIntyre, R.S., and Jung, J.Y. (2017). The association between insulin resistance and depression in the Korean general population. *J. Affect. Disord.* *208*, 553–559.

Lee, S.-H., Zabolotny, J.M., Huang, H., Lee, H., and Kim, Y.-B. (2016). Insulin in the nervous system and the mind: Functions in metabolism, memory, and mood. *Mol. Metab.* *5*, 589–601.

- Lehto, S.M., Huotari, A., Niskanen, L., Tolmunen, T., Koivumaa-Honkanen, H., Honkalampi, K., Ruotsalainen, H., Herzig, K.-H., Viinamäki, H., and Hintikka, J. (2010). Serum adiponectin and resistin levels in major depressive disorder. *Acta Psychiatr. Scand.* *121*, 209–215.
- Leibiger, B., Wahlander, K., Berggren, P.O., and Leibiger, I.B. (2000). Glucose-stimulated insulin biosynthesis depends on insulin-stimulated insulin gene transcription. *J. Biol. Chem.* *275*, 30153–30156.
- Lemondé, S., Turecki, G., Bakish, D., Du, L., Hrdina, P.D., Bown, C.D., Sequeira, A., Kushwaha, N., Morris, S.J., Basak, A., et al. (2003). Impaired repression at a 5-hydroxytryptamine 1A receptor gene polymorphism associated with major depression and suicide. *J. Neurosci. Off. J. Soc. Neurosci.* *23*, 8788–8799.
- Leo, R., Di Lorenzo, G., Tesouro, M., Cola, C., Fortuna, E., Zanasi, M., Troisi, A., Siracusano, A., Lauro, R., and Romeo, F. (2006). Decreased plasma adiponectin concentration in major depression. *Neurosci. Lett.* *407*, 211–213.
- Lesch, K.P., and Manji, H.K. (1992). Signal-transducing G proteins and antidepressant drugs: evidence for modulation of alpha subunit gene expression in rat brain. *Biol. Psychiatry* *32*, 549–579.
- Lesch, K.-P., and Waider, J. (2012). Serotonin in the modulation of neural plasticity and networks: implications for neurodevelopmental disorders. *Neuron* *76*, 175–191.
- Lesch, K.P., Hough, C.J., Aulakh, C.S., Wolozin, B.L., Tolliver, T.J., Hill, J.L., Akiyoshi, J., Chuang, D.M., and Murphy, D.L. (1992). Fluoxetine modulates G protein alpha s, alpha q, and alpha 12 subunit mRNA expression in rat brain. *Eur. J. Pharmacol.* *227*, 233–237.
- Leto, D., and Saltiel, A.R. (2012). Regulation of glucose transport by insulin: traffic control of GLUT4. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* *13*, 383–396.
- Levy, R. (2012). Apathy: a pathology of goal-directed behaviour: a new concept of the clinic and pathophysiology of apathy. *Rev. Neurol. (Paris)* *168*, 585–597.
- Lewinsohn, P.M., Clarke, G.N., Seeley, J.R., and Rohde, P. (1994). Major Depression in Community Adolescents: Age at Onset, Episode Duration, and Time to Recurrence. *J. Am. Acad. Child Adolesc. Psychiatry* *33*, 809–818.
- Lexchin, J.L., Cude-Simpson, K.D., and Stancer, H.C. (1977). Brain and blood indole metabolites after peripheral administration of (14)C-5-HT in rat. *Neurochem. Res.* *2*, 39–50.
- Ley, S.H., Hamdy, O., Mohan, V., and Hu, F.B. (2014). Prevention and Management of Type 2 Diabetes: Dietary Components and Nutritional Strategies. *Lancet Lond. Engl.* *383*, 1999–2007.
- Li, J.J., Hilton, E.C., Lu, Q., Hong, J., Greenberg, J.S., and Mailick, M.R. (2019). Validating psychosocial pathways of risk between neuroticism and late life depression using a polygenic score approach. *J. Abnorm. Psychol.* *128*, 200–211.
- Li, R.-Z., Ding, X.-W., Geetha, T., Al-Nakkash, L., Broderick, T.L., and Babu, J.R. (2020). Beneficial Effect of Genistein on Diabetes-Induced Brain Damage in the ob/ob Mouse Model. *Drug Des. Devel. Ther.* *14*, 3325–3336.
- Li, S., Zhai, X., Rong, P., McCabe, M.F., Wang, X., Zhao, J., Ben, H., and Wang, S. (2014). Therapeutic Effect of Vagus Nerve Stimulation on Depressive-Like Behavior, Hyperglycemia and Insulin Receptor Expression in Zucker Fatty Rats. *PLoS ONE* *9*, e112066.
- Li, Y., Luikart, B.W., Birnbaum, S., Chen, J., Kwon, C.-H., Kernie, S.G., Bassel-Duby, R., and Parada, L.F. (2008). TrkB regulates hippocampal neurogenesis and governs sensitivity to antidepressant treatment. *Neuron* *59*, 399–412.
- Liao, L., Zhang, X.D., Li, J., Zhang, Z.W., Yang, C.C., Rao, C.L., Zhou, C.J., Zeng, L., Zhao, L.B., Fang, L., et al. (2017). Pioglitazone attenuates lipopolysaccharide-induced depression-like behaviors, modulates NF- κ B/IL-6/STAT3, CREB/BDNF pathways and central serotonergic neurotransmission in mice. *Int. Immunopharmacol.* *49*, 178–186.
- Liberzon, I., and Sripada, C.S. (2008). The functional neuroanatomy of PTSD: a critical review. *Prog. Brain Res.* *167*, 151–169.
- Lihn, A.S., Pedersen, S.B., and Richelsen, B. (2005). Adiponectin: action, regulation and association to insulin sensitivity. *Obes. Rev. Off. J. Int. Assoc. Study Obes.* *6*, 13–21.

- Lin, K.W., Wroolie, T.E., Robakis, T., and Rasgon, N.L. (2015). Adjuvant pioglitazone for unremitted depression: Clinical correlates of treatment response. *Psychiatry Res.* *230*, 846–852.
- Lin, R., Liang, J., Wang, R., Yan, T., Zhou, Y., Liu, Y., Feng, Q., Sun, F., Li, Y., Li, A., et al. (2020). The Raphe Dopamine System Controls the Expression of Incentive Memory. *Neuron* *106*, 498-514.e8.
- Lindvall, O., and Björklund, A. (1974). The organization of the ascending catecholamine neuron systems in the rat brain as revealed by the glyoxylic acid fluorescence method. *Acta Physiol. Scand. Suppl.* *412*, 1–48.
- Lira, A., Zhou, M., Castanon, N., Ansorge, M.S., Gordon, J.A., Francis, J.H., Bradley-Moore, M., Lira, J., Underwood, M.D., Arango, V., et al. (2003). Altered depression-related behaviors and functional changes in the dorsal raphe nucleus of serotonin transporter-deficient mice. *Biol. Psychiatry* *54*, 960–971.
- Little, A. (2009). Treatment-resistant depression. *Am. Fam. Physician* *80*, 167–172.
- Liu, R.-J., and Aghajanian, G.K. (2008). Stress blunts serotonin- and hypocretin-evoked EPSCs in prefrontal cortex: role of corticosterone-mediated apical dendritic atrophy. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *105*, 359–364.
- Liu, Y.F., and Albert, P.R. (1991). Cell-specific signaling of the 5-HT_{1A} receptor. Modulation by protein kinases C and A. *J. Biol. Chem.* *266*, 23689–23697.
- Liu, C., Maejima, T., Wyler, S.C., Casadesus, G., Herlitze, S., and Deneris, E.S. (2010). Pet-1 is required across different stages of life to regulate serotonergic function. *Nat. Neurosci.* *13*, 1190–1198.
- Liu, J., Guo, M., Zhang, D., Cheng, S.-Y., Liu, M., Ding, J., Scherer, P.E., Liu, F., and Lu, X.-Y. (2012). Adiponectin is critical in determining susceptibility to depressive behaviors and has antidepressant-like activity. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *109*, 12248–12253.
- Liu, L., Zhang, Y., Chen, N., Shi, X., Tsang, B., and Yu, Y.-H. (2007). Upregulation of myocellular DGAT1 augments triglyceride synthesis in skeletal muscle and protects against fat-induced insulin resistance. *J. Clin. Invest.* *117*, 1679–1689.
- Liu, R.-J., Lambe, E.K., and Aghajanian, G.K. (2005). Somatodendritic autoreceptor regulation of serotonergic neurons: dependence on L-tryptophan and tryptophan hydroxylase-activating kinases. *Eur. J. Neurosci.* *21*, 945–958.
- Liu, Z., Zhou, J., Li, Y., Hu, F., Lu, Y., Ma, M., Feng, Q., Zhang, J.-E., Wang, D., Zeng, J., et al. (2014). Dorsal raphe neurons signal reward through 5-HT and glutamate. *Neuron* *81*, 1360–1374.
- Liu, Z., Patil, I.Y., Jiang, T., Sancheti, H., Walsh, J.P., Stiles, B.L., Yin, F., and Cadenas, E. (2015). High-fat diet induces hepatic insulin resistance and impairment of synaptic plasticity. *PLoS One* *10*, e0128274.
- Llamosas, N., Bruzos-Cidón, C., Rodríguez, J.J., Ugedo, L., and Torrecilla, M. (2015). Deletion of GIRK2 Subunit of GIRK Channels Alters the 5-HT_{1A} Receptor-Mediated Signaling and Results in a Depression-Resistant Behavior. *Int. J. Neuropsychopharmacol.* *18*, pyv051.
- Llamosas, N., Ugedo, L., and Torrecilla, M. (2017). Inactivation of GIRK channels weakens the pre- and postsynaptic inhibitory activity in dorsal raphe neurons. *Physiol. Rep.* *5*.
- Lo, F.-S., and Erzurumlu, R.S. (2018). Insulin receptor sensitization restores neocortical excitation/inhibition balance in a mouse model of autism. *Mol. Autism* *9*, 13.
- Lopez de Lara, C., Brezo, J., Rouleau, G., Lesage, A., Dumont, M., Alda, M., Benkelfat, C., and Turecki, G. (2007). Effect of tryptophan hydroxylase-2 gene variants on suicide risk in major depression. *Biol. Psychiatry* *62*, 72–80.
- Lu, X.-Y. (2007). The leptin hypothesis of depression: a potential link between mood disorders and obesity? *Curr. Opin. Pharmacol.* *7*, 648–652.
- Lu, Q., Mouri, A., Yang, Y., Kunisawa, K., Teshigawara, T., Hirakawa, M., Mori, Y., Yamamoto, Y., Libo, Z., Nabeshima, T., et al. (2019). Chronic unpredictable mild stress-induced behavioral changes are coupled with dopaminergic hyperfunction and serotonergic hypofunction in mouse models of depression. *Behav. Brain Res.* *372*, 112053.
- Luddington, N.S., Mandadapu, A., Husk, M., and El-Mallakh, R.S. (2009). Clinical Implications of Genetic Variation in the Serotonin Transporter Promoter Region: A Review. *Prim. Care Companion J. Clin. Psychiatry* *11*, 93–102.
- Lv, J., and Liu, F. (2017). The Role of Serotonin beyond the Central Nervous System during Embryogenesis. *Front. Cell. Neurosci.* *11*.

Lv, H., Tang, L., Guo, C., Jiang, Y., Gao, C., Wang, Y., and Jian, C. (2020). Intranasal insulin administration may be highly effective in improving cognitive function in mice with cognitive dysfunction by reversing brain insulin resistance. *Cogn. Neurodyn.* *14*, 323–338.

M. Hennings, J., Schaaf, L., and Fulda, S. (2012). Glucose Metabolism and Antidepressant Medication. *Curr. Pharm. Des.* *18*, 5900–5919.

Ma, X.-H., Zhong, P., Gu, Z., Feng, J., and Yan, Z. (2003). Muscarinic Potentiation of GABA_A Receptor Currents Is Gated by Insulin Signaling in the Prefrontal Cortex. *J. Neurosci.* *23*, 1159–1168.

Machado-Vieira, R., Baumann, J., Wheeler-Castillo, C., Latov, D., Henter, I.D., Salvatore, G., and Zarate, C.A. (2010). The Timing of Antidepressant Effects: A Comparison of Diverse Pharmacological and Somatic Treatments. *Pharmaceuticals* *3*, 19–41.

MacKenzie, R.G., and Trulsson, M.E. (1978). Effects of insulin and streptozotocin-induced diabetes on brain tryptophan and serotonin metabolism in rats. *J. Neurochem.* *30*, 205–211.

Maddaloni, G., Migliarini, S., Napolitano, F., Giorgi, A., Nazzi, S., Biasci, D., De Felice, A., Gritti, M., Cavaccini, A., Galbusera, A., et al. (2018). Serotonin depletion causes valproate-responsive manic-like condition and increased hippocampal neuroplasticity that are reversed by stress. *Sci. Rep.* *8*, 11847.

Madsbad, S. (2014). The role of glucagon-like peptide-1 impairment in obesity and potential therapeutic implications. *Diabetes Obes. Metab.* *16*, 9–21.

Madsen, K., Torstensen, E., Holst, K.K., Haahr, M.E., Knorr, U., Frokjaer, V.G., Brandt-Larsen, M., Iversen, P., Fisher, P.M., and Knudsen, G.M. (2014). Familial risk for major depression is associated with lower striatal 5-HT₄ receptor binding. *Int. J. Neuropsychopharmacol.* *18*.

Magnan, C., and Ktorza, A. (2005). Production et sécrétion de l'insuline par la cellule β pancréatique. *EMC - Endocrinol.* *2*, 241–264.

Mago, R., Tripathi, N., and Andrade, C. (2014). Cardiovascular adverse effects of newer antidepressants. *Expert Rev. Neurother.* *14*, 539–551.

Maheux, P., Ducros, F., Bourque, J., Garon, J., and Chiasson, J.L. (1997). Fluoxetine improves insulin sensitivity in obese patients with non-insulin-dependent diabetes mellitus independently of weight loss. *Int. J. Obes. Relat. Metab. Disord. J. Int. Assoc. Study Obes.* *21*, 97–102.

Maimaiti, S., Anderson, K.L., DeMoll, C., Brewer, L.D., Rauh, B.A., Gant, J.C., Blalock, E.M., Porter, N.M., and Thibault, O. (2016). Intranasal Insulin Improves Age-Related Cognitive Deficits and Reverses Electrophysiological Correlates of Brain Aging. *J. Gerontol. A. Biol. Sci. Med. Sci.* *71*, 30–39.

Malakar, P., Chartarifsky, L., Hija, A., Leibowitz, G., Glaser, B., Dor, Y., and Karni, R. (2016). Insulin receptor alternative splicing is regulated by insulin signaling and modulates beta cell survival. *Sci. Rep.* *6*, 31222.

Malberg, J.E., and Duman, R.S. (2003). Cell proliferation in adult hippocampus is decreased by inescapable stress: reversal by fluoxetine treatment. *Neuropsychopharmacol. Off. Publ. Am. Coll. Neuropsychopharmacol.* *28*, 1562–1571.

Malberg, J.E., Eisch, A.J., Nestler, E.J., and Duman, R.S. (2000). Chronic antidepressant treatment increases neurogenesis in adult rat hippocampus. *J. Neurosci. Off. J. Soc. Neurosci.* *20*, 9104–9110.

Man, H.Y., Lin, J.W., Ju, W.H., Ahmadian, G., Liu, L., Becker, L.E., Sheng, M., and Wang, Y.T. (2000). Regulation of AMPA receptor-mediated synaptic transmission by clathrin-dependent receptor internalization. *Neuron* *25*, 649–662.

Manderbacka, K., Jokela, M., Sund, R., and Elovainio, M. (2014). Treatment of depression in diagnosed diabetes: common cause or detection bias? *Psychol. Med.* *44*, 1205–1212.

Mann, J.J. (1999). Role of the serotonergic system in the pathogenesis of major depression and suicidal behavior. *Neuropsychopharmacol. Off. Publ. Am. Coll. Neuropsychopharmacol.* *21*, 99S-105S.

el Mansari, M., and Blier, P. (1996). Functional characterization of 5-HT_{1D} autoreceptors on the modulation of 5-HT release in guinea-pig mesencephalic raphe, hippocampus and frontal cortex. *Br. J. Pharmacol.* *118*, 681–689.

Mansur, R.B., Ahmed, J., Cha, D.S., Woldeyohannes, H.O., Subramaniapillai, M., Lovshin, J., Lee, J.G., Lee, J.-H., Brietzke, E., Reininghaus, E.Z., et al. (2017). Liraglutide promotes improvements in objective measures

of cognitive dysfunction in individuals with mood disorders: A pilot, open-label study. *J. Affect. Disord.* 207, 114–120.

Marcinkiewicz, C.A., Mazzone, C.M., D’Agostino, G., Halladay, L.R., Hardaway, J.A., DiBerto, J.F., Navarro, M., Burnham, N., Cristiano, C., Dorrier, C.E., et al. (2016). Serotonin engages an anxiety and fear-promoting circuit in the extended amygdala. *Nature* 537, 97–101.

Margolis, R.U., and Altszuler, N. (1967). Insulin in the cerebrospinal fluid. *Nature* 215, 1375–1376.

