



HAL
open science

Signalisation de l'insuline au sein du système sérotoninergique central : nexus de la comorbidité diabète-dépression

Sebastien Bullich

► **To cite this version:**

Sebastien Bullich. Signalisation de l'insuline au sein du système sérotoninergique central : nexus de la comorbidité diabète-dépression. Neurosciences. Université Paul Sabatier - Toulouse III, 2021. Français. NNT : 2021TOU30155 . tel-03626613

HAL Id: tel-03626613

<https://theses.hal.science/tel-03626613>

Submitted on 31 Mar 2022

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

En vue de l'obtention du
DOCTORAT DE L'UNIVERSITÉ DE TOULOUSE
Délivré par l'Université Toulouse 3 - Paul Sabatier

Présentée et soutenue par
Sébastien BULLICH

Le 16 décembre 2021

**Signalisation de l'insuline au sein du système sérotoninergique
central : nexus de la comorbidité diabète-dépression**

Ecole doctorale : **BSB - Biologie, Santé, Biotechnologies**

Spécialité : **NEUROSCIENCES**

Unité de recherche :
CRCA - Centre de Recherches sur la Cognition Animale

Thèse dirigée par
Bruno GUIARD

Jury

M. Sebastian FERNANDEZ, Rapporteur
Mme Céline CRUCIANI-GUGLIELMACCI, Rapporteur
M. Guillaume FERREIRA, Rapporteur
Mme Isabelle CASTAN-LAURELL, Examinatrice
Mme Amandine GAUTIER-STEIN, Examinatrice
M. Bruno GUIARD, Directeur de thèse

« Les plus grandes victoires sont celles que l'on remporte sur
soi-même »

- *Bobby Jones*

À mon grand-père,

REMERCIEMENTS

Tout d'abord, je tiens à remercier **Pr. Céline Cruciani-Gugliemacci, Dr. Sebastian Fernandez** et le **Dr. Guillaume Ferreira** pour avoir accepté d'être rapporteurs de mon manuscrit de thèse. De la même façon, je remercie les examinatrices de ce jury, **Pr. Isabelle Laurell** et **Dr. Amandine Gautier-Stein**. Merci à l'ensemble du jury de m'avoir fait l'honneur d'accepter d'évaluer mes travaux de thèse.

Je tiens également à remercier vivement **Dr Amandine GAUTIER-STEIN** et **Pr Philippe VALET** pour avoir suivi et guidé mon projet de thèse lors de mes comités de suivi de thèse. J'en profite également pour remercier Philippe pour sa disponibilité et son enthousiasme durant notre agréable collaboration.

J'adresse mes sincères remerciement au **Dr Xavier FIORAMONTI** et au **Dr Hugo Martin**. Merci pour ces quelques virées bordelaises et surtout ces réunions virtuelles au cours desquelles nous avons pu faire avancer nos projets en toute convivialité. Ce travail n'aurait clairement pas été le même sans votre collaboration, merci.

~

Je ne peux que remercier chaleureusement et sincèrement, **Bruno Guiard**, mon directeur de thèse. Notre rencontre a littéralement tracé ma voie professionnelle de la plus belle des manières. Merci pour tout. Ton encadrement et ton soutien ont alimenté ma motivation et la réussite de mon cursus universitaire. Ta bienveillance, ton optimisme sans faille, ta générosité et ton humour insatiable ont fait de ce périple le plus doux des voyages (enfin presque .. ça reste une thèse quand même). Je ne te remercierai jamais assez pour tout ton investissement dans la thèse mais aussi pour mon développement personnel. Merci d'avoir cru en moi, de m'avoir fait confiance pendant toutes ces années et de m'avoir autant fait grandir professionnellement et humainement.

Je souhaite également remercier l'ensemble de l'**équipe REMEMBeR** sans qui cette thèse n'aurait été la même. Merci **Claire** pour ton écoute et tes propos toujours rassurants qui illustrent bien la bienveillance qui règne dans l'équipe et que tu te dévoues de faire perdurer à

l'échelle du laboratoire. Merci **Laure** pour tous tes conseils si précieux que je m'efforcerais de ne jamais oublier, surtout ceux concernant l'esthétique de mes diapositives. Merci **Lionel M**, **Cédric** et **Lionel D** pour les échanges scientifiques que nous avons pu avoir lors de nombreuses réunions ou au détour d'un couloir. Merci à **Camille**, **Sébastien** et **Stéphane** pour leur aide et leur soutien moral quotidien.

Un grand merci tout particulier aux thésards de l'équipe : **Basile** pour avoir été comme un grand frère en qui je pouvais toujours compter, **Fares** pour ta gentillesse débordante et tes mots toujours rassurants, **Flora** pour ton humeur rafraichissante et ton écoute libératrice, **Guillaume** pour m'avoir définitivement converti aux jeux de société, **Célia** pour m'avoir sauvé un nombre incalculable de fois et pour nos discussions de fin de journée égarés sur les chemins de la fac, et enfin **Pauline** pour les shots de motivation pendant la dernière ligne droite. Le bureau 206/4007 représentait pour moi un vrai bol d'air frais (et de sucre) où l'entraide et la bonne humeur étaient contagieuses. J'ai partagé de réels moments d'amitié avec vous et je suis persuadé qu'il y en aura d'autres.

Mes remerciements vont aussi à toutes ces personnes bienveillantes qui à un moment ou à un autre m'ont apporté support et/ou conseils. Je pense particulièrement à **Marlène**, **Iulia**, **Marie-Christine**, **Stella**, **Benjamin**, et **Jean-Marc**.

~

Merci à mes **parents** et **grands-parents**, pour m'avoir permis de réaliser mes études dans les meilleures conditions. Merci pour vos petits passages à Toulouse pour mes anniversaires et autres occasions, merci pour les colis remplis de bonbons et de légumes du jardin et pour les petits plats mijotés avec amour que je dégustais à la pause déjeunée. Merci à ma **marraine** pour son regard pétillant de fierté qui trouvait toujours le moyen de me reconforter et m'encourager quand je le croisais. Merci à mon **frère**, pour avoir transformé son handicap en force et pour me la transmettre depuis bientôt 28 ans.

Je remercie mes amis sans qui je ne serais clairement pas là aujourd'hui et qui me rendent meilleur chaque jour. Merci à **Clémence** car même depuis Toulouse, Orléans ou Montpellier tu as su être là quand il le fallait. Merci pour nos rituels annuels avec 'la famille' qui étaient comme un second souffle pour moi.

Merci à **Morgane, Rémi, Carine** et **Julien** pour nos ‘réunions des thésards anonymes’ pas très hebdomadaires mais qui réussissaient à me faire m’évader.

Et enfin, un merci spécial à **Emma, Carine** et **Pauline**. Merci d’apporter autant de rires dans ma vie, pour m’avoir redonné le sourire pendant les coups durs, pour avoir bravé confinements et couvre-feux pour me sauver de mes week-ends de solitude et pour m’avoir laissé être bon gagnant aux jeux de société.

(Merci Netflix pour la catharsis.)

RÉSUMÉ

Les études épidémiologiques estiment que le risque de dépression majeure (DM) est plus élevé chez les patients diabétiques comparé à la population générale. Des études plus spécifiques corrélient la dégradation de certains paramètres métaboliques avec les symptômes anxio-dépressifs chez l'humain. C'est notamment le cas pour l'insulino-résistance périphérique qui est positivement corrélée à la sévérité de la DM. En revanche, les conséquences de l'insulino-résistance centrale sur les troubles dépressifs n'ont jamais été étudiées de manière approfondie non seulement en clinique mais également chez l'animal. Compte tenu de la présence du récepteur à l'insuline dans le cerveau, une des hypothèses serait que cette hormone module directement (ou indirectement) l'activité des systèmes monoaminergiques et notamment celle des neurones sérotoninergiques (5-HT) majoritairement regroupés dans le noyau dorsal du raphé (DRN). En effet, si l'influence de l'insuline sur le système dopaminergique et le comportement alimentaire a déjà été montré, très peu d'études se sont intéressées à son impact sur le système 5-HT pourtant clé dans la physiopathologie de la DM.

Au cours de ce travail de thèse, nous avons pu montrer que le récepteur à l'insuline est présent sur les neurones 5-HT du DRN. Nous avons caractérisé l'effet excitateur de l'insuline sur l'activité électrique de ces neurones par patch clamp. Toutefois, in-vivo l'insuline induit un effet net inhibiteur sur le tonus sérotoninergique. Ces résultats nous ont conduit à tester les effets comportementaux de l'insuline et à montrer ses effets anxiolytiques suite à son injection intra-raphé ou intra-nasale chez la souris saine. Dans un second temps, nous nous sommes placés dans un contexte pathologique afin de mieux comprendre l'impact de la perturbation de la signalisation de l'insuline sur les comportements émotionnels. Pour cela, nous avons étudié l'activité du système 5-HT et les comportements anxio-dépressifs dans des modèles murins de diabète de type 1 et 2 (DT1/DT2). Dans ces deux modèles, que ce soit dans un contexte d'insulinopénie (DT1) ou d'insulino-résistance (DT2), les souris présentent un phénotype anxieux et certains symptômes de la DM associés à une diminution de l'activité du système 5-HT du DRN. Enfin, nous avons tenté d'identifier l'implication de l'apeline, une adipokine connue pour ses propriétés insulino-sensibilisatrice sur les anomalies comportementales induites par un DT2. Nos résultats montrent que les souris présentant une invalidation génétique de l'apeline, sont plus susceptibles de développer une insulino-résistance en réponse à un régime alimentaire diabétogène. Une diminution de l'activité du système 5-HT et une anxiété exacerbée ont également été observés dans ces conditions. De manière intéressante le traitement par la metformine, un antidiabétique aux propriétés insulino-sensibilisatrice, ne permet pas l'amélioration des paramètres métaboliques de ces souris mais améliore leur phénotype anxieux.

Ainsi ce travail de thèse souligne l'existence d'interactions anatomiques et fonctionnelles entre le système insulinergique et 5-HT central ainsi que leur importance dans l'anxiété, un trouble psychiatrique souvent annonciateur d'un épisode dépressif. Par ailleurs, nous avons identifié l'apeline comme un acteur potentiel impliqué dans la comorbidité diabète-dépression laissant entrevoir de nouvelles pistes thérapeutiques ciblant cette adipokine ou l'insuline directement. Finalement, ces travaux de thèse appuient l'hypothèse selon laquelle des stratégies insulino-sensibilisatrices pourraient améliorer les symptômes anxio-dépressifs avec ou sans comorbidité métabolique. Ils ouvrent également la voie au développement de stratégies de potentialisation basées sur l'utilisation de l'insuline ou autres antidiabétiques oraux pour renforcer l'efficacité des antidépresseurs. En revanche, les mécanismes qui sous-tendent ces effets méritent d'être encore mieux caractérisés.

ABSTRACT

Epidemiological studies estimate a higher risk of developing major depression (MD) among diabetic patients compared to the general population. More specifically, human studies highlighted correlations between impairments of metabolic parameters and depressive symptoms. Peripheral insulin resistance could be determinant in this relationship since defect in insulin signaling positively correlates with the severity of MD. However, brain insulin resistance consequences on depressive disorders in humans and pre-clinical models are yet to be deeply investigated. Because the brain is endowed with a high density of insulin receptor, it has been proposed that insulin could directly (or indirectly) modulates monoaminergic systems and more particularly serotonergic (5-HT) neuronal activity in the dorsal raphe nucleus (DRN). In agreement with the latter hypothesis, previous findings indicate that insulin influences the dopaminergic system and related feeding behaviors but only few studies have focused on the impact of this hormone on the 5-HT system yet indisputably involved in MD. During this thesis, we were able to show that insulin receptor is expressed in DRN 5-HT neurons. Interestingly, although *in-vitro* patch-clamp experiments emphasize a direct excitatory effect of insulin on DRN 5-HT neuronal activity, *in vivo* electrophysiological and neurochemical data are consistent with a net inhibitory effect on this system leading to a decreased 5-HT tone in the hippocampus. These results led us to test whether insulin modulates neurobehaviors. Doing so, we demonstrated that acute intra-DRN or intra-nasal insulin injection produces anxiolytic-like effects in healthy mice. In a second part, we studied the activity of the 5-HT system and anxio-depressive-like behaviors in mouse models of type 1 or type 2 diabetes (T1D/T2D) thereby providing insight into the relationship between insulin signaling impairment and emotionality. In a context of insulinopenia (T1D) or insulin resistance (T2D), mice displayed apparent anxious behaviors accompanied by a significant reduction of 5-HT firing rate. Then, we tried to identify the implication of apelin, an adipokine known for its insulin-sensitizing properties, in T2D-induced behavioral anomalies. Our results showed that Apelin knock-out mice are more prone to develop insulin resistance in response to a diabetogenic diet but also marked behavioral disturbances reminiscent of anxiety. Interestingly, although chronic metformin treatment, an oral antidiabetic drug, did not improve peripheral metabolic parameters, it exerted anxiolytic-like effects in these mutant mice.

Thus far, this work highlights the existence of anatomic and functional interactions between insulinergic and serotonergic systems and their importance in anxiety, a psychiatric disorder often predictive of depressive episodes. Furthermore, we identified apelin as a potential actor implicated in the comorbidity between diabetes and depression anticipating putative pharmacological strategies targeting this adipokine. Indeed, this work strengthens the hypothesis in which insulin-sensitizers could alleviate anxio-depressive symptoms in patients displaying (or not) metabolic syndrome. It also paves the way for the development of potentiation strategies based on the use of insulin or antidiabetic treatments to reinforce antidepressant efficacy. However, the mechanisms underpinning such effects warrant further investigations for future studies.

SOMMAIRE

REMERCIEMENTS	1
RESUME	5
ABSTRACT.....	6
SOMMAIRE.....	7
LISTES.....	11
LISTE DES FIGURES	11
LISTE DES TABLEAUX	12
LISTES DES ABREVIATIONS.....	13
INTRODUCTION.....	17

PARTIE 1 : LA DÉPRESSION MAJEURE ET LES DIABÈTES SUCRÉS

.....	19
I. <i>La dépression majeure</i>	21
A. Épidémiologie.....	21
B. Étiologie.....	22
L'hypothèse monoaminergique : rôle du système sérotoninergique	23
C. Le système sérotoninergique.....	28
1. Anatomie des Noyau du raphé.....	28
2. La synapse sérotoninergique.....	30
3. Les récepteurs à la sérotonine et fonctions associées	31
II. <i>Les diabètes sucrés</i>	37
A. Le diabète de type 1	38
1. Étiologie.....	38
2. Épidémiologie.....	38
3. Traitement.....	38
B. Le diabète de type 2	38
1. Étiologie.....	38
2. Épidémiologie.....	39
3. Traitements	39
C. Le diabète gestationnel	42
1. Étiologie.....	42
2. Épidémiologie.....	43
3. Traitement.....	43
D. Le diabète de type 3	43
E. Les modèles animaux des diabètes	44
1. Modèles animaux du diabète de type 1	44
2. Modèles animaux du diabète de type 2.....	46

III. Lien bidirectionnel entre diabète et dépression majeure.....	48
A. Épidémiologie.....	48
B. Hypothèses mécanistiques.....	49

PARTIE 2 : L'INSULINE ET SON RÔLE DANS LE SYSTEME NERVEUX CENTRAL53

I. <i>L'insuline et ses acteurs</i>	55
A. L'insuline.....	55
1. Gène, structure et biosynthèse.....	55
2. Sécrétion et dégradation de l'insuline.....	55
B. Le récepteur à l'insuline.....	59
1. Gène, expression et structure.....	59
2. Voie de signalisation.....	60
3. Actions périphériques.....	63
a. Métabolisme des carbohydrates.....	63
b. Métabolisme des lipides.....	64
c. Autres effets.....	64
C. L'insuline et ses acteurs dans le cerveau.....	65
1. Passage de la barrière hématoencéphalique et synthèse locale.....	65
2. Le récepteur à l'insuline central.....	66
II. <i>Rôles physiologiques de l'insuline dans le cerveau</i>	67
A. Actions centrales.....	67
1. Insuline centrale et métabolisme.....	67
2. Insuline et mémoire.....	70
3. Insuline et comportements anxio-dépressifs.....	72
III. <i>Impact de l'insuline sur le système sérotoninergique et conséquences</i>	74
IV. <i>Impact de la sérotonine sur la signalisation de l'insuline</i>	91

PARTIE 3 : LA RESISTANCE À L'INSULINE ET SON IMPLICATION DANS L'ETIOLOGIE DE LA DEPRESSION MAJEURE..... 95

I. <i>Insulino-résistance : Généralité et Définition</i>	96
II. <i>Origines moléculaires de l'insulino-résistance :</i>	96
a. Origines génétiques de l'insulino-résistance.....	96
b. Lipotoxicité.....	97
c. Inflammation.....	97
d. Hyperglycémie, Dysfonctionnement mitochondrial et stress du réticulum endoplasmique.....	99
III. <i>Insulino-résistance centrale et troubles émotionnels</i>	100
IV. <i>Effets antidépresseurs des stratégies insulino-sensibilisatrices/-sécrétrices</i>	101
A. Études précliniques.....	101
1. L'insuline.....	101
2. Les insulino-sécréteurs.....	102
3. Les insulino-sensibilisateurs.....	103
4. Combinaison Antidépresseurs et Antidiabétiques.....	104
B. Etudes Cliniques :.....	116

1. L'insuline	116
2. Les insulino-sensibilisateurs	116
3. Les insulino-sécréteurs.....	117

PARTIE 4 : L'APELINE, UNE ADIPOKINE AUX EFFETS ANTIDÉPRESSEURS À L'INTERFACE DIABETE-CERVEAU ?.....119

<i>I. Le système apelinergique.....</i>	<i>120</i>
A. L'apeline et son récepteur APJ	120
B. Production d'apeline	121
C. Signalisation de l'apeline.....	121
<i>II. Rôles physiologiques de l'apeline.....</i>	<i>123</i>
A. Rôles de l'apeline en périphérie.....	123
B. Rôles de l'apeline en central.....	124
1. Métabolisme énergétique.....	124
2. Apeline et mémoire.....	125
3. Apeline et comportements anxio-dépressifs	127

OBJECTIFS DES TRAVAUX DE THÈSE..... 129

MATERIELS ET METHODES 133

1. <i>Autorisation à expérimenter</i>	<i>133</i>
2. <i>Animaux</i>	<i>133</i>
A. Hébergement.....	133
3. <i>Traitements pharmacologiques.....</i>	<i>134</i>
4. <i>Injection intra-raphé d'insuline.....</i>	<i>134</i>
5. <i>Analyses comportementales</i>	<i>135</i>
6. <i>Electrophysiologie in-vivo</i>	<i>141</i>
7. <i>Microdialyse intracébrale</i>	<i>141</i>
8. <i>Analyses métaboliques</i>	<i>143</i>
9. <i>Western Blot.....</i>	<i>144</i>
10. <i>Statistiques</i>	<i>144</i>

RESULTATS..... 147

PARTIE 1 : LIEN ENTRE L'INSULINE ET LE SYSTEME SEROTONINERGIQUE EN CONDITION PHYSIOLOGIQUE.....147

PARTIE 2 : MODULATIONS NEGATIVES DU SYSTEME DE L'INSULINE : IMPACTS METABOLIQUES ET NEUROCOMPORTEMENTAUX196

PARTIE 3 : ETUDE DE L'EFFET COMPORTEMENTAL D'UNE STRATEGIE INSULINO-SENSIBILISATRICE (METFORMINE) DANS DES MODELES DE COMORBIDITE DIABETE-DEPRESSION	236
DISCUSSION ET PERSPECTIVES.....	296
CONCLUSION	308
REFERENCES.....	312

Listes

Liste des Figures

<i>FIGURE 1. SCHEMA DES PRINCIPALES STRUCTURES CEREBRALES IMPLIQUEES DANS LA DEPRESSION MAJEURE ET LEURS INTERACTIONS ANATOMIQUES ET FONCTIONNELLES VIA LES MONOAMINES.</i>	24
<i>FIGURE 2. APPROCHES OPTOGENETIQUES ET CHEMOGENETIQUES DANS L'ETUDE DE L'IMPLICATION DU SYSTEME 5-HT DANS LA MODULATION DE L'HUMEUR.</i>	27
<i>FIGURE 3. REPRESENTATION SCHEMATIQUE DU SYSTEME SEROTONINERGIQUE.</i>	28
<i>FIGURE 4. LOCALISATION DES DIFFERENTS POPULATIONS NEURONALES DU NDR.</i>	30
<i>FIGURE 5. SCHEMA DE LA SYNAPSE SEROTONINERGIQUE : DE LA SYNTHESE DE LA SEROTONINE A LA SIGNALISATION POST-SYNAPTIQUE.</i>	31
<i>FIGURE 6. EFFETS DE LA METFORMINE.</i>	41
<i>FIGURE 7. MECANISMES D'ACTION DES DIFFERENTES STRATEGIES ANTIDIABETIQUES.</i>	41
<i>FIGURE 8. MODELES MURINS DU DIABETE.</i>	48
<i>FIGURE 9. MODULATION CENTRALE DE LA SECRETION D'INSULINE.</i>	57
<i>FIGURE 10. PRINCIPAUX ACTEURS DE LA REGULATION DE LA SECRETION D'INSULINE.</i>	58
<i>FIGURE 11. RECEPTEURS A L'INSULINE, A L'IGF1 ET RECEPTEURS HYDRIDES : LIGANDS ET AFFINITES.</i>	60
<i>FIGURE 12. FONCTIONS SPECIFIQUES DES PROTEINES IRS. D'APRES TANGUCHI ET AL., 2006.</i>	61
<i>FIGURE 13. PRINCIPAUX NOEUDS DE SIGNALISATION DE L'INSULINE.</i>	62
<i>FIGURE 14. EXPRESSION DE L'IR, IGF1R, IRS1 ET IRS2 DANS LE CERVEAU DETERMINEE PAR RT-QPCR CHEZ LA SOURIS C57BL/6.</i>	66
<i>FIGURE 15. REGULATION HYPOTHALAMIQUE DE LA PRISE ALIMENTAIRE PAR L'INSULINE.</i> ..	68
<i>FIGURE 16. PRINCIPAUX EFFETS CONNUS DE L'INSULINE.</i>	70
<i>FIGURE 17. EXEMPLES DE MODULATION DE LA SECRETION D'INSULINE PAR LE SYSTEME SEROTONINERGIQUE.</i>	92
<i>FIGURE 18. HYPOTHESE INFLAMMATOIRE DE LA RESISTANCE A L'INSULINE.</i>	98
<i>FIGURE 19. VOIES DE SIGNALISATION DE L'INSULINO-RESISTANCE.</i>	100
<i>FIGURE 20. EXPRESSION DU SYSTEME APELINERGIQUE. D'APRES SHIN ET AL., 2017.</i>	121
<i>FIGURE 21. SCHEMA DE LA SIGNALISATION DE L'APELINE ET SON RECEPTEUR APJ.</i>	122
<i>FIGURE 22. DISPOSITIF DE TEST DE CHAMP OUVERT.</i>	136
<i>FIGURE 23. DISPOSITIF DE LA BOITE CLAIRE/SOMBRE.</i>	136
<i>FIGURE 24. DISPOSITIF DU LABYRINTHE EN CROIX SURELEVE.</i>	137
<i>FIGURE 25. DISPOSITIF DU TEST DE SUSPENSION CAUDALE.</i>	138
<i>FIGURE 26. DISPOSITIF DU TEST D'INTERACTION SOCIALE.</i>	138
<i>FIGURE 27. PRINCIPE DU TEST D'ECLABOUSSURE.</i>	139
<i>FIGURE 28. PRNCIPE ET DISPOSITIF DU TEST DE RECONNAISSANCE D'OBJET.</i>	140
<i>FIGURE 29. FORMULE PERMETTANT LE CALCUL DU Z-SCORE.</i>	140
<i>FIGURE 30. PRINCIPE DE LA MICRODIALYSE INTRACEREBRALE.</i>	142
<i>FIGURE 31. VALIDATION METABOLIQUE DU MODELE STZ CHEZ LA SOURIS C57BL/6.</i>	197
<i>FIGURE 32. TAUX DE DECHARGE DES NEURONES 5-HT DU DRN CHEZ LES SOURIS STZ.</i> ...	198
<i>FIGURE 33. LES SOURIS STZ PRESENTENT DES COMPORTEMENTS PSEUDO-DEPRESSIFS.</i> ...	198
<i>FIGURE 34. LES SOURIS STZ PRESENTENT UN PHENOTYPE ANXIEUX.</i>	199
<i>FIGURE 35. ABSENCE D'EFFETS INSULINO-SENSIBILISATEURS DE LA METFORMINE CHEZ LES SOURIS AP^{-/-}.</i>	293
<i>FIGURE 36. EFFET ANXIOLYTIQUE DE LA METFORMINE CHEZ LA SOURIS AP^{-/-}.</i>	294

<i>FIGURE 37. HYPOTHESE DU MODELE D'ACTION DE L'INSULINE SUR LE SYSTEME SEROTONINERGIQUE DANS LE NOYAU DU RAPHE DORSAL.....</i>	<i>298</i>
<i>FIGURE 38. MODELE SCHEMATIQUE DE LA MODULATION DU SYSTEME SEROTONINERGIQUE PAR L'INSULINE : IMPACT SUR LE COMPORTEMENT ANXIEUX.</i>	<i>310</i>

Liste des tableaux

<i>TABLEAU 1 – SYMPTOMES DE LA DEPRESSION MAJEURE SELON LE DMS-V.....</i>	<i>21</i>
<i>TABLEAU 2 - CRITERES DE DIAGNOSTIQUES DES DIFFERENTS TYPES DE DIABETE.</i>	<i>37</i>
<i>TABLEAU 3. SYNTHESE DES EFFETS ANTIDEPRESSEURS DE L'INSULINE ET DES ANTIDIABETIQUES ORAUX.</i>	<i>115</i>
<i>TABLEAU 4. COMPOSITION DES REGIMES ALIMENTAIRES.....</i>	<i>134</i>
<i>TABLEAU 5. RESUME DES RESULTATS OBTENUS DANS LES DIFFERENTS MODELES ETUDIES AU COURS DE CE TRAVAIL DE THESE.</i>	<i>308</i>
<i>TABLEAU 6. EFFETS DE LA METFORMINE DANS LES DIFFERENTS MODELES ETUDIES AU COURS DE CE TRAVAIL DE THESE.</i>	<i>309</i>

Listes des abréviations

5-HIAA – acide 5-hydroxyindol-acétique
5-HT – 5-hydroxytryptamine
5-HTP – 5-hydroxytryptophane
8-OH-DPAT – 8-hydroxy-2-(di-n-propylamino)tétralin
α-MSH – alpha-melanocyte-stimulating hormone
AA – amino acids
Aβ – amyloid beta
AgRP – Agouti related protein
ADN – acide désoxyribonucléique
AKT – serine-threonine protein kinase
AMPA – alpha-amino-3-hydroxy-5-méthyl-4-isoxazole propionique acid receptor
AMPK – Adenosine monophosphate-activated protein kinase
APJ – putative receptor protein related to the angiotensin receptor ATI
ARN – acide ribonucléique
ATP – adenosine-triphosphate
BB - BioBreeding
BHE – barrière hémato-encéphalique
CCK - cholécystokinine
CRF – corticotropin releasing factor
CRP – C-reactive protein
DAAA – D-amino acid aminotransferase
DM – Dépression majeure
DPP-4 - dipeptidyl peptidase-4
DRN – Dorsal raphe nucleus
DSM-V - Diagnostic and Statistical Manual of Mental Disorders V
DT1/DT2 – Diabète de type 1/2
eNOS – endothelial nitric oxid synthase
ERK – extracellular signal-regulated kinase
FFA – free fatty acid
FISH – fluorescence in situ hybridation
GABA – Gamma-aminobutyric acid
GIP – gastric inhibitory polypeptide
GLP-1 – glucagon-like peptide 1
GLUT 1/2/3/4 – glucose transporter 1/2/3/4
GRP – gastrin-releasing peptide
GSK3 – glycogen synthase kinase 3
GTPases – Guanosine triphosphate hydrolase
HbA1C – Glycosylated haemoglobin
HFD – High-fat diet
HPA – hypothalamic-pituitary-adrenal axis
HSHF – High-sucrose High-fat diet
ICV – intracérébroventriculaire
IDE – insulin-degrading enzyme
IFN-γ – interferon-γ
IGF-1 – insulin-like growth factor 1
IGF-1R – insulin-like growth factor 1 receptor
IL-6/1B – interleukin 6/1B

IN – intranasal insulin
IR A/B – insulin receptor A/B
IR - insulin receptor
IRS1-6 – insulin receptor substrate 1-6
IRSN – inhibiteur de la recapture sélectif de la noradrénaline
ISRS – inhibiteur sélectif de la recapture de la sérotonine
L-Trp – L-tryptophane
LPS - lipopolysaccharide
LTD – long-term depression
LTP – long-term potentiation
MA – Maladie d’Alzheimer
MAO A/B – monoamine oxidase A/B
MAPK – mitogen-activated protein kinase
MDMA – 3,4-methylenedioxyméthamphetamine
MHC – major histocompatibility complex
miARN – micro-ARN
mPFC – medial prefrontal cortex
mTOR – mammalian target of rapamycin
NAc – Noyau accumbens
NASH – non-alcoholic steatohepatitis
NET – norepinephrine transporter
NO – nitric oxide
NOD – non-obese diabetic
NIRKO – neuron-specific insulin receptor knock-out
NPY – neuropeptide Y
OGTT – oral glucose test tolerance
PACAP - pituitary adenylate cyclase activating polypeptide
PC1/2 - prohormones convertases 1/2
PI3K – phosphatidylinositol-4,5-bisphosphate 3-kinase
PIP3 – phosphatidylinositol (3,4,5)-triphosphate
PKA – protein kinase A
POMC – pro-opiomelanocortin
PPAR- γ – peroxisome proliferator-activated receptor gamma
PTB - phosphotyrosine binding
PTEN – phosphatase and tensin homolog
PTP1B – tyrosine-protein phosphatase non-receptor type 1
ROS – reactive oxygen species
RTK – receptor tyrosine kinase
RT-qPCR – real-time quantitative polymerase chain reaction
SH2 – Src homology 2
SERT – serotonin transporter
SN – substance noire
STZ - streptozotocin
TCA – tricyclic antidepressant
TH – tyrosine hydroxylase
TNF- α – tumor necrosis alpha
TPH2 – tryptophan hydroxylase 2
TRPC-5 – transient receptor potential channel 5
UCMS – unpredictable chronic mild stress
UCP1 – uncoupling protein 1

VIP – vasoactive intestinal peptide
VMAT – vesicular monoamine transporter
VTA – ventral tegmental area
WB – Western blot

INTRODUCTION

PARTIE 1 :

**LA DÉPRESSION MAJEURE ET LES
DIABÈTES SUCRÉS**

I. La dépression majeure

A. Épidémiologie

La dépression majeure (DM) est un trouble psychiatrique qui, selon l'Organisation mondiale de la Santé, affecte plus de 300 millions de personnes de tout âge faisant d'elle la première cause d'incapacité dans le monde (OMS ; James et al., 2017 ; Otte et al., 2016). Elle touche deux fois plus les femmes que les hommes et on estime qu'environ 15% de la population mondiale vivra un épisode dépressif au cours de sa vie (Kessler, 2003 ; Seedat et al., 2009 ; Bromet et al., 2011). Le diagnostic de la dépression majeure se base sur le DSM-V (Diagnostic and Statistical Manual of Mental Disorders - V). Il décrit la DM comme un épisode d'au moins deux semaines au cours duquel l'individu présente au moins 5 des 9 symptômes couramment associés à ce trouble (voir Tableau 1). Les données épidémiologiques de la dépression risquent fortement d'être impactées par la crise sanitaire mondiale actuelle. En effet, une méta-analyse regroupant 13 études publiées entre le début de la pandémie de la Covid-19 et mai 2020 montre déjà une prévalence avoisinant les 30% pour cette période (Salari et al., 2020).

La DM est très largement associée à l'anxiété mais également à d'autres troubles psychiatriques comme la schizophrénie ou les troubles bipolaires (Belmaker and Agam, 2008, Whitton et al., 2015). Il est courant de développer de l'anxiété dans le syndrome dépressif. Réciproquement, l'anxiété peut participer à la formation de la DM. C'est pour cela que l'on parle communément de syndrome anxio-dépressif.

Listes des symptômes de la dépression majeure		
Humeur dépressive	Augmentation/diminution de l' appétit	Perte d'intérêt, de plaisir
Agitation ou retard psychomoteur	Insomnie ou hypersomnie	Sentiment d'inutilité ou de culpabilité excessive ou inappropriée
Fatigue ou perte d'énergie	Diminution de la concentration, motivation	Pensées récurrentes pour la mort et le suicide

Tableau 1 – Symptômes de la dépression majeure selon le DMS-V. D'après l'American Psychiatric Association, 2015.

B. Étiologie

L'étiologie exacte de la dépression majeure n'est pas connue mais différentes hypothèses (non exclusives) ont vu le jour grâce à la recherche et notamment la découverte des premiers antidépresseurs. En effet, entre 1950 et 1955, des chercheurs se sont aperçus qu'un antituberculeux (Iproniazide, Marsilid©) améliorait l'humeur des patients atteints de tuberculose. Ils se sont rendus compte que cet agent pharmacologique inhibait les monoamines oxydases, enzymes de dégradation des monoamines, mettant ainsi en lumière l'importance de ces systèmes dans la régulation de l'humeur. C'est donc la sérendipité de la découverte des antidépresseurs qui est à l'origine de ladite **hypothèse monoaminergique** (Hamon et Blier 2013). Cette hypothèse repose donc sur la théorie d'une déficience en monoamines traduisant un dysfonctionnement des neurotransmissions sérotoninergique, noradrénergique et/ou dopaminergique.

Il existe aussi l'**hypothèse reposant sur une dérégulation de l'axe hypothalamo-hypophysio-surrénalien** (axe HPA), autrement nommé axe corticotrope. Un défaut de rétrocontrôle négatif sur cet axe en réponse à un stress serait responsable de sa suractivation et conduirait à une libération importante d'hormone de stress (cortisol chez l'humain/corticostérone chez l'animal) dans le sang. L'excès de glucocorticoïdes résultant d'une inadaptation de la réponse endocrine au stress sont connus pour participer au développement des symptômes dépressifs. Ces mécanismes agiraient notamment de manière négative sur la plasticité cérébrale (Pariante and Lightman., 2008 ; Willner et al., 2013).

L'**hypothèse neurotrophique** stipule que l'altération du processus de neurogénèse hippocampique et de plasticité synaptique sont des mécanismes clés dans la DM qui pourraient se mettre en place en réponse à un déficit de neurotransmission monoaminergique et/ou une dérégulation de l'axe HPA. Cette piste est très étudiée depuis les années 2000 pour tenter d'expliquer le développement progressif de la DM et le mécanisme d'action des antidépresseurs (Liu et al., 2017).

Enfin, l'**hypothèse inflammatoire** reposant sur l'implication des acteurs de l'inflammation périphérique et centrale constitue un axe de recherche incontournable pour tenter de comprendre les causes de la DM (Beurel et al., 2020).

Il semblerait que l'étiologie de la DM ne soit pas dû à une seule de ces hypothèses car aucune d'elles, prise séparément, ne rendrait compte de la complexité de la pathologie. Au contraire, il est fort probable que la DM repose sur plusieurs de ces altérations neurobiologiques et que celles-ci soient intimement liées, notamment d'un point de vue fonctionnel.

Nous nous focaliserons dans ces travaux de thèse sur la description de l'hypothèse monoaminergique mais surtout sur l'implication du système sérotoninergique dans la physiopathologie de la DM. Les autres hypothèses ne seront pas pour autant écartées du raisonnement de cette étude et de l'interprétation de nos données expérimentales.

L'hypothèse monoaminergique : rôle du système sérotoninergique

Comme mentionné précédemment, l'hypothèse monoaminergique provient du mécanisme d'action des antidépresseurs découvert dans les années 50. S'en suit l'apparition des antidépresseurs touchant plusieurs systèmes avec les antidépresseurs tricycliques (TCA) qui inhibent les transporteurs des monoamines avec différentes affinités. En raison de leur cardiotoxicité, des traitements ont progressivement été remplacés par les inhibiteurs de recapture de la sérotonine et de la noradrénaline (IRSN), même s'ils restent aujourd'hui une option thérapeutique de choix dans les formes sévères de DM. Le risque lié à l'augmentation des taux de noradrénaline en réponse au blocage du transporteur NET, a conduit entre les années 1970 et 1980, au développement de molécules plus sélectives. C'est ainsi que l'intérêt pour le système sérotoninergique (ou système 5-HT pour 5-hydroxytryptamine) grandit et que les inhibiteurs sélectifs de recapture de la sérotonine (ISRS) voient le jour avec la fluoxétine (Prozac©) comme chef de file développée par l'industrie pharmaceutique Eli Lilly (Wong et al., 1974). Cet ISRS fut mis sur le marché en 1986.

D'un point de vue phylogénétique, la sérotonine est l'un des plus anciens neurotransmetteurs. En effet ce système fait intervenir 16 sous-types de récepteurs différents regroupés en 7 familles (selon la nature de leur couplage) et les fibres sérotoninergiques sont omniprésentes dans le cerveau innervant notamment la plupart des structures corticales et sous-corticales impliquées dans la régulation de l'humeur (Figure 1). La sérotonine joue aussi un rôle majeur dans d'autres fonctions vitales comme la régulation thermique, la prise alimentaire, le sommeil, la mémoire et d'autres fonctions périphériques.

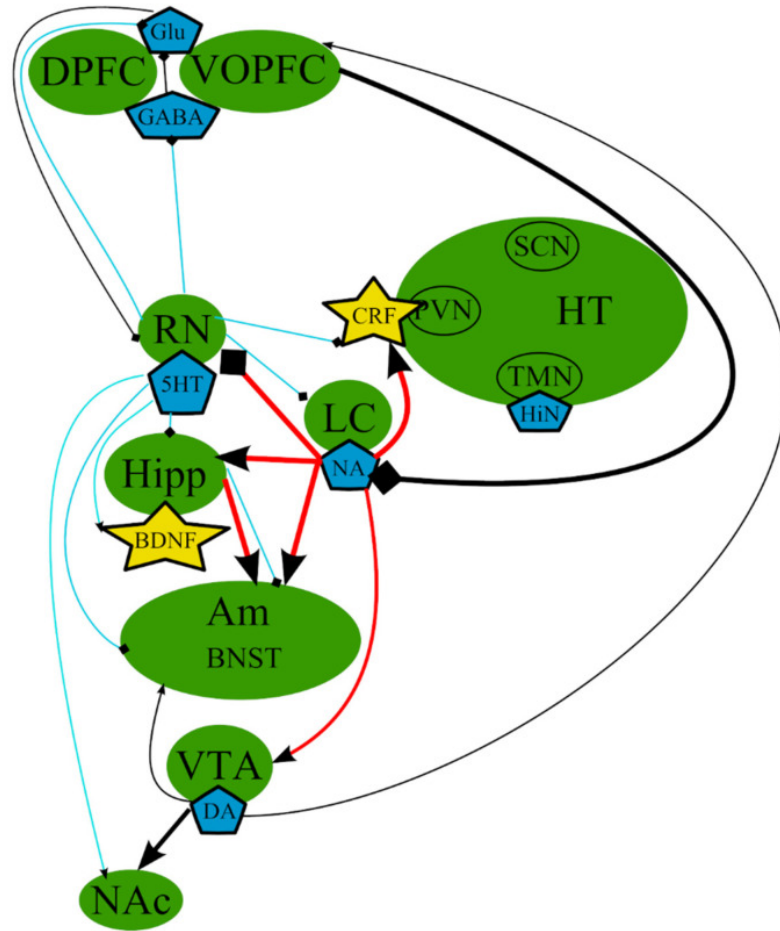


Figure 1. Schéma des principales structures cérébrales impliquées dans la dépression majeure et leurs interactions anatomiques et fonctionnelles via les monoamines. D'après Filatove et al., 2021. BDNF = brain-derived neurotrophic factor; BNST = bed nuclei stria terminalis; CRF = corticotropin-releasing factor; DA = dopamine; DPFC = dorsal prefrontal cortex; Glu = glutamine; GABA = gamma-aminobutyric acid; HiN = histamine; Hipp = hippocampus; HT = hypothalamus; 5-HT = sérotonine; LC = locus ceruleus; NA = noradrénaline; NAc = noyau accumbens; Oxn = orexin; SCN = suprachiasmatic nucleus; TMN = tuberomammillar nucleus; RN = raphe nucleus; PVN = paraventricular nucleus; VOPFC = ventral and orbital prefrontal cortex; VTA = ventral.

Si on se focalise sur les preuves cliniques qui relient le système sérotoninergique à la DM, on peut distinguer deux axes majeurs, à savoir l'altération d'acteurs impliqués dans le métabolisme de la sérotonine et la modulation des acteurs du système 5-HT (récepteurs, transporteur, etc.). Concernant l'altération directe du métabolisme de la sérotonine, il a été montré que des patients atteints de DM présentent une diminution des taux plasmatiques de L-Trp (L-tryptophane), le précurseur de la sérotonine, et des taux plus élevés de 5-HIAA (acide

5-hydroxyindolacétique), métabolite de la sérotonine (Ogawa et al., 2014 ; Dencker et al., 1966, Mendels et al., 1972, van Prag and de Haan, 1979). Bien que les mécanismes responsables de la diminution des taux de tryptophane ne soient pas encore complètement élucidés, des données récentes montrent que les cytokines inflammatoires peuvent diminuer les concentrations circulantes de tryptophane par l'induction de l'enzyme Indoléamine 2,3-dioxygénase (IDO) à la fois à la périphérie et dans le cerveau. L'IDO est la première enzyme de dégradation de cet acide aminé dans la voie de la kynurénine s'accomplissant au détriment de la voie de la synthèse de sérotonine (Vancassel et al., 2018, Diné et al., 2014). Ces résultats sur la diminution de tryptophane font également écho à la diminution d'expression de TPH2 (tryptophan hydroxylase 2), enzyme de synthèse limitante de la sérotonine et à l'augmentation d'expression de la MAO (monoamine oxydase), enzyme de dégradation de la sérotonine (Meyer et al., 2006 ; Zhang et al., 2015). Ces modulations d'expression peuvent résulter de polymorphismes génétiques qui sont associées à une plus grande susceptibilité de développer la DM et/ou à une vulnérabilité accrue au suicide (Chiuccariello et al., 2014; Lopez de Lara et al., 2007 ; Lim et al., 2007). Ensemble, ces altérations du métabolisme de la sérotonine convergent vers un renouvellement/turnover accéléré de celle-ci chez les patients dépressifs qui est notamment contrebalancé par l'administration d'ISRS (Barton et al., 2008).

D'autres polymorphismes génétiques des acteurs du système sérotoninergique semblent impliqués dans l'étiologie de la DM, notamment ceux du SERT (transporteur de la sérotonine), mais aussi ceux de nombreux récepteurs à la sérotonine. Le SERT codé par le gène SLC6A4 présente deux polymorphismes décrits comme court, appelé « s », ou long, « l ». (Heils et al., 1996). L'allèle « s », associé à une plus grande vulnérabilité à la DM, diminue l'expression de 50% du SERT entraînant une diminution de la clairance synaptique de la sérotonine (Luddington et al., 2009). Quant aux récepteurs, beaucoup d'entre eux sont également décrits comme ayant une expression modifiée chez des patients atteints de DM mais aussi des capacités de fixation altérées (pour revue : Köhler et al., 2016).

Outre les preuves cliniques, les modèles précliniques ont aussi permis d'apporter des preuves supplémentaires quant à l'implication du système sérotoninergique dans la DM. Par exemple, une diminution du tonus sérotoninergique associée à une hypersensibilité de l'auto-récepteur 5-HT_{1A} dans un modèle génétique de dépression (« souris helpless/souris Rouen ») a été rapportée (Yacoubi et al., 2013). On retrouve globalement une diminution du taux de sérotonine dans les structures limbiques, dont le raphé dorsal de souris présentant des comportements pseudo-dépressifs suite à une séparation maternelle (Ohta et al., 2014). Des

anomalies sont aussi remarquables dans des modèles de stress chroniques. Une diminution de la quantité de sérotonine associée à une hypofonction du système sérotoninergique a été observée dans le cortex préfrontal médian de souris soumises aux stress chroniques modérés imprévisibles (UCMS pour « Unpredictable Chronic Mild Stress ») (Ahmad et al., 2010 et Lu et al., 2019). On peut retrouver, dans le modèle de dépression induite par la défaite sociale, une augmentation de sérotonine intracellulaire hippocampique durant le stress coïncidant avec une augmentation de l'expression du SERT dans le DRN, l'hippocampe, l'amygdale et le cortex frontal (Zhang et al., 2012 et Keeney et al., 2006). Restant sur ces considérations, on peut également citer des travaux montrant que si on impacte directement le métabolisme de la sérotonine en induisant un déficit de 60-80% de synthèse de celle-ci grâce à une mutation génétique de la tryptophane hydroxylase 2 (R439H), les souris présentent une plus forte vulnérabilité au stress (Sachs et al., 2015). Dans la même idée, de nombreux modèles génétiques de déficience en sérotonine montrent une perturbation des comportements anxio-dépressifs (pour revue : Fernandez and Gaspar, 2012).

Il existe aussi des perturbations du système 5-HT dans les modèles induits par des traitements. En effet, dans le modèle induit par l'administration chronique de corticostérone, une diminution des courants excitateurs post-synaptiques perçus par les neurones 5-HT du raphé dorsal a été observée (Prouty et al., 2019 et Sowa et al., 2019). On retrouve également moins de 5-HT hippocampique dans le modèle de dépression induit par l'injection d'un agent pro-inflammatoire, le lipopolysaccharide (LPS) (Carabelli et al., 2020).