Marks, D.R., Tucker, K., Cavallin, M.A., Mast, T.G., and Fadool, D.A. (2009). Awake Intranasal Insulin Delivery Modifies Protein Complexes and Alters Memory, Anxiety, and Olfactory Behaviors. *J. Neurosci.* 29, 6734–6751.

Martin, B.C., Warram, J.H., Krolewski, A.S., Bergman, R.N., Soeldner, J.S., and Kahn, C.R. (1992). Role of glucose and insulin resistance in development of type 2 diabetes mellitus: results of a 25-year follow-up study. *Lancet Lond. Engl.* 340, 925–929.

Martin, G.M., Chen, P.-C., Devaraneni, P., and Shyng, S.-L. (2013). Pharmacological rescue of trafficking-impaired ATP-sensitive potassium channels. *Front. Physiol.* 4, 386.

Martin, H., Bullich, S., Guiard, B.P., and Fioramonti, X. (2021). The impact of insulin on the serotonergic system and consequences on diabetes-associated mood disorders. *J. Neuroendocrinol.* 33, e12928.

Martín-Cora, F.J., Fornal, C.A., Metzler, C.W., and Jacobs, B.L. (2002). Insulin-induced hypoglycemia decreases single-unit activity of serotonergic medullary raphe neurons in freely moving cats: relationship to sympathetic and motor output: Medullary 5-HT neuronal responses to glucoregulatory challenges. *Eur. J. Neurosci.* 16, 722–734.

Martínez-Gómez, L.E., Cruz, M., Martínez-Nava, G.A., Madrid-Marina, V., Parra, E., García-Mena, J., Espinoza-Rojo, M., Estrada-Velasco, B.I., Piza-Roman, L.F., Aguilera, P., et al. (2011). A replication study of the IRS1, CAPN10, TCF7L2, and PPARG gene polymorphisms associated with type 2 diabetes in two different populations of Mexico. *Ann. Hum. Genet.* 75, 612–620.

Martinez-Rachadell, L., Aguilera, A., Perez-Domper, P., Pignatelli, J., Fernandez, A.M., and Torres-Aleman, I. (2019). Cell-specific expression of insulin/insulin-like growth factor-I receptor hybrids in the mouse brain. *Growth Horm. IGF Res. Off. J. Growth Horm. Res. Soc. Int. IGF Res. Soc.* 45, 25–30.

Massague, J., Pilch, P.F., and Czech, M.P. (1980). Electrophoretic resolution of three major insulin receptor structures with unique subunit stoichiometries. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 77, 7137–7141.

Mathias, A.P., Ross, D.M., and Schachter, M. (1957). Identification and distribution of 5-hydroxytryptamine in a sea anemone. *Nature* 180, 658–659.

Matschinsky, F.M. (1990). Glucokinase as glucose sensor and metabolic signal generator in pancreatic beta-cells and hepatocytes. *Diabetes* 39, 647–652.

Matulewicz, N., and Karczewska-Kupczewska, M. (2016). Insulin resistance and chronic inflammation. *Postepy Hig. Med. Doswiadczalnej Online* 70, 1245–1258.

Mazucanti, C.H., Liu, Q.-R., Lang, D., Huang, N., O’Connell, J.F., Camandola, S., and Egan, J.M. (2019). Release of insulin produced by the choroid plexis is regulated by serotonergic signaling. *JCI Insight* 4.

McIntyre, R.S., Soczynska, J.K., Lewis, G.F., MacQueen, G.M., Konarski, J.Z., and Kennedy, S.H. (2006). Managing psychiatric disorders with antidiabetic agents: translational research and treatment opportunities. *Expert Opin. Pharmacother.* 7, 1305–1321.

McIntyre, R.S., Xiao, H.X., Syeda, K., Vinberg, M., Carvalho, A.F., Mansur, R.B., Maruschak, N., and Cha, D.S. (2015). The prevalence, measurement, and treatment of the cognitive dimension/domain in major depressive disorder. *CNS Drugs* 29, 577–589.

Mebel, D.M., Wong, J.C.Y., Dong, Y.J., and Borgland, S.L. (2012). Insulin in the ventral tegmental area reduces hedonic feeding and suppresses dopamine concentration via increased reuptake. *Eur. J. Neurosci.* 36, 2336–2346.

Meek, J.L., and Neff, N.H. (1972). Tryptophan 5-hydroxylase: approximation of half-life and rate of axonal transport. *J. Neurochem.* 19, 1519–1525.

- Mehran, A.E., Templeman, N.M., Brigidi, G.S., Lim, G.E., Chu, K.-Y., Hu, X., Botezelli, J.D., Asadi, A., Hoffman, B.G., Kieffer, T.J., et al. (2012). Hyperinsulinemia drives diet-induced obesity independently of brain insulin production. *Cell Metab.* *16*, 723–737.
- Meijer, R.I., Gray, S.M., Aylor, K.W., and Barrett, E.J. (2016). Pathways for insulin access to the brain: the role of the microvascular endothelial cell. *Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol.* *311*, H1132–H1138.
- Mendels, J., Frazer, A., Fitzgerald, R.G., Ramsey, T.A., and Stokes, J.W. (1972). Biogenic amine metabolites in cerebrospinal fluid of depressed and manic patients. *Science* *175*, 1380–1382.
- Menting, J.G., Whittaker, J., Margetts, M.B., Whittaker, L.J., Kong, G.K.-W., Smith, B.J., Watson, C.J., Záková, L., Kletvíková, E., Jiráček, J., et al. (2013). How insulin engages its primary binding site on the insulin receptor. *Nature* *493*, 241–245.
- Mett, A., Karbat, I., Tsoory, M., Fine, S., Iwanir, S., and Reuveny, E. (2021). Reduced activity of GIRK1-containing heterotetramers is sufficient to affect neuronal functions, including synaptic plasticity and spatial learning and memory. *J. Physiol.* *599*, 521–545.
- Meyer, J.H., Ginovart, N., Boovariwala, A., Sagrati, S., Hussey, D., Garcia, A., Young, T., Praschak-Rieder, N., Wilson, A.A., and Houle, S. (2006). Elevated monoamine oxidase A levels in the brain: an explanation for the monoamine imbalance of major depression. *Arch. Gen. Psychiatry* *63*, 1209–1216.
- Meyer, J.H., Wilson, A.A., Sagrati, S., Miler, L., Rusjan, P., Bloomfield, P.M., Clark, M., Sacher, J., Voineskos, A.N., and Houle, S. (2009). Brain monoamine oxidase A binding in major depressive disorder: relationship to selective serotonin reuptake inhibitor treatment, recovery, and recurrence. *Arch. Gen. Psychiatry* *66*, 1304–1312.
- Michelsen, K.A., Schmitz, C., and Steinbusch, H.W.M. (2007). The dorsal raphe nucleus—From silver stainings to a role in depression. *Brain Res. Rev.* *55*, 329–342.
- Miele, C., Riboulet, A., Maitan, M.A., Oriente, F., Romano, C., Formisano, P., Giudicelli, J., Beguinot, F., and Van Obberghen, E. (2003). Human glycated albumin affects glucose metabolism in L6 skeletal muscle cells by impairing insulin-induced insulin receptor substrate (IRS) signaling through a protein kinase C alpha-mediated mechanism. *J. Biol. Chem.* *278*, 47376–47387.
- Mielke, J.G., and Wang, Y.T. (2005). Insulin exerts neuroprotection by counteracting the decrease in cell-surface GABA receptors following oxygen-glucose deprivation in cultured cortical neurons. *J. Neurochem.* *92*, 103–113.
- Mirshamsi, S., Laidlaw, H.A., Ning, K., Anderson, E., Burgess, L.A., Gray, A., Sutherland, C., and Ashford, M.L. (2004). Leptin and insulin stimulation of signalling pathways in arcuate nucleus neurones: PI3K dependent actin reorganization and KATP channel activation. *BMC Neurosci.* *5*, 54.
- Miyata, S., Hirano, S., and Kamei, J. (2004). Diabetes Attenuates the Antidepressant-Like Effect Mediated by the Activation of 5-HT_{1A} Receptor in the Mouse Tail Suspension Test. *Neuropsychopharmacology* *29*, 461–469.
- Miyata, S., Yamada, N., Hirano, S., Tanaka, S., and Kamei, J. (2007). Diabetes attenuates psychological stress-elicited 5-HT secretion in the prefrontal cortex but not in the amygdala of mice. *Brain Res.* *1147*, 233–239.
- Mlinar, B., Montalbano, A., Waider, J., Lesch, K.-P., and Corradetti, R. (2017). Increased functional coupling of 5-HT_{1A} autoreceptors to GIRK channels in Tph2^{-/-} mice. *Eur. Neuropsychopharmacol. J. Eur. Coll. Neuropsychopharmacol.* *27*, 1258–1267.
- Moller, D.E., Yokota, A., Caro, J.F., and Flier, J.S. (1989). Tissue-specific expression of two alternatively spliced insulin receptor mRNAs in man. *Mol. Endocrinol. Baltim. Md* *3*, 1263–1269.
- Molnár, G., Faragó, N., Kocsis, Á.K., Rózsa, M., Lovas, S., Boldog, E., Báldi, R., Csajbók, É., Gardi, J., Puskás, L.G., et al. (2014). GABAergic neurogliaform cells represent local sources of insulin in the cerebral cortex. *J. Neurosci. Off. J. Soc. Neurosci.* *34*, 1133–1137.
- Montalbano, A., Waider, J., Barbieri, M., Baytas, O., Lesch, K.-P., Corradetti, R., and Mlinar, B. (2015). Cellular resilience: 5-HT neurons in Tph2^{-/-} mice retain normal firing behavior despite the lack of brain 5-HT. *Eur. Neuropsychopharmacol.* *25*, 2022–2035.
- Monteggia, L.M., Barrot, M., Powell, C.M., Berton, O., Galanis, V., Gemelli, T., Meuth, S., Nagy, A., Greene, R.W., and Nestler, E.J. (2004). Essential role of brain-derived neurotrophic factor in adult hippocampal function. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *101*, 10827–10832.

- de Montigny, C., Chaput, Y., and Blier, P. (1990). Modification of serotonergic neuron properties by long-term treatment with serotonin reuptake blockers. *J. Clin. Psychiatry* *51 Suppl B*, 4–8.
- Morris, A.P., Voight, B.F., Teslovich, T.M., Ferreira, T., Segrè, A.V., Steinthorsdottir, V., Strawbridge, R.J., Khan, H., Grallert, H., Mahajan, A., et al. (2012). Large-scale association analysis provides insights into the genetic architecture and pathophysiology of type 2 diabetes. *Nat. Genet.* *44*, 981–990.
- Mosko, S.S., Haubrich, D., and Jacobs, B.L. (1977). Serotonergic afferents to the dorsal raphe nucleus: evidence from HRP and synaptosomal uptake studies. *Brain Res.* *119*, 269–290.
- Mueller, P.L., Pritchett, C.E., Wiechman, T.N., Zharikov, A., and Hajnal, A. (2018). Antidepressant-like effects of insulin and IGF-1 are mediated by IGF-1 receptors in the brain. *Brain Res. Bull.* *143*, 27–35.
- Mulders, P.C., van Eijndhoven, P.F., Schene, A.H., Beckmann, C.F., and Tendolkar, I. (2015). Resting-state functional connectivity in major depressive disorder: A review. *Neurosci. Biobehav. Rev.* *56*, 330–344.
- Muller, D.C., Elahi, D., Tobin, J.D., and Andres, R. (1996). The effect of age on insulin resistance and secretion: a review. *Semin. Nephrol.* *16*, 289–298.
- Murata, Y., Narisawa, Y., Shimono, R., Ohmori, H., Mori, M., Ohe, K., Mine, K., and Enjoji, M. (2017). A high fat diet-induced decrease in hippocampal newly-born neurons of male mice is exacerbated by mild psychological stress using a Communication Box. *J. Affect. Disord.* *209*, 209–216.
- Murch, S.J., Alan, A.R., Cao, J., and Saxena, P.K. (2009). Melatonin and serotonin in flowers and fruits of *Datura metel* L. *J. Pineal Res.* *47*, 277–283.
- Murphy, G.M., Hollander, S.B., Rodrigues, H.E., Kremer, C., and Schatzberg, A.F. (2004). Effects of the serotonin transporter gene promoter polymorphism on mirtazapine and paroxetine efficacy and adverse events in geriatric major depression. *Arch. Gen. Psychiatry* *61*, 1163–1169.
- Myers, M.G., and White, M.F. (1996). Insulin signal transduction and the IRS proteins. *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.* *36*, 615–658.
- Myers, M.G., Wang, L.M., Sun, X.J., Zhang, Y., Yenush, L., Schlessinger, J., Pierce, J.H., and White, M.F. (1994). Role of IRS-1-GRB-2 complexes in insulin signaling. *Mol. Cell. Biol.* *14*, 3577–3587.
- Naef, L., Seabrook, L., Hsiao, J., Li, C., and Borgland, S.L. (2019). Insulin in the ventral tegmental area reduces cocaine-evoked dopamine in the nucleus accumbens in vivo. *Eur. J. Neurosci.* *50*, 2146–2155.
- Naggert, J.K., Fricker, L.D., Varlamov, O., Nishina, P.M., Rouille, Y., Steiner, D.F., Carroll, R.J., Paigen, B.J., and Leiter, E.H. (1995). Hyperproinsulinaemia in obese fat/fat mice associated with a carboxypeptidase E mutation which reduces enzyme activity. *Nat. Genet.* *10*, 135–142.
- Nakatani, Y., Sato-Suzuki, I., Tsujino, N., Nakasato, A., Seki, Y., Fumoto, M., and Arita, H. (2008). Augmented brain 5-HT crosses the blood-brain barrier through the 5-HT transporter in rat. *Eur. J. Neurosci.* *27*, 2466–2472.
- Nalbandian, A., Sehgal, K., Gupta, A., Madhavan, M.V., McGroder, C., Stevens, J.S., Cook, J.R., Nordvig, A.S., Shalev, D., Sehrawat, T.S., et al. (2021). Post-acute COVID-19 syndrome. *Nat. Med.* 1–15.
- Nam, S.M., Kim, J.W., Kwon, H.J., Yoo, D.Y., Jung, H.Y., Kim, D.W., Hwang, I.K., Seong, J.K., and Yoon, Y.S. (2017). Differential Effects of Low- and High-dose Zinc Supplementation on Synaptic Plasticity and Neurogenesis in the Hippocampus of Control and High-fat Diet-fed Mice. *Neurochem. Res.* *42*, 3149–3159.
- Narboux-Nême, N., Sagné, C., Doly, S., Diaz, S.L., Martin, C.B.P., Angenard, G., Martres, M.-P., Giros, B., Hamon, M., Lanfumey, L., et al. (2011). Severe serotonin depletion after conditional deletion of the vesicular monoamine transporter 2 gene in serotonin neurons: neural and behavioral consequences. *Neuropsychopharmacol. Off. Publ. Am. Coll. Neuropsychopharmacol.* *36*, 2538–2550.
- Nasca, C., Zelli, D., Bigio, B., Piccinin, S., Scaccianoce, S., Nisticò, R., and McEwen, B.S. (2015). Stress dynamically regulates behavior and glutamatergic gene expression in hippocampus by opening a window of epigenetic plasticity. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *112*, 14960–14965.
- Natarajan, R., Forrester, L., Chiaia, N.L., and Yamamoto, B.K. (2017). Chronic-Stress-Induced Behavioral Changes Associated with Subregion-Selective Serotonin Cell Death in the Dorsal Raphe. *J. Neurosci.* *37*, 6214–6223.