Enfin, l'optogénétique et chémogénétique s'avèrent être des outils incontournables pour appréhender les liens entre le système sérotoninergique et les comportements anxio-dépressifs (Figure 2). En effet, différents travaux montrent que l'activation optogénétique des neurones 5-HT du DRN entraîne des effets de types antidépresseurs alors que celle des neurones 5-HT du noyau du raphé médian (MRN) est responsable d'un état d'anxiété (Ohmura et al., 2014 ; Abela et al., 2020). Bien que les approches optogénétiques soient utiles pour un contrôle aigu spécifique de l'activité des neurones 5-HT, le recours à la chémogénétique s'avère indispensable pour modéliser des effets chroniques de la manipulation des neurones 5-HT. Le DREADD (Designer Receptor Exclusively Activated by Designer Drugs) hM3Dq couplé à une protéine Gαq a pu être utilisé pour activer les neurones 5-HT du DRN de manière plus prolongée. À court et long terme, l'activation de cette population neuronale par la clozapine N-oxides (CNO) induit également des effets de type antidépresseurs (Teissier et al., 2015 ; Urban et al., 2016) et celle des neurones 5-HT du MRN des effets de type anxiogènes et pro-dépressifs (Li et al., 2018).

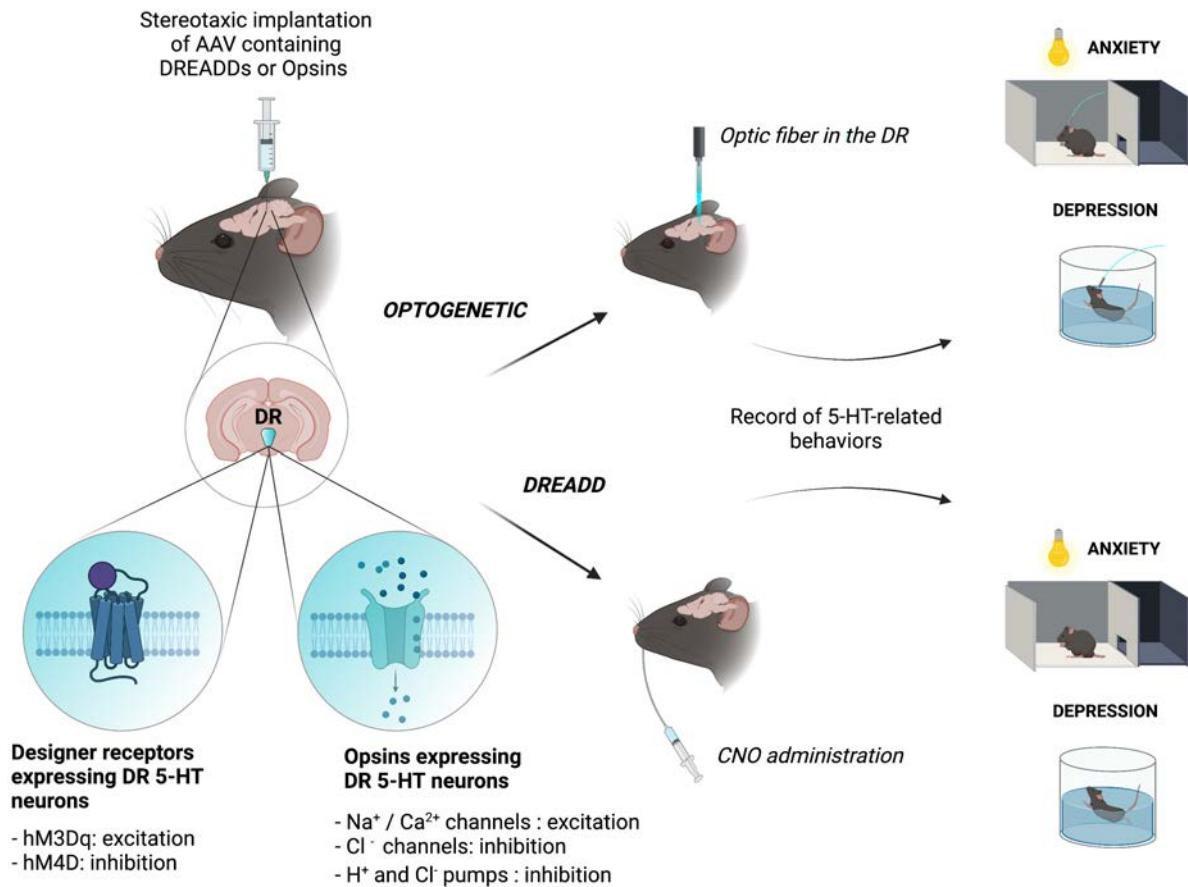


Figure 2. Approches optogénétiques et chémogénétiques dans l'étude de l'implication du système 5-HT dans la modulation de l'humeur. Les animaux sont injectés avec des vecteurs viraux exprimant soit l'opsine soit le DREADD qui vont promouvoir l'activation ou l'inhibition d'un réseau neuronal spécifique (dans ce schéma les neurones 5-HT du DRN). Dans le cadre de l'approche optogénétique, l'activation de l'opsine se fait en réponse à une lumière envoyée à travers une fibre optique placée au préalable par chirurgie stéréotaxique. Pour l'approche de chémogénétique, l'activation du DREADD se fait via le CNO injecté par voie intrapéritonéale ou administré dans l'eau de boisson. Pendant l'activation lumineuse ou après l'administration de CNO, les comportements émotionnels sont évalués à travers une batterie de test dont des tests d'anxiété et de dépression.

Tant sur le point de vue préclinique que clinique, différentes preuves expérimentales viennent étayer l'importance du système sérotoninergique dans la physiopathologie de la DM. Puisque ce système est au cœur de ce projet de thèse, les paragraphes ci-dessous détaillent son organisation anatomique et fonctionnelle dans le système nerveux central.

C. Le système sérotoninergique

1. Anatomie des noyau du raphé (DRN)

Les neurones sérotoninergiques sont localisés dans 9 noyaux nommés de B1 à B9 selon la nomenclature classique, situés au niveau du pont, du mésencéphale et du bulbe rachidien. Ces noyaux sont regroupés en deux sous-groupes selon leurs projections. Les noyaux les plus rostraux dans le mésencéphale et le pont rostral (B5-B9) dont le raphé dorsal (RD) (B6, B7) et le raphé médian (B5, B8) projettent dans des structures du prosencéphale et modulent l'humeur, la mémoire et le cycle sommeil-éveil. Quant aux noyaux plus caudaux du pont caudal et de la médulla : le raphé magnus (B3), le raphé obscurus (B2) et le raphé pallidus (B1) projettent dans la moelle épinière et participent au contrôle de la nociception, du mouvement et de la régulation du système nerveux autonome (Lesch and Waider, 2012, Figure 3).

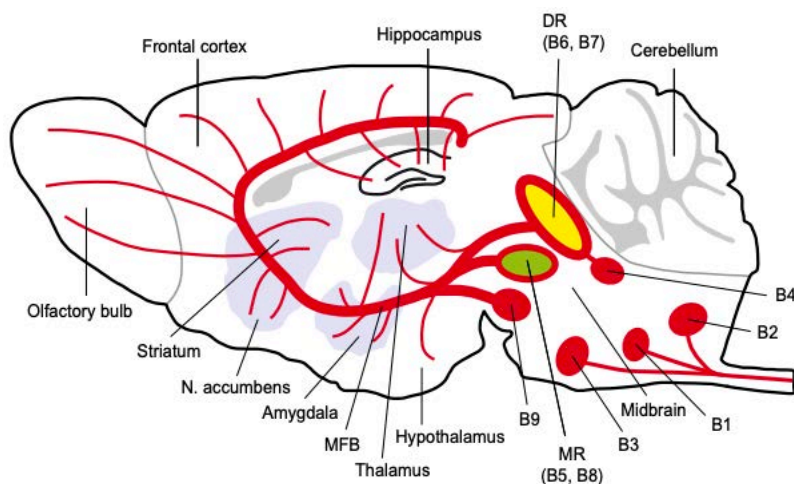


Figure 3. Représentation schématique du système sérotoninergique. D'après Lesch and Waider, 2012. DR = dorsal raphe nucleus; MR = median raphe nucleus ; MFB = medial frontal bundle.

Au cours de cette thèse nous avons focalisé nos recherches sur le noyau dorsal du raphé, notamment dans la cadre des études électrophysiologiques. A ce titre, la suite de ce chapitre détaillera plus en profondeur les propriétés anatomiques et fonctionnelles de ce noyau sérotoninergique.

Le noyau du raphé dorsal est subdivisé en 3 sous-régions anatomiques, la partie dorsomédiane, la partie ventromédiane et les ailes latérales. Il contient des neurones

sérotoninergiques mais également des neurones GABAergiques, dopaminergiques et peptidergiques (Figure 4).

Les neurones sérotoninergiques du DRN représentent jusqu'à 60% des neurones ce qui équivaut à environ à 9000 neurones chez la souris (Ishimura et al., 1988 ; Descarries et al., 1982). Ces neurones sérotoninergiques sont très hétérogènes (Andrade and Haj-Dahmane, 2013) puisque dans la littérature plusieurs classifications tentent de les catégoriser en sous-populations. En effet, on peut retrouver une classification basée sur les caractères morphologiques de ces neurones (Descarries et al., 1982), les propriétés électriques (Fernandez et al., 2016) ou encore selon l'expression de certains marqueurs géniques (Ren et al., 2019). Une étude montre par exemple que les neurones sérotoninergiques n'exprimant pas le marqueur Pet1 (un des facteurs de transcription clé dans l'acquisition du phénotype sérotoninergique) projeteraient vers l'amygdale basolatérale, les noyaux paraventriculaires de l'hypothalamus ou les noyaux thalamiques intralaminaires (Kiyasava et al., 2011). De plus, les neurones 5-HT projetant vers l'amygdale basolatérale seraient plus excitables et auraient des propriétés électrophysiologiques particulières (fréquence de décharge, durée/amplitude du potentiel d'action) comparées à celles des neurones innervant le cortex et l'hippocampe (Fernandez et al., 2016). Dans cette même étude, l'analyse en clustering a permis de mettre en évidence une population de neurone 5-HT 'atypique' présentant une excitabilité faible, un long délai de décharge et qui exprimeraient de manière préférentielle le transporteur VGLUT.

Les neurones GABAergiques peuvent être de plusieurs natures. Ils représentent 25 à 30% des neurones du DRN (Johnson, 1994 ; Allers and Sharp, 2003 ; Hernández-Vázquez et al., 2018). La majorité sont des interneurones projetant localement sur les neurones sérotoninergiques voisins. Ces neurones sont connus pour réguler et synchroniser l'activité des neurones sérotoninergiques et ce particulièrement au cours du sommeil (Nitz and Siegel, 1997 ; Gervasoni et al., 2000).

Les neurones dopaminergiques sont eux beaucoup plus minoritaires. Ils bordent la partie dorsale du DRN et forment également des bandes au niveau de la surface ventrale faisant face à l'aqueduc de Sylvius. Ils projettent au niveau du noyau accumbens, du septum et du cortex préfrontal (Stratford and Wirtshafter, 1990) (Figure 3). Le DRN reçoit également des afférences dopaminergiques qui modulent positivement l'activité électrique des neurones sérotoninergiques par l'activation du récepteur D2 (Aman et al., 2006 ; Haj-dhamane, 2001).

Enfin, des neurones peptidergiques ont été identifiés dans le DRN, parmi eux, des neurones à substance P, CRF, neurotensine, neuropeptide Y et enképhaline (pour revue Michelsen et al., 2007).

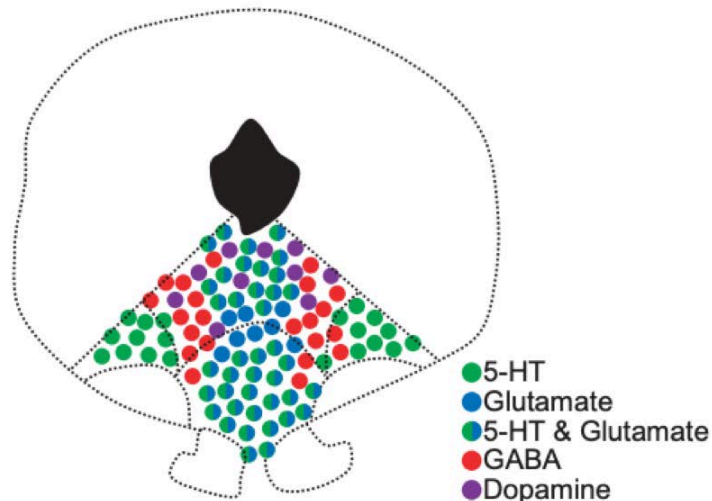


Figure 4. Localisation des différents populations neuronales du NDR. D'après Luo et al., 2015.

2. La synapse sérotoninergique

La synthèse de sérotonine se fait en deux étapes depuis le tryptophane, le précurseur de synthèse. Le tryptophane est un acide aminé essentiel apporté à l'organisme par l'alimentation (chocolat, produits laitier, bananes). Une fois passé la barrière intestinale ainsi que la barrière hémato-encéphalique, le tryptophane arrive au contact des neurones sérotoninergiques où il y est métabolisé en deux étapes après son processus de recapture. Dans un premier temps, le tryptophane intracellulaire est transformé en 5-hydroxytryptophane (5-HTP) grâce à la tryptophane hydroxylase (TPH2). La deuxième transformation est réalisée par la décarboxylase des acides aminés aromatiques (DAAA) qui produit la sérotonine à partir du 5-HTP. Une fois produite au sein du neurone, la sérotonine est stockée dans des vésicules d'exocytose au niveau du bouton synaptique grâce au transporteur vésiculaire des monoamines (VMAT). La libération de sérotonine peut ensuite avoir lieu notamment lorsqu'une dépolarisation de la terminaison synaptique est suffisante pour permettre l'ouverture des canaux calciques voltage-dépendants. L'accumulation de Ca^{2+} active des protéines responsables de la fusion de la membrane vésiculaire avec la membrane plasmique. Une fois dans la fente synaptique, la sérotonine peut alors agir sur les différents récepteurs pre-(5-HT_{1A/B/D}) ou post-synaptiques (5-HT_{1A/B/D/E/F}, 5-HT_{2A/B/C}, 5-HT₃, 5-HT₄, 5-HT_{5A/B}, 5-HT₅, 5-HT₆ et 5-HT₇) (David and Garder, 2016) (Figure 5).

La régulation de la quantité de sérotonine au niveau synaptique se fait par l'intermédiaire de plusieurs mécanismes. Tout d'abord, la sérotonine peut pénétrer dans le

neurone pré-synaptique par l'intermédiaire du transporteur de haute affinité de la sérotonine (SERT). Une fois à l'intérieur du neurone, la sérotonine peut être catabolisée en acide 5-hydroxyindolol-acétique (5-HIAA) par une enzyme mitochondriale : la monoamine oxydase de type A (MAO-A). Également, différentes données expérimentales suggèrent qu'elle peut être recaptée par les astrocytes qui vont pouvoir la recycler ou activer des récepteurs post-synaptiques présents sur ces cellules gliales (Quesseveur et al., 2013). Enfin, la sérotonine peut directement moduler sa quantité synaptique en exerçant un rétrocontrôle négatif d'une part sur l'activité électrique du neurone présynaptique via l'activation des autorécepteurs somatodendritiques 5-HT_{1A} et d'autre part sur le processus de libération via l'activation des autorécepteurs terminaux 5-HT_{1B/D}.

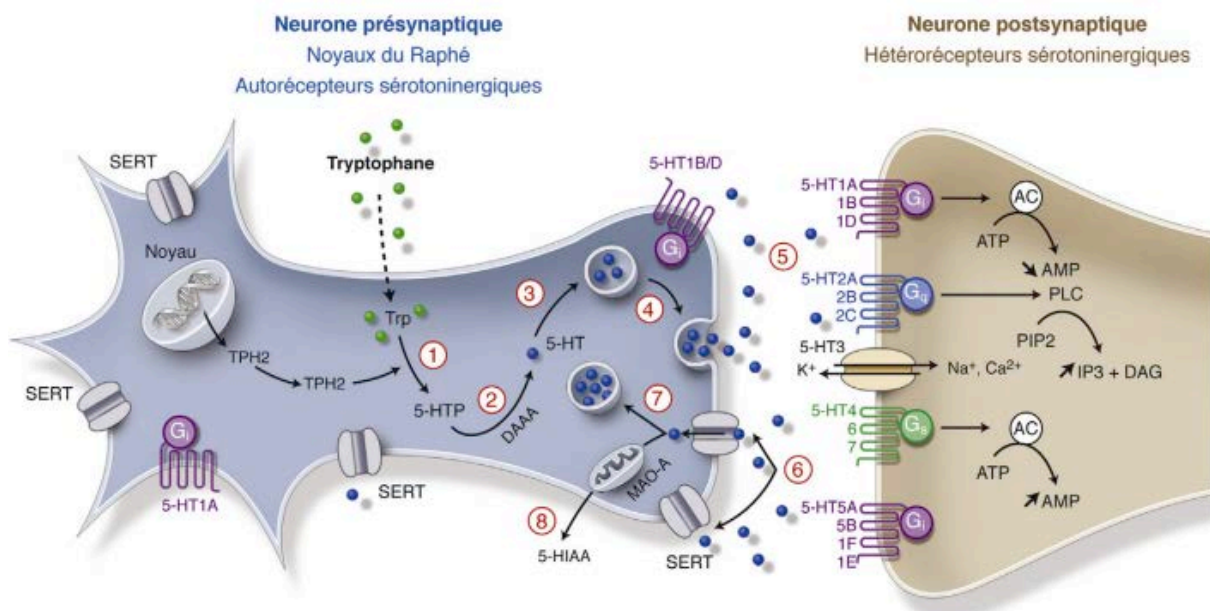


Figure 5. Schéma de la synapse sérotoninergique : de la synthèse de la sérotonine à la signalisation post-synaptique. D'après David and Garder, 2016. Trp = tryptophane ; 5-HTP = 5-hydroxytryptophane ; TPH2 = tryptophane hydroxylase ; 5-HT = sérotonine ; DAAA = acides aminés aromatiques ; VMAT = vesicular transporter ; MAO-A = monoamine-oxydase de type A ; SERT = transporteur sérotoninergique ; 5-HIAA = 5-hydroxy-indole acétique.

3. Les récepteurs à la sérotonine et fonctions associées

Dans le génome humain, les récepteurs à la sérotonine sont codés par 17 gènes générant 12 récepteurs métabotropiques et 5 sous-unités du récepteur 5-HT₃ ionotropique. Ils sont regroupés en 7 familles allant de 5-HT₁ à 5-HT-7, basé sur leur homologie de structure, la nature de leur couplage aux protéines G et leurs effecteurs intracellulaires.

Les récepteurs 5-HT₁

Cette sous-famille contient 5 récepteurs, le 5-HT_{1A}, 5-HT_{1B}, 5-HT_{1D}, 5-HT_{1E} et 5-HT_{1F}, et ils sont tous couplés à des protéines G_{i/o} inhibant l'adénylate cyclase.

Le **récepteur 5-HT_{1A}** est très largement distribué dans le système nerveux central et particulièrement dans les noyaux du raphé puisque c'est un autorécepteur somatodendritique qui permet l'inhibition de l'activité électrique des neurones sérotoninergiques. Il peut également être retrouvé sur les neurones post-synaptique agissant ainsi comme hétéro-récepteur, notamment au niveau de structures limbiques comme l'hippocampe pour la régulation de l'humeur (Cryan & Leonard, 2000). Les études précliniques montrent que son activation est connue pour générer un phénotype comportemental caractéristique chez le rongeur reposant sur une posture aplatie, un piétinement des pattes arrières ainsi que des oscillations de la tête (Hoyer et al., 2002 ; Lucki 1992). Outre ce phénotype comportemental, le récepteur 5-HT_{1A} est aussi impliqué dans la régulation de la température corporelle (Lesch et al., 1990). Sa fonction d'autorécepteur joue également un rôle clé dans le mécanisme d'action des antidépresseurs ciblant le système sérotoninergique. En effet, en raison de son effet inhibiteur sur l'activité électrique des neurones 5-HT, son activation atténue l'efficacité des traitements actuels. En effet, il a été proposé que le long délai d'action des antidépresseurs sérotoninergiques (3-4 semaines) coïncide avec le temps nécessaire à ces agents pharmacologiques pour désensibiliser cet auto-récepteur 5-HT_{1A} (Blier, 2001).

Le **récepteur 5-HT_{1B}** est principalement exprimé dans les ganglions de la base, le striatum et le cortex frontal. Tout comme le récepteur 5-HT_{1A}, il s'agit d'un autorécepteur inhibiteur (qui joue aussi le rôle d'hétéro-récepteur) régulant négativement la libération de sérotonine. En tant qu'hétéro-récepteur il contrôle également négativement la libération d'autres neurotransmetteurs comme l'acétylcholine, la glutamine, la dopamine, la noradrénaline et le GABA (Barnes and Sharp, 1999 ; Cryan & Leonard, 2000 ; Hoyer et al., 2002). Tant du point de vue préclinique que clinique, il est largement montré que le récepteur 5-HT_{1B} est impliqué dans les troubles anxieux et dépressifs (Ruf and Bhagwagar, 2009) mais aussi l'agressivité et l'impulsivité (Nautiyal et al., 2015).

Quant aux **récepteurs 5-HT_{1D/E/F}**, en raison du manque d'outils pharmacologiques et de leur faible niveau d'expression, ils sont à ce jour peu étudiés et aucun comportement associé

n'a été clairement décrit. Cependant, les agonistes 5-HT_{1D} (les triptans) sont utilisés pour le traitement des migraines via une action périphérique sur les vaisseaux sanguins (Mathew, 1997).

Les récepteurs 5-HT₂

Cette sous-famille contient 3 récepteurs, le 5-HT_{2A}, 5-HT_{2B} et 5-HT_{2C} qui sont couplés à la protéine Gq/11.

Le **récepteur 5-HT_{2A}** est principalement localisé dans le cortex, le claustrum et les ganglions de la base (Hoyer et al., 2002). Son implication dans la modulation de l'anxiété et des comportements dépressifs est largement décrite. En effet, des études précliniques mettent en évidence la potentialisation des effets thérapeutiques des ISRS comme la fluoxétine et le citalopram suite au blocage de ces récepteurs (Marek et al., 2005 ; Boothman et al., 2006). Bien que le mécanisme d'action de cet effet potentialisateur ne soit pas complètement connu, les travaux de l'équipe du Pr. Blier ont permis de montrer que l'inactivation pharmacologique des récepteurs 5-HT_{2A} à l'aide d'antipsychotiques atypiques comme la risperidone permet de lever le frein inhibiteur exercé par l'augmentation des concentrations extracellulaires de sérotonine sur les systèmes catécholaminergiques (dopamine et noradrénaline) (Dremencov et al., 2007). Outre son implication dans l'anxiété et la dépression, le récepteur 5-HT_{2A} semble également impliqué dans le contrôle de l'impulsivité puisqu'un antagoniste atténue ce comportement dans différents modèles animaux (Winstanley et al., 2004). Il est également admis que l'activation du récepteur 5-HT_{2A} cortical est responsable des effets hallucinogènes des psychédéliques mesurés à l'aide des mouvements anormaux de la tête des rats ou souris (Gonzalez-Maesco et al., 2007 ; Halberstadt et al., 2020).

Le **récepteur 5-HT_{2B}** est relativement peu exprimé dans le cerveau et ne possède pas beaucoup de ligands sélectifs. Toutefois, l'étude de souris invalidées génétiquement pour ce récepteur a permis de mettre en évidence son implication dans la réponse aux antidépresseurs (Diaz et al., 2012 ; 2016), la motricité, le comportement social, l'attention, les processus de la mémoire, l'impulsivité et le sommeil (Pitychoutis et al., 2015). De manière intéressante, différents travaux proposent que ce récepteur pourrait être un auto-récepteur excitateur mais le manque d'outils pharmacologiques n'a pas permis d'apporter des conclusions définitives quant à ce rôle potentiel (Belmer et al., 2018 ; 2019).

Le **récepteur 5-HT_{2C}** est particulièrement concentré dans les plexus choroïdes mais on le retrouve également dans les noyaux subthalamiques, l'hypothalamus, l'hippocampe et l'amygdale (Mengod et al., 1990). Les études cliniques et précliniques soulignent l'implication du récepteur 5-HT_{2C} dans les troubles alimentaires et le gain de poids (Tecott et al., 1995 ; De Luca et al., 2007 ; Yuan et al., 2000). Les souris knock-out pour ce récepteur sont également moins anxieuses (Teccot et al., 1998 ; Heisler et al., 2007) et plus sensibles à l'effet antidépresseur de la fluoxétine dans le test de suspension caudale (Cremers et al., 2004). Il est aussi établi que le récepteur 5-HT_{2C} est impliqué dans la régulation de la température, de l'activité locomotrice, du comportement sexuel et l'occurrence de troubles convulsifs (Jensen et al., 2017 ; Di Giovanni and De Deurwaerdere, 2016).

Les récepteurs 5-HT₃

Les **récepteur 5-HT₃** sont différents des autres récepteurs 5-HT de par sa nature. En effet, ce récepteur est un canal ionique constitué de 5 sous-unités perméables aux cations Na⁺, K⁺ et Ca²⁺ permettant l'excitation du neurone en réponse à la sérotonine. Parmi elles résident au moins une sous-unité 5-HT_{3A} accompagnée d'une ou plusieurs sous-unités 5-HT_{3B}, 5-HT_{3C} et 5-HT_{3E} (Barnes and Sharp, 1999 ; Jensen et al., 2008). Le récepteur 5-HT₃ est impliqué dans l'anxiété, la cognition, le signal douloureux et la sensibilité aux médicaments addictifs (Costall and Naylor, 1992 ; Bentley and Barnes, 1995 ; Barnes and Sharp, 1999 ; Walstab et al., 2010 ; Gupta et al., 2016). Cependant le rôle précis de ce récepteur est encore vague puisque parfois la sur-expression ou l'inactivation génétique de ce récepteur induit les mêmes modifications, notamment en lien avec l'anxiété et varie selon le fond génétique des animaux (Harrell and Allan, 2003 ; Kelley et al., 2003). De plus, ce récepteur pourrait bien être impliqué dans la formation de la mémoire puisque la vortioxétine, un ISRS également antagoniste des récepteurs 5-HT₃ serait reconnu pour avoir des effets bénéfiques sur les capacités mnésiques (Frampton, 2016 ; McIntyre et al., 2016 ; David et al., 2016).

Les antagonistes 5-HT₃ (les sétrons) sont utilisés dans le domaine de la cancérologie pour soulager les nausées induites par les chimiothérapies. Ils constituent ainsi une famille d'antiémétiques (Stables et al., 1987 ; Wolf, 2000).

Le récepteur 5-HT₄

Le **récepteur 5-HT₄** post-synaptique est le plus exprimé au niveau du système limbique (septum, hippocampe, amygdale et ganglion de la base) (Bockaert et al., 2004). Il a été démontré qu'il est nécessaire à l'hypophagie induite par le stress et la MDMA (Compan et al 2004 ; Jean et al., 2007). L'étude du knock-out spécifique et de l'effet d'agonistes a également permis de déceler son implication dans les comportements anxio-dépressifs. Par exemple, les souris knock-out sont plus anxieuses (Amigó et al., 2016 ; Compan et al., 2004) et l'agoniste du récepteur 5-HT₄ exerce des effets antidepresseurs dans le test de nage forcée et de préférence au sucrose (Lucas et al., 2007 ; Amigó et al., 2016). De plus, il a été montré que l'injection aigue d'un agoniste 5-HT₄ dans le cortex préfrontal médian (mPFC) induit des effets anxiolytiques de manière indépendante de la neurogénèse hippocampique (Mendez-David et al., 2014 ; Faye et al., 2020). Il est également clairement admis que le récepteurs 5-HT₄ joue un rôle dans les comportements alimentaires. En effet, des agonistes et antagonistes induisent respectivement de l'hypo- et de l'hyperphagie (Jean et al., 2007 ; Bockeart et al., 2011). De plus, les agonistes exercent des effets pro-cognitifs chez plusieurs espèces dans de nombreux paradigmes (Hagena and Manahan-Vaughan, 2016) comme par exemple dans le test de reconnaissance d'objet, le labyrinthe de Barnes et le conditionnement à la peur dans le modèle de dépression induit par la corticostérone (Darcet et al., 2016).

De plus, des polymorphismes du 5-HT₄ humain ont été identifiés comme associés avec des troubles bipolaires (Ohtsuki et al., 2002) et de dépression majeure (Madsen et al., 2014).

Les récepteurs 5-HT₅

La sous-famille des récepteurs 5-HT₅ compte deux membres, le 5-HT_{5A} et le 5-HT_{5B} chez le rat et la souris. En revanche chez l'Homme seul le 5-HT_{5A} est exprimé puisque la séquence correspondante au 5-HT_{5B} est interrompue par un codon STOP (Nelson, 2004).

Le **récepteur 5-HT_{5A}** est largement exprimé dans le système nerveux que ce soit chez la souris (Matthes et al., 1993), le rat (Erlander et al., 1993) ou l'humain (Pasqualetti et al., 1998) incluant le cortex cérébral, l'hippocampe, le thalamus, l'habénula, l'hypothalamus, le cervelet et la moelle épinière. Le **récepteur 5-HT_{5B}** quant à lui est plus localisé avec une expression réduite à l'hippocampe, l'habénula et le noyau dorsal du raphé chez le rat et la souris (Erlander et al., 1993; Matthes et al., 1993; Serrats, Raurich, Vilaro, Mengod, & Cortes, 2004).

Les souris knock-out pour le 5-HT_{5A} témoignent une activité exploratoire plus élevée dans un nouvel environnement sans modification du comportement anxieux (Grailhe et al., 1999). Le manque d'outil pharmacologique ne permet pas actuellement d'appréhender le rôle du 5-HT_{5A}. Cependant une étude récente utilisant des souris knock-out pour le 5-HT_{5A} spécifiquement dans les neurones à parvalbumine du gyrus denté montre que ce récepteur est nécessaire pour obtenir les effets comportementaux d'un traitement par un inhibiteur sélectif de la recapture de sérotonine (Sagi et al., 2019). Son association avec le risque de développer une dépression est encore largement discutée dans la littérature suite à l'étude des polymorphismes humains.

Le récepteur 5-HT₆

Le récepteur 5-HT₆ est positivement couplé à la protéine Gs et son expression est moindre chez la souris que chez le rat ou chez l'humain (Hirst et al., 2003). L'utilisation d'agonistes et antagonistes a permis de mettre en évidence l'implication de ce récepteur dans l'apprentissage et la mémoire (Mitchell and Neumaier, 2005; de Jongand and Mork, 2017) mais également le comportement alimentaire, l'addiction (Karila et al., 2015; Brodsky et al., 2016; Chaumont-Dubel et al., 2019) et les comportements anxio-dépressifs (Svenningsson et al., 2007; Wesolowska and Nikiforuk, 2007 ; Wesolowska et al., 2007).

Le récepteur 5-HT₇

Le récepteur 5-HT₇ est le récepteur le plus récemment décrit. Sa densité est plus importante dans le thalamus, l'hypothalamus, l'amygdale, l'hippocampe, le cortex et le raphé dorsal (Thomas et al., 2002 ; Varnäs et al., 2004). Il est analogue du récepteur 5-HT₆ et il a été montré que le 8-OH-DPAT (8-hydroxy-2-(di-n-propylamino)tétralin) a une affinité pour le récepteur 5-HT₇ identifié comme étant également impliqué dans l'effet hypothermique de celui-ci (Brenchat et al., 2012). Les souris knock-out pour ce récepteur décrivent une résignation réduite associée à une diminution du sommeil paradoxal (Guscott et al., 2005 ; Hedlund et al., 2005). Les outils pharmacologiques ont également permis de décrire des effets antidépresseurs sur le plan comportemental (Bonaventure et al., 2007; Mnie-Filali et al., 2011; Wesolowska et al., 2006). Ces mêmes souris ont des déficits d'apprentissage spatial et possèdent une altération de la potentialisation à long terme (Roberts et al., 2004). En revanche, à l'heure actuelle aucune étude des polymorphismes humains ne met en évidence d'association entre ce récepteur et le risque de développer des pathologies cérébrales.

La dépression et l'implication du système sérotoninergique dans cette pathologie psychiatrique étant introduite, nous allons maintenant décrire les différentes formes de diabètes afin de pouvoir ensuite appréhender la comorbidité ainsi que les liens mécanistiques entre ces deux pathologies.

II. Les diabètes sucrés

D'après la fédération internationale du diabète (IDF), en 2019, approximativement 463 millions de personnes dans le monde souffraient de diabète et ce chiffre devrait s'élever à 700 millions en 2045. En d'autres termes, la prévalence du diabète s'élève à 9,3% à l'échelle planétaire. Cette même année, le diabète a coûté plus de 760 milliards de dollars et entraîné le décès de 4,2 millions de personnes faisant de cette pathologie un enjeu économique et de santé publique majeur notamment en raison de la progression constante de ce trouble métabolique. À ce jour, plusieurs types de diabètes ont été caractérisés, le diabète de type 1 ou diabète insulino-dépendant, le diabète de type 2 ou diabète insulino-résistant et le diabète gestationnel. Le diagnostic clinique du diabète repose sur une glycémie à jeun ≥ 126 mg/dl, ou un taux d'hémoglobine glyquée HbA1c $\geq 6,5$ % ou encore une glycémie ≥ 200 mg/dl en réponse à un test de tolérance au glucose oral (American diabetes association, 2021 ; Tableau 2).

Paramètres	Diabète gestationnel	Pre-diabète	Diabète de type 1 et 2
Glucose plasmatique à jeun	≥ 92 mg/dL	100-125mg/dL	126mg/dL
Glucose plasmatique durant l'OGTT	≥ 153 mg/dL	140-199mg/dL	≥ 200mg/dL
Hémoglobine glyquée	/	5,7-6,4%	$\geq 6,5\%$

Tableau 2 - Critères de diagnostics des différents types de diabète. D'après l'Association Américaine du Diabète, 2021.

A. Le diabète de type 1

1. Étiologie

Le diabète de type 1 (DT1) aussi nommé diabète auto-immun, diabète insulino-dépendant ou encore diabète inné, est caractérisé par un défaut de sécrétion d'insuline résultant en une insulino-pénie associée à une hyperglycémie pathologique. Il est causé par une destruction auto-immune progressive des îlots β du pancréas responsable de la sécrétion endogène d'insuline assurant en conditions physiologiques l'homéostasie glucidique (Todd et al., 2010). Le développement d'auto-anticorps dirigés contre ces îlots seraient dû à une perte de régulation de l'immunité, l'exposition à des facteurs environnementaux ou encore à des prédispositions génétiques (Atkinson et al., 2014 Norris et al., 2020).

2. Épidémiologie

D'un point de vue épidémiologique, le DT1 concerne moins de 10% des diabétiques et peut survenir à n'importe quel âge avec un pic d'incidence autour des 10-14 ans et qui semblerait toucher plus particulièrement les jeunes garçons (The DIAMOND project group, 2016 & Diaz-Valencia et al., 2015). A l'échelle mondiale, cette incidence ne cesse d'augmenter depuis les années 50 avec une augmentation annuelle avoisinant les 3-4% depuis une trentaine d'années. Dans les pays du sud de l'Europe, dont la France, l'incidence du DT1 est autour des 10-20 malades pour 100 000 personnes/an (Gale, 2002 & Patterson et al., 2018).

3. Traitement

Malgré une hétérogénéité importante et peu comprise à tous les stades de la pathologie, le DT1 se traite correctement grâce à des administrations d'insuline. Cependant, le DT1 n'est pas sans possibles complications et comorbidités.

B. Le diabète de type 2

1. Étiologie

Le diabète de type 2 (DT2) aussi nommé diabète insulino-résistant, diabète gras ou encore diabète acquis, est caractérisé par une résistance à l'insuline et/ou un dysfonctionnement des cellules β aboutissant, tout comme le DT1, à une hyperglycémie pathologique. L'étiologie

de cette forme de diabète est plus complexe à aborder. En effet, à l'heure actuelle on ne sait pas qui de l'insulino-résistance ou du dysfonctionnement des cellules β prend place en premier, ou même si l'un est la conséquence de l'autre. Une chose est certaine, ces deux paramètres sont étroitement liés et convergent vers un défaut de signalisation de l'insuline. La dysfonction des cellules β se traduisant par une diminution de la sécrétion d'insuline réduit directement la quantité de cette hormone, alors que la résistance à l'insuline diminue l'activité physiologique de l'insuline endogène.

2. Épidémiologie

D'un point de vue épidémiologique, le DT2 concerne 90% des diabétiques et touche plus communément les adultes âgés mais peut survenir à n'importe quel âge notamment à cause de nombreux facteurs de risques comme l'obésité et une mauvaise hygiène de vie. En effet l'obésité est un risque majeur pour le développement du DT2 (Colditz et al., 1995 ; Luppino et al., 2010). Les différences sexuelles dans la pathologie de l'obésité seraient à l'origine des différences sexuelles dans le diabète de type 2. Ceci pourrait être la conséquence d'un trait évolutif, à savoir la répartition de la masse grasseuse (Power et al., 2007). Les hommes ont une masse grasseuse viscérale plus importante que les femmes, c'est pourquoi ils seraient diagnostiqués diabétiques avec un indice de masse corporelle (IMC) plus bas (Wändell et al., 2014).

3. Traitements

Il existe plusieurs stratégies thérapeutiques pour traiter le diabète de type 2. Des approches pharmacologiques mais également des stratégies non-médicamenteuses sont utilisées pour améliorer l'efficacité de l'insuline endogène.

3.1 Approches pharmacologiques

3.1.1. Les insulino-sécréteurs

Dans l'optique d'améliorer l'efficacité de l'insuline, *les sulfamides* (également appelés sulfonylurées) et les glinides vont stimuler directement la libération de l'insuline par les cellules

β du pancréas. On parle alors d'insulino-sécréteurs. **Les sulfonylurés** sont des antidiabétiques qui promeuvent directement la sécrétion d'insuline en dépolarisant les cellules β pancréatiques grâce au blocage de canaux K^+ sensibles à l'ATP.

Une autre classe d'antidiabétique agit sur le système des incrétones, différentes hormones insulino-sensibilisatrices sécrétées par l'intestin suite à un repas. Ce sont **les gliptines** qui regroupent 2 types de molécules. Les inhibiteurs de la DPP-4 (dipeptidyl peptidase-4), l'enzyme responsable de la dégradation des incrétones, qui permet donc d'augmenter les taux circulants d'incrétines et donc leur activité bénéfique sur l'insulino-sensibilité et la sécrétion d'insuline. Quant aux « incréto-mimétiques », ils miment l'action du GLP-1 puisqu'il s'agit d'agonistes de son récepteur permettant la stimulation de la sécrétion d'insuline glucose-dépendante, d'inhiber la sécrétion de glucagon (hormone hyperglycémiant) et de réduire l'appétit. Ces traitements sont essentiellement utilisés en combinaison avec d'autres antidiabétiques oraux.

3.1.2 Les insulino-sensibilisateurs

Les thiazolidinediones (ou glitazones) sont des agents insulino-sensibilisateurs qui stimulent PPAR- γ qui est un facteur de transcription de gènes impliqués dans le métabolisme glucidique et lipidique du foie, des muscles et du tissu adipeux. Cependant ces molécules sont retirées du marché dans le début des années 2010 à cause de risques cardiovasculaires trop importants.

Les biguanides et plus particulièrement la metformine représentent le traitement de première intention. Son mécanisme d'action précis sur le métabolisme glucidique n'est pas parfaitement élucidé car ce médicament complexe possède de multiples sites d'action et mécanismes moléculaires. Sa cible majeure est le foie dans lequel elle va inhiber le complexe I de la chaîne respiratoire mitochondriale induisant une activation de l'AMPK aboutissant à l'inhibition de la néoglucogenèse mais aussi de la lipogenèse. Une autre cible de la metformine est l'entérocyte. En effet, elle augmente l'utilisation de glucose au niveau intestinal et stimule la sécrétion de GLP-1. Elle possède également un rôle anti-inflammatoire puisqu'elle inhibe la sécrétions de cytokines pro-inflammatoires. Ces conséquences hépatiques, intestinales et

inflammatoires convergent vers l'amélioration de la sensibilité à l'insuline (pour revue Rena et al., 2017) (Figure 6).

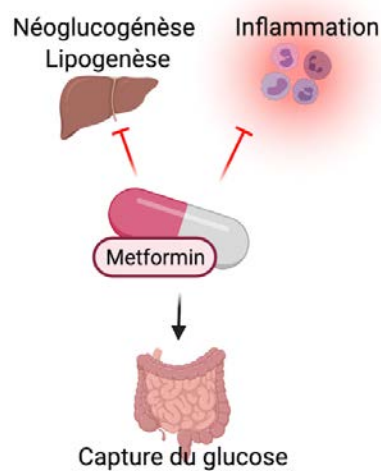


Figure 6. Effets de la metformine.

De plus, une revue regroupe des évidences cliniques récentes selon laquelle la metformine modulerait les taux de certaines adipokines. Elle rapporte notamment une augmentation de la concentration d'adiponectine ainsi qu'une diminution de leptine et de resistine (Dludla et al., 2020).

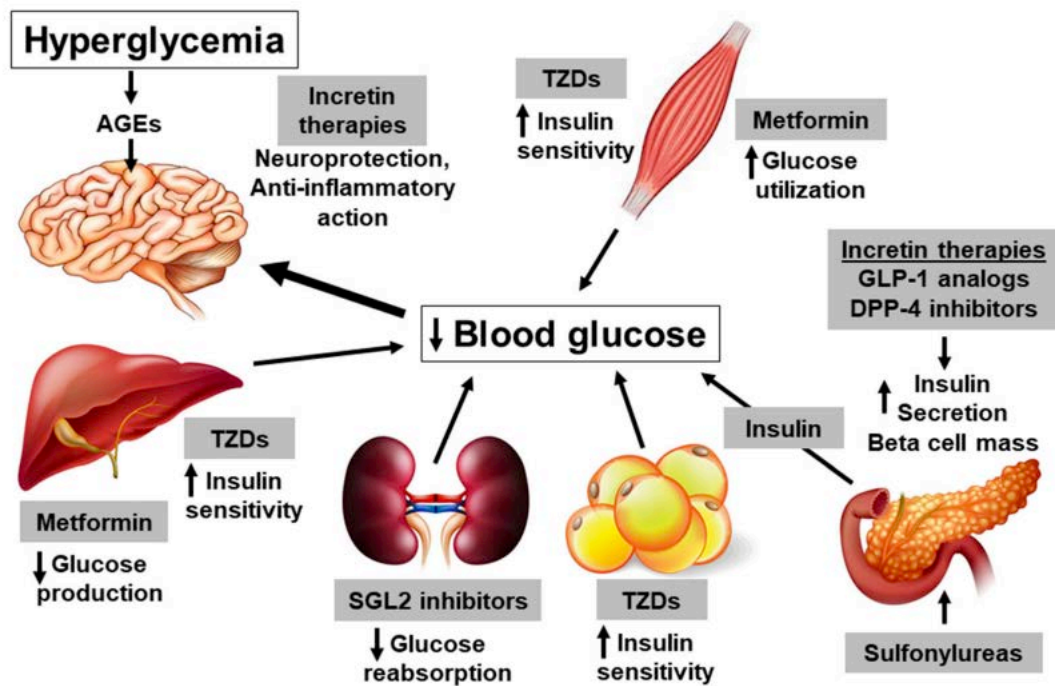


Figure 7. Mécanismes d'action des différentes stratégies antidiabétiques. D'après Tyagi and Pugazhenti, 2021.

3.2. *Approches non pharmacologiques*

Comme mentionné précédemment, l'obésité est le facteur de risque majeur pour le développement du diabète de type 2. C'est pourquoi des stratégies non médicamenteuses visant à améliorer l'hygiène de vie ont vu le jour pour prévenir mais aussi améliorer le statut métabolique des patients.

L'exercice physique régulier permet notamment d'améliorer le métabolisme glucidique puisqu'il augmente l'utilisation de glucose par les muscles et la sensibilité à l'insuline (Hübinger et al., 1987 ; Minuk et al., 1981). L'exercice physique promeut aussi la perte de poids et d'autant plus lorsqu'il est associé à un régime alimentaire contrôlé. Cela permet de réduire l'hyperlipidémie, de prévenir les maladies cardiovasculaires et de prévenir l'apparition de DT2 (American Diabetes association, 2004).

C. Le diabète gestationnel

1. Étiologie

Le terme de diabète gestationnel a été utilisé la première fois par Carrington en 1957 et fut reconnu après la publication des travaux de O'Sullivan en 1961 (Carrington et al., 1957 & O'Sullivan, 1961). Comme tous les autres diabètes, il s'agit d'une hyperglycémie pathologique se manifestant durant la grossesse. Dans la plupart des cas, ce type de diabète retourne à la normale suite à l'accouchement (Hadden, 2008). Il faut savoir qu'une augmentation de la glycémie est physiologique et nécessaire dans le cadre d'une grossesse, elle est d'environ 30%. Cependant lors du jeûne, la glycémie est plus faible, notamment à cause d'un volume plasmatique plus important associé à une utilisation de glucose plus conséquente chez la femme enceinte. Ainsi, cela résulte en une insulino-résistance qui entraîne une sécrétion 2 à 3 fois plus importante d'insuline pour maintenir l'euglycémie (Catalano et al., 1991). Dans ce contexte, les femmes ayant un pré-diabète, à savoir une résistance à l'insuline et/ou un dysfonctionnement des cellules β naissantes, ou des prédispositions au développement d'un diabète de type 2 comme un surpoids, un âge avancé ou des facteurs génétiques, auront plus de chance de développer une hyperglycémie pathologique au cours de leur grossesse. Ce diabète à première vue « transitoire » n'est pourtant pas sans possibles conséquences. En effet s'il n'est pas bien pris en charge, il peut engendrer des complications durant la grossesse (pré-éclampsie,

macrosomie), à l'accouchement (dystocie des épaules, extraction instrumentale) et à court terme après la naissance pour le nouveau-né (jaunisse, hypoglycémie néonatale, mort périnatale) (Persson et Hanson, 1998 & Casey et al., 1997). D'après une étude transgénérationnelle sur l'animal, au long terme le diabète gestationnel augmenterait le risque d'hyperglycémie, de diabète, d'obésité, de problème cardiovasculaire et hypothalamique chez la descendance (Harder et al., 2001 & Aerts et Van Assche 2005). Chez la mère, il existe une augmentation du risque de développer un DT1 et DT2 ainsi qu'un syndrome métabolique et des maladies cardiovasculaires, hépatique, rénale et de la rétine (Kramer et al., 2019 & Daly et al., 2018).