- Nautiyal, K.M., Tritschler, L., Ahmari, S.E., David, D.J., Gardier, A.M., and Hen, R. (2016). A Lack of Serotonin 1B Autoreceptors Results in Decreased Anxiety and Depression-Related Behaviors. *Neuropsychopharmacology* *41*, 2941–2950.
- Nestler, E.J., Barrot, M., DiLeone, R.J., Eisch, A.J., Gold, S.J., and Monteggia, L.M. (2002). Neurobiology of depression. *Neuron* *34*, 13–25.
- Newman-Tancredi, A., Conte, C., Chaput, C., Spedding, M., and Millan, M.J. (1997). Inhibition of the constitutive activity of human 5-HT_{1A} receptors by the inverse agonist, spiperone but not the neutral antagonist, WAY 100,635. *Br. J. Pharmacol.* *120*, 737–739.
- Nguyen, T.T., Ta, Q.T.H., Nguyen, T.K.O., Nguyen, T.T.D., and Van Giau, V. (2020). Type 3 Diabetes and Its Role Implications in Alzheimer’s Disease. *Int. J. Mol. Sci.* *21*.
- Nibuya, M., Morinobu, S., and Duman, R.S. (1995). Regulation of BDNF and trkB mRNA in rat brain by chronic electroconvulsive seizure and antidepressant drug treatments. *J. Neurosci. Off. J. Soc. Neurosci.* *15*, 7539–7547.
- Nicolas, S., Debayle, D., Béchade, C., Maroteaux, L., Gay, A.-S., Bayer, P., Heurteaux, C., Guyon, A., and Chabry, J. (2018). Adiporon, an adiponectin receptor agonist acts as an antidepressant and metabolic regulator in a mouse model of depression. *Transl. Psychiatry* *8*.
- Nierenberg, A.A., and DeCecco, L.M. (2001). Definitions of antidepressant treatment response, remission, nonresponse, partial response, and other relevant outcomes: a focus on treatment-resistant depression. *J. Clin. Psychiatry* *62 Suppl 16*, 5–9.
- Nishi, K., Kanemaru, K., and Diksic, M. (2009). A genetic rat model of depression, Flinders Sensitive Line, has a lower density of 5-HT_{1A} receptors, but a higher density of 5-HT_{1B} receptors, compared to control rats. *Neurochem. Int.* *54*, 299–307.
- Nishitani, N., Nagayasu, K., Asaoka, N., Yamashiro, M., Andoh, C., Nagai, Y., Kinoshita, H., Kawai, H., Shibui, N., Liu, B., et al. (2019). Manipulation of dorsal raphe serotonergic neurons modulates active coping to inescapable stress and anxiety-related behaviors in mice and rats. *Neuropsychopharmacology* *44*, 721–732.
- Niswender, K.D., Morrison, C.D., Clegg, D.J., Olson, R., Baskin, D.G., Myers, M.G., Seeley, R.J., and Schwartz, M.W. (2003). Insulin activation of phosphatidylinositol 3-kinase in the hypothalamic arcuate nucleus: a key mediator of insulin-induced anorexia. *Diabetes* *52*, 227–231.
- Nizar, J.M., Shepard, B.D., Vo, V.T., and Bhalla, V. Renal tubule insulin receptor modestly promotes elevated blood pressure and markedly stimulates glucose reabsorption. *JCI Insight* *3*.
- Nordström*, A., Hadrévi, J., Olsson, T., Franks, P.W., and Nordström, P. (2016). Higher Prevalence of Type 2 Diabetes in Men Than in Women Is Associated With Differences in Visceral Fat Mass. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* *101*, 3740–3746.
- Novak, V., Milberg, W., Hao, Y., Munshi, M., Novak, P., Galica, A., Manor, B., Roberson, P., Craft, S., and Abduljalil, A. (2014). Enhancement of vasoreactivity and cognition by intranasal insulin in type 2 diabetes. *Diabetes Care* *37*, 751–759.
- Obici, S., Zhang, B.B., Karkanias, G., and Rossetti, L. (2002). Hypothalamic insulin signaling is required for inhibition of glucose production. *Nat. Med.* *8*, 1376–1382.
- Ogawa, S., Fujii, T., Koga, N., Hori, H., Teraishi, T., Hattori, K., Noda, T., Higuchi, T., Motohashi, N., and Kunugi, H. (2014). Plasma L-tryptophan concentration in major depressive disorder: new data and meta-analysis. *J. Clin. Psychiatry* *75*, e906-915.
- Oh, Y.-S., Gao, P., Lee, K.-W., Ceglia, I., Seo, J.-S., Zhang, X., Ahn, J.-H., Chait, B.T., Patel, D.J., Kim, Y., et al. (2013). SMARCA3, a chromatin-remodeling factor, is required for p11-dependent antidepressant action. *Cell* *152*, 831–843.
- Ohmura, Y., Tanaka, K.F., Tsunematsu, T., Yamanaka, A., and Yoshioka, M. (2014). Optogenetic activation of serotonergic neurons enhances anxiety-like behaviour in mice. *Int. J. Neuropsychopharmacol.* *17*, 1777–1783.
- Ohmura, Y., Tsutsui-Kimura, I., Sasamori, H., Nebuka, M., Nishitani, N., Tanaka, K.F., Yamanaka, A., and Yoshioka, M. (2020). Different roles of distinct serotonergic pathways in anxiety-like behavior, antidepressant-like, and anti-impulsive effects. *Neuropharmacology* *167*, 107703.

- Ohta, K.-I., Miki, T., Warita, K., Suzuki, S., Kusaka, T., Yakura, T., Liu, J.-Q., Tamai, M., and Takeuchi, Y. (2014). Prolonged maternal separation disturbs the serotonergic system during early brain development. *Int. J. Dev. Neurosci. Off. J. Int. Soc. Dev. Neurosci.* *33*, 15–21.
- Okaty, B.W., Freret, M.E., Rood, B.D., Brust, R.D., Hennessy, M.L., deBairos, D., Kim, J.C., Cook, M.N., and Dymecki, S.M. (2015). Multi-Scale Molecular Deconstruction of the Serotonin Neuron System. *Neuron* *88*, 774–791.
- Okaty, B.W., Commons, K.G., and Dymecki, S.M. (2019). Embracing diversity in the 5-HT neuronal system. *Nat. Rev. Neurosci.* *20*, 397–424.
- Okaty, B.W., Sturrock, N., Escobedo Lozoya, Y., Chang, Y., Senft, R.A., Lyon, K.A., Alekseyenko, O.V., and Dymecki, S.M. (2020). A single-cell transcriptomic and anatomic atlas of mouse dorsal raphe Pet1 neurons. *ELife* *9*.
- Okuyama, S., Shinoka, W., Nakamura, K., Kotani, M., Sawamoto, A., Sugawara, K., Sudo, M., Nakajima, M., and Furukawa, Y. (2018). Suppressive effects of the peel of *Citrus kawachiensis* (Kawachi Bankan) on astroglial activation, tau phosphorylation, and inhibition of neurogenesis in the hippocampus of type 2 diabetic db/db mice. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* *82*, 1384–1395.
- O'Mahony, S.M., Clarke, G., Borre, Y.E., Dinan, T.G., and Cryan, J.F. (2015). Serotonin, tryptophan metabolism and the brain-gut-microbiome axis. *Behav. Brain Res.* *277*, 32–48.
- O'Neill, T.J., Craparo, A., and Gustafson, T.A. (1994). Characterization of an interaction between insulin receptor substrate 1 and the insulin receptor by using the two-hybrid system. *Mol. Cell. Biol.* *14*, 6433–6442.
- Oomura, Y., and Kita, H. (1981). Insulin acting as a modulator of feeding through the hypothalamus. *Diabetologia* *20*, 290–298.
- Orosco, M., and Nicolaidis, S. (1994). Insulin and glucose-induced changes in feeding and medial hypothalamic monoamines revealed by microdialysis in rats. *Brain Res. Bull.* *33*, 289–297.
- Osterlund, M.K., Overstreet, D.H., and Hurd, Y.L. (1999). The flinders sensitive line rats, a genetic model of depression, show abnormal serotonin receptor mRNA expression in the brain that is reversed by 17 β -estradiol. *Brain Res. Mol. Brain Res.* *74*, 158–166.
- Otte, C., Gold, S.M., Penninx, B.W., Pariante, C.M., Etkin, A., Fava, M., Mohr, D.C., and Schatzberg, A.F. (2016). Major depressive disorder. *Nat. Rev. Dis. Primer* *2*, 16065.
- Owens, M.J., Morgan, W.N., Plott, S.J., and Nemeroff, C.B. (1997). Neurotransmitter receptor and transporter binding profile of antidepressants and their metabolites. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* *283*, 1305–1322.
- Owens, M.J., Knight, D.L., and Nemeroff, C.B. (2001). Second-generation SSRIs: human monoamine transporter binding profile of escitalopram and R-fluoxetine. *Biol. Psychiatry* *50*, 345–350.
- Ozcan, U., Cao, Q., Yilmaz, E., Lee, A.-H., Iwakoshi, N.N., Ozdelen, E., Tuncman, G., Görgün, C., Glimcher, L.H., and Hotamisligil, G.S. (2004). Endoplasmic reticulum stress links obesity, insulin action, and type 2 diabetes. *Science* *306*, 457–461.
- Ozes, O.N., Akca, H., Mayo, L.D., Gustin, J.A., Maehama, T., Dixon, J.E., and Donner, D.B. (2001). A phosphatidylinositol 3-kinase/Akt/mTOR pathway mediates and PTEN antagonizes tumor necrosis factor inhibition of insulin signaling through insulin receptor substrate-1. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *98*, 4640–4645.
- Page, M.E., Detke, M.J., Dalvi, A., Kirby, L.G., and Lucki, I. (1999). Serotonergic mediation of the effects of fluoxetine, but not desipramine, in the rat forced swimming test. *Psychopharmacology (Berl.)* *147*, 162–167.
- Palacios, J.M. (2016). Serotonin receptors in brain revisited. *Brain Res.* *1645*, 46–49.
- Palleria, C., Leo, A., Andreozzi, F., Citraro, R., Iannone, M., Spiga, R., Sesti, G., Constanti, A., De Sarro, G., Arturi, F., et al. (2017). Liraglutide prevents cognitive decline in a rat model of streptozotocin-induced diabetes independently from its peripheral metabolic effects. *Behav. Brain Res.* *321*, 157–169.
- Pan, Y., Hong, Y., Zhang, Q.-Y., and Kong, L.-D. (2013). Impaired hypothalamic insulin signaling in CUMS rats: restored by icariin and fluoxetine through inhibiting CRF system. *Psychoneuroendocrinology* *38*, 122–134.
- Panatier, A., Vallée, J., Haber, M., Murai, K.K., Lacaille, J.-C., and Robitaille, R. (2011). Astrocytes Are Endogenous Regulators of Basal Transmission at Central Synapses. *Cell* *146*, 785–798.

- Panayotis, N., Sheinin, A., Dagan, S.Y., Tsoory, M.M., Rother, F., Vadhvani, M., Meshcheriakova, A., Koley, S., Marvaldi, L., Song, D.-A., et al. (2018). Importin $\alpha 5$ Regulates Anxiety through MeCP2 and Sphingosine Kinase 1. *Cell Rep.* 25, 3169-3179.e7.
- Pandini, G., Frasca, F., Mineo, R., Sciacca, L., Vigneri, R., and Belfiore, A. (2002). Insulin/insulin-like growth factor I hybrid receptors have different biological characteristics depending on the insulin receptor isoform involved. *J. Biol. Chem.* 277, 39684–39695.
- Papazoglou, I.K., Jean, A., Gertler, A., Taouis, M., and Vacher, C.-M. (2015). Hippocampal GSK3 β as a Molecular Link Between Obesity and Depression. *Mol. Neurobiol.* 52, 363–374.
- Pardridge, W.M., Eisenberg, J., and Yang, J. (1985). Human Blood—Brain Barrier Insulin Receptor. *J. Neurochem.* 44, 1771–1778.
- Park, S.-S., Park, H.-S., Kim, C.-J., Baek, S.-S., and Kim, T.-W. (2019). Exercise attenuates maternal separation-induced mood disorder-like behaviors by enhancing mitochondrial functions and neuroplasticity in the dorsal raphe. *Behav. Brain Res.* 372, 112049.
- Parton, L.E., Ye, C.P., Coppari, R., Enriori, P.J., Choi, B., Zhang, C.-Y., Xu, C., Vianna, C.R., Balthasar, N., Lee, C.E., et al. (2007). Glucose sensing by POMC neurons regulates glucose homeostasis and is impaired in obesity. *Nature* 449, 228–232.
- Pearson, S., Schmidt, M., Patton, G., Dwyer, T., Blizzard, L., Otahal, P., and Venn, A. (2010). Depression and insulin resistance: cross-sectional associations in young adults. *Diabetes Care* 33, 1128–1133.
- Penington, N.J., Kelly, J.S., and Fox, A.P. (1991). A study of the mechanism of Ca²⁺ current inhibition produced by serotonin in rat dorsal raphe neurons. *J. Neurosci. Off. J. Soc. Neurosci.* 11, 3594–3609.
- Penington, N.J., Kelly, J.S., and Fox, A.P. (1993). Whole-cell recordings of inwardly rectifying K⁺ currents activated by 5-HT_{1A} receptors on dorsal raphe neurones of the adult rat. *J. Physiol.* 469, 387–405.
- Perry, R.J., Samuel, V.T., Petersen, K.F., and Shulman, G.I. (2014). The role of hepatic lipids in hepatic insulin resistance and type 2 diabetes. *Nature* 510, 84–91.
- Petrov, D., Pedrós, I., Artiach, G., Sureda, F.X., Barroso, E., Pallàs, M., Casadesús, G., Beas-Zarate, C., Carro, E., Ferrer, I., et al. (2015). High-fat diet-induced deregulation of hippocampal insulin signaling and mitochondrial homeostasis deficiencies contribute to Alzheimer disease pathology in rodents. *Biochim. Biophys. Acta* 1852, 1687–1699.
- Petty, F., Kramer, G., and Wilson, L. (1992). Prevention of learned helplessness: in vivo correlation with cortical serotonin. *Pharmacol. Biochem. Behav.* 43, 361–367.
- Pham, T.H., Mendez-David, I., Defaix, C., Guiard, B.P., Tritschler, L., David, D.J., and Gardier, A.M. (2017). Ketamine treatment involves medial prefrontal cortex serotonin to induce a rapid antidepressant-like activity in BALB/cJ mice. *Neuropharmacology* 112, 198–209.
- Piñeyro, G., and Blier, P. (1996). Regulation of 5-hydroxytryptamine release from rat midbrain raphe nuclei by 5-hydroxytryptamine_{1D} receptors: effect of tetrodotoxin, G protein inactivation and long-term antidepressant administration. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 276, 697–707.
- Piñeyro, G., and Blier, P. (1999). Autoregulation of serotonin neurons: role in antidepressant drug action. *Pharmacol. Rev.* 51, 533–591.
- Pitsavos, C., Tampourlou, M., Panagiotakos, D.B., Skoumas, Y., Chrysohoou, C., Nomikos, T., and Stefanadis, C. (2007). Association Between Low-Grade Systemic Inflammation and Type 2 Diabetes Mellitus Among Men and Women from the ATTICA Study. *Rev. Diabet. Stud. RDS* 4, 98–104.
- Pittenger, C., and Duman, R.S. (2008). Stress, depression, and neuroplasticity: a convergence of mechanisms. *Neuropsychopharmacol. Off. Publ. Am. Coll. Neuropsychopharmacol.* 33, 88–109.
- Planchez, B., Surget, A., and Belzung, C. (2019). Animal models of major depression: drawbacks and challenges. *J. Neural Transm. Vienna Austria 1996* 126, 1383–1408.
- Plitzko, D., Rumpel, S., and Gottmann, K. (2001). Insulin promotes functional induction of silent synapses in differentiating rat neocortical neurons. *Eur. J. Neurosci.* 14, 1412–1415.
- Pocai, A., Morgan, K., Buettner, C., Gutierrez-Juarez, R., Obici, S., and Rossetti, L. (2005). Central leptin acutely reverses diet-induced hepatic insulin resistance. *Diabetes* 54, 3182–3189.