2. Épidémiologie

D'après la dernière classification et les critères de diagnostic publiés par l'Association Américaine du Diabète en 2021, il faut réaliser un test oral de tolérance au glucose au cours des semaines 24-28 de gestation. La glycémie à jeun doit être $>92\text{mg/dL}$, $>180\text{mg/dL}$ 1h après la prise de glucose et $>153\text{mg/dL}$ au bout de 2h. La prévalence du diabète gestationnel peut varier entre 1% et $>30\%$ selon les régions du monde, mais il est compliqué de comparer les pays entre eux en raison d'un manque de consensus autour des critères de diagnostic (McIntyre et al., 2019).

3. Traitement

Le traitement du diabète gestationnel consiste en première intention à normaliser la glycémie par un régime hygiéno-diététique comprenant une alimentation équilibrée et de l'activité physique. Si ce n'est pas le cas, un traitement par insuline peut être instauré.

D. Le diabète de type 3

Le diabète de type 3, aussi appelé diabète du cerveau, n'est pas encore reconnu comme une forme de diabète à part entière. En revanche, il semble étroitement lié à la maladie d'Alzheimer (MA). En effet, des études précliniques ont montré qu'un manque d'insuline et/ou une insulino-résistance centrale peut induire l'apparition de marqueurs caractéristiques de la MA. En particulier, le diabète peut renforcer la neurotoxicité induite par les plaques amyloïdes $A\beta$, l'hyperphosphorylation de Tau, l'activation de caspases suite à l'augmentation du stress oxydatif et la production de cytokines inflammatoires par les cellules gliales faisant converger

le tout vers la neurodégénérescence (pour revue : Nguyen et al.,2020). De plus, il a été montré que des patients non diabétiques atteints de la MA présentaient une insulino-résistance centrale associée à un déclin cognitif (Talbot et al., 2012). L'insulino-résistance a même été caractérisée comme prédicteur de dépôts amyloïdes au niveau du lobe frontal et temporal chez l'adulte (Wilette et al., 2015). C'est pour cela que la recherche clinique actuelle tente d'utiliser des stratégies antidiabétiques dont l'injection intra-nasale d'insuline dans un contexte de démence ou de MA (pour revue : Hallschmid 2021). Cependant il reste encore beaucoup à découvrir quant au rôle de l'insuline sur le cerveau afin de pouvoir caractériser cette forme particulière de diabète dit de type 3 et ses conséquences.

L'ensemble des diabètes présentés dans cette partie est étudié en recherche préclinique par l'intermédiaire de modèles animaux qui tentent de rendre compte des particularités de chaque trouble afin d'en étudier les mécanismes, les conséquences ainsi que les traitements potentiels. Les principaux modèles de DT1 et DT2 utilisés au cours de cette étude, à savoir le modèle streptozotocine (STZ) et « High Fat Diet » (HFD) seront développés dans les chapitres suivants, les autres le seront plus brièvement.

E. Les modèles animaux des diabètes

1. Modèles animaux du diabète de type 1

Les modèles du diabète de type 1 peuvent être de trois types, des modèles dits spontanés (ne nécessitant aucune intervention), des modèles chirurgicaux et des modèles chimiques.

Les **modèles spontanés**, comme les souris diabétiques non obèses (NOD) et les rats Biobreeding (BB), ont été générés par sélections progressives des animaux les plus susceptibles à développer un diabète puis en les faisant se reproduire entre eux. Ceux-ci sont obtenus à partir de croisements successifs sur plusieurs générations afin d'atteindre une forte stabilité phénotypique en termes d'anomalies métaboliques. Ces deux modèles reposent sur des modifications génétiques des gènes des acteurs de l'immunité comme les gènes qui encodent le complexe majeur d'histocompatibilité de classe 2, comme chez l'humain, faisant d'eux de très bons modèles pour étudier l'étiologie du diabète du type 1 (Atkinson et al., 1999). Il existe

également des modèles de souris transgéniques pour lesquelles des mutations du système immunitaire sont exprimées (pour revue : Acharjee et al., 2013).

Le **modèle chirurgical**, le moins couteux, consiste tout simplement à retirer le pancréas pour développer un diabète insulino-dépendant. Cependant cette méthode est assez drastique et représente un stress important pour l'animal (Bonner-Weir et al., 1983).

Concernant les **modèles chimiques**, il en existe 2 qui sont largement répandus pour induire un DT1 par deux analogues du glucose. Ces substances sont toxiques pour les cellules β du pancréas qui expriment le transporteurs GLUT2 (glucose transporter 2). En effet, ces transporteurs constituent la porte d'entrée de ces deux molécules toxiques. En revanche, il est important de noter que toutes les cellules insulino-sécrétrices pancréatiques n'expriment pas ces transporteurs et sont donc résistantes à de telles approches (Elsner et al., 2000 and Schnedl et al., 1994). De plus le transporteur GLUT2 n'est pas exclusivement pancréatique impliquant ainsi une toxicité non-spécifique notamment hépatique et rénale indésirables (Thorens, 2014).

Le premier, l'alloxane, est cytotoxique pour les cellules β grâce à la production d'espèces réactives de l'oxygène (ROS) connus pour leurs rôles dans le processus de mort cellulaire. La streptozotocine (STZ) quant à elle, est un agent alkylant de l'ADN causant des dommages sur celle-ci. Cela déclenche une cascade d'événements qui aboutit à la fragmentation de l'ADN puis à la mort cellulaire (Yamamoto et al., 1981). Les conséquences sont alors évidentes : la production d'insuline endogène est drastiquement réduite et entraîne une hyperglycémie pathologique. Le modèle streptozotocine (STZ) est un modèle du DT1 couramment utilisé puisqu'il partage la même étiologie que le DT1 humain, à savoir la destruction des cellules β (Lenzen et al., 2007). Il existe deux stratégies différentes pour l'induction d'un DT1 à l'aide de la STZ. La première consiste à administrer de manière répétée de faibles doses de STZ. Ce processus induit moins de nécrose des cellules β en premier lieu mais génère une inflammation qui causera à plus long terme leur destruction. De manière conjointe, l'apparition de l'hyperglycémie n'est pas directe mais est un peu retardée et progressive ce qui serait plus proche de la pathologie humaine (Like and Rossini 1976). L'autre méthode, repose sur une seule injection d'une forte dose de STZ. Ce protocole agressif est connu pour être plus toxique, induisant principalement de la nécrose des cellules β mais également de la toxicité au niveau d'autres organes (foie, reins). L'apparition de l'hyperglycémie est plus rapide c'est-à-dire qu'elle intervient autour du 2^{em}-3^{em} jours suivant

l'injection. Dans les deux cas, les souris présentent une insulinopénie, une hyperglycémie, une polydipsie (soif excessive) associées à une polyurie (augmentation du volume urinaire) caractéristiques du DT1 humain (Kolb, 1987).

2. Modèles animaux du diabète de type 2

Tout comme le DT1, le diabète de type 2 peut être modélisé à l'aide de souris génétiquement modifiées ou des régimes alimentaires particuliers. Ils reposent pour la plupart sur la prise de poids et surtout la formation de tissu adipeux.

Les **modèles génétiques** les plus répandus sont les souris déficientes pour la leptine (ob/ob), les souris déficientes pour son récepteur (db/db) et les rats Zucker possédant une mutation du récepteur de la leptine (fa/fa). L'altération du système de la leptine entraîne une diminution du signal de satiété au niveau central provoquant une hyperphagie et donc en prise de masse graisseuse (Wang et al., 2014).

Concernant les **modèles spontanés**, le plus largement décrit et utilisé est le rat Goto-Kakizaki (rat GK). Ce sont des rats sélectionnés au cours des générations pour leur susceptibilité à développer une hyperglycémie. Ils sont décrits comme ayant une insulino-résistance et des problèmes de sécrétion d'insuline faisant d'eux un modèle de choix pour le DT2 puisqu'il n'est pas accompagné d'une prise de poids qui peut être un facteur confondant dans certaines études (Guest., 2018).

Le **modèle HFD** (pour « High-fat diet ») repose aussi sur cette prise de poids puisqu'il s'agit d'exposer les animaux à un régime enrichi en gras. Il existe beaucoup de protocoles différents dans la littérature. En effet la durée d'exposition peut varier de quelques semaines à plusieurs mois. L'âge d'exposition peut également être important, tout comme la lignée de souris utilisée (Jinglei et al., 2020 ; Jovicic et al., 2015). La nature du régime est aussi variable avec des taux en lipides pouvant atteindre 60%. Cet apport massif en acide gras est l'élément déclencheur de dérèglements métaboliques en cascade. Dans un premier temps, en réponse à l'insuline qui active la lipogenèse, l'adiposité générale de l'animal va croître. C'est le cas aussi pour l'adiposité viscérale, connue pour être la plus pathologique notamment à cause de la sécrétion importante de TNF- α , et d'IL-6 (Guo, 2014), responsables d'une inflammation de bas grade (Cencello and Clément, 2006). Cette lipotoxicité va ensuite s'étendre à d'autres organes

périphériques comme le cœur, le muscle squelettique, le foie, les reins ou encore le pancréas induisant un stress et une altération des fonctions cellulaires. Tout cela va aboutir à une insulino-résistance se traduisant par une hyperglycémie pathologique puis par une hyperinsulinémie (Kalupahana et al., 2012 ; Romeo et al., 2012). Une fois le contexte d'insulino-résistance établi, le foie se remet à produire du glucose par le processus de néoglucogénèse et, à cause d'une 'insulino-résistance sélective', il continue de faire de la lipogenèse aggravant ainsi le diabète (Brown et al., 2008). Le modèle HFD est un très bon modèle qui mime l'étiologie du DT2 humain associé à un surpoids/obésité mais il possède certaines limites. C'est un modèle qui est moins efficace sur les souris femelles (Morselli et al., 2014). Aussi, il n'y a pas d'évidences mettant en lumière un dysfonctionnement des cellules β du pancréas existant chez l'humain. Pour pallier à cela, certains groupes combinent le régime HFD avec une injection de STZ pour mimer respectivement l'insulino-résistance et le dysfonctionnement des cellules β (Nath et al., 2016 ; Reed et al., 2000). Pour résumer, le modèle HFD est un bon modèle, complexe, à l'interface de plusieurs pathologies métaboliques (diabète, obésité, NASH, pathologie cardiovasculaire...) et nous verrons par la suite que ce modèle déborde aussi sur le syndrome anxio-dépressif.

Le régime enrichi en fructose est lui aussi un régime diabétogène utilisé pour modéliser le DT2 n'induisant pas d'obésité. En effet, il aboutit en une altération du métabolisme glucidique avec une insulino-résistance, une hyperglycémie, hyperinsulinémie. Mais aussi, il s'accompagne d'une hypertriglycéridémie et d'une augmentation de la synthèse de novo de lipide par le foie (Balakumar et al., 2016 ; Rai et al., 2020 ; Crescenzo et al., 2012).

Enfin, le régime occidental (« Western diet », WD ou encore HSHF pour High-sucrose high-fat diet) est un régime combinant un apport riche en gras mais également en glucides simples. Selon des études s'étant intéressées à la comparaison entre HFD et WD, les souris ou rats nourris avec des WD ont une insuliniémie, leptinémie et adiposité supérieure aux HFD lors d'une exposition dépassant les 16 semaines (Bortolin et al., 2017 ; Heinonen et al., 2014). Ce modèle semble plus adapté à la modélisation de l'obésité et/ou du syndrome métabolique car de nombreux paramètres du métabolisme des lipides est plus impactés chez les souris WD et s'accompagne souvent de problèmes cardiaques associés (Panchal et al., 2011).







Type 1		Type 2			
Inductibles	Spontanés	Inductibles	Génétiques		
					
Modèle Streptozotocine et/ou Alloxane	Modèle de souris non obèses diabétiques	Régimes enrichis en gras et/ou carbohydrates	Souris <i>ob/ob</i> et <i>db/db</i>	Rats Zucker	Modèle polygénétiques
Ces modèles reposent sur la destruction des cellules b du pancréas et donc sur la production endogène d'insuline	Ces modèles développent une auto-immunité dirigée contre les cellules b du pancréas spontanée (Souris NOD, rats BB)	Ces modèles reflètent les caractéristiques d'un diabète induit par l'obésité	Ces souris possèdent une mutation déficitaire pour la leptine ou son récepteur respectivement	Ces rats possèdent une mutation du récepteur à la leptine (<i>fa/fa</i>) et développent un diabète spontané	Ex : Otsuka LongEvans Tokushima Fatty (OLETF) rats, les souris TallyHo, et les souris New Zealand Obese (NZO)

Figure 8. Modèles murins du diabète. Adapté d'après Barakat et al., 2020.

III. Lien bidirectionnel entre diabète et dépression majeure

A. Épidémiologie

Au cours des dernières décennies, les études épidémiologiques suggèrent un lien étroit entre le diabète et la DM. En effet, il semblerait que la prévalence de la dépression parmi les patients diabétiques soit doublée atteignant, selon les études, jusqu'à 30% des patients comparée aux 10% parmi la population générale (Anderson et al., 2001). Cette observation est indépendante du type de diabète puisque cela a été reporté pour le DT1 (Buchberger et al., 2016; Shaban et al., 2006; Gendelman et al., 2009) mais également le DT2 (Ali et al., 2006; Roy et al., 2012; Wang et al., 2019). La réciproque est moins documentée mais serait également valable puisque quelques études soulignent aussi cette augmentation d'un facteur 2 de la prévalence du diabète parmi les patients souffrant de DM (Vancampfort et al., 2015; Chien et al., 2012). Ceci s'expliquerait par une hygiène de vie dégradée chez les sujets dépressifs et notamment une mauvaise alimentation. Des études suggèrent également que le taux plasmatique élevé de cortisol, l'hormone de stress, associé à la DM serait un facteur important dans le développement de troubles métaboliques (Joseph and Golden, 2016).

Ensemble, ces données traduisent l'existence d'un lien bidirectionnel entre troubles métaboliques et psychiatriques mais dont les mécanismes sous-jacents sont encore peu étudiés. Les paragraphes ci-dessous décrivent brièvement les différentes hypothèses mécanistiques envisagées tentant d'expliquer cette comorbidité.

B. Hypothèses mécanistiques

La **sur-activation de l'axe HPA** est considérée comme un mécanisme important qui pourrait sous-tendre la comorbidité entre le diabète et la dépression. Les patients diabétiques et les modèles animaux correspondants présentent une hypersécrétion de cortisol par les glandes surrénales (Chiodini et al., 2005). Or, on sait aujourd'hui qu'un tel processus peut être observé chez certains patients dépressifs (Wong et al., 2000). De manière intéressante, différentes études montrent que dans les deux pathologies, le rétrocontrôle négatif exercé par les glucocorticoïdes endogènes sur l'axe HPA est significativement diminué (Pace et al., 2007). Bien que les mécanismes exacts ne soient pas encore complètement élucidés, l'inflammation pourrait là aussi avoir un rôle majeur. En effet, il a été montré que des médiateurs pro-inflammatoires inactivent les récepteurs inhibiteurs des glucocorticoïdes dont le rôle est d'exercer un rétrocontrôle négatif sur l'axe HPA (Lewis-Tuffin et al., 2006 ; Raison et al., 2003). De manière remarquable, d'importants niveaux de glucocorticoïdes induisent une insulino-résistance en réduisant l'expression et la phosphorylation d'IRS1 (insulin receptor substrate 1) (Sakoda et al., 2000), ce qui pourrait expliquer que le stress chronique favorise l'apparition de troubles métaboliques.

Le **stress oxydatif** représente un processus physiopathologique souvent associé à la dépression autant chez l'humain que chez le rongeur (Réus et al., 2019). Cela implique l'altération de l'homéostasie « redox » caractérisée par la surproduction d'espèces réactives de l'oxygène (ROS) qui ne peuvent correctement être pris en charge par la cellule. Cela peut s'expliquer par une dérégulation spécifique des enzymes « redox ». Par exemple, on retrouve une diminution de la quantité de superoxyde dismutase chez les patients atteints de DM (Herken et al., 2007). Des études expérimentales ont également montré que des rats rendus diabétiques par l'alloxane présentent des niveaux élevés de ROS associés à des comportements de type dépressifs mesurés dans le test de nage forcée. De manière intéressante, ces paramètres sont corrigés par l'administration d'antidépresseurs tricycliques dont l'imipramine (Ceretta et al., 2012). En accord avec ces résultats, Tang et collaborateurs (Tang et al., 2015) ont montré que

l'injection de sulfure d'hydrogène, une molécule de signalisation du cerveau ayant des propriétés anti-oxydantes, était capable d'atténuer le phénotype pseudo-dépressif de rats diabétiques en réponse à l'administration de STZ. Ces résultats suggèrent que les changements comportementaux sont dépendants du niveau de stress oxydatif notamment dans l'hippocampe (Tang et al., 2015). De manière intéressante, les ROS induiraient l'insulino-résistance par le biais de l'activation de sérine/thréonine kinases responsables de l'inhibition de l'IR et/ou d'IRS-1 (Evans et al., 2005) et diminuerait la translocation de GLUT4 au niveau des adipocytes (Rudich et al., 1998). De plus, il est important de noter que l'augmentation de ROS est un prérequis pour l'activation de l'inflammasome et donc que les effet pro-dépresseurs des ROS pourraient être médiés par l'intermédiaire des acteurs de l'inflammation (Solleiro-Villavicencio et al., 2018). Ceci nous mène directement à l'hypothèse mécanistique suivante : l'inflammation.

L'inflammation de bas grade est associée à des symptômes dépressifs exacerbés chez les patients obèses avec des désordres métaboliques (Delgado et al., 2018). Au-delà du fait que des taux élevés de LPS ont été observés chez des sujets diabétiques comparés à des sujets contrôles sains (Gomes et al., 2017), cette endotoxine est utilisée comme modèle de prédilection chez le rat ou la souris pour entraîner une réponse inflammatoire. Des études pré-cliniques menées chez les rongeurs indiquent que des marqueurs de l'inflammation tels qu'un taux élevé de globules blancs, une élévation de la protéine C réactive (CRP) ou d'interleukine 6 (IL-6) représentent des facteurs de risque pour le développement du diabète (Barzilay et al., 2001 ; Pradhan et al., 2001 ; Schmidt et al., 1999). En effet, outre le fait que cette molécule soit connue pour induire une septicémie périphérique sévère augmentant les taux d'IL-1B, IL-6, TNF- α (tumor necrosis factor α) et l'expression d'autres cytokines dans le cerveau (Breder et al., 1994 ; Layé et al., 1994), il est admis que cette inflammation sous-tend, du moins en partie, les comportements pseudo-dépressifs dans ce modèle. Ces cytokines inflammatoires convergent également vers l'activation de sérine/thréonine kinases impliquées dans l'inhibition de la voie de signalisation de l'insuline induisant l'insulino-résistance (Fan et al., 2010 ; Zhang et al., 2010 ; Hirosumi et al., 2002).

L'ensemble de ces données nous conduit à considérer la signalisation de l'insuline comme un mécanisme crucial qui pourrait sous-tendre la comorbidité entre le diabète et la dépression. Cette hypothèse est appuyée par une étude clinique récente rapportant une corrélation positive entre la sévérité des symptômes dépressifs et celle de la résistance à l'insuline (Phillip and Perry, 2015). Les données précliniques sont également en accord avec

cette hypothèse puisqu'il a été montré à que l'insulino-résistance induite par un régime HFD chez le rat ou la souris, provoque une augmentation du niveau d'anxiété accompagnée de certains comportements caractéristiques d'un phénotype pseudo-dépressif (Dutheil et al., 2016 ; Hassan et al., 2019 ; Yang et al., 2016 ; Zemdegs et al., 2016). De manière intéressante, ces anomalies comportementales ont également été observées dans des modèles génétiques de DT2 comme les souris db/db (déficientes pour le récepteur à la leptine) ou les rats Zucker fa/fa (mutés pour le récepteur à la leptine) (Dinel et al., 2011 ; Li et al., 2014). Ces anomalies ne sont pas restreintes au DT2 puisque l'injection de STZ induit également ce type de troubles neurocomportementaux chez le rongeur (Miyata et al., 2004 ; Huang et al., 2016 ; Pan et al., 2013).

A l'inverse, différentes études précliniques rapportent que l'induction de symptômes pseudo-dépressifs, consécutifs à l'exposition de rongeurs à des stress chroniques, s'accompagnent d'une résistance périphérique à l'insuline. C'est notamment le cas dans le modèle de stress chronique imprévisible (ou UCMS pour Unpredictable Chronic Mild Stress) et dans un modèle de dépression induit par la dexaméthasone (Pan et al., 2013 ; Delanogare et al., 2020 ; Tsuneki et al., 2013). Cependant dans ces modèles, il n'est pas clairement précisé si les perturbations métaboliques sont des causes ou des conséquences des anomalies comportementales.

La comorbidité entre le diabète et la DM semble être bidirectionnelle mais aucun mécanisme d'action n'a été admis à ce jour. Son étude est complexe, d'autant plus que les rôles de l'insuline au niveau du système nerveux central sont encore flous vis à vis de la modulation des comportements anxio-dépressifs. Les hypothèses majeures pouvant expliquer l'impact du diabète sur ces comportements concernent la sur-activation de l'axe HPA, le stress oxydatif et l'inflammation qui peuvent être liées à l'insulino-résistance comme nous le verrons dans la partie 2 après avoir introduit l'insuline et ses rôles centraux.

PARTIE 2 :

**L'INSULINE ET SON RÔLE DANS LE SYSTEME
NERVEUX CENTRAL**

I. L'insuline et ses acteurs

A. L'insuline

1. Gène, structure et biosynthèse

L'insuline fut isolée la première fois en 1921 par Banting et Best depuis un pancréas de chien. Ce fut l'un des plus grands événements de la recherche biomédicale du siècle puisque cette molécule était non loin du miracle pour tous les sujets souffrant de diabètes. Elle aura valu à Banting et Best le prix Nobel en 1923. Ce fut également la première protéine dont la séquence primaire a été séquencée en 1955 par Sanger qui remporta également le prix Nobel pour ses travaux en 1958 (Ryle, 1955).

La forme circulante et biologiquement active de l'insuline est un monomère composé de 2 chaînes, une chaîne A de 21 acides aminés (AA) et une chaîne B de 30AA liées par 2 ponts disulfures chez l'humain. Cette protéine est codée par un petit gène de 1425 bases (*INS*) localisé sur le chromosome 11 composé de 3 exons séparés par 2 introns (Bell et al., 1980). Il code la pré-pro-insuline de 110AA, précurseur de l'insuline. Cette pré-pro-insuline traduite dans le cytosol comprend une séquence d'adressage de 25AA qui va lui permettre d'être transloquée au niveau du lumen du réticulum endoplasmique. Après clivage de la séquence d'adressage, le peptide va subir des repliements au niveau du réticulum endoplasmique grâce à la formation de ponts disulfures. C'est après un passage dans le trans-Golgi que l'insuline et le peptide C sont produits après clivage de jonctions par les prohormones convertases 1 et 2 (PC1 et PC2) (pour revue Weiss et al., 2009). Ces deux produits sont alors stockés dans des vésicules prêts à être sécrétés.

2. Sécrétion et dégradation de l'insuline

L'insuline est synthétisée et sécrétée au niveau des cellules β du pancréas. Le mécanisme principal de sécrétion de cette hormone est dit glucose-dépendant. En effet, en postprandial, la concentration plasmatique du glucose sanguin augmente et celui-ci est transporté à l'intérieur des cellules β par le biais du transporteur GLUT2 (rongeurs) ou GLUT-1 et GLUT-3 (humain). Une fois à l'intérieur de la cellule, le glucose est métabolisé par la glycolyse entraînant l'augmentation de la concentration d'ATP responsable de la fermeture des canaux K^+ sensibles à l'ATP (K_{ATP}). Cette fermeture se traduit par une accumulation d'ions K^+ dans la cellule β provoquant la dépolarisation de la membrane et l'ouverture des canaux Ca^{2+} voltage-dépendants. L'entrée massive de Ca^{2+} qui en découle va alors déclencher la sécrétion

d'insuline (Wollheim et al., 1981). Cette sécrétion est dite biphasique, la première phase consiste en la libération de l'insuline antérieurement synthétisée et stockée et la seconde phase réside en la libération de l'insuline synthétisée de novo (Seino et al., 2011).

Outre la stimulation postprandiale, la sécrétion d'insuline varie au cours du temps selon deux types d'oscillations. La première possède une période ultradienne entre 1 et 3h alors que la seconde est très rapide avec une période allant de 10 à 15min (Polonsky et al. 1988 ; Lang et al., 1979). Ces caractéristiques témoignent de la présence de rétrocontrôles ainsi que de l'implication de nombreux acteurs.

En effet, la sécrétion d'insuline peut être modulée par de nombreux facteurs. Le glucose reste le chef d'orchestre de cette libération mais d'autres marqueurs du statut métabolique comme les acides aminés ou les acides gras peuvent amplifier la sécrétion d'insuline induite par le glucose (Newsholme et al., 2007 ; Acosta-montaña et al., 2019). De nombreux modulateurs peuvent jouer en faveur ou défaveur de ce phénomène selon plusieurs axes.

Tout d'abord, selon un **axe hypothalamo-insulaire**, le système nerveux autonome va pouvoir impacter positivement la sécrétion d'insuline majoritairement par le biais de l'acétylcholine via le système parasympathique vagal en agissant sur les récepteurs muscariniques métabotropiques M3 couplés à Gq présents sur les cellules β (Azua et al., 2011 ; Zhu et al., 2020). Concernant le système sympathique, il va moduler négativement la sécrétion d'insuline en grande partie via la noradrénaline agissant sur les récepteurs $\alpha 2$ couplés à Gi. D'autres acteurs provenant du système nerveux autonome peuvent agir dans une moindre mesure sur le processus de libération mais aussi de synthèse de l'insuline comme le VIP (vasoactive intestinal peptide) ; le GRP (gastrin releasing peptide), le PACAP (pituitary adenylate cyclase activating polypeptide), la galanine, le NPY (neuropeptide Y) et la somatostatine (pour revue : Magnan et Ktorza 2005 ; Rorsman et Braun, 2013) (Figure 9).

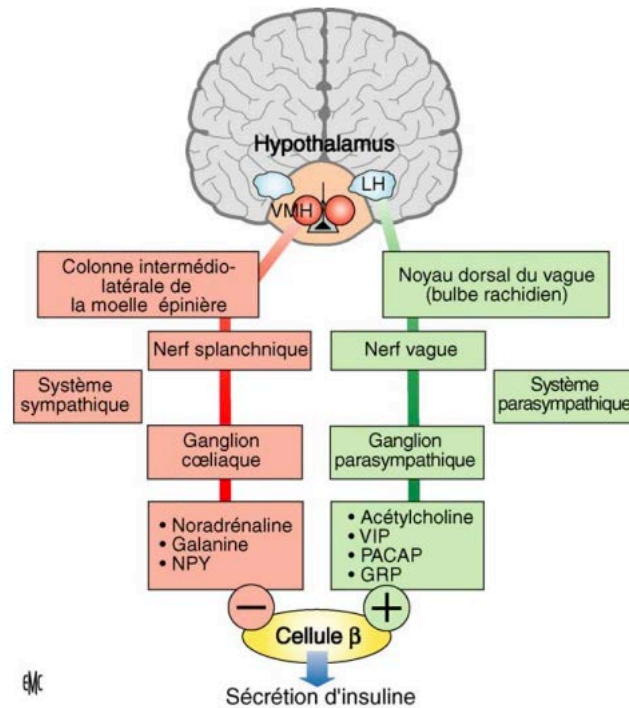


Figure 9. Modulation centrale de la sécrétion d'insuline. D'après Magnan and Ktorza, 2005.

L'**axe entéro-insulaire** est également un acteur majeur de la régulation de la cellules β par l'intermédiaire des incrétines. Celles-ci exercent un effet insulino-trope avec le GIP (gastric inhibitory polypeptide), le GLP-1 (glucacon like peptide-1) et la CCK (cholécystokinine) pour les principales.

Le tissu adipeux va également, par le biais des adipokines qu'il sécrète, réguler la sécrétion de l'insuline. Les deux plus connues, l'adiponectine et la leptine, exclusivement produites par le tissu adipeux blanc, influencent respectivement positivement et négativement la sécrétion d'insuline (Emilsson et al., 1997 ; Okamoto et al., 2008). Cet **axe adipo-insulaire** est d'autant plus important dans un contexte pathologique comme l'obésité ou le DT2 puisque les niveaux d'adipokines sont modifiés (Considine et al., 1996 ; Hotta et al., 2000). L'impact de nombreuses adipokines (dont l'apeline qui fait l'objet d'une partie spécifique de cette thèse) sur la sécrétion d'insuline est référencé dans la revue de Cantley (Cantley, 2014).

Enfin, l'**axe insulo-insulaire** assure par un mécanisme d'action paracrine et/ou autocrine la régulation des taux d'insuline. En particulier, le glucagon, la somatostatine et l'insuline elle-même, jouent un rôle dans la modulation de la sécrétion d'insuline. Le glucagon et la somatostatine, produits par les cellules α et δ du pancréas, stimulent et inhibent respectivement ce processus (Samols et al., 1965 ; Olsson et al., 1976). Le rétrocontrôle exercé par l'insuline sur sa propre sécrétion n'est pas complètement admis et reste controversé (pour

revue : Leibiger et al., 2002). Cependant une étude *in vitro* montre que l'insuline pourrait réguler négativement sa sécrétion en activant les canaux K_{ATP} des cellules β par le biais de PI3K (phosphatidylinositol-3-kinase) (Khan et al., 2001). Également, les souris génétiquement invalidées pour le récepteur à l'insuline spécifiquement dans les cellules β (bIRKO), montrent une perte de sécrétion de l'insuline stimulée par le glucose (Kulkarni et al., 1999).

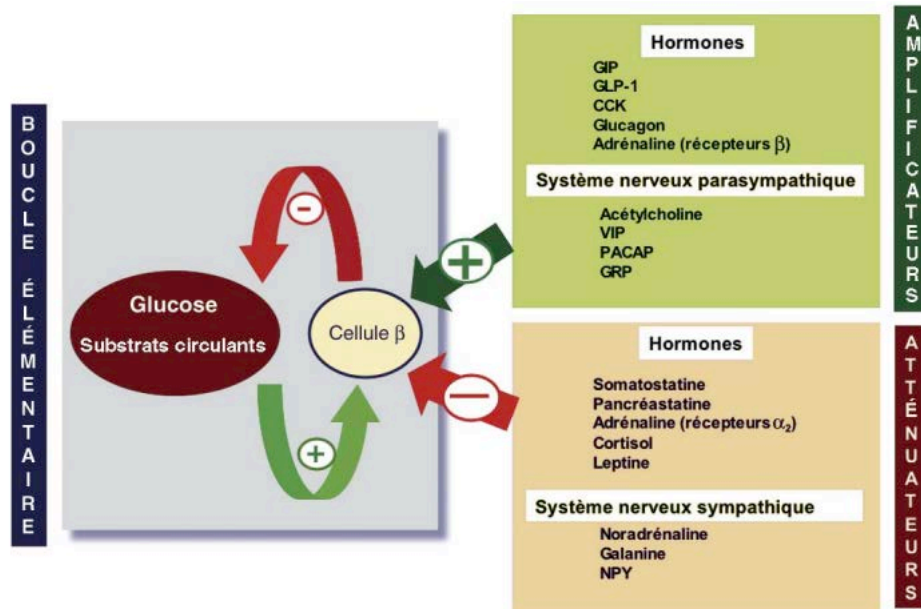


Figure 10. Principaux acteurs de la régulation de la sécrétion d'insuline. D'après Magnan and Ktorza, 2005.

Concernant le catabolisme de l'insuline, il est admis que cette hormone est dégradée par une enzyme spécifique appelée IDE pour « insulin-degrading enzyme ». Il s'agit d'une métalloprotéase exprimée de façon ubiquitaire dans les cellules sensibles, ou pas, à l'insuline (Kuo et al., 1993). Elle est avant tout cytosolique mais se retrouve également au niveau des péroxisomes, mitochondries et endosomes. Cette métaloendoprotéase exerce son action biologique de clivage au niveau de 9 sites dont 2 localisés sur la chaîne A et 7 sur la chaîne B (Stentz et al., 1989). En particulier, après sa sécrétion et son relargage au niveau de la veine porte, l'insuline va subir un premier passage hépatique connu pour réguler la concentration périphérique d'insuline (Meier et al., 2005). Les reins participent ensuite majoritairement à la dégradation de l'insuline comme ont pu le montrer des études de radiographie (Hysing et al., 1989). L'insuline y est filtrée au niveau des glomérules puis réabsorbée par endocytose dans le tube proximal pour enfin être dégradée. Sa dégradation se ferait ensuite, selon les études princeps, par le biais de l'IDE mais les approches modernes semblent suggérer que d'autres voies et acteurs seraient impliqués (pour revue : Leissring et al., 2021).

B. Le récepteur à l'insuline

1. Gène, expression et structure

Le récepteur à l'insuline (IR) est codé par le gène *INSR* d'environ 150kpb situé sur le chromosome 19 et est composé de 22 exons (Seino et al., 1990). Lors de sa transcription, il peut subir un épissage alternatif de l'exon 11 pouvant résulter en 2 isoformes, IR-A qui contient l'exon 11 ou IR-B qui en est dépourvu (Moller et al., 1989). Ce récepteur est formé de 2 chaînes (IR-A ou IR-B) issues du même précurseur assemblées par des pont disulfures. Chaque chaîne est composée d'une unité α (pourvu ou non de la partie codée par l'exon 11) et d'une unité β . Une fois le tétramère formé et localisé au niveau de la membrane, les 2 sous unités α sont localisées du côté extracellulaire et possèdent la séquence de liaison à l'insuline alors que les sous-unités β au niveau cytoplasmique portent l'activité tyrosine kinase. C'est donc un RTK (récepteur à activité tyrosine kinase) qui peut avoir 3 formes IR-A:IR-A et IR-B:IR-B qui sont des homotétramères et IR-A:IR-B, un récepteur hybride. De plus, ayant une forte homologie avec le récepteur pour IGF-1R (insulin-like growth factor1 receptor), une chaîne IR-A ou IR-B peut dimériser avec une chaîne IGF-R formant ainsi des hétérotétramères ou récepteurs hybrides : IR-A:IGF-1R et IR-B:IGF-1R. Tous les récepteurs listés auparavant lient l'insuline, IGF-1 et IGF-2 selon des affinités différentes résumées dans la Figure 11 (Escribano et al., 2017). De manière générale, le « crosstalk » entre les IGF et l'insuline est le plus important au niveau du IR-A:IR-A pour lequel les trois molécules ont une très bonne affinité et au niveau du récepteur hybride IGF-1R:IR-A pour lequel l'insuline présente une affinité modérée (Sciaccia et al., 2010 ; Slaaby, 2015).

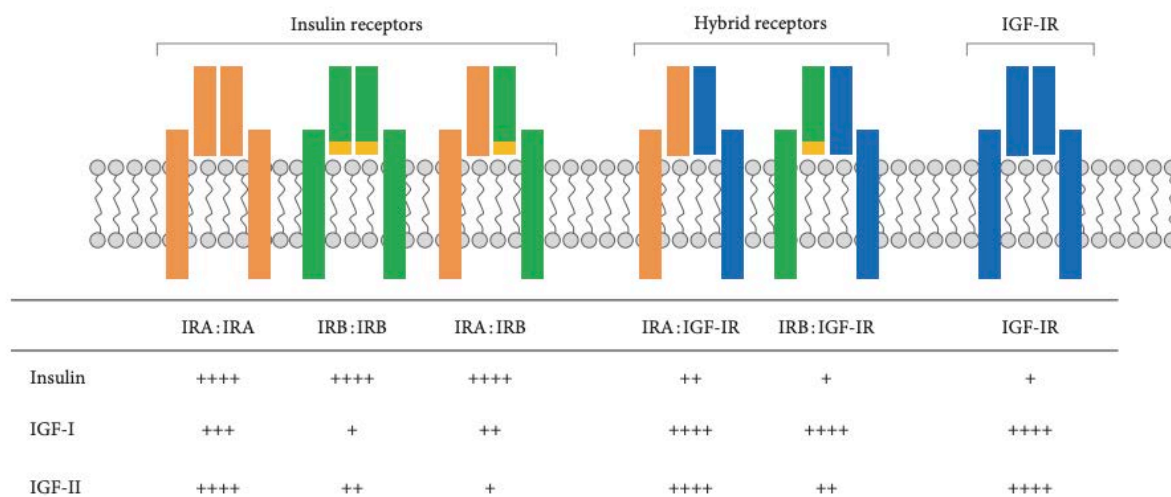


Figure 11. Récepteurs à l'insuline, à l'IGF1 et récepteurs hybrides : ligands et affinités. D'après Escribano et al., 2017.

2. Voie de signalisation

Comme évoqué précédemment, l'IR est un RTK qui va initier la transduction du signal par une série de transautophosphorylation induite par un changement de conformation en réponse à la fixation de l'insuline (Figure 11). Les tyrosines phosphorylées vont alors permettre le recrutement des protéines IRS (insulin receptor substrates) grâce aux domaines PTB (phosphotyrosine binding) (Eck et al., 1996). Il existe 6 protéines IRS identifiées chez l'humain mais les sous-types IRS-1, IRS-2, et IRS-4 sont les plus étudiées. Si IRS-5 et IRS-6 ont été récemment caractérisées chez l'humain (Cai et al., 2003), IRS-3 serait seulement présente chez le rongeur (Bjornholm et al., 2002). IRS-1 et IRS-2 sont très largement exprimées dans de nombreux types cellulaires alors que certaines protéines IRS sont très spécifiques comme IRS-3 dont l'expression semble limitée aux adipocytes, au foie et aux poumons (Sciacchitano and Taylor, 1997) (Figure 12).

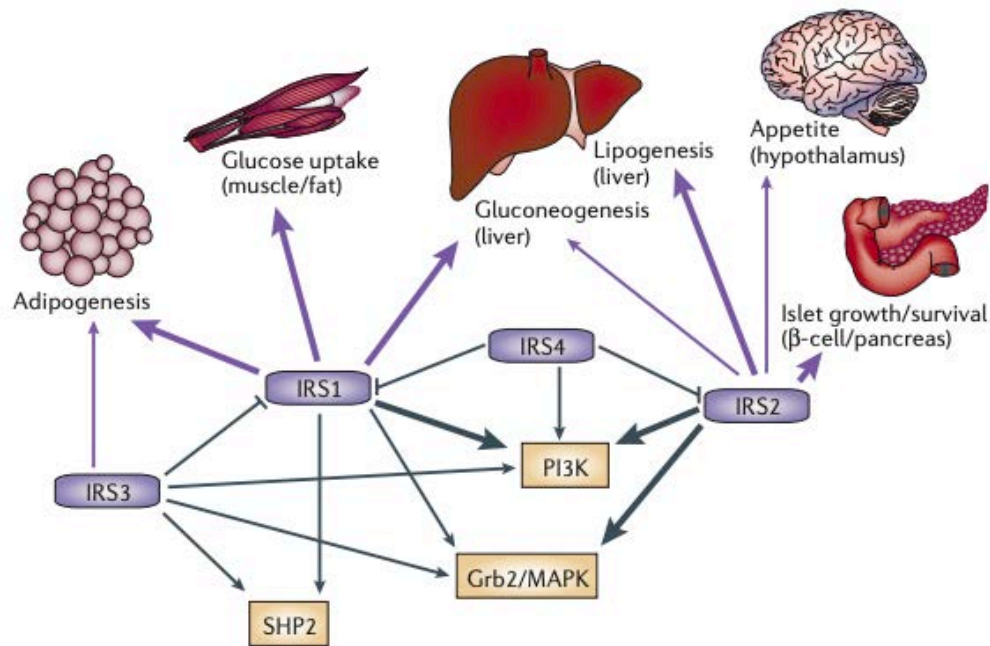


Figure 12. Fonctions spécifiques des protéines IRS. D'après Tanguchi et al., 2006.

Une fois recrutées au niveau des sous-unités β de l'IR, les protéines IRS vont être à leur tour phosphorylées sur des résidus tyrosines afin de pouvoir recruter d'autres protéines sous-effectrices possédant un domaine SH2 (Src homology 2) interagissant avec ces résidus (Haeusler et al., 2017). Les protéines IRS sont donc des protéines d'échafaudages capables d'induire des cascades de signalisation pouvant avoir des effets différents selon les différents sous-types (Sun et al., 1991 ; Sun et al., 1995). Toutefois, les deux principales voies activées par ces protéines sont la voie des RAS/MAPK impliquée dans la survie cellulaire et la voie de PI3K/Akt entraînant la transcription de gènes impliqués dans le métabolisme (Escribano et al., 2017). Il semblerait que IRS1 soit plus apte à activer la voie RAS/MAPK puisque des souris mutantes privées d'IRS1 ($IRS1^{-/-}$) présentent de lourds retards de croissance alors qu'ils sont mineurs chez des souris mutantes $IRS2^{-/-}$. Quant aux souris $IRS2^{-/-}$, ces dernières présentent une intolérance au glucose alors que les souris $IRS1^{-/-}$ sont semblables aux contrôles témoignant du rôle majeur d'IRS2 dans la régulation métabolique et donc dans la voie PI3K/Akt (Withers et al., 1999). Cela reflète très bien la redondance entre IRS1 et IRS2 tout en illustrant le fait que chaque protéine possède un pattern de signalisation qui leur est propre vu les différences phénotypiques (White et al., 2002 ; Taniguchi et al., 2006) (Figure 13).

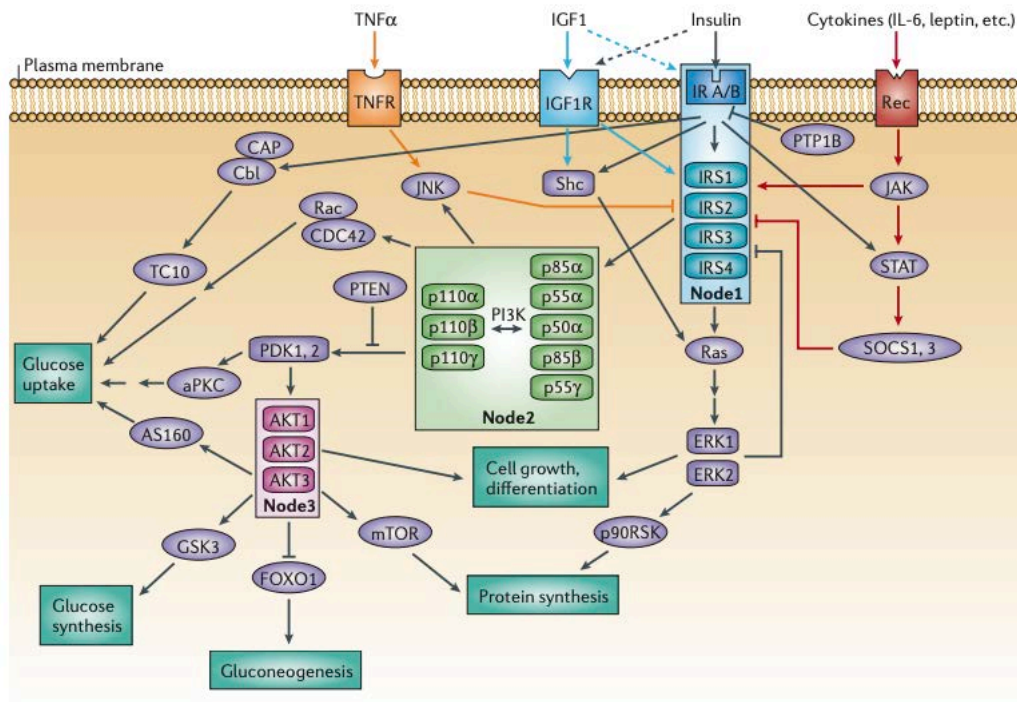


Figure 13. Principaux noeuds de signalisation de l'insuline. D'après Taniguchi et al., 2006.

Quant à l'inhibition ou le rétrocontrôle de la voie de signalisation de l'IR, elle peut se faire à plusieurs niveaux avec différents acteurs. On retrouve tout d'abord une multitude de phosphatases qui inactivent, par déphosphorylation, des acteurs de la voie de signalisation. Par exemple PTP1B, une phosphotyrosine phosphatase, déphosphoryle directement l'IR inhibant ainsi le recrutement des protéines sous-jacentes. Son inactivation induit d'ailleurs une augmentation de la sensibilité à l'insuline chez la souris (Tiganis, 2012). On retrouve aussi PTEN, une phosphatase des lipides qui inactive PIP3 et réduit donc la cascade de signalisation qui en découle (Parsons, 2004).

Cependant, il n'y a pas que des déphosphorylations qui peuvent moduler négativement la voie de signalisation de l'insuline, puisque la phosphorylation des IRS sur leurs résidus sérine (Ser) ou thréonine (Thr) en fait de même. En effet, malgré une forte densité en site de phosphorylation, l'implication de certains résidus dans l'inactivation des IRS a pu être démontrée. La cascade PI3K/Akt/mTOR semble être responsable de la plupart de ces phosphorylations inhibitrices sur les IRS, jouant ainsi le rôle de rétrocontrôle négatif de la voie (Copps and White, 2012 ; Hançer and al., 2014). Certaines de ces phosphorylations seraient même à la base des mécanismes d'insulino-résistance. Les IRS sont également modulées

négativement par dégradation mobilisant un processus de poly-ubiquitinylation guidant ces protéines vers le protéasome (Xu et al., 2008 ; Xu et al., 2012).

Enfin, des micros ARNs (miARN), qui sont de petites séquences non codantes permettant d'inhiber la traduction d'ARN cibles, vont empêcher l'expression des acteurs de la voie de signalisation de l'IR. Par exemple le miARN LET7 peut cibler l'ARNm d'IGF1R, IR, IRS1, IRS2, PI3K et AKT (Zhu et al., 2011). Il existe de nombreux miARN capables d'interférer avec la plupart des protéines impliquées (pour revue : Nigi et al., 2018).