- Poggini, S., Golia, M.T., Alboni, S., Milior, G., Sciarria, L.P., Viglione, A., Matte Bon, G., Brunello, N., Puglisi-Allegra, S., Limatola, C., et al. (2019). Combined Fluoxetine and Metformin Treatment Potentiates Antidepressant Efficacy Increasing IGF2 Expression in the Dorsal Hippocampus. *Neural Plast.* 2019, 1–12.
- Pollak Dorocic, I., Fürth, D., Xuan, Y., Johansson, Y., Pozzi, L., Silberberg, G., Carlén, M., and Meletis, K. (2014). A Whole-Brain Atlas of Inputs to Serotonergic Neurons of the Dorsal and Median Raphe Nuclei. *Neuron* 83, 663–678.
- Pollock, B.G., Ferrell, R.E., Mulsant, B.H., Mazumdar, S., Miller, M., Sweet, R.A., Davis, S., Kirshner, M.A., Houck, P.R., Stack, J.A., et al. (2000). Allelic variation in the serotonin transporter promoter affects onset of paroxetine treatment response in late-life depression. *Neuropsychopharmacol. Off. Publ. Am. Coll. Neuropsychopharmacol.* 23, 587–590.
- Pompeiano, M., Palacios, J.M., and Mengod, G. (1992). Distribution and cellular localization of mRNA coding for 5-HT1A receptor in the rat brain: correlation with receptor binding. *J. Neurosci. Off. J. Soc. Neurosci.* 12, 440–453.
- Popa, D., Cerdan, J., Repérant, C., Guiard, B.P., Guilloux, J.-P., David, D.J., and 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, 83–90.
- Porsolt, R.D., Bertin, A., and Jalfre, M. (1977). Behavioral despair in mice: a primary screening test for antidepressants. *Arch. Int. Pharmacodyn. Ther.* 229, 327–336.
- Porte, D., and Woods, S.C. (1981). Regulation of food intake and body weight in insulin. *Diabetologia* 20 Suppl, 274–280.
- Potter van Loon, B.J., Radder, J.K., Frölich, M., Krans, H.M., Zwinderman, A.H., and Meinders, A.E. (1992). Fluoxetine increases insulin action in obese nondiabetic and in obese non-insulin-dependent diabetic individuals. *Int. J. Obes. Relat. Metab. Disord. J. Int. Assoc. Study Obes.* 16, 79–85.
- Pousti, F., Ahmadi, R., Mirahmadi, F., Hosseinmardi, N., and Rohampour, K. (2018). Adiponectin modulates synaptic plasticity in hippocampal dentate gyrus. *Neurosci. Lett.* 662, 227–232.
- Powell, D.J., Hajduch, E., Kular, G., and Hundal, H.S. (2003). Ceramide disables 3-phosphoinositide binding to the pleckstrin homology domain of protein kinase B (PKB)/Akt by a PKCzeta-dependent mechanism. *Mol. Cell. Biol.* 23, 7794–7808.
- van Praag, H.M., and de Haan, S. (1979). Central serotonin metabolism and frequency of depression. *Psychiatry Res.* 1, 219–224.
- Pradhan, A.D., Manson, J.E., Rifai, N., Buring, J.E., and Ridker, P.M. (2001). C-reactive protein, interleukin 6, and risk of developing type 2 diabetes mellitus. *JAMA* 286, 327–334.
- Pravetoni, M., and Wickman, K. (2008). Behavioral characterization of mice lacking GIRK/Kir3 channel subunits. *Genes Brain Behav.* 7, 523–531.
- Prouty, E.W., Chandler, D.J., Gao, W.-J., and Waterhouse, B.D. (2019). Selective vulnerability of dorsal raphe-medial prefrontal cortex projection neurons to corticosterone-induced hypofunction. *Eur. J. Neurosci.* 50, 1712–1726.
- Prut, L., and Belzung, C. (2003). The open field as a paradigm to measure the effects of drugs on anxiety-like behaviors: a review. *Eur. J. Pharmacol.* 463, 3–33.
- Qiao, L., Goldberg, J.L., Russell, J.C., and Sun, X.J. (1999). Identification of Enhanced Serine Kinase Activity in Insulin Resistance*. *J. Biol. Chem.* 274, 10625–10632.
- Qiao, L., Zhande, R., Jetton, T.L., Zhou, G., and Sun, X.J. (2002). In Vivo Phosphorylation of Insulin Receptor Substrate 1 at Serine 789 by a Novel Serine Kinase in Insulin-resistant Rodents*. *J. Biol. Chem.* 277, 26530–26539.
- Qin, M., Xia, Z., Huang, T., and Smith, C.B. (2011). Effects of chronic immobilization stress on anxiety-like behavior and basolateral amygdala morphology in Fmr1 knockout mice. *Neuroscience* 194, 282–290.
- Qiu, J., Zhang, C., Borgquist, A., Nestor, C.C., Smith, A.W., Bosch, M.A., Ku, S., Wagner, E.J., Rønnekleiv, O.K., and Kelly, M.J. (2014). Insulin excites anorexigenic proopiomelanocortin neurons via activation of canonical transient receptor potential channels. *Cell Metab.* 19, 682–693.

- Qiu, J., Bosch, M.A., Meza, C., Navarro, U.-V., Nestor, C.C., Wagner, E.J., Rønnekleiv, O.K., and Kelly, M.J. (2018). Estradiol Protects Proopiomelanocortin Neurons Against Insulin Resistance. *Endocrinology* *159*, 647–664.
- Qiu, J., Bosch, M.A., Zhang, C., Rønnekleiv, O.K., and Kelly, M.J. (2020). Estradiol Protects Neuropeptide Y/Agouti-Related Peptide Neurons against Insulin Resistance in Females. *Neuroendocrinology* *110*, 105–118.
- Quah, S.K.L., McIver, L., Roberts, A.C., and Santangelo, A.M. (2020). Trait Anxiety Mediated by Amygdala Serotonin Transporter in the Common Marmoset. *J. Neurosci. Off. J. Soc. Neurosci.* *40*, 4739–4749.
- Quentin, E., Belmer, A., and Maroteaux, L. (2018). Somato-Dendritic Regulation of Raphe Serotonin Neurons; A Key to Antidepressant Action. *Front. Neurosci.* *12*, 982.
- Rafa-Zabłocka, K., Kreiner, G., Bagińska, M., and Nalepa, I. (2018). Selective Depletion of CREB in Serotonergic Neurons Affects the Upregulation of Brain-Derived Neurotrophic Factor Evoked by Chronic Fluoxetine Treatment. *Front. Neurosci.* *12*.
- Rahier, J., Guiot, Y., Goebbels, R.M., Sempoux, C., and Henquin, J.C. (2008). Pancreatic beta-cell mass in European subjects with type 2 diabetes. *Diabetes Obes. Metab.* *10 Suppl 4*, 32–42.
- Rainer, Q., Nguyen, H.T., Quesseveur, G., Gardier, A.M., David, D.J., and Guiard, B.P. (2012). Functional status of somatodendritic serotonin 1A autoreceptor after long-term treatment with fluoxetine in a mouse model of anxiety/depression based on repeated corticosterone administration. *Mol. Pharmacol.* *81*, 106–112.
- Rapport, M.M., Green, A.A., and Page, I.H. (1948). Crystalline Serotonin. *Science* *108*, 329–330.
- Rasgon, N.L., Kenna, H.A., Williams, K.E., Powers, B., Wroolie, T., and Schatzberg, A.F. (2010). Rosiglitazone add-on in treatment of depressed patients with insulin resistance: a pilot study. *ScientificWorldJournal* *10*, 321–328.
- Ravichandran, K.S. (2001). Signaling via Shc family adapter proteins. *Oncogene* *20*, 6322–6330.
- Reisinger, S.N., Sideromenos, S., Horvath, O., Derdak, S., Cicvaric, A., Monje, F.J., Bilban, M., Häring, M., Glat, M., and Pollak, D.D. (2020). STAT3 in the dorsal raphe gates behavioural reactivity and regulates gene networks associated with psychopathology. *Mol. Psychiatry* 1–14.
- Ren, J., Isakova, A., Friedmann, D., Zeng, J., Grutzner, S.M., Pun, A., Zhao, G.Q., Kolluru, S.S., Wang, R., Lin, R., et al. (2019). Single-cell transcriptomes and whole-brain projections of serotonin neurons in the mouse dorsal and median raphe nuclei. *ELife* *8*.
- Rena, G., Hardie, D.G., and Pearson, E.R. (2017). The mechanisms of action of metformin. *Diabetologia* *60*, 1577–1585.
- Rhea, E.M., Humann, S.R., Nirkhe, S., Farr, S.A., Morley, J.E., and Banks, W.A. (2017). Intranasal Insulin Transport is Preserved in Aged SAMP8 Mice and is Altered by Albumin and Insulin Receptor Inhibition. *J. Alzheimers Dis. JAD* *57*, 241–252.
- Rhea, E.M., Rask-Madsen, C., and Banks, W.A. (2018). Insulin transport across the blood-brain barrier can occur independently of the insulin receptor: Insulin transport across the BBB. *J. Physiol.* *596*, 4753–4765.
- Rhea, E.M., Salameh, T.S., and Banks, W.A. (2019). Routes for the delivery of insulin to the central nervous system: A comparative review. *Exp. Neurol.* *313*, 10–15.
- Riad, M., Garcia, S., Watkins, K.C., Jodoin, N., Doucet, E., Langlois, X., el Mestikawy, S., Hamon, M., and Descarries, L. (2000). Somatodendritic localization of 5-HT_{1A} and preterminal axonal localization of 5-HT_{1B} serotonin receptors in adult rat brain. *J. Comp. Neurol.* *417*, 181–194.
- Riad, M., Zimmer, L., Rbahi, L., Watkins, K.C., Hamon, M., and Descarries, L. (2004). Acute treatment with the antidepressant fluoxetine internalizes 5-HT_{1A} autoreceptors and reduces the in vivo binding of the PET radioligand [18F]MPPF in the nucleus raphe dorsalis of rat. *J. Neurosci. Off. J. Soc. Neurosci.* *24*, 5420–5426.
- Riboulet-Chavey, A., Pierron, A., Durand, I., Murdaca, J., Giudicelli, J., and Van Obberghen, E. (2006). Methylglyoxal impairs the insulin signaling pathways independently of the formation of intracellular reactive oxygen species. *Diabetes* *55*, 1289–1299.
- Richardson-Jones, J.W., Craige, C.P., Guiard, B.P., Stephen, A., Metzger, K.L., Kung, H.F., Gardier, A.M., Dranovsky, A., David, D.J., Beck, S.G., et al. (2010). 5-HT_{1A} autoreceptor levels determine vulnerability to stress and response to antidepressants. *Neuron* *65*, 40–52.

Richardson-Jones, J.W., Craige, C.P., Nguyen, T.H., Kung, H.F., Gardier, A.M., Dranovsky, A., David, D.J., Guiard, B.P., Beck, S.G., Hen, R., et al. (2011). Serotonin-1A autoreceptors are necessary and sufficient for the normal formation of circuits underlying innate anxiety. *J. Neurosci. Off. J. Soc. Neurosci.* *31*, 6008–6018.

Rinderknecht, E., and Humbel, R.E. (1978). Primary structure of human insulin-like growth factor II. *FEBS Lett.* *89*, 283–286.

Ritze, Y., Kern, W., Ebner, E.-M., Jahn, S., Benedict, C., and Hallschmid, M. (2018). Metabolic and Cognitive Outcomes of Subchronic Once-Daily Intranasal Insulin Administration in Healthy Men. *Front. Endocrinol.* *9*, 663.

Roddy, D.W., Farrell, C., Doolin, K., Roman, E., Tozzi, L., Frodl, T., O’Keane, V., and O’Hanlon, E. (2019). The Hippocampus in Depression: More Than the Sum of Its Parts? Advanced Hippocampal Substructure Segmentation in Depression. *Biol. Psychiatry* *85*, 487–497.

Rodrigues, F.T.S., de Souza, M.R.M., Lima, C.N. de C., da Silva, F.E.R., Costa, D.V. da S., Dos Santos, C.C., Miyajima, F., de Sousa, F.C.F., Vasconcelos, S.M.M., Barichello, T., et al. (2018). Major depression model induced by repeated and intermittent lipopolysaccharide administration: Long-lasting behavioral, neuroimmune and neuroprogressive alterations. *J. Psychiatr. Res.* *107*, 57–67.

Rodríguez-Ramos, Á., Moriana, J.A., García-Torres, F., and Ruiz-Rubio, M. (2019). Emotional stability is associated with the MAOA promoter uVNTR polymorphism in women. *Brain Behav.* *9*, e01376.

Romeo, G.R., Lee, J., and Shoelson, S.E. (2012). Metabolic syndrome, insulin resistance, and roles of inflammation--mechanisms and therapeutic targets. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* *32*, 1771–1776.

Romero, L., Bel, N., Artigas, F., de Montigny, C., and Blier, P. (1996). Effect of pindolol on the function of pre- and postsynaptic 5-HT_{1A} receptors: in vivo microdialysis and electrophysiological studies in the rat brain. *Neuropsychopharmacol. Off. Publ. Am. Coll. Neuropsychopharmacol.* *15*, 349–360.

Romero, L., Celada, P., Martín-Ruiz, R., Díaz-Mataix, L., Mourelle, M., Delgado, J., Hervás, I., and Artigas, F. (2003). Modulation of serotonergic function in rat brain by VN2222, a serotonin reuptake inhibitor and 5-HT_{1A} receptor agonist. *Neuropsychopharmacol. Off. Publ. Am. Coll. Neuropsychopharmacol.* *28*, 445–456.

Rosa, A.O., Kaster, M.P., Binfaré, R.W., Morales, S., Martín-Aparicio, E., Navarro-Rico, M.L., Martínez, A., Medina, M., García, A.G., López, M.G., et al. (2008). Antidepressant-like effect of the novel thiazolidinone NP031115 in mice. *Prog. Neuropsychopharmacol. Biol. Psychiatry* *32*, 1549–1556.

Rosado, A.F., Rosa, P.B., Platt, N., Pierone, B.C., Neis, V.B., Severo Rodrigues, A.L., Kaster, M.P., and Kaufmann, F.N. (2021). Glibenclamide treatment prevents depressive-like behavior and memory impairment induced by chronic unpredictable stress in female mice. *Behav. Pharmacol.* *32*, 170–181.

Rösen, P., Nawroth, P.P., King, G., Möller, W., Tritschler, H.J., and Packer, L. (2001). The role of oxidative stress in the onset and progression of diabetes and its complications: a summary of a Congress Series sponsored by UNESCO-MCBN, the American Diabetes Association and the German Diabetes Society. *Diabetes Metab. Res. Rev.* *17*, 189–212.

Rosenblat, J.D., Kakar, R., and McIntyre, R.S. (2015). The Cognitive Effects of Antidepressants in Major Depressive Disorder: A Systematic Review and Meta-Analysis of Randomized Clinical Trials. *Int. J. Neuropsychopharmacol.* *19*.

Rosenkranz, J.A., Venheim, E.R., and Padival, M. (2010). Chronic stress causes amygdala hyperexcitability in rodents. *Biol. Psychiatry* *67*, 1128–1136.

Rossi, D.V., Burke, T.F., McCasland, M., and Hensler, J.G. (2008). Serotonin-1A receptor function in the dorsal raphe nucleus following chronic administration of the selective serotonin reuptake inhibitor sertraline. *J. Neurochem.* *105*, 1091–1099.

Rotter, V., Nagaev, I., and Smith, U. (2003). Interleukin-6 (IL-6) induces insulin resistance in 3T3-L1 adipocytes and is, like IL-8 and tumor necrosis factor-alpha, overexpressed in human fat cells from insulin-resistant subjects. *J. Biol. Chem.* *278*, 45777–45784.

Roy, T., and Lloyd, C.E. (2012). Epidemiology of depression and diabetes: a systematic review. *J. Affect. Disord.* *142 Suppl*, S8-21.

Roy, B., Ehlert, L., Mullur, R., Freeby, M.J., Woo, M.A., Kumar, R., and Choi, S. (2020). Regional Brain Gray Matter Changes in Patients with Type 2 Diabetes Mellitus. *Sci. Rep.* *10*, 9925.

- Rudich, A., Tirosh, A., Potashnik, R., Hemi, R., Kanety, H., and Bashan, N. (1998). Prolonged oxidative stress impairs insulin-induced GLUT4 translocation in 3T3-L1 adipocytes. *Diabetes* 47, 1562–1569.
- Rudnick, G., and Wall, S.C. (1992). The molecular mechanism of “ecstasy” [3,4-methylenedioxy-methamphetamine (MDMA)]: serotonin transporters are targets for MDMA-induced serotonin release. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 89, 1817–1821.
- Ruhé, H.G., Mason, N.S., and 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, 331–359.
- Rui, L., Yuan, M., Frantz, D., Shoelson, S., and White, M.F. (2002). SOCS-1 and SOCS-3 block insulin signaling by ubiquitin-mediated degradation of IRS1 and IRS2. *J. Biol. Chem.* 277, 42394–42398.
- Rush, A.J., Trivedi, M.H., Wisniewski, S.R., Nierenberg, A.A., Stewart, J.W., Warden, D., Niederehe, G., Thase, M.E., Lavori, P.W., Lebowitz, B.D., et al. (2006). Acute and longer-term outcomes in depressed outpatients requiring one or several treatment steps: a STAR*D report. *Am. J. Psychiatry* 163, 1905–1917.
- Ryle, A.P., Sanger, F., Smith, L.F., and Kitai, R. (1955). The disulphide bonds of insulin. *Biochem. J.* 60, 541–556.
- Sachs, B.D., Ni, J.R., and Caron, M.G. (2015). Brain 5-HT deficiency increases stress vulnerability and impairs antidepressant responses following psychosocial stress. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 112, 2557–2562.
- Saha, S., Batten, T.F., and Henderson, Z. (2000). A GABAergic projection from the central nucleus of the amygdala to the nucleus of the solitary tract: a combined anterograde tracing and electron microscopic immunohistochemical study. *Neuroscience* 99, 613–626.
- Salameh, T.S., Bullock, K.M., Hujoel, I.A., Niehoff, M.L., Wolden-Hanson, T., Kim, J., Morley, J.E., Farr, S.A., and Banks, W.A. (2015). Central Nervous System Delivery of Intranasal Insulin: Mechanisms of Uptake and Effects on Cognition. *J. Alzheimers Dis. JAD* 47, 715–728.
- Salehi-Sadaghiani, M., Javadi-Paydar, M., Gharedaghi, M.H., Zandieh, A., Heydarpour, P., Yousefzadeh-Fard, Y., and Dehpour, A.R. (2012). NMDA receptor involvement in antidepressant-like effect of pioglitazone in the forced swimming test in mice. *Psychopharmacology (Berl.)* 223, 345–355.
- Salmeen, A., Andersen, J.N., Myers, M.P., Tonks, N.K., and Barford, D. (2000). Molecular basis for the dephosphorylation of the activation segment of the insulin receptor by protein tyrosine phosphatase 1B. *Mol. Cell* 6, 1401–1412.
- Samuel, V.T., Petersen, K.F., and Shulman, G.I. (2010). Lipid-induced insulin resistance: unravelling the mechanism. *Lancet Lond. Engl.* 375, 2267–2277.
- Sanchez, C., Asin, K.E., and Artigas, F. (2015). Vortioxetine, a novel antidepressant with multimodal activity: review of preclinical and clinical data. *Pharmacol. Ther.* 145, 43–57.
- Sanders-Bush, E. (1982). Regulation of serotonin storage and release. *Adv. Biochem. Psychopharmacol.* 34, 17–34.
- Santarelli, L., Gobbi, G., Debs, P.C., Sibille, E.L., Blier, P., Hen, R., and Heath, M.J.S. (2001). Genetic and pharmacological disruption of neurokinin 1 receptor function decreases anxiety-related behaviors and increases serotonergic function. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 98, 1912–1917.
- Santarelli, L., Saxe, M., Gross, C., Surget, A., Battaglia, F., Dulawa, S., Weisstaub, N., Lee, J., Duman, R., Arancio, O., et al. (2003). Requirement of hippocampal neurogenesis for the behavioral effects of antidepressants. *Science* 301, 805–809.
- Sargent, P.A., Kjaer, K.H., Bench, C.J., Rabiner, E.A., Messa, C., Meyer, J., Gunn, R.N., Grasby, P.M., and Cowen, P.J. (2000). Brain serotonin_{1A} receptor binding measured by positron emission tomography with [¹¹C]WAY-100635: effects of depression and antidepressant treatment. *Arch. Gen. Psychiatry* 57, 174–180.
- Sari, Y. (2004). Serotonin_{1B} receptors: from protein to physiological function and behavior. *Neurosci. Biobehav. Rev.* 28, 565–582.
- Sasaoka, T., Ishiki, M., Wada, T., Hori, H., Hirai, H., Haruta, T., Ishihara, H., and Kobayashi, M. (2001). Tyrosine phosphorylation-dependent and -independent role of Shc in the regulation of IGF-1-induced mitogenesis and glycogen synthesis. *Endocrinology* 142, 5226–5235.