Je terminerai ce paragraphe sur une notion récente concernant la signalisation du récepteur à l'insuline qui ouvre de nouveaux horizons. Ce récepteur serait capable d'agir comme un récepteur nucléaire pouvant s'associer directement à des facteurs de transcription et ainsi agir au niveau de l'ADN pour réguler l'expression génique (Hancock et al., 2019).

3. Actions périphériques

L'insuline est une hormone anabolisante agissant sur de multiples systèmes. En effet elle module le métabolisme des carbohydrates, des lipides et des protéines en agissant sur de nombreux organes comme le muscle, le tissu adipeux et le foie pour les principaux. Mais elle exerce aussi des effets au niveau de la vascularisation, du cœur et du pancréas que je vais brièvement énumérer.

a. Métabolisme des carbohydrates

Tout d'abord, l'insuline promeut l'utilisation des sucres et de façon cohérente inhibe leur production. Pour se faire, elle augmente le taux de transport de glucose dans les cellules musculaires et les adipocytes en augmentant la translocation du transporteur GLUT4 à la membrane des cellules musculaires et des adipocytes (Shepherd and Kahn, 1999). L'utilisation de ce glucose au sein de ces cellules se voit également augmentée par l'activation de la glycolyse par la stimulation de l'hexokinase et la 6-phosphofructokinase (Mandarino et al., 1995). Dans le même sens, l'insuline stimule le stockage du glucose en augmentant le taux de synthèse de glycogène dans le muscle, le tissu adipeux, le foie. Elle inhibe la dégradation du glycogène musculaire et hépatique ainsi que la néoglucogenèse au niveau du foie (Petersen and Shulman, 2018).

b. Métabolisme des lipides

L'impact de l'insuline sur le métabolisme des lipides fait écho aux effets sur le métabolisme glucidique puisqu'elle augmente l'utilisation et la dégradation des lipides tout en inhibant leur formation. En effet, l'insuline, stimule la capture de triglycérides dans le tissu adipeux et le muscle, l'oxydation des lipides dans le muscle et le foie, la synthèse d'acide gras et de triacylglycérol dans les tissus et atténue la lipolyse adipocitaire (Petersen and Shulman., 2018).

c. Autres effets

La première action de l'insuline après son relargage se joue sur les vaisseaux sanguins puisque l'insuline va permettre l'augmentation du débit sanguin en stimulant la production de monoxyde d'azote épithélial (Zeng and Quon, 1996 ; Montagnani et al., 2001). Elle affecte également des paramètres cardiaques (pour revue : Iliadis et al., 2011).

Comme décrit précédemment, elle exerce aussi un rétrocontrôle sur le pancréas. Historiquement, il a été démontré que l'insuline réduit la masse de cellule β pancréatique ainsi que la quantité d'insuline qu'elle contient chez des rats injectés chroniquement avec de l'insuline (Best and Haist, 1941). Une étude allant dans le même sens montre une hyperplasie des cellules β dans un modèle de déficience en insuline ou en IRS2 (Duvillié et al., 2002, Withers et al., 1998). Cependant d'autres modèles témoignent l'inverse, notamment dans un modèle de souris déficientes en IRS1 montrant une plus grande proportion de cellule β (Kubota et al., 2000) (pour revue Leibiger et al., 2008).

Ces voies de signalisations ont été largement décrites dans les organes périphériques mais le sont également de plus en plus au niveau du système nerveux central. L'implication de ces voies dans certaines régulations et fonctions neuronales seront précisées dans la partie II.A « Actions centrales de l'insuline ».

C. L'insuline et ses acteurs dans le cerveau

1. Passage de la barrière hématoencéphalique et synthèse locale

Le système insulinergique du cerveau n'est pas encore complètement élucidé malgré l'engouement qu'il a pu susciter au cours des dernières décennies. Dans les années 1950, l'insuline était considérée comme trop volumineuse pour passer la barrière hématoencéphalique notamment suite aux études d'autoradiographie ne permettant pas de détecter sa présence dans le cerveau suite à son injection systémique (Elgee et al., 1954 ; Haugaard et al., 1954). Vingt ans après, Margolis et Altszuler ont été les premiers à identifier l'insuline dans le liquide cérébro-spinal et cela fut confirmé par la suite à l'aide de différentes approches (Margolis and Altszuler, 1967 ; Woods and Porte 1977, Stein et al., 1983).

Les plexus choroïdes ont suscité une attention particulière puisque à leur niveau la barrière hémato-encéphalique (BHE) est plus perméable grâce aux capillaires fenêtrés mais aussi de par la présence de cellules épithéliales contenant une très forte densité en récepteur à l'insuline (Baskin et al., 1986). Ces caractéristiques alimentent l'hypothèse selon laquelle les plexus choroïdes pourraient être la porte d'entrée de l'insuline vers le cerveau. De nombreuses études ont mis en évidence l'existence d'un transport saturable et actif médié, du moins en partie, par l'IR au niveau de ces structures (Duffy et al., 1987 ; Baura et al., 1993 ; Banks et al., 1998) En effet, cette transcytose peut être médiée par différentes protéines capable de lier l'insuline afin de l'internaliser. Le récepteur à l'insuline lui-même semble impliqué dans ce processus puisque l'application de l'antagoniste S-961 du récepteur à l'insuline bloque la capture de cette hormone des cellules endothéliales en culture (Gray et al., 2017). En revanche, *in vivo*, l'administration de ce même antagoniste chez la souris n'inhibe que légèrement le transport de l'insuline suggérant l'implication d'autres mécanismes (Rhea et al., 2018).

Outre le transport de l'insuline périphérique vers le système nerveux central, des preuves expérimentales suggèrent que l'insuline pourrait aussi être synthétisée directement dans le cerveau. En effet, l'ARNm du gène *INS* a été identifié dans différentes structures telles que l'hippocampe, l'amygdale, le lobe temporal, les bulbes olfactifs, le cervelet ainsi qu'au niveau du pont (Mehran et al., 2012). Chez la souris, il en est de même pour le l'ARNm du gène *Ins2* retrouvé dans le système nerveux central (Mehran et al., 2012) ainsi que dans des cultures d'astrocytes de rat (Takano et al., 2017). L'ARNm *Ins2* se voit même augmenté dans l'hippocampe de souris exposées à un régime HFD pouvant traduire une compensation de l'insulino-résistance (Dutheil et al., 2015). Enfin, des travaux récents montrent que les plexus

choroïdes pourraient produire et sécréter de l'insuline (Mazucanti et al., 2019). Ensemble, ces études renforcent l'hypothèse d'une synthèse centrale de cette hormone considérée jusqu'alors exclusivement pancréatique.

2. Le récepteur à l'insuline central

Que l'insuline passe la BHE ou pas, qu'elle soit synthétisée localement dans le système nerveux ou pas, son récepteur est bien exprimé dans le cerveau. Sa présence a notamment été découverte grâce à l'utilisation d'insuline radiomarquée permettant de mettre en évidence la présence de l'IR dans le cortex de nombreuses espèces animales dont le rat (Havrankova et al., 1978 ; Unger et al., 1989). Ces études précisent même la liaison spécifique de l'insuline (et non pas d'IGF1) sur son récepteur dans de nombreuses structures cérébrales comme le bulbe olfactif, le cortex, l'hippocampe, l'hypothalamus, l'amygdale, le septum, le cervelet, le striatum et bien d'autre structures chez le rat. D'autre part, le groupe de Ronald Kahn a quantifié le nombre de transcrits par RT-qPCR permettant d'apprécier une cartographie de l'expression de l'IR ainsi que d'autres acteurs comme IRS-1 et IRS-2 (Kleinriders et al., 2014) (Figure 14). Pour avoir une idée quantitative, l'expression de l'IR dans les noyaux du raphé compte 250 copies/ng contre 600 copies/ng pour l'hypothalamus connue pour être une des régions les plus denses.

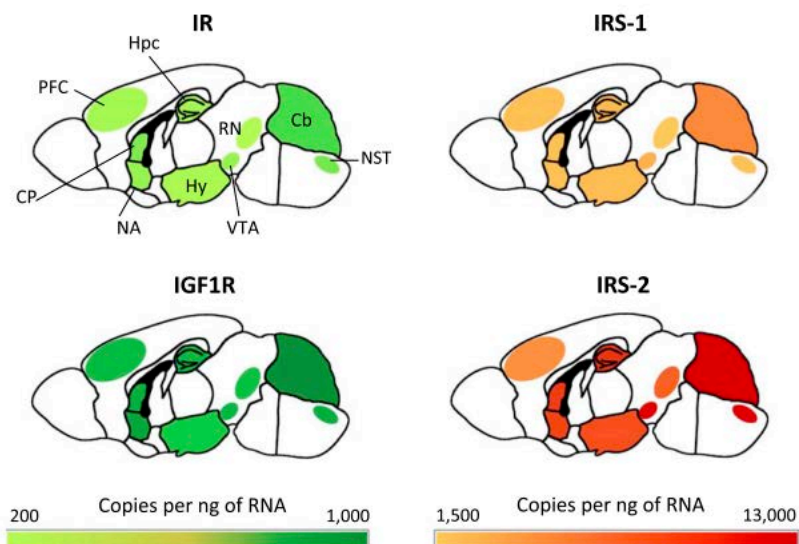


Figure 14. Expression de l'IR, IGF1R, IRS1 et IRS2 dans le cerveau déterminée par RT-qPCR chez la souris C57Bl/6. D'après Kleinriders et al., 2014. Cb, cerebellum; CP, caudate putamen; Hpc, hippocampus; Hy, hypothalamus; NA, nucleus accumbens; NST, nucleus tractus solitaries; PFC, prefrontal cortex; RN, raphe nucleus; VTA, ventral tegmental area.

Comme mentionné précédemment, l'IR possède plusieurs iso-formes et il semblerait que la forme IR-A:IR-A soit la seule exprimée par les neurones alors que les deux formes sont présentes au niveau de la glie (Spencer et al., 2018 ; Kotzke et al., 1995 ; Garwood et al., 2015). Concernant la forme hybride IR/IGF-1R, celle-ci est exprimée par les neurones, les astrocytes, la microglie et dans une moindre mesure par les cellules endothéliales. En revanche, les oligodendrocytes n'expriment pas cette forme (Martinez-Rachedell et al., 2019).

II. Rôles physiologiques de l'insuline dans le cerveau

A. Actions centrales

Le chapitre suivant décrit les effets connus de l'insuline dans le cerveau avec une attention particulière sur ses effets comportementaux qui sont au cœur de mes travaux.

1. Insuline centrale et métabolisme

1.1. Comportement alimentaire et métabolisme énergétique

1.1.1. Insuline et comportement alimentaire

L'effet central de l'insuline le plus largement connu et exploré est son impact sur le comportement alimentaire et plus généralement sur le métabolisme énergétique. En effet, après la découverte de l'insuline, il a été montré dès la fin des années 70 que cette hormone diminuait la prise alimentaire et le gain de poids chez le babouin (Woods et al., 1979). Ces effets sont associés à l'inhibition des neurones orexigènes à NPY (neuropeptide Y) et à AgRP (agouti-related peptide) et à l'activation des neurones anorexigènes POMC (proopiomélanocortine) (Benoit et al., 2002, Qiu et al., 2014). En se fixant sur son récepteur, l'insuline, induit une hyperpolarisation des neurones NPY/AgRP via l'ouverture de canaux K_{ATP} et une dépolarisation des neurones POMC par l'activation de canaux TRPC-5 (Transient Receptor Potential Canonical-5) via la voie PI3K (Plum et al., 2006 ; Qiu et al., 2014). L'insuline semble également réduire l'expression du NPY (Sipols et al., 1995) et d'AgRP (Gelling et al., 2006) et augmenter celle de POMC comme suggéré par l'effet inverse observé chez des souris exposées

à la STZ (Könner et al., 2007). Ces modulations d'activités neuronales au niveau du noyau arqué convergent vers l'activation des neurones à activité α MSH (α -melanocyte-stimulating hormone) du noyau paraventriculaire de l'hypothalamus qui a pour conséquence la réduction de la prise alimentaire (Figure 15). En revanche, l'inactivation de l'IR dans l'ensemble des neurones n'entraîne pas de phénotype particulier concernant la prise alimentaire chez la souris (Kleinridders et al., 2015). La modulation de la prise alimentaire peut également être régulée par le système dopaminergique et pour ce faire, il a été montré qu'une injection d'insuline directement dans la VTA diminue la prise alimentaire (Bruijnzeel et al., 2011). En accord avec ces résultats, l'inactivation génétique du récepteur à l'insuline dans les neurones dopaminergiques induit une prise de poids, une masse graisseuse plus importante associées à une hyperphagie et la perte de l'effet excitateur de l'insuline sur ces neurones (Könner et al., 2011).

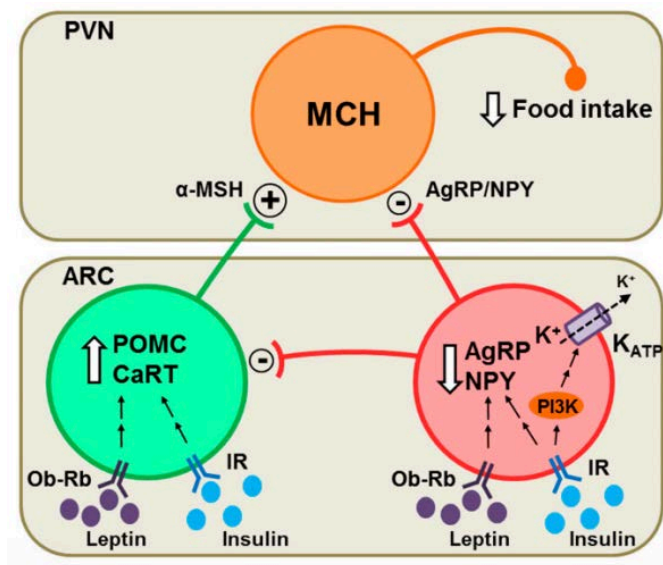


Figure 15. Régulation hypothalamique de la prise alimentaire par l'insuline. D'après Kleinridders et al., 2014.

1.1.2. Insuline centrale et conséquences métaboliques périphériques

De par ses effets sur la prise alimentaire, l'insuline induit des effets sur le métabolisme énergétique d'organes périphériques (Kleinridders et al., 2014). Par exemple, il a été montré que l'infusion d'insuline dans le 3^{ème} ventricule augmente l'inhibition de la synthèse de glucose par le foie et ce, de manière dépendante de la voie PI3K hypothalamique (Obici et al., 2002). Il semblerait aussi qu'elle joue un rôle important dans la contre régulation de la glycémie induite

par l'hypoglycémie puisque son récepteur central est nécessaire pour une réponse sympathique normale (Fisher et al., 2005). De plus, l'administration chronique d'insuline par voie intracérébro-ventriculaire entraîne une augmentation de la taille des adipocytes ainsi que le pourcentage de gras corporel chez la souris suggérant un effet activateur de la lipogenèse de l'insuline centrale (Koch et al., 2008).

1.1.3. Insuline et circuit de la récompense et de la motivation

Les effets de l'insuline centrale ne se résument pas seulement à ses actions hypothalamiques puisqu'elle a aussi été identifiée comme ayant un rôle dans la modulation du circuit de la récompense et de la motivation. Ces circuits font intervenir des projections dopaminergiques impliquant l'aire tegmentale ventrale (VTA), la substance noire (SN), le striatum et le noyau accumbens (NAc). Il est intéressant de noter que l'IR est exprimé par les neurones TH (tyrosine hydroxylase), témoignant de sa présence sur les neurones dopaminergique à la fois au niveau somatodendritique et terminal (Figlewicz et al., 2003). L'inactivation génétique de l'IR dans les neurones TH positifs entraîne une plus forte prise de poids et de masse grasseuse chez la souris associées à une hyperphagie (Könner et al., 2011). Par ailleurs, dans un contexte d'insulino-résistance induite par un régime HFD, les souris présentent une réduction de la recapture de dopamine dans le NAc (Fordahl and Jones, 2017). Cette observation est restaurée par l'injection de TCS 401, un agent insulino-sensibilisateur. Dans le même esprit, l'injection directe d'insuline dans la VTA réduit la libération de dopamine induite par la cocaïne (Naef et al., 2019) ainsi que le comportement hédonique (Mebel et al., 2012). En revanche, l'injection locale d'anticorps dirigés contre l'insuline dans le NAc réduit le comportement hédonique des souris vis-à-vis d'une solution sucrée (Stouffer et al., 2015). Si l'on s'intéresse à la mécanistique pouvant sous-tendre de tels effets, une étude montre que la morphine nécessite la voie IRS2-AKT pour avoir son effet hédonique (Russo et al., 2007). Il a également été montré que l'inactivation de l'IR dans l'ensemble des neurones entraîne la sur-expression des monoamines oxydase de type A et B (MAO-A / MAO-B) responsable de la dégradation de dopamine dans le striatum et le NAc (Kleinridders et al., 2015) témoignant une fois de plus de l'impact de la signalisation de l'insuline sur le système dopaminergique.

Ensemble ces résultats soulignent l'implication de l'insuline dans la valence positive lié à la prise alimentaire et de l'aspect motivationnel dans la recherche de nourriture dépendantes du système dopaminergique et complémentaires des effets hypothalamiques.

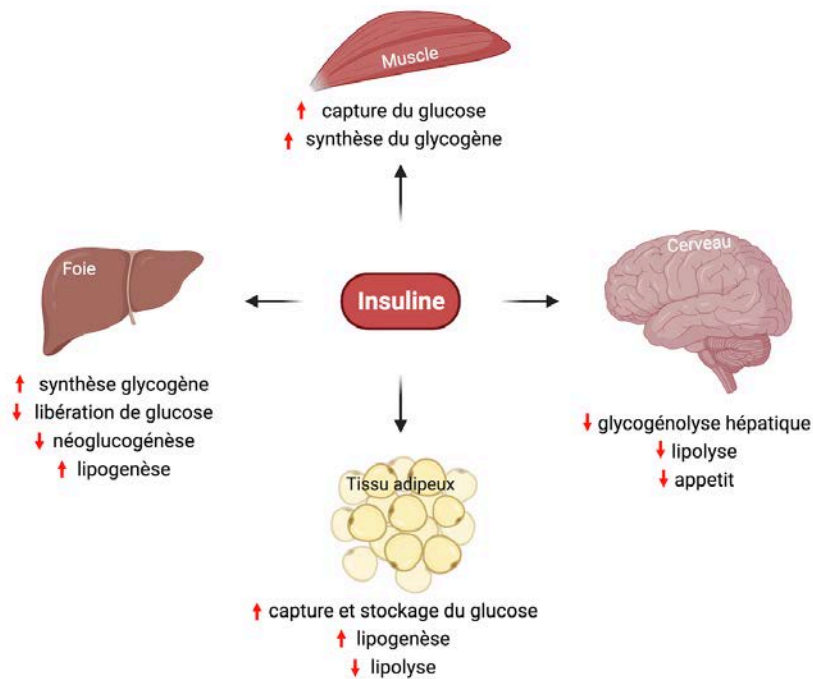


Figure 16. Principaux effets connus de l'insuline.

2. Insuline et mémoire

L'implication de l'insuline dans les processus de mémoire fait l'objet de nombreuses études depuis la fin des années 90. C'est de l'ensemble de ces recherches qu'est née l'hypothèse du diabète de type 3 pour caractériser la maladie d'Alzheimer (MA) et certaines formes de démence.

De manière intéressante, des rats sains soumis à une tâche de mémoire spatiale montrent une expression de l'IR plus importante au niveau hippocampique suggérant la potentielle implication bénéfique du système insulinerigique dans les processus de mémoire (Zhao et al., 1999). En accord avec ces données, il a été montré que l'injection aigue intra-hippocampique d'insuline 10min avant les tests comportementaux induit l'amélioration des performances mnésiques chez des rats contrôles (Mcnay et al., 2010). De la même façon, l'injection intranasale chronique d'insuline améliore les performances dans le test de reconnaissance d'objets à court et à long terme chez la souris (Marks et al., 2009). D'un point de vue mécanistique, l'insuline pourrait promouvoir la neurogenèse hippocampique comme le rapporte des études réalisant une injection intranasale d'insuline dans un modèle de souris ayant subit une injection intracérébroventriculaire (ICV) de STZ (modèle de la MA sporadique) ainsi que dans lignée double transgénique APP/PS1, modèles de la maladie d'Alzheimer (Lv et al., 2020 ; Mao et al., 2016).

Outre la neurogenèse, l'insuline est également impliquée dans la plasticité synaptique. Elle joue un rôle notamment dans la potentialisation à long terme (ou LTP pour « long term potentiation ») ainsi que dans la dépression à long terme (ou LTD pour « long term depression »). Pour se faire, l'insuline permet la phosphorylation des récepteurs NMDA de manière PI3K dépendante et favorise leur adressage/expression au niveau membranaire, renforçant ainsi la neurotransmission glutamatergique hippocampique (Christie et al., 2001 ; Skeberdis et al., 2001 ; Van Der Heide et al., 2005). Au contraire, il a été montré que l'insuline stimule l'internalisation des récepteurs AMPA dans des cultures primaires hippocampiques (Beattie et al., 2000 ; Man et al., 2000), un effet cohérent avec l'inhibition du taux de décharge des neurones pyramidaux hippocampiques (Palovcik et al., 1984) et l'inhibition des potentiels post-synaptiques excitateurs en réponse à l'administration de cette hormone (Zhao et al., 2019). Cette endocytose serait dépendante de la phosphorylation de résidus tyrosines des récepteurs AMPA (Ahmadian et al., 2004 ; Lin et al., 2000). Ces changements synaptiques induits par l'insuline sont associés à l'induction de LTD au niveau du CA1 hippocampique (Ahmadian et al., 2004 ; Man et al., 2000). De plus, les rats diabétiques STZ présentent des problèmes mnésiques au cours d'une tâche spatiale dans le paradigme de la piscine de Morris associés à des perturbations de LTP hippocampique (Biessels et al., 1996). L'administration sous-cutanée d'insuline ne réverse pas les déficits mnésiques et n'améliore que partiellement la LTP. En revanche, l'insuline administrée de manière préventive et répétée par voie sous-cutanée permet de corriger l'ensemble du phénotype (Biessels et al., 1998). Tous ces résultats illustrent largement l'implication de l'insuline dans les processus de plasticité synaptique de type LTP et LTD primordiaux dans les processus de mémoire.