- Savelieva, K.V., Zhao, S., Pogorelov, V.M., Rajan, I., Yang, Q., Cullinan, E., and Lanthorn, T.H. (2008). Genetic disruption of both tryptophan hydroxylase genes dramatically reduces serotonin and affects behavior in models sensitive to antidepressants. *PLoS One* *3*, e3301.
- Schellenberg, E.S., Dryden, D.M., Vandermeer, B., Ha, C., and Korownyk, C. (2013). Lifestyle interventions for patients with and at risk for type 2 diabetes: a systematic review and meta-analysis. *Ann. Intern. Med.* *159*, 543–551.
- Schenk, S., Saberi, M., and Olefsky, J.M. (2008). Insulin sensitivity: modulation by nutrients and inflammation. *J. Clin. Invest.* *118*, 2992–3002.
- Scherer, T., Wolf, P., Smajis, S., Gaggini, M., Hackl, M., Gastaldelli, A., Klimek, P., Einwallner, E., Marculescu, R., Luger, A., et al. (2017). Chronic Intranasal Insulin Does Not Affect Hepatic Lipids but Lowers Circulating BCAAs in Healthy Male Subjects. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* *102*, 1325–1332.
- Schildkraut, J.J. (1965). The catecholamine hypothesis of affective disorders: a review of supporting evidence. *Am. J. Psychiatry* *122*, 509–522.
- Schlessinger, J., Van Obberghen, E., and Kahn, C.R. (1980). Insulin and antibodies against insulin receptor cap on the membrane of cultured human lymphocytes. *Nature* *286*, 729–731.
- Schmelzle, K., Kane, S., Gridley, S., Lienhard, G.E., and White, F.M. (2006). Temporal dynamics of tyrosine phosphorylation in insulin signaling. *Diabetes* *55*, 2171–2179.
- Schmid, V., Kullmann, S., Gfrörer, W., Hund, V., Hallschmid, M., Lipp, H.-P., Häring, H.-U., Preissl, H., Fritsche, A., and Heni, M. (2018). Safety of intranasal human insulin: A review. *Diabetes Obes. Metab.* *20*, 1563–1577.
- Schmitt, A., Mössner, R., Gossmann, A., Fischer, I.G., Gorboulev, V., Murphy, D.L., Koepsell, H., and Lesch, K.P. (2003). Organic cation transporter capable of transporting serotonin is up-regulated in serotonin transporter-deficient mice. *J. Neurosci. Res.* *71*, 701–709.
- Schoups, A.A., and De Potter, W.P. (1988). Species dependence of adaptations at the pre- and postsynaptic serotonergic receptors following long-term antidepressant drug treatment. *Biochem. Pharmacol.* *37*, 4451–4460.
- Schwaber, J.S., Kapp, B.S., Higgins, G.A., and Rapp, P.R. (1982). Amygdaloid and basal forebrain direct connections with the nucleus of the solitary tract and the dorsal motor nucleus. *J. Neurosci. Off. J. Soc. Neurosci.* *2*, 1424–1438.
- Schwartz, M.W., Figlewicz, D.F., Kahn, S.E., Baskin, D.G., Greenwood, M.R., and Porte, D. (1990). Insulin binding to brain capillaries is reduced in genetically obese, hyperinsulinemic Zucker rats. *Peptides* *11*, 467–472.
- Schwartz, T.L., Siddiqui, U.A., and Stahl, S.M. (2011). Vilazodone: a brief pharmacological and clinical review of the novel serotonin partial agonist and reuptake inhibitor. *Ther. Adv. Psychopharmacol.* *1*, 81–87.
- Schweimer, J.V., and Ungless, M.A. (2010). Phasic responses in dorsal raphe serotonin neurons to noxious stimuli. *Neuroscience* *171*, 1209–1215.
- Sciacca, L., Cassarino, M.F., Genua, M., Pandini, G., Le Moli, R., Squatrito, S., and Vigneri, R. (2010). Insulin analogues differently activate insulin receptor isoforms and post-receptor signalling. *Diabetologia* *53*, 1743–1753.
- Seino, S., Seino, M., Nishi, S., and Bell, G.I. (1989). Structure of the human insulin receptor gene and characterization of its promoter. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *86*, 114–118.
- Seino, S., Shibasaki, T., and Minami, K. (2011). Dynamics of insulin secretion and the clinical implications for obesity and diabetes. *J. Clin. Invest.* *121*, 2118–2125.
- Sen, R.N., and Anand, B.K. (1957). Effect of electrical stimulation of the limbic system of brain (visceral brain) on gastric secretory activity and ulceration. *Indian J. Med. Res.* *45*, 515–521.
- Sengupta, A., and Holmes, A. (2019). A Discrete Dorsal Raphe to Basal Amygdala 5-HT Circuit Calibrates Aversive Memory. *Neuron* *103*, 489–505.e7.
- Seo, C., Guru, A., Jin, M., Ito, B., Sleezer, B.J., Ho, Y.-Y., Wang, E., Boada, C., Krupa, N.A., Kullakanda, D.S., et al. (2019). Intense threat switches dorsal raphe serotonin neurons to a paradoxical operational mode. *Science* *363*, 538–542.
- Seo, J.-S., Park, J.-Y., Choi, J., Kim, T.-K., Shin, J.-H., Lee, J.-K., and Han, P.-L. (2012). NADPH oxidase mediates depressive behavior induced by chronic stress in mice. *J. Neurosci. Off. J. Soc. Neurosci.* *32*, 9690–9699.

- Seo, J.-S., Wei, J., Qin, L., Kim, Y., Yan, Z., and Greengard, P. (2017). Cellular and molecular basis for stress-induced depression. *Mol. Psychiatry* 22, 1440–1447.
- Sestan-Pesa, M., and Horvath, T.L. (2016). Metabolism and Mental Illness. *Trends Mol. Med.* 22, 174–183.
- Sestile, C.C., Maraschin, J.C., Rangel, M.P., Cuman, R.K.N., and Audi, E.A. (2016). Antidepressant-like Effect of Insulin in Streptozotocin-induced Type 2 Diabetes Mellitus Rats. *Basic Clin. Pharmacol. Toxicol.* 119, 243–248.
- Shan, Z., Ma, H., Xie, M., Yan, P., Guo, Y., Bao, W., Rong, Y., Jackson, C.L., Hu, F.B., and Liu, L. (2015). Sleep duration and risk of type 2 diabetes: a meta-analysis of prospective studies. *Diabetes Care* 38, 529–537.
- Sharma, S., and Fulton, S. (2013). Diet-induced obesity promotes depressive-like behaviour that is associated with neural adaptations in brain reward circuitry. *Int. J. Obes.* 37, 382.
- Sharma, A.N., Elased, K.M., and Lucot, J.B. (2012). Rosiglitazone treatment reversed depression- but not psychosis-like behavior of *db/db* diabetic mice. *J. Psychopharmacol. (Oxf.)* 26, 724–732.
- Sharp, T., and Hjorth, S. (1990). Application of brain microdialysis to study the pharmacology of the 5-HT_{1A} autoreceptor. *J. Neurosci. Methods* 34, 83–90.
- Sharp, T., Boothman, L., Raley, J., and Quéree, P. (2007). Important messages in the “post”: recent discoveries in 5-HT neurone feedback control. *Trends Pharmacol. Sci.* 28, 629–636.
- Shaskan, E.G., and Snyder, S.H. (1970). Kinetics of serotonin accumulation into slices from rat brain: relationship to catecholamine uptake. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 175, 404–418.
- Shen, C., Li, H., and Meller, E. (2002). Repeated treatment with antidepressants differentially alters 5-HT_{1A} agonist-stimulated [35S]GTP gamma S binding in rat brain regions. *Neuropharmacology* 42, 1031–1038.
- Shih, J.C., Chen, K., and Ridd, M.J. (1999). Role of MAO A and B in neurotransmitter metabolism and behavior. *Pol. J. Pharmacol.* 51, 25–29.
- Shin, A.C., Fasshauer, M., Filatova, N., Grundell, L.A., Zielinski, E., Zhou, J.-Y., Scherer, T., Lindtner, C., White, P.J., Lapworth, A.L., et al. (2014). Brain insulin lowers circulating BCAA levels by inducing hepatic BCAA catabolism. *Cell Metab.* 20, 898–909.
- Shivavedi, N., Kumar, M., Tej, G.N.V.C., and Nayak, P.K. (2017). Metformin and ascorbic acid combination therapy ameliorates type 2 diabetes mellitus and comorbid depression in rats. *Brain Res.* 1674, 1–9.
- Shopsin, B., Friedman, E., and Gershon, S. (1976). Parachlorophenylalanine reversal of tranylcypromine effects in depressed patients. *Arch. Gen. Psychiatry* 33, 811–819.
- Siddle, K. (2012). Molecular Basis of Signaling Specificity of Insulin and IGF Receptors: Neglected Corners and Recent Advances. *Front. Endocrinol.* 3.
- Silverstein, J., Cheng, P., Ruedy, K.J., Kollman, C., Beck, R.W., Klingensmith, G.J., Wood, J.R., Willi, S., Bacha, F., Lee, J., et al. (2015). Depressive Symptoms in Youth With Type 1 or Type 2 Diabetes: Results of the Pediatric Diabetes Consortium Screening Assessment of Depression in Diabetes Study. *Diabetes Care* 38, 2341–2343.
- Singh, M.K., Leslie, S.M., Packer, M.M., Zaiko, Y.V., Phillips, O.R., Weisman, E.F., Wall, D.M., Jo, B., and Rasgon, N. (2019). Brain and behavioral correlates of insulin resistance in youth with depression and obesity. *Horm. Behav.* 108, 73–83.
- Siuciak, J.A., Clark, M.S., Rind, H.B., Whittmore, S.R., and Russo, A.F. (1998). BDNF induction of tryptophan hydroxylase mRNA levels in the rat brain. *J. Neurosci. Res.* 52, 149–158.
- Skolnik, E.Y., Batzer, A., Li, N., Lee, C.H., Lowenstein, E., Mohammadi, M., Margolis, B., and Schlessinger, J. (1993). The function of GRB2 in linking the insulin receptor to Ras signaling pathways. *Science* 260, 1953–1955.
- Slaaby, R. (2015). Specific insulin/IGF1 hybrid receptor activation assay reveals IGF1 as a more potent ligand than insulin. *Sci. Rep.* 5, 7911.
- Smythe, G.A., Bradshaw, J.E., Nicholson, M.V., Grunstein, H.S., and Storlien, L.H. (1985). Rapid bidirectional effects of insulin on hypothalamic noradrenergic and serotonergic neuronal activity in the rat: role in glucose homeostasis. *Endocrinology* 117, 1590–1597.

- Soiza-Reilly, M., Meye, F.J., Olusakin, J., Telley, L., Petit, E., Chen, X., Mameli, M., Jabaudon, D., Sze, J.-Y., and Gaspar, P. (2019). SSRIs target prefrontal to raphe circuits during development modulating synaptic connectivity and emotional behavior. *Mol. Psychiatry* *24*, 726–745.
- Soliman, E., Essmat, N., Mahmoud, M.F., and Mahmoud, A.A.A. (2020). Impact of some oral hypoglycemic agents on type 2 diabetes-associated depression and reserpine-induced depression in rats: the role of brain oxidative stress and inflammation. *Naunyn. Schmiedebergs Arch. Pharmacol.* *393*, 1391–1404.
- Son, H., Yang, J.H., Kim, H.J., and Lee, D.K. (2019). A Chronic Immobilization Stress Protocol for Inducing Depression-Like Behavior in Mice. *J. Vis. Exp. JoVE*.
- Song, X., Lichti, C.F., Townsend, R.R., and Mueckler, M. (2013). Single Point Mutations Result in the Miss-Sorting of Glut4 to a Novel Membrane Compartment Associated with Stress Granule Proteins. *PLoS ONE* *8*.
- Soto, M., Cai, W., Konishi, M., and Kahn, C.R. (2019). Insulin signaling in the hippocampus and amygdala regulates metabolism and neurobehavior. *Proc. Natl. Acad. Sci.* *116*, 6379–6384.
- Sowa, J., Kusek, M., Bobula, B., Hess, G., and Tokarski, K. (2019). Ketamine Administration Reverses Corticosterone-Induced Alterations in Excitatory and Inhibitory Transmission in the Rat Dorsal Raphe Nucleus. *Neural Plast.* *2019*.
- Spanwick, D., Smith, M.A., Mirshamsi, S., Routh, V.H., and Ashford, M.L. (2000). Insulin activates ATP-sensitive K⁺ channels in hypothalamic neurons of lean, but not obese rats. *Nat. Neurosci.* *3*, 757–758.
- Sparrow, L.G., McKern, N.M., Gorman, J.J., Strike, P.M., Robinson, C.P., Bentley, J.D., and Ward, C.W. (1997). The disulfide bonds in the C-terminal domains of the human insulin receptor ectodomain. *J. Biol. Chem.* *272*, 29460–29467.
- Sprouse, J., Braselton, J., and Reynolds, L. (2000). 5-HT(1A) agonist potential of pindolol: electrophysiologic studies in the dorsal raphe nucleus and hippocampus. *Biol. Psychiatry* *47*, 1050–1055.
- Stamford, J.A., Kruk, Z.L., and Millar, J. (1990). Striatal dopamine terminals release serotonin after 5-HTP pretreatment: in vivo voltammetric data. *Brain Res.* *515*, 173–180.
- Steiner, D.F., Cunningham, D., Spigelman, L., and Aten, B. (1967). Insulin biosynthesis: evidence for a precursor. *Science* *157*, 697–700.
- Stiles, B., Wang, Y., Stahl, A., Bassilian, S., Lee, W.P., Kim, Y.-J., Sherwin, R., Devaskar, S., Lesche, R., Magnuson, M.A., et al. (2004). Liver-specific deletion of negative regulator Pten results in fatty liver and insulin hypersensitivity. *Proc. Natl. Acad. Sci.* *101*, 2082–2087.
- Stouffer, M.A., Woods, C.A., Patel, J.C., Lee, C.R., Witkovsky, P., Bao, L., Machold, R.P., Jones, K.T., de Vaca, S.C., Reith, M.E.A., et al. (2015). Insulin enhances striatal dopamine release by activating cholinergic interneurons and thereby signals reward. *Nat. Commun.* *6*, 8543.
- Stranahan, A.M., Norman, E.D., Lee, K., Cutler, R.G., Telljohann, R., Egan, J.M., and Mattson, M.P. (2008). Diet-induced insulin resistance impairs hippocampal synaptic plasticity and cognition in middle-aged rats. *Hippocampus* *18*, 1085–1088.
- Strobel, A., Gutknecht, L., Rothe, C., Reif, A., Mössner, R., Zeng, Y., Brocke, B., and Lesch, K.-P. (2003). Allelic variation in 5-HT1A receptor expression is associated with anxiety- and depression-related personality traits. *J. Neural Transm. Vienna Austria 1996* *110*, 1445–1453.
- Strubbe, J.H., and Mein, C.G. (1977). Increased feeding in response to bilateral injection of insulin antibodies in the VMH. *Physiol. Behav.* *19*, 309–313.
- Studer, B., and Knecht, S. (2016). A benefit-cost framework of motivation for a specific activity. *Prog. Brain Res.* *229*, 25–47.
- Su, W.-J., Peng, W., Gong, H., Liu, Y.-Z., Zhang, Y., Lian, Y.-J., Cao, Z.-Y., Wu, R., Liu, L.-L., Wang, B., et al. (2017). Antidiabetic drug glyburide modulates depressive-like behavior comorbid with insulin resistance. *J. Neuroinflammation* *14*, 210.
- Sukhov, I.B., Lebedeva, M.F., Zakharova, I.O., Derkach, K.V., Bayunova, L.V., Zorina, I.I., Avrova, N.F., and Shpakov, A.O. (2020). Intranasal Administration of Insulin and Gangliosides Improves Spatial Memory in Rats with Neonatal Type 2 Diabetes Mellitus. *Bull. Exp. Biol. Med.* *168*, 317–320.
- Sun, C., Zhang, F., Ge, X., Yan, T., Chen, X., Shi, X., and Zhai, Q. (2007). SIRT1 improves insulin sensitivity under insulin-resistant conditions by repressing PTP1B. *Cell Metab.* *6*, 307–319.

- Sun, X.J., Miralpeix, M., Myers, M.G., Glasheen, E.M., Backer, J.M., Kahn, C.R., and White, M.F. (1992). Expression and function of IRS-1 in insulin signal transmission. *J. Biol. Chem.* *267*, 22662–22672.
- Sun, X.J., Wang, L.M., Zhang, Y., Yenush, L., Myers, M.G., Glasheen, E., Lane, W.S., Pierce, J.H., and White, M.F. (1995). Role of IRS-2 in insulin and cytokine signalling. *Nature* *377*, 173–177.
- Sur, C., Betz, H., and Schloss, P. (1996). Immunocytochemical detection of the serotonin transporter in rat brain. *Neuroscience* *73*, 217–231.
- Surwit, R.S., Kuhn, C.M., Cochrane, C., McCubbin, J.A., and Feinglos, M.N. (1988). Diet-induced type II diabetes in C57BL/6J mice. *Diabetes* *37*, 1163–1167.
- Svenningsson, P., Chergui, K., Rachleff, I., Flajolet, M., Zhang, X., El Yacoubi, M., Vaugeois, J.-M., Nomikos, G.G., and Greengard, P. (2006). Alterations in 5-HT_{1B} receptor function by p11 in depression-like states. *Science* *311*, 77–80.
- Szmulowicz, E.D., Josefson, J.L., and Metzger, B.E. (2019). Gestational Diabetes Mellitus. *Endocrinol. Metab. Clin. North Am.* *48*, 479–493.
- Taché, Y., Yang, H., and Kaneko, H. (1995). Caudal raphe-dorsal vagal complex peptidergic projections: role in gastric vagal control. *Peptides* *16*, 431–435.
- Takahashi, T., Kobayashi, T., Ozaki, M., Takamatsu, Y., Ogai, Y., Ohta, M., Yamamoto, H., and Ikeda, K. (2006). G protein-activated inwardly rectifying K⁺ channel inhibition and rescue of weaver mouse motor functions by antidepressants. *Neurosci. Res.* *54*, 104–111.
- Takano, A., Arakawa, R., Hayashi, M., Takahashi, H., Ito, H., and Suhara, T. (2007). Relationship between neuroticism personality trait and serotonin transporter binding. *Biol. Psychiatry* *62*, 588–592.
- Tamir, H., and Gershon, M.D. (1990). Serotonin-storing secretory vesicles. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* *600*, 53–66; discussion 67.
- Tan, K., Kimber, W.A., Luan, J., Soos, M.A., Semple, R.K., Wareham, N.J., O’Rahilly, S., and Barroso, I. (2007). Analysis of genetic variation in Akt2/PKB-beta in severe insulin resistance, lipodystrophy, type 2 diabetes, and related metabolic phenotypes. *Diabetes* *56*, 714–719.
- Tangvarasittichai, S. (2015). Oxidative stress, insulin resistance, dyslipidemia and type 2 diabetes mellitus. *World J. Diabetes* *6*, 456–480.
- Taniguchi, C.M., Emanuelli, B., and Kahn, C.R. (2006). Critical nodes in signalling pathways: insights into insulin action. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* *7*, 85–96.
- Taylor, S.I., Accili, D., Cama, A., Kadowaki, H., Kadowaki, T., Imano, E., and Sierra, M.L. (1991). Mutations in the insulin receptor gene in patients with genetic syndromes of insulin resistance. *Adv. Exp. Med. Biol.* *293*, 197–213.
- Teissier, A., Chemiakine, A., Inbar, B., Bagchi, S., Ray, R.S., Palmiter, R.D., Dymecki, S.M., Moore, H., and Ansoorge, M.S. (2015). Activity of Raphé Serotonergic Neurons Controls Emotional Behaviors. *Cell Rep.* *13*, 1965–1976.
- Teruel, T., Hernandez, R., and Lorenzo, M. (2001). Ceramide mediates insulin resistance by tumor necrosis factor- α in brown adipocytes by maintaining Akt in an inactive dephosphorylated state. *Diabetes* *50*, 2563–2571.
- Thomas, D.R., Nelson, D.R., and Johnson, A.M. (1987). Biochemical effects of the antidepressant paroxetine, a specific 5-hydroxytryptamine uptake inhibitor. *Psychopharmacology (Berl.)* *93*, 193–200.
- Tiedemann, L.J., Schmid, S.M., Hettel, J., Giesen, K., Francke, P., Büchel, C., and Brassens, S. (2017). Central insulin modulates food valuation via mesolimbic pathways. *Nat. Commun.* *8*.
- Timonen, M., Laakso, M., Jokelainen, J., Rajala, U., Meyer-Rochow, V.B., and Keinänen-Kiukaanniemi, S. (2005). Insulin resistance and depression: cross sectional study. *BMJ* *330*, 17–18.
- Timonen, M., Rajala, U., Jokelainen, J., Keinänen-Kiukaanniemi, S., Meyer-Rochow, V.B., and Räsänen, P. (2006). Depressive symptoms and insulin resistance in young adult males: results from the Northern Finland 1966 birth cohort. *Mol. Psychiatry* *11*, 929–933.
- Tomilov, A.A., Ramsey, J.J., Hagopian, K., Giorgio, M., Kim, K.M., Lam, A., Migliaccio, E., Lloyd, K.C., Berniakovich, I., Prolla, T.A., et al. (2011). The Shc locus regulates insulin signaling and adiposity in mammals. *Aging Cell* *10*, 55–65.

- Torabi, N., Noursadeghi, E., Shayanfar, F., Nazari, M., Fahanik-Babaei, J., Saghiri, R., Khodaghali, F., and Eliassi, A. (2021). Intranasal insulin improves the structure-function of the brain mitochondrial ATP-sensitive Ca²⁺ activated potassium channel and respiratory chain activities under diabetic conditions. *Biochim. Biophys. Acta Mol. Basis Dis.* *1867*, 166075.
- Törk, I. (1990). Anatomy of the serotonergic system. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* *600*, 9–34; discussion 34–35.
- Travagli, R.A., and Anselmi, L. (2016). Vagal neurocircuitry and its influence on gastric motility. *Nat. Rev. Gastroenterol. Hepatol.* *13*, 389–401.
- Trivedi, M.H., Rush, A.J., Wisniewski, S.R., Nierenberg, A.A., Warden, D., Ritz, L., Norquist, G., Howland, R.H., Lebowitz, B., McGrath, P.J., et al. (2006). Evaluation of Outcomes With Citalopram for Depression Using Measurement-Based Care in STAR*D: Implications for Clinical Practice. *Am. J. Psychiatry* *163*, 28–40.
- Trujillo, M.E., and Scherer, P.E. (2005). Adiponectin--journey from an adipocyte secretory protein to biomarker of the metabolic syndrome. *J. Intern. Med.* *257*, 167–175.
- Trulsson, M.E., and Jacobs, B.L. (1979). Raphe unit activity in freely moving cats: correlation with level of behavioral arousal. *Brain Res.* *163*, 135–150.
- Tsuneki, H., Tokai, E., Sugawara, C., Wada, T., Sakurai, T., and Sasaoka, T. (2013). Hypothalamic orexin prevents hepatic insulin resistance induced by social defeat stress in mice. *Neuropeptides* *47*, 213–219.
- Tuominen, L., Miettunen, J., Cannon, D.M., Drevets, W.C., Frokjaer, V.G., Hirvonen, J., Ichise, M., Jensen, P.S., Keltikangas-Järvinen, L., Klaver, J.M., et al. (2017). Neuroticism Associates with Cerebral in Vivo Serotonin Transporter Binding Differently in Males and Females. *Int. J. Neuropsychopharmacol.* *20*, 963–970.
- Ueki, K., Kondo, T., and Kahn, C.R. (2004). Suppressor of cytokine signaling 1 (SOCS-1) and SOCS-3 cause insulin resistance through inhibition of tyrosine phosphorylation of insulin receptor substrate proteins by discrete mechanisms. *Mol. Cell. Biol.* *24*, 5434–5446.
- Ullrich, A., Bell, J.R., Chen, E.Y., Herrera, R., Petruzzelli, L.M., Dull, T.J., Gray, A., Coussens, L., Liao, Y.C., and Tsubokawa, M. (1985). Human insulin receptor and its relationship to the tyrosine kinase family of oncogenes. *Nature* *313*, 756–761.
- Ullrich, A., Gray, A., Tam, A.W., Yang-Feng, T., Tsubokawa, M., Collins, C., Henzel, W., Le Bon, T., Kathuria, S., and Chen, E. (1986). Insulin-like growth factor I receptor primary structure: comparison with insulin receptor suggests structural determinants that define functional specificity. *EMBO J.* *5*, 2503–2512.
- Urban, D.J., Zhu, H., Marcinkiewicz, C.A., Michaelides, M., Oshibuchi, H., Rhea, D., Aryal, D.K., Farrell, M.S., Lowery-Gionta, E., Olsen, R.H.J., et al. (2016). Elucidation of The Behavioral Program and Neuronal Network Encoded by Dorsal Raphe Serotonergic Neurons. *Neuropsychopharmacol. Off. Publ. Am. Coll. Neuropsychopharmacol.* *41*, 1404–1415.
- Vaag, A., Henriksen, J.E., and Beck-Nielsen, H. (1992). Decreased insulin activation of glycogen synthase in skeletal muscles in young nonobese Caucasian first-degree relatives of patients with non-insulin-dependent diabetes mellitus. *J. Clin. Invest.* *89*, 782–788.
- Vadodaria, K.C., Ji, Y., Skime, M., Paquola, A.C., Nelson, T., Hall-Flavin, D., Heard, K.J., Fredlender, C., Deng, Y., Elkins, J., et al. (2019a). Altered serotonergic circuitry in SSRI-resistant major depressive disorder patient-derived neurons. *Mol. Psychiatry* *24*, 808–818.
- Vadodaria, K.C., Ji, Y., Skime, M., Paquola, A., Nelson, T., Hall-Flavin, D., Fredlender, C., Heard, K.J., Deng, Y., Le, A.T., et al. (2019b). Serotonin-induced hyperactivity in SSRI-resistant major depressive disorder patient-derived neurons. *Mol. Psychiatry* *24*, 795–807.
- Valenciano, A.I., Corrochano, S., de Pablo, F., de la Villa, P., and de la Rosa, E.J. (2006). Proinsulin/insulin is synthesized locally and prevents caspase- and cathepsin-mediated cell death in the embryonic mouse retina. *J. Neurochem.* *99*, 524–536.
- Vancampfort, D., Mitchell, A.J., De Hert, M., Sienaert, P., Probst, M., Buys, R., and Stubbs, B. (2015). TYPE 2 DIABETES IN PATIENTS WITH MAJOR DEPRESSIVE DISORDER: A META-ANALYSIS OF PREVALENCE ESTIMATES AND PREDICTORS: Review: Depression and Diabetes. *Depress. Anxiety* *32*, 763–773.
- Vandermaelen, C.P., and Aghajanian, G.K. (1983). Electrophysiological and pharmacological characterization of serotonergic dorsal raphe neurons recorded extracellularly and intracellularly in rat brain slices. *Brain Res.* *289*, 109–119.

- van der Veen, F.M., Evers, E.A.T., Deutz, N.E.P., and Schmitt, J.A.J. (2007). Effects of acute tryptophan depletion on mood and facial emotion perception related brain activation and performance in healthy women with and without a family history of depression. *Neuropsychopharmacol. Off. Publ. Am. Coll. Neuropsychopharmacol.* *32*, 216–224.
- Versteyhe, S., Blanquart, C., Hampe, C., Mahmood, S., Christeff, N., De Meyts, P., Gray, S.G., and Issad, T. (2010). Insulin receptor substrates-5 and -6 are poor substrates for the insulin receptor. *Mol. Med. Rep.* *3*, 189–193.
- Vertes, R.P. (1991). A PHA-L analysis of ascending projections of the dorsal raphe nucleus in the rat. *J. Comp. Neurol.* *313*, 643–668.
- Vetiska, S.M., Ahmadian, G., Ju, W., Liu, L., Wymann, M.P., and Wang, Y.T. (2007). GABAA receptor-associated phosphoinositide 3-kinase is required for insulin-induced recruitment of postsynaptic GABAA receptors. *Neuropharmacology* *52*, 146–155.
- Vollenweider, F.X., and Preller, K.H. (2020). Psychedelic drugs: neurobiology and potential for treatment of psychiatric disorders. *Nat. Rev. Neurosci.* *21*, 611–624.
- van de Vondervoort, I.I.G.M., Amiri, H., Bruchhage, M.M.K., Oomen, C.A., Rustogi, N., Cooper, J.D., van Asten, J.J.A., Heerschap, A., Bahn, S., Williams, S.C.R., et al. (2019). Converging evidence points towards a role of insulin signaling in regulating compulsive behavior. *Transl. Psychiatry* *9*, 225.
- Wahlqvist, M.L., Lee, M.-S., Chuang, S.-Y., Hsu, C.-C., Tsai, H.-N., Yu, S.-H., and Chang, H.-Y. (2012). Increased risk of affective disorders in type 2 diabetes is minimized by sulfonylurea and metformin combination: a population-based cohort study. *BMC Med.* *10*, 150.
- Waider, J., Popp, S., Lange, M.D., Kern, R., Kolter, J.F., Kobler, J., Donner, N.C., Lowe, K.R., Malzbender, J.H., Brazell, C.J., et al. (2017). Genetically driven brain serotonin deficiency facilitates panic-like escape behavior in mice. *Transl. Psychiatry* *7*, e1246.
- Waider, J., Popp, S., Mlinar, B., Montalbano, A., Bonfiglio, F., Aboagye, B., Thuy, E., Kern, R., Thiel, C., Araragi, N., et al. (2019). Serotonin Deficiency Increases Context-Dependent Fear Learning Through Modulation of Hippocampal Activity. *Front. Neurosci.* *13*.
- Wakabayashi, T., Yamaguchi, K., Matsui, K., Sano, T., Kubota, T., Hashimoto, T., Mano, A., Yamada, K., Matsuo, Y., Kubota, N., et al. (2019). Differential effects of diet- and genetically-induced brain insulin resistance on amyloid pathology in a mouse model of Alzheimer's disease. *Mol. Neurodegener.* *14*, 15.
- Walf, A.A., and Frye, C.A. (2007). The use of the elevated plus maze as an assay of anxiety-related behavior in rodents. *Nat. Protoc.* *2*, 322–328.
- Walsh, R.N., and Cummins, R.A. (1976). The Open-Field Test: a critical review. *Psychol. Bull.* *83*, 482–504.
- Walther, D.J., and Bader, M. (2003). A unique central tryptophan hydroxylase isoform. *Biochem. Pharmacol.* *66*, 1673–1680.
- Wan, J., Peng, W., Li, X., Qian, T., Song, K., Zeng, J., Deng, F., Hao, S., Feng, J., Zhang, P., et al. (2021). A genetically encoded sensor for measuring serotonin dynamics. *Nat. Neurosci.*
- Wan, Q., Xiong, Z.G., Man, H.Y., Ackerley, C.A., Branton, J., Lu, W.Y., Becker, L.E., MacDonald, J.F., and Wang, Y.T. (1997). Recruitment of functional GABA(A) receptors to postsynaptic domains by insulin. *Nature* *388*, 686–690.
- Wandel, S., Schurmann, A., Becker, W., Summers, S.A., Shanahan, M.F., and Joost, H.G. (1995). Mutation of two conserved arginine residues in the glucose transporter GLUT4 suppresses transport activity, but not glucose-inhibitable binding of inhibitory ligands. *Naunyn. Schmiedebergs Arch. Pharmacol.* *353*, 36–41.
- Warden, M.R., Selimbeyoglu, A., Mirzabekov, J.J., Lo, M., Thompson, K.R., Kim, S.-Y., Adhikari, A., Tye, K.M., Frank, L.M., and Deisseroth, K. (2012). A prefrontal cortex-brainstem neuronal projection that controls response to behavioural challenge. *Nature* *492*, 428–432.
- Watson, K.T., Simard, J.F., Henderson, V.W., Nutkiewicz, L., Lamers, F., Rasgon, N., and Penninx, B. (2021). Association of Insulin Resistance With Depression Severity and Remission Status: Defining a Metabolic Endophenotype of Depression. *JAMA Psychiatry* *78*, 439–441.

- Wegener, G., Bandpey, Z., Heiberg, I.L., Mørk, A., and Rosenberg, R. (2003). Increased extracellular serotonin level in rat hippocampus induced by chronic citalopram is augmented by subchronic lithium: neurochemical and behavioural studies in the rat. *Psychopharmacology (Berl.)* 166, 188–194.
- Weina, H., Yuhu, N., Christian, H., Birong, L., Feiyu, S., and Le, W. (2018). Liraglutide attenuates the depressive- and anxiety-like behaviour in the corticosterone induced depression model via improving hippocampal neural plasticity. *Brain Res.* 1694, 55–62.
- Weissman, D.G., Lambert, H.K., Rodman, A.M., Peverill, M., Sheridan, M.A., and McLaughlin, K.A. (2020). Reduced hippocampal and amygdala volume as a mechanism underlying stress sensitization to depression following childhood trauma. *Depress. Anxiety* 37, 916–925.
- West, I.C. (2000). Radicals and oxidative stress in diabetes. *Diabet. Med. J. Br. Diabet. Assoc.* 17, 171–180.
- Whalen, P.J., Rauch, S.L., Etcoff, N.L., McInerney, S.C., Lee, M.B., and Jenike, M.A. (1998). Masked presentations of emotional facial expressions modulate amygdala activity without explicit knowledge. *J. Neurosci. Off. J. Soc. Neurosci.* 18, 411–418.
- White, M.F. (2002). IRS proteins and the common path to diabetes. *Am. J. Physiol. Endocrinol. Metab.* 283, E413–422.
- Williams, I.M., Valenzuela, F.A., Kahl, S.D., Ramkrishna, D., Mezo, A.R., Young, J.D., Wells, K.S., and Wasserman, D.H. (2018). Insulin exits skeletal muscle capillaries by fluid-phase transport. *J. Clin. Invest.* 128, 699–714.
- Williams, K.W., Margatho, L.O., Lee, C.E., Choi, M., Lee, S., Scott, M.M., Elias, C.F., and Elmquist, J.K. (2010). Segregation of acute leptin and insulin effects in distinct populations of arcuate proopiomelanocortin neurons. *J. Neurosci. Off. J. Soc. Neurosci.* 30, 2472–2479.
- Willner, P. (1984). The validity of animal models of depression. *Psychopharmacology (Berl.)* 83, 1–16.
- Withers, D.J., Gutierrez, J.S., Towery, H., Burks, D.J., Ren, J.M., Previs, S., Zhang, Y., Bernal, D., Pons, S., Shulman, G.I., et al. (1998). Disruption of IRS-2 causes type 2 diabetes in mice. *Nature* 391, 900–904.
- Woo, Y.S., McIntyre, R.S., Kim, J.-B., Lee, M.-S., Kim, J.-M., Yim, H.W., and Jun, T.-Y. (2016). Association of treatment response with obesity and other metabolic risk factors in adults with depressive disorders: Results from a National Depression Cohort study in Korea (the CRESCEND study). *J. Affect. Disord.* 203, 190–198.
- Woods, S.C., Lotter, E.C., McKay, L.D., and Porte, D. (1979). Chronic intracerebroventricular infusion of insulin reduces food intake and body weight of baboons. *Nature* 282, 503–505.
- Wu, J., Kramer, G.L., Kram, M., Steciuk, M., Crawford, I.L., and Petty, F. (1999). Serotonin and learned helplessness: a regional study of 5-HT_{1A}, 5-HT_{2A} receptors and the serotonin transport site in rat brain. *J. Psychiatr. Res.* 33, 17–22.
- Xaio, H., Banks, W.A., Niehoff, M.L., and Morley, J.E. (2001). Effect of LPS on the permeability of the blood-brain barrier to insulin. *Brain Res.* 896, 36–42.
- Xia, G., Han, Y., Meng, F., He, Y., Srisai, D., Farias, M., Dang, M., Palmiter, R.D., Xu, Y., and Wu, Q. (2021). Reciprocal control of obesity and anxiety-depressive disorder via a GABA and serotonin neural circuit. *Mol. Psychiatry*.
- Xia, J., He, Q., Li, Y., Xie, D., Zhu, S., Chen, J., Shen, Y., Zhang, N., Wei, Y., Chen, C., et al. (2011). The relationship between neuroticism, major depressive disorder and comorbid disorders in Chinese women. *J. Affect. Disord.* 135, 100–105.
- Xia, P., Inoguchi, T., Kern, T.S., Engerman, R.L., Oates, P.J., and King, G.L. (1994). Characterization of the mechanism for the chronic activation of diacylglycerol-protein kinase C pathway in diabetes and hypergalactosemia. *Diabetes* 43, 1122–1129.
- Xiao, C., Dash, S., Stahel, P., and Lewis, G.F. (2018). Effects of intranasal insulin on endogenous glucose production in insulin-resistant men. *Diabetes Obes. Metab.* 20, 1751–1754.
- Xue, X., Shao, S., Li, M., Shao, F., and Wang, W. (2013). Maternal separation induces alterations of serotonergic system in different aged rats. *Brain Res. Bull.* 95, 15–20.

- Yamamoto, R., Hatano, N., Sugai, T., and Kato, N. (2014). Serotonin induces depolarization in lateral amygdala neurons by activation of TRPC-like current and inhibition of GIRK current depending on 5-HT_{2C} receptor. *Neuropharmacology* 82, 49–58.
- Yang, H., Wang, C., Ji, G., Feng, Z., Duan, J., Chen, F., Zhou, X.J., Shi, Y., and Xie, H. (2019). Aberrant interhemispheric functional connectivity in first-episode, drug-naïve major depressive disorder. *Brain Imaging Behav.* 13, 1302–1310.
- Yang, J.L., Liu, D.X., Jiang, H., Pan, F., Ho, C.S., and Ho, R.C. (2016a). The Effects of High-fat-diet Combined with Chronic Unpredictable Mild Stress on Depression-like Behavior and Leptin/LepRb in Male Rats. *Sci. Rep.* 6.
- Yang, L., Zhang, J., Xing, W., Zhang, X., Xu, J., Zhang, H., Chen, L., Ning, X., Ji, G., Li, J., et al. (2016b). SIRT3 Deficiency Induces Endothelial Insulin Resistance and Blunts Endothelial-Dependent Vasorelaxation in Mice and Human with Obesity. *Sci. Rep.* 6, 23366.
- Yau, S.Y., Li, A., Hoo, R.L.C., Ching, Y.P., Christie, B.R., Lee, T.M.C., Xu, A., and So, K.-F. (2014). Physical exercise-induced hippocampal neurogenesis and antidepressant effects are mediated by the adipocyte hormone adiponectin. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 111, 15810–15815.
- Yoon, H.-K., and Kim, Y.-K. (2009). TPH2 -703G/T SNP may have important effect on susceptibility to suicidal behavior in major depression. *Prog. Neuropsychopharmacol. Biol. Psychiatry* 33, 403–409.
- Young, W.S. (1986). Periventricular hypothalamic cells in the rat brain contain insulin mRNA. *Neuropeptides* 8, 93–97.
- Yu, C., Chen, Y., Cline, G.W., Zhang, D., Zong, H., Wang, Y., Bergeron, R., Kim, J.K., Cushman, S.W., Cooney, G.J., et al. (2002). Mechanism by which fatty acids inhibit insulin activation of insulin receptor substrate-1 (IRS-1)-associated phosphatidylinositol 3-kinase activity in muscle. *J. Biol. Chem.* 277, 50230–50236.
- Yuan, M., Konstantopoulos, N., Lee, J., Hansen, L., Li, Z.W., Karin, M., and Shoelson, S.E. (2001). Reversal of obesity- and diet-induced insulin resistance with salicylates or targeted disruption of Ikkbeta. *Science* 293, 1673–1677.
- Zanardi, R., Benedetti, F., Di Bella, D., Catalano, M., and Smeraldi, E. (2000). Efficacy of paroxetine in depression is influenced by a functional polymorphism within the promoter of the serotonin transporter gene. *J. Clin. Psychopharmacol.* 20, 105–107.
- Zanoveli, J.M., Carvalho, M.C., Cunha, J.M., and Brandão, M.L. (2009). Extracellular serotonin level in the basolateral nucleus of the amygdala and dorsal periaqueductal gray under unconditioned and conditioned fear states: an in vivo microdialysis study. *Brain Res.* 1294, 106–115.
- Zawoiski, E.J. (1967). Gastric secretory response of the unrestrained cat following electrical stimulation of the hypothalamus, amygdala, and basal ganglia. *Exp. Neurol.* 17, 128–139.
- Zeinoddini, A., Sorayani, M., Hassanzadeh, E., Arbabi, M., Farokhnia, M., Salimi, S., Ghaleiha, A., and Akhondzadeh, S. (2015). PIOTITAZONE ADJUNCTIVE THERAPY FOR DEPRESSIVE EPISODE OF BIPOLAR DISORDER: A RANDOMIZED, DOUBLE-BLIND, PLACEBO-CONTROLLED TRIAL: Research Article: Pioglitazone for Bipolar Depression. *Depress. Anxiety* 32, 167–173.
- Zemdegs, J., Quesseveur, G., Jarriault, D., Pénicaud, L., Fioramonti, X., and Guiard, B.P. (2016). High-fat diet-induced metabolic disorders impairs 5-HT function and anxiety-like behavior in mice. *Br. J. Pharmacol.* 173, 2095–2110.
- Zemdegs, J., Martin, H., Pintana, H., Bullich, S., Manta, S., Marqués, M.A., Moro, C., Layé, S., Ducrocq, F., and Chattipakorn, N. (2019). Metformin promotes anxiolytic and antidepressant-like responses in insulin-resistant mice by decreasing circulating branched-chain amino acids. *J. Neurosci.* 39, 5935–5948.
- Zeng, M.Y., Inohara, N., and Nuñez, G. (2017). Mechanisms of inflammation-driven bacterial dysbiosis in the gut. *Mucosal Immunol.* 10, 18–26.
- Zhang, B., and Roth, R.A. (1991). A region of the insulin receptor important for ligand binding (residues 450-601) is recognized by patients' autoimmune antibodies and inhibitory monoclonal antibodies. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 88, 9858–9862.
- Zhang, A., Yang, C., Li, G., Wang, Y., Liu, P., Liu, Z., Sun, N., and Zhang, K. (2020). Functional connectivity of the prefrontal cortex and amygdala is related to depression status in major depressive disorder. *J. Affect. Disord.* 274, 897–902.

- Zhang, H., Hao, Y., Manor, B., Novak, P., Milberg, W., Zhang, J., Fang, J., and Novak, V. (2015a). Intranasal Insulin Enhanced Resting-State Functional Connectivity of Hippocampal Regions in Type 2 Diabetes. *Diabetes* *64*, 1025–1034.
- Zhang, J., Fan, Y., Li, Y., Zhu, H., Wang, L., and Zhu, M.-Y. (2012). Chronic social defeat up-regulates expression of the serotonin transporter in rat dorsal raphe nucleus and projection regions in a glucocorticoid-dependent manner. *J. Neurochem.* *123*, 1054–1068.
- Zhang, X., Zhang, G., Zhang, H., Karin, M., Bai, H., and Cai, D. (2008). Hypothalamic IKKbeta/NF-kappaB and ER stress link overnutrition to energy imbalance and obesity. *Cell* *135*, 61–73.
- Zhang, Y., Chang, Z., Chen, J., Ling, Y., Liu, X., Feng, Z., Chen, C., Xia, M., Zhao, X., Ying, W., et al. (2015b). Methylation of the tryptophan hydroxylase-2 gene is associated with mRNA expression in patients with major depression with suicide attempts. *Mol. Med. Rep.* *12*, 3184–3190.
- Zhao, F., Siu, J.J., Huang, W., Askwith, C., and Cao, L. (2019). Insulin Modulates Excitatory Synaptic Transmission and Synaptic Plasticity in the Mouse Hippocampus. *Neuroscience* *411*, 237–254.
- Zhao, Q., Wu, X., Yan, S., Xie, X., Fan, Y., Zhang, J., Peng, C., and You, Z. (2016). The antidepressant-like effects of pioglitazone in a chronic mild stress mouse model are associated with PPAR γ -mediated alteration of microglial activation phenotypes. *J. Neuroinflammation* *13*, 259.
- Zhao, Z.-Q., Scott, M., Chiechio, S., Wang, J.-S., Renner, K.J., Gereau, R.W., Johnson, R.L., Deneris, E.S., and Chen, Z.-F. (2006). *Lmx1b* Is Required for Maintenance of Central Serotonergic Neurons and Mice Lacking Central Serotonergic System Exhibit Normal Locomotor Activity. *J. Neurosci.* *26*, 12781–12788.
- Zhou, Q., Xiao, M., and Nicoll, R.A. (2001). Contribution of cytoskeleton to the internalization of AMPA receptors. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *98*, 1261–1266.
- Ziegler, A.N., Schneider, J.S., Qin, M., Tyler, W.A., Pintar, J.E., Fraidenraich, D., Wood, T.L., and Levison, S.W. (2012). IGF-II Promotes Stemness of Neural Restricted Precursors. *Stem Cells Dayt. Ohio* *30*, 1265–1276.
- Zill, P., Büttner, A., Eisenmenger, W., Möller, H.-J., Ackenheil, M., and Bondy, B. (2007). Analysis of tryptophan hydroxylase I and II mRNA expression in the human brain: a post-mortem study. *J. Psychiatr. Res.* *41*, 168–173.
- Zoicas, I., Huber, S.E., Kalinichenko, L.S., Gulbins, E., Müller, C.P., and Kornhuber, J. (2020). Ceramides affect alcohol consumption and depressive-like and anxiety-like behavior in a brain region- and ceramide species-specific way in male mice. *Addict. Biol.* *25*, e12847.

Annexes

ANNEXE I:

TABLEAU STATISTIQUE

Data	Statistical analysis	n	Outcome measure	p value
Figure 27				
27.C	One sample test vs 100 (#)	aCSF/insulin: 12 PPP/insulin: 11 S961/insulin: 13	DR 5-HT Firing frequency from baseline	aCSF/insulin: p=0,0119 PPP/insulin: p=0,0103 S961/insulin: p=0,6833
27.C	One-way ANOVA (\$)			F (2,33)= 6,936; p=0,0031 Tuckey's multiple comparisons test aCSF vs PPP: p=0,0507 aCSF vs S961: p=0,0025
27.D	Paired t-test	Before/after insulin: 12	sEPSC	t=0,9669; p=0,3544

27.E	Wilcoxon matched-pairs signed rank test	Before/after insulin: 12	sIPSC	W=0,000; p>0,9999
27.F	Paired t-test	Before/after insulin: 12	DR 5-HT firing frequency	t=2,522; p=0,0284
27.G	Paired t-test	Before/after insulin: 11	DR 5-HT firing frequency	t=3,204; p=0,0094
27.H	Wilcoxon matched-pairs signed rank test	Before/after insulin: 13	DR 5-HT firing frequency	W=-25,00; p=0,4041
Figure 28				
28.B	One sample test vs 100 (#)	Insulin: 4 WAY- 100635: 4	Extracellular 5- HT	Insulin: p=0,0003 WAY-100635; p=0,0889
28.C	T-test	Insulin: 4 WAY- 100635: 4	AUC of extracellular 5-HT	t=3,615; p=0,0068
Figure 29	Wilcoxon matched-pairs signed rank test	Before/after WAY100635: 10	DR 5-HT firing frequency	W=-4,000; p=0,8125
Figure 30				
30.A	Two-way RM ANOVA	Veh: 6 INI 4IU: 6	Food intake after fasting- refeeding	F (2,20)=1,0807; p=0,3562

30.B	Two-way RM ANOVA	Veh: 6 INI 2IU: 6	Fasting glycemia	F (4,40)=0,8293; p=0,5145
Figure 31				
31.A	T-test	Veh: 7 INI 2IU: 7	5-HT content in amygdala	t=2,163; p=0,0514
31.B	T-test	Veh: 6 INI 2IU: 7	5-HT content in NAc	t=2,317; p=0,0408
31.C	T-test	Veh: 7 INI 2IU: 6	5-HT content in PFC	t=1,142; p=0,2778
31.D	T-test	Veh: 7 INI 2IU: 6	5-HT content in vHIP	t=1,633; p=0,1307
31.E	T-test	Veh: 7 INI 2IU: 6	5-HT content in DRN	t=1,521; p=0,1564
Figure 32				
32.A	T-test	Veh: 9 INI 2IU: 9	OF: time in center	t=3,310; p=0,0044
32.A	T-test	Veh: 9 INI 2IU: 9	OF: total distance	t=0,6055; p=0,5534
32.B	Two-way ANOVA	Veh: 9 INI 2IU: 9	EPM: time in open arms	F (1, 40)=7,873; p=0,0077

				Sidak's multiple comparisons test (Veh vs INI 2IU) : control, p=0,0388 PCPA, p=0,2382
Figure 35				
35.A	Paired t-test	Before/after insulin: 15	DR 5-HT firing frequency	t=0,9890 ; p=0,3395
35.B	T-test	Veh: 11 INI 2IU: 12	EPM: time in open arms	t=0,2742; p=0,7866
35.B	T-test	Veh: 14 INI 2IU: 14	OF: time in center	t=0,1523; p=0,8801
35.B	T-test	Veh: 14 INI 2IU: 14	OF: total distance	t=0,6409; p=0,5272
Figure 36				
36.C	One-way ANOVA	STD-Veh HFD-Veh HFD-MetF	Body weight	F (2,27)=49,57; p<0,0001 Tukey's multiple comparisons test: STD-Veh vs HFD-Veh: p<0,0001

				<p>STD-Veh vs HFD-MetF: p<0,0001</p> <p>HFD-Veh vs HFD-MetF, p=0,0288</p>
36.D	One-way ANOVA	<p>STD-Veh: 10 HFD-Veh: 8 HFD-MetF: 9</p>	Fasting glycemia	<p>F (2,24)=23,94; p<0,0001</p> <p>Tukey's multiple comparisons test:</p> <p>STD-Veh vs HFD-Veh: p<0,0001</p> <p>STD-Veh vs HFD-MetF: p=0,1678</p> <p>HFD-Veh vs HFD-MetF, p<0,0001</p>
36.E	One-way ANOVA	<p>STD-Veh: 9 HFD-Veh: 7 HFD-MetF: 8</p>	Fasting insulinemia	<p>F (2,21)=10,11; p=0,0008</p> <p>Tukey's multiple comparisons test:</p> <p>STD-Veh vs HFD-Veh: p=0,0006</p> <p>STD-Veh vs HFD-MetF: p=0,0509</p>

				HFD-Veh vs HFD-MetF, p=0,1398
36.F	Two-way RM ANOVA	STD-Veh: 10 HFD-Veh: 8 HFD-MetF: 9	ipGTT	F (8,96)=4,474; p=0,0001 Tukey's multiple comparisons test: STD-Veh vs HFD-Veh: p<0,0001 STD-Veh vs HFD-MetF: p=0,9840 HFD-Veh vs HFD-MetF, p<0,0001
36.F	One-way ANOVA	STD-Veh: 10 HFD-Veh: 8 HFD-MetF: 9	AUC ipGTT	F (2,24)=14,75; p<0,0001 Tukey's multiple comparisons test: STD-Veh vs HFD-Veh: p=0,0002 STD-Veh vs HFD-MetF: p=0,9998 HFD-Veh vs HFD-MetF, p=0,0002

Figure 37

37.A	One-way ANOVA	STD-Veh: 10 HFD-Veh: 9 HFD-MetF: 10	OF: time in center	F (2,26)=4,174; p=0,0268 Tukey's multiple comparisons test: STD-Veh vs HFD-Veh: p=0,0206 STD-Veh vs HFD-MetF: p=0,2840 HFD-Veh vs HFD-MetF, p=0,3691
37.B	One-way ANOVA	STD-Veh: 10 HFD-Veh: 9 HFD-MetF: 10	OF: total distance	F (2,26)=1,381; p=0,2691
37.C	One-way ANOVA	STD-Veh: 10 HFD-Veh: 9 HFD-MetF: 10	EPM: time in open arms	F (2,26)=5,810; p=0,0268 Tukey's multiple comparisons test: STD-Veh vs HFD-Veh: p=0,0064 STD-Veh vs HFD-MetF: p=0,4695

				HFD-Veh vs HFD-MetF, p=0,0880
37.D	One-way ANOVA	STD-Veh: 10 HFD-Veh: 10 HFD-MetF: 10	NSF: latency to feed	F (2,27)=27,33; p<0,0001 Tukey's multiple comparisons test: STD-Veh vs HFD-Veh: p<0,0001 STD-Veh vs HFD-MetF: p=0,0029 HFD-Veh vs HFD-MetF, p=0,0027
37.E	One-way ANOVA	STD-Veh: 9 HFD-Veh: 9 HFD-MetF: 10	ST: time of grooming	F (2,25)=5,527; p=0,0103 Tukey's multiple comparisons test: STD-Veh vs HFD-Veh: p=0,0097 STD-Veh vs HFD-MetF: p=0,0637 HFD-Veh vs HFD-MetF, p=0,6307

37.F	One-way ANOVA	STD-Veh: 10 HFD-Veh: 10 HFD-MetF: 10	TST: Immobility time	F (2,27)=5,255; p=0,0118 Tukey's multiple comparisons test: STD-Veh vs HFD-Veh: p=0,6058 STD-Veh vs HFD-MetF: p=0,0104 HFD-Veh vs HFD-MetF, p=0,0895
Figure 38				
38.B	One-way ANOVA	STD-Veh: 20 HFD-Veh: 20 HFD-MetF: 20	DR 5-HT input resistance	F (2,57)=751,1; p<0,0001 Tukey's multiple comparisons test: STD-Veh vs HFD-Veh: p<0,0001 STD-Veh vs HFD-MetF: p<0,0001 HFD-Veh vs HFD-MetF, p<0,0001

38.C	Two-way RM ANOVA	STD-Veh: 20 HFD-Veh: 20 HFD-MetF: 20	DR 5-HT IV curve	F (14,399)=7,463; p<0,0001 Tukey's multiple comparisons test: -80 pA: STD-Veh vs HFD-Veh: p=0,0057 STD-Veh vs HFD-MetF: p<0,0001 HFD-Veh vs HFD-MetF, p<0,0001 -70 pA: STD-Veh vs HFD-Veh: p=0,1270 STD-Veh vs HFD-MetF: p=0;0517 HFD-Veh vs HFD-MetF, p<0,0001 -60 pA:
------	------------------	--	------------------	---

				<p>STD-Veh vs HFD-Veh: p=0,4995</p> <p>STD-Veh vs HFD-MetF: p=0,0231</p> <p>HFD-Veh vs HFD-MetF, p=0,0005</p> <p>-50 pA:</p> <p>STD-Veh vs HFD-Veh: p=0,4746</p> <p>STD-Veh vs HFD-MetF: p=0,1603</p> <p>HFD-Veh vs HFD-MetF, p=0,0081</p> <p>-40 pA:</p> <p>STD-Veh vs HFD-Veh: p=0,6424</p> <p>STD-Veh vs HFD-MetF: p=0,1338</p> <p>HFD-Veh vs HFD-MetF, p=0,0139</p>
--	--	--	--	---

38.D	One-way ANOVA	STD-Veh: 7 HFD-Veh: 8 HFD-MetF: 9	DR 5-HT firing frequency	F (2,21)=10,24; p=0,0008 Tukey's multiple comparisons test: STD-Veh vs HFD-Veh: p=0,0006 STD-Veh vs HFD-MetF: p=0,1361 HFD-Veh vs HFD-MetF, p=0,0339
38.E	Two-way RM ANOVA	STD-Veh: 19 HFD-Veh: 15 HFD-MetF: 20	DR 5-HT IF curve	F (16,408)=3,795; p<0,0001 Tukey's multiple comparisons test: STD-Veh vs HFD-Veh: p=0,4874 STD-Veh vs HFD-MetF: p=0,0007 HFD-Veh vs HFD-MetF, p=0,0354
38.F	One-way ANOVA	STD-Veh: 20	DR 5-HT AHP amplitude	F (2,60)=8,657; p=0,0005

		<p>HFD-Veh: 23</p> <p>HFD-MetF: 20</p>		<p>Tukey's multiple comparisons test:</p> <p>STD-Veh vs HFD-Veh: $p=0,0015$</p> <p>STD-Veh vs HFD-MetF: $p=0,9763$</p> <p>HFD-Veh vs HFD-MetF, $p=0,0029$</p>
38.G	One-way ANOVA	<p>STD-Veh: 20</p> <p>HFD-Veh: 23</p> <p>HFD-MetF: 20</p>	DR 5-HT AP amplitude	<p>$F(2,60)=24,33$; $p<0,0001$</p> <p>Tukey's multiple comparisons test:</p> <p>STD-Veh vs HFD-Veh: $p<0,0001$</p> <p>STD-Veh vs HFD-MetF: $p=0,1100$</p> <p>HFD-Veh vs HFD-MetF, $p<0,0001$</p>
38.H	One-way ANOVA	<p>STD-Veh: 20</p> <p>HFD-Veh: 23</p> <p>HFD-MetF: 20</p>	DR 5-HT AP rise time	<p>$F(2,60)=8,314$; $p=0,0007$</p> <p>Tukey's multiple comparisons test:</p>

				<p>STD-Veh vs HFD-Veh: p=0,0004</p> <p>STD-Veh vs HFD-MetF: p=0,2045</p> <p>HFD-Veh vs HFD-MetF, p=0,0678</p>
38.I	Kruskal-Wallis test	<p>STD-Veh: 20</p> <p>HFD-Veh: 22</p> <p>HFD-MetF: 20</p>	DR 5-HT AP decay time	<p>K=8,975; p=0,0112</p> <p>Dunn's multiple comparisons test:</p> <p>STD-Veh vs HFD-Veh: p=0,0082</p> <p>STD-Veh vs HFD-MetF: p=0,4157</p> <p>HFD-Veh vs HFD-MetF, p=0,4172</p>
38.J	Mann Whitney test	<p>STD-Veh: 21</p> <p>HFD-Veh: 16</p>	sEPSC frequency	<p>U=155,5; p=0,7106</p>
38.K	T-test	<p>STD-Veh: 21</p> <p>HFD-Veh: 16</p>	sEPSC amplitude	<p>t=1,243; p=0,2220</p>
38.L	Mann Whitney test	<p>STD-Veh: 31</p>	sIPSC frequency	<p>U=375,5; p=0,8477</p>

		HFD-Veh: 25		
38.M	Mann Whitney test	STD-Veh: 31 HFD-Veh: 25	sIPSC amplitude	U=359; p=0,4888
Figure 40				
40.B	T-test	WT: 5 KO: 5	IR mRNA expression in DR	t=2,682; p=0,0278
40.C	T-test	WT: 5 KO: 5	IR mRNA expression in HT	t=0,9737; p=0,3587
40.D	T-test	WT: 5 KO: 5	IGF-1R mRNA expression in DR	t=0,07597; p=0,9413
40.E	T-test	WT: 5 KO: 5	IGF-1R mRNA expression in HT	t=1,194; p=0,2667
40.F	Paired t-test	Before/after insulin: 9	DR 5-HT firing frequency	t=4,435; p=0,0022
40.G	Paired t-test	Before/after insulin: 10	DR 5-HT firing frequency	t=0,814; p=0,4220
40.H	One sample test vs 100 (#)	WT: 9 KO: 10	DR 5-HT firing frequency from baseline	WT: t=5,617; p=0,0005 KO: t=0,3097; p=0,7638
	T-test (\$)			t=4,654; p=0,0002
Figure 41				

41.B	T-test	WT: 13 KO: 13	Body weight	t=1,078; p=0,2916
41.C	Two-way RM ANOVA	WT: 4 KO: 4	Food intake after fasting-refeeding	F (4,24)=0,6468; p=0,6346
41.D	T-test	WT: 4 KO: 6	Fasting glycemia	t=0,7338; p=0,4840
41.E	Two-way RM ANOVA	WT: 4 KO: 6	ip GTT	F (6,48)=1,014; p=0,4274
41.F	T-test	WT: 4 KO: 6	AUC ip GTT	t=3,174; p=0,0056
Figure 42				
42.A	Mann Whitney test	WT: 82 KO: 74	DR 5-HT firing rate <i>in-vivo</i>	U=1771; p<0,0001
42.C	Two-way RM ANOVA	WT: 28 KO: 29	DR 5-HT IV curve	F (12,540)=0,2516; p=0,9941
42.F	Two-way RM ANOVA	WT: 28 KO: 29	DR 5-HT IF curve	F (2,102)=0,2639; p=0,7781
42.G	Mann Whitney test	WT: 28 KO: 29	DR 5-HT rheobase	U=300; p=0,0838
42.H	T- test	WT: 28 KO: 29	DR 5-HT relative activation gap	t=1,684; p=0,0978

42.J	T- test	WT: 27 KO: 29	DR 5-HT AP duration	t=2,508; p=0,0152
42.K	T- test	WT: 27 KO: 29	DR 5-HT AP rise time	t=3,808; p=0,0004
42.L	Mann Whitney test	WT: 27 KO: 29	DR 5-HT AP decay time	U=277; p=0,0396
42.M	T- test	WT: 28 KO: 29	DR 5-HT AP amplitude	t=1,437; p=0,1565
42.N	T- test	WT: 28 KO: 29	DR 5-HT AHP amplitude	t=0,4189; p=0,6769
42.O	Mann Whitney test	WT: 24 KO: 29	DR 5-HT AHP time to peak	U=226,5; p=0,0442
42.P	Mann Whitney test	WT: 25 KO: 20	DR 5-HT Relative AHP dv/dt	U=129; p=0,0050

Figure 43

43.A	T-test	WT: 10 KO: 10	EPM: time in open arms	t=4,252; p=0,0005
43.B	T-test	WT: 13 KO: 9	L/D: % time spent in dark box	t=2,019; p=0,0571
43.C	Mann Whitney test	WT: 10 KO: 9	OF: time in center	U=28; p=0,1823
43.D	T-test	WT: 10 KO: 9	OF: total distance	t=1,697; p=0,1079

43.E	Log-rank (Mantel-Cox) test	WT: 12 KO: 9	NSF: latency to feed, survival	Chi square=2,574; p=0,0494
43.F	T-test	WT: 10 KO: 9	TST: immobility time	t=2,498; p=0,0231
Figure 44	Two-way ANOVA	WT-Veh: 13 WT-FLX: 14 KO-Veh: 6 KO-FLX: 4	TST: immobility time	F (1,33)=8,668; p=0,0059 Tukey's multiple comparisons test: WT-Veh vs WT-FLX: p<0,0001 WT-Veh vs KO-Veh: p=0,0032
Figure 45				
45.A	One-way ANOVA	Veh: 8 INI: 8 FLX: 7 INI + FLX: 7	TST: immobility time	F (3,26)=16,70; p<0,0001 Tukey's multiple comparisons test: Veh vs FLX: p=0,0440 Veh vs FLX + INI: p<0,0001 INI vs FLX + INI: p<0,0001 FLX vs INI +FLX: p=0,0090

45.B	Kruskal-Wallis test	Veh: 13 INI: 13 FLX: 14 INI + FLX: 14	TST: immobility time	K=27,80; p<0,0001 Dunn's multiple comparisons test: Veh vs FLX: p=0,0096 Veh vs FLX + INI: p=0,0033 INI vs FLX: p=0,0005 INI vs FLX + INI: p=0,0002 FLX vs INI + FLX: p>0,9999
Figure 46				
46.B	Kruskal-Wallis test	Veh: 8 INI: 9 FLX: 8 INI + FLX: 9	TST: immobility time	K=14,76; p=0,0020 Dunn's multiple comparisons test: Veh vs FLX + INI: p=0,0040 INI vs FLX + INI: p=0,0099
46.C	Kruskal-Wallis test	Veh: 8 INI: 9 FLX: 9 INI + FLX: 9	OF: time in center	K=3,644; p=0,3025

46.D	One-way ANOVA	Veh: 8 INI: 9 FLX: 9 INI + FLX: 9	OF : total distance	F (3,31)=3,088; p=0,0414 Tukey's multiple comparisons test: INI vs FLX + INI: p=0,0352
-------------	------------------	--	------------------------	--

ANNEXE II :

LISTE DES PUBLICATIONS ET DES COMMUNICATIONS

Publications:

Martin, H*, Bullich, S*, Guiard, BP., Fioramonti X. The impact of insulin on the serotonergic system and consequences on diabetes-associated mood disorders. 2021. J Neuroendocrinol. 2021. [IF : 3,392]

Zemdegs, J*, **Martin, H***, Pintana, H*, Bullich, S., Manta, S., Marqués, M.A., Moro, C., Chattipakorn, N., Chattipakorn, S.C., Rampon, C., Pénicaud, L., Fioramonti, X*, Guiard, B.P*. Metformin promotes anxiolytic and antidepressant-like responses in insulin-resistant mice by decreasing circulating branched-chain amino acids. 2019. J. Neuroscience. [IF : 6,074]

Bouyakdan, K., **Martin, H.**, Liénard, L., Budry, B., Taib, B., Rodaros, D., Chrétien, C., Biron, E., Husson, Z., Cota, D., Pénicaud, L., Fulton, S., Fioramonti, X., Alquier, T. The gliotransmitter ACBP controls feeding and energy homeostasis via the melanocortin system. 2019. JCI. [IF : 12,282]

Busquets-Garcia, A., Oliveira da Cruz, J.F., Terral, G., Pagano Zottola, A.C., Soria-Gomez, E., Contini, A., **Martin, H.**, Redon, B., Varilh, M., Ioannidou, C., Drago, F., Massa, F., Fioramonti, X., Trifilieff, P., Ferreira, G.*, Marsicano, G.* Hippocampal CB1 Receptors Control Incidental Associations. 2018. Neuron. [IF : 14,403]

Communications orales:

ECNP Copenhagen 2019, communication orale au “new findings symposium”.

Bordeaux Synapse Day 2019.

Colloque de la Société de Neuroendocrinologie 2019, Tours.

Communications affichées:

ECNP workshop for early career scientist, 2019, Nice, Prix poster.

Journée Bordeaux Neurocampus, 2019, Prix poster.

Vulgarisation scientifique:

Participation au programme “Ma thèse en BD”, 2020

Pint of Science, 2019

Semaine du Cerveau, 2019.