De manière intéressante, il semblerait que l'expression de l'IR décroît avec l'âge (Frölich et al., 1998) ce qui pourrait laisser entrevoir son rôle dans l'étiologie de la MA et des troubles cognitifs associées à cette maladie neurodégénérative. En ce sens, l'administration intranasale d'insuline chez les patients atteints de la MA ou de démence améliore la mémoire verbale (pour revue : Avgerinos et al., 2018). Également, l'insuline est liée au métabolisme du peptide amyloïde- β ($A\beta$) dont l'implication dans la physiopathologie de la MA est largement décrite. Même si nous sommes encore loin de savoir si l'accumulation d' $A\beta$ est une cause ou une conséquence d'une mauvaise signalisation de l'insuline, des évidences témoignent de l'impact de l'insuline sur son métabolisme et les troubles associés. En effet, dans un modèle murin de troubles mnésiques induits par l'administration hippocampique d'amyloïde β ,

l'injection locale chronique d'insuline restaure le phénotype (Ghasemi et al., 2014). Ces effets semblent nécessiter l'activation de la voie des MAPK (Ghasemi et al., 2014 ; Gasparini et al., 2001), mais GSK-3 semble aussi largement impliquée dans la dégradation du peptide amyloïde (Phiel et al., 2003). Une étude in vitro suggère que l'insuline stimule l'expression d'IDE dans les astrocytes de manière dépendante de ERK témoignant aussi de l'implication des astrocytes dans la dégradation de l'insuline centrale ainsi que d'A β (Yamamoto et al., 2018). En plus d'avoir un rôle dans la formation des plaques amyloïdes, l'insuline est également impliquée dans la phosphorylation de tau et donc dans la formation des enchevêtrements neurofibrillaires, un autre marqueur de la MA (Schubert et al., 2004).

3. Insuline et comportements anxio-dépressifs

Concernant les études chez le rongeur, différentes preuves expérimentales montrent que l'insuline peut moduler l'activité de certains circuits neuronaux dont le système dopaminergique connu pour son implication dans la régulation de l'humeur et des comportements hédoniques (Mann, 1999 ; Kay et al., 2012). La mise en évidence des liens entre la signalisation de l'insuline et les comportements anxio-dépressifs a initialement été démontrée à l'aide de souris knock-out privées du récepteur à l'insuline spécifiquement dans les neurones (souris NIRKO). Ces animaux mutants présentent un phénotype anxieux et pseudo-dépressif associés à une accélération du turn-over de la dopamine (Kleinridders et al., 2015). De manière intéressante, ces troubles anxieux et pseudo-dépressifs sont plus généralement retrouvés dans les modèles de DT1 et de DT2 pour lesquels la signalisation de l'insuline est perturbée. En effet, les souris ou rats moins d'insuline endogène suite à l'injection de STZ, présentent un phénotype anxieux et résigné dans les tests de nage forcé, de suspension caudale et de labyrinthe en croix surélevé (Gupta et al., 2014 ; Rahmani et al., 2018 ; Şahin et al., 2019) tandis que l'administration intrapéritonéale d'insuline corrige ces comportements (Gupta et al., 2014). Dans le modèle de souris db/db présentant de l'insulino-résistance, un phénotype de résignation et d'anxiété a également été observé en plus d'un comportement anhédonique dans le test de préférence au sucrose (Sharma et al., 2010 ; Liu et al., 2017). Chez ces souris mutantes, l'administration de Rosiglitazone (un antidiabétique insulino-sensibilisateur activant la voie de PPAR- γ) améliore ce phénotype (Sharma et al., 2012). Concernant le modèle HFD, plusieurs travaux retrouvent des anomalies comportementales telles que de l'anxiété, des troubles d'interactions sociale et de l'anhédonie (Hassan et al., 2018 ; Dutheil et al., 2015 ; Zemdegs et

al., 2016 ; Zemdegs et al., 2019) qui peuvent être corrigés, en partie, par l'administration chronique de metformine (un autre agent insulino-sensibilisateur) (Zemdegs et al., 2019).

Si on s'intéresse maintenant aux études réalisées chez le patient dépressif, il a été montré qu'ils possèdent moins d'insuline dans le liquide cérébro-spinal mais également dans le plasma par rapport à des contrôles appariés (Craft et al., 1998). L'IR est également impacté puisque son expression est réduite et/ou délocalisée et que son affinité pour l'insuline est réduite comparées au groupe de sujets contrôles (Steen et al. 2005).

Ces résultats obtenus à travers différents modèles de perturbations de la signalisation de l'insuline permettent de rendre compte de l'importance de cette hormone dans la régulation de différents comportements dont les troubles anxio-dépressifs. L'identification des mécanismes sous-jacents font l'objet de ce travail de thèse qui s'intéresse plus particulièrement aux liens fonctionnels entre l'insuline et le système sérotoninergique.

III. Impact de l'insuline sur le système sérotoninergique et conséquences

Les connaissances actuelles concernant l'impact de l'insuline sur le système sérotoninergique ainsi que les conséquences fonctionnelles et neurocomportementales ont été traitées dans la revue suivante rédigée en étroite collaboration avec le Drs. X. Fioramonti et H. Martin (INRAE UMR 1286, Nutrineuro, Bordeaux).

ARTICLE 1 :

The impact of insulin on the serotonergic system and consequences on diabetes-associated mood disorders

Hugo Martin, Sébastien Bullich, Bruno P. Guiard et Xavier Fioramonti

¹*NutriNeuro, UMR 1286 INRAE, Bordeaux INP, Bordeaux University, Bordeaux, France*

²*Centre de Recherches sur la Cognition Animale (CRCA), Centre de Biologie Intégrative (CBI), CNRS UMR5169, UPS, Université de Toulouse, Toulouse, France*

Résumé :

L'idée que l'insuline pourrait influencer les comportements émotionnels a longtemps été suggérée. Cependant, les mécanismes sous-jacents n'ont pas encore été résolus et aucune évidence directe et claire démontre que cet effet mobilise le système sérotoninergique central. Un argument en faveur de cette association entre insuline, sérotonine et émotions est que l'atténuation de l'action de l'insuline dans un diabète de type 1 ou de type 2 cause des symptômes anxieux et dépressifs associés à une diminution des taux de sérotonine dans le cerveau. Cette revue synthétise les hypothèses mécanistiques principales qui pourraient expliquer la comorbidité entre le diabète et la dépression fournit également un état de l'art des preuves expérimentales directes et indirectes concernant la modulation des neurones sérotoninergiques centraux par l'insuline. Enfin, cette revue met en lumière la littérature supportant l'idée que les traitements anti-diabétiques exercent des effets antidépresseurs et que les antidépresseurs, quant à eux, modulent l'homéostasie glucidique. De manière générale, cette revue résume les aperçus mécanistiques de la modulation de la neurotransmission sérotoninergique par l'insuline et les comportements associés offrant de nouvelles options thérapeutiques.

Contribution personnelle :

Au cours de ce travail, j'ai participé activement :

- à la synthèse de la littérature sur le sujet et à la rédaction de parties spécifiques de la revue
- à son édition lors du processus de reviewing

The impact of insulin on the serotonergic system and consequences on diabetes-associated mood disorders

Hugo Martin¹ | Sébastien Bullich² | Bruno P. Guiard²  | Xavier Fioramonti¹ 

¹NutriNeuro, UMR 1286 INRAE, Bordeaux INP, Bordeaux University, Bordeaux, France

²Centre de Recherches sur la Cognition Animale (CRCA), Centre de Biologie Intégrative (CBI), CNRS UMR5169, UPS, Université de Toulouse, Toulouse, France

Correspondence

Xavier Fioramonti, NutriNeuro, UMR 1286 INRAE, Bordeaux University, Bordeaux INP, Bâtiment UFR Pharmacie, 146 rue Léo Saignat, 33076 Bordeaux, France.
Email: xavier.fioramonti@inrae.fr

Bruno Guiard, Centre de Recherches sur la Cognition Animale (CRCA), Centre de Biologie Intégrative (CBI), Bât4R3, 118 Route de Narbonne, 31062 Toulouse cedex 09, France.
Email: bruno.guiard@univ-tlse3.fr

Funding information

Société Française du Diabète; Fondation Bordeaux Université - FMC; INRAE-Région Nouvelle Aquitaine

Abstract

The idea that insulin could influence emotional behaviours has long been suggested. However, the underlying mechanisms have yet to be solved and there is no direct and clear-cut evidence demonstrating that such action involves brain serotonergic neurones. Indeed, initial arguments in favour of the association between insulin, serotonin and mood arise from clinical or animal studies showing that impaired insulin action in type 1 or type 2 diabetes causes anxiety- and depressive symptoms along with blunted plasma and brain serotonin levels. The present review synthesises the main mechanistic hypotheses that might explain the comorbidity between diabetes and depression. It also provides a state of knowledge of the direct and indirect experimental evidence that insulin modulates brain serotonergic neurones. Finally, it highlights the literature suggesting that antidiabetic drugs present antidepressant-like effects and, conversely, that serotonergic antidepressants impact glucose homeostasis. Overall, this review provides mechanistic insights into how insulin signalling alters serotonergic neurotransmission and related behaviours bringing new targets for therapeutic options.

KEYWORDS

antidepressant, depression, diabetes, insulin, serotonin

1 | INTRODUCTION

The focus of the present review is to provide a description of the effects of insulin on the brain serotonergic network and the consequences of this with respect to the regulation of mood. This review does not describe the impact of insulin on the peripheral serotonergic system. The literature demonstrating that insulin is able to directly modulate the activity of serotonin (5-HT) neurones in the dorsal and/or median raphe nuclei (DRN/MRN) is limited. The main cues indicating that insulin could modulate this neuronal population come from an abundant literature showing that the risk of developing mood disorders is significantly increased in patients with either type 1 or type 2 diabetes (T1D or T2D).

2 | THE COMORBIDITY BETWEEN DIABETES AND DEPRESSION

2.1 | Prevalence of depression in patients with diabetes

During the past two decades, epidemiological studies have suggested a close link between diabetes and depression. Indeed, it appears that the prevalence of depression among patients with either T1D or T2D is doubled, if not more.¹⁻⁴ Based on a meta-analysis by Anderson et al,¹ the prevalence of depression appears to be the same for both subtypes of diabetes. Nevertheless, studies emphasise that the risk of developing mood disorders is higher among patients with T2D than T1D.^{5,6} Such differences could be related to distinct inflammatory states existing between T1D and T2D patients because the evidence shows that inflammatory biomarkers correlate with depressive symptoms only

Martin, Bullich, Guiard and Fioramonti contributed equally to this work.

for T2D patients.⁷ Alternatively, because one of the most obvious differences between T1D and T2D is insulin resistance, in this review, we have developed the hypothesis that impaired insulin signalling at the peripheral and/or central level sustains the development of mood disorders. Although beyond of the scope of this review, it is noteworthy that the reciprocal link also exists, even though it is less documented. Indeed, different studies have proposed that the prevalence of diabetes among depressed patients could also be doubled.^{8,9} Collectively, these data highlight the existence of a bidirectional link between metabolic and psychiatric disorders.

2.2 | Hypothetical mechanisms linking metabolic disorders and depression

Several biological mechanisms have been suggested to explain the comorbidity between diabetes and psychiatric disorders. Oxidative stress represents a pathophysiological process often associated with depression in both rodents and humans.¹⁰ It involves disrupted redox homeostasis characterised by an overproduction of reactive oxygen species (ROS), which cannot be effectively cleared. This results from distinct mechanisms including dysregulation of specific 'redox' enzymes. For example, chronic stress alters, amongst others, super oxide dismutase in the hippocampus, thereby leading to neurotoxic intracellular ROS accumulation.¹¹ Experimental studies have shown that alloxan-treated diabetic rats displayed high levels of ROS along with depressive-like behaviours in a forced swim test, whereas treatment with the antidepressant imipramine reversed this phenotype.¹² Consistent with these results, Tang et al¹³ demonstrated that hydrogen sulphide, a signalling molecule in the brain with antioxidant activity was able to reverse the depressive-like behaviour in streptozotocin (STZ)-induced T1D rats. It was suggested that this behavioural change was associated with a reduction in oxidative stress in the hippocampus.¹³ Regarding animal models of T2D, high-fat diet (HFD)-induced obesity and insulin resistance was also associated with oxidative stress and depressive-like behaviours.^{14,15} Although the putative antioxidant properties of antidepressant drugs in this HFD model have never been investigated, all these experimental data are important because increased ROS is a prerequisite for inflammasome activation,¹⁶ representing another process that might link metabolic and psychiatric disorders.^{17,18}

Prospective clinical studies indicated that inflammatory factors such as high white blood cell counts, increased C-reactive protein and interleukin (IL)-6 levels are risk factors for developing diabetes.¹⁹⁻²¹ Interestingly, all of these changes are also associated with exacerbated depressive symptoms in obese patients with metabolic disorders.²² Apart from the fact that higher lipopolysaccharide (LPS) concentrations were observed in diabetic subjects compared to in healthy controls,²³ this endotoxaemia is used in animals as the gold standard model to replicate much of the inflammatory responses. Indeed, besides the induction of severe peripheral sepsis, LPS increases IL-1B, IL-6, tumour necrosis factor- α or the expression other cytokines in the mice brain^{24,25} and these changes are considered to sustain the depressive-like symptoms reported in this model.

The hyperactivation of hypothalamic-pituitary-adrenal (HPA) axis must be also considered as an important mechanism that might underpin the comorbidity between diabetes and depression. Patients and animals with poorly controlled or uncontrolled diabetes show an hypersecretion of cortisol,²⁶ as commonly observed in depressed patients.²⁷ Evidence suggests that, in both pathologies, the negative-feedback exerted by endogenous glucocorticoids on this axis is impaired. Although the precise mechanisms have not been fully determined, inflammation could have a major role. Thus, it has been shown that pro-inflammatory mediators inactivate inhibitory glucocorticoid receptors and, by doing so, contribute to hinder the negative-feedback.²⁸⁻³⁰ Remarkably, high levels of glucocorticoids induce insulin resistance by reducing the expression and phosphorylation of insulin receptor substrate-1.³¹ From this observation, it can be inferred that the comorbidity between diabetes and depression relies on the impairment of insulin action.

A recent clinical study reported that depressive symptoms correlate with insulin resistance.⁹ Preclinical research also support this concept because it has been repeatedly shown that HFD-induced insulin resistance in mice or rats causes anxiety and depressive-like phenotypes.³²⁻³⁵ In line with these results, depressive-like symptoms are observed in genetic models of T2D such as in leptin-receptor deficient mice (db/db) or Zucker fa/fa rats.^{36,37} These behavioural anomalies are not restricted to T2D because STZ injection-induced T1D in mice also promotes anxiety and depressive-like symptoms.³⁸⁻⁴⁰ Conversely, animal studies have shown that chronic mild stress-, social defeat- or dexamethasone-induced depressive-like symptoms are correlated with peripheral insulin resistance.⁴⁰⁻⁴² Nevertheless, in these models, it has not been shown whether metabolic impairments precede or cause mood abnormalities. Of particular note, different studies have investigated the potential therapeutic effect of insulin or antidiabetic drugs in these models of T1D or T2D and show their beneficial effects on emotionality in relation to an improvement of peripheral insulin signalling and/or anti-inflammatory properties. As an example, in a rat model of T2D, chronic i.p. administration of insulin elicits comparable antidepressant-like response than sertraline.⁴³ In an STZ-T1D mouse model, subchronic i.p. insulin treatment also reverses freezing behaviour without attenuating hyperglycaemia thereby suggesting a therapeutic effect of insulin.⁴⁴ An important question that has yet to be solved is whether peripheral and/or central insulin resistance contributes to modify brain circuits involved in depression. This review summarises the arguments in favour of the hypothesis that brain insulin resistance has a key role in these deleterious effects of diabetes on behaviours.

3 | BRAIN INSULIN AND REGULATION OF EMOTIONALITY

3.1 | Overview of brain insulin signalling

Insulin signalling in the brain is not fully characterised but has represented an important field of investigation for decades. As a result

of the molecular weight of insulin (approximately 5800 g mol^{-1}) and the fact that former studies were not able to detect this hormone in the cerebrospinal fluid (CSF),^{45,46} it has long been assumed that insulin could not cross the blood-brain barrier (BBB). During the 1970s, Margolis and Altszuler⁴⁷ were the first to identify insulin in the CSF and this discovery was further confirmed using different approaches.^{48,49} Today, it is well accepted that peripheral insulin readily crosses the BBB through a saturable receptor-mediated process at the choroid plexi level.⁵⁰⁻⁵² This transcytosis can be handled by many different proteins that are able to bind insulin and become internalised. It could therefore be mediated through a direct way recruiting the insulin receptor (IR) itself. Accordingly, a recent study reports that the IR antagonist S-961 blunted insulin uptake in a brain endothelial cell culture,⁵³ whereas another study shows that the same antagonist slightly reduces insulin transport to the mouse brain suggesting that insulin transport can occur independently of its receptor.⁵⁴ Interestingly, recent evidence demonstrates that insulin can be directly produced by choroid plexi⁵⁵ and might be provided to brain structures closed to the ventricles.

Alternate splicing of IR mRNA leads to two different forms of the IR, namely IR-A and IR-B. Glial cells preferentially express the IR-B subtype and neurones IR-A,⁵⁶ although, based on ligand binding experiment studies, it appears that brain IR could be different from the subtypes expressed in peripheral organs.⁵⁷ In the brain, *in situ* hybridisation and immunohistochemistry analyses identified the IR in several discrete areas with different levels of expression: olfactory bulbs > cortex > hippocampus > hypothalamus > cerebellum > striatum > thalamus.⁵⁸⁻⁶⁰ It is interesting to note that the IR-A isoform has a stronger affinity for another hormone, insulin-like growth factor (IGF)-1, emphasising an inevitable cross-talk.⁶¹ In the same vein, at high dose, insulin can interact with IGF-1 receptor (IGF1-R), although its distribution appears to be distinct from that of IR,⁵⁹ suggesting well dissociated signalling and effects between IGF-1 and insulin. Taken together, these studies strongly suggest that peripheral insulin reaches the brain and the limbic system where it might play a crucial role in higher brain functions, including mood regulation. The next part of this review synthesises the experimental evidence supporting the idea that insulin influences the activity of the serotonergic system and related behaviours.

3.2 | Effects of intracerebral insulin delivery on emotionality

As outlined above, the IR is widely distributed in the central nervous system.⁶² Thus, in both human and animal studies, the intranasal delivery of insulin (IDI) has been used to investigate brain insulin action without interfering with peripheral metabolism (ie, with its ability to induce hypoglycaemia). In clinical studies, single IDI has been shown to attenuate HPA-axis hyperactivity in response to psychosocial stress.⁶³ Moreover, chronic IDI treatment in healthy humans has been reported to improve self-confidence and good feelings, to decrease anger and to enhance the fear-extinction process.^{64,65} Given

that IDI also displays pro-cognitive effects and that cognitive impairments are recognised as core symptoms of depression, this pharmacological intervention might represent a novel opportunity for an 'add-on' strategy with the currently available antidepressant drugs. Studies performed in animal models also support a role of insulin in the brain with respect to regulating emotional behaviours. Subchronic IDI treatments produced an apparent decrease in anxiety along with an improvement of memory in rodents.^{66,67} Robust antidepressant-like activity was also described in response to a single *i.c.v.* injection of insulin in naïve rats. However, the possibility that the central effects of insulin are mediated, at least in part, through IGF1-R activation cannot be ruled out⁶⁸ and future experiments will undoubtedly address this issue.

3.3 | Evidence from animal models of impaired brain insulin signalling

Even if the association between insulin resistance and depressive symptoms has been described,⁶⁹ the possibility that such a process occurs in the brain to influence neurobehaviours has been raised for a decade. Kleinridders et al⁷⁰ were the first to investigate whether brain insulin resistance modelled by the genetic deletion of IR selectively in neurones causes behavioural alterations in mice. Thus, NIRKO mice (ie, Neuronal Insulin Receptor Knock-Out) display spontaneous pro-depressive- and anxiety-like phenotypes throughout their lifespan. Although these changes parallel impairments in brain dopaminergic activity, this study did not investigate the putative involvement of the other monoaminergic neuronal populations. More recently, studies have shown that the selective knock-down of IR in the hippocampus or hypothalamus using viral approaches also leads to emotional and cognitive impairments.^{71,72} Going one step further, it has been demonstrated that knocking-down both the IR and IGF1-R in the hippocampus or amygdala results in exaggerated anxiety. Although interesting, this study did not determine whether one or both receptors are required to interfere with this behaviour.⁷³ Yet, more studies are needed to highlight the nature of the specific neuronal circuits underpinning the effects of insulin in the brain. It is important to note that the expression of IR is not restricted to neurones and has also been detected in astrocytes.⁷⁴ Constitutive or inducible knockout of IR in astrocytes also induces depressive-like phenotype in GIRKO mice (ie, Glial Insulin Receptor Knock-Out mice).⁷⁵ Hence, a deficit of action of insulin selectively in the brain is crucial for the regulation of emotional states. From these observations, we can fairly assume that disrupted brain insulin signalling, originating from insulin resistance or impaired insulin secretion, could be the putative keystone underpinning the comorbidity between diabetes and depression. Nevertheless, further investigations are required to determine the specific neuronal circuits affected by insulin signalling disruption that are relevant to the pathophysiology of depressive disorders. The next part of the present review provides evidence that brain serotonergic network and its post-synaptic targets are critical for insulin neurobehavioural actions.

4 | EVIDENCE OF THE IMPACT OF INSULIN ONTO SEROTONERGIC-MEDIATED NEUROTRANSMISSION

4.1 | Overview of the role of DRN 5-HT neurones in mood

Serotonin neurones arising from the DRN and MRN innervate the entire forebrain and midbrain and, as such, are considered important in modulating various biological functions notably emotional states.⁷⁶ Although pharmacological and neuro-anatomical/-functional studies have been widely used to gain insight into the role of DRN and MRN and their respective neuronal projections in mood disorders,⁷⁷ the poor selectivity of these approaches has not provided accurate and comprehensive insights about the roles of the different serotonergic circuits. The recent development of opto- and chemogenetic approaches has helped delineate, more specifically, these 5-HT pathways. In particular, the direct optogenetic activation of DRN 5-HT neurones has been shown to produce antidepressant-like effects, whereas that of MRN 5-HT neurones promotes anxiety in conjunction with an increase in 5-HT levels in the hippocampus.^{78,79} Even though optogenetic approaches are useful for the acute control of specific 5-HT neurones, they are not suitable for mimicking the long-term modulation of 5-HT neuronal activity. Chemogenetic approaches have thus been launched to overcome this issue and hM3Dq DREADD (Designer Receptor Exclusively Activated Designer Drug), which is coupled to the Gq-signalling pathway, has been successfully used to activate 5-HT neurone subpopulations. Under these conditions, short- and long-term activation of DRN 5-HT neurones via clozapine-*N*-oxyde induces behavioural responses reminiscent of the action of antidepressant drugs^{80,81} thereby establishing a causal relationship between DRN serotonergic activity and emotion. In marked contrast, the activation of 5-HT neurones in the MRN mediates anxiety-like and depressive-like behaviours.⁸² Taken together, these findings strengthen the role of 5-HT neurones in the control of emotional behaviour by DRN and MRN, presumably in opposite directions.

4.2 | Evidence of insulin action on 5-HT neurones

Transcriptomic data analysis revealed that 5-HT neurones express IR mRNA.⁸³ However, there is no evidence that 5-HT neurones preferentially express the IR-A or IR-B isoform. Nevertheless, given that the IR-A is essentially expressed in neurones,⁵⁶ we could assume that the IR-A isoform is specifically expressed in serotonergic neurones to control their functional activity in response to insulin. Thus, seminal experiments have shown that peripheral injection of insulin increases both plasma and brain tryptophan levels.^{84,85} This observation suggested that peripheral insulin favours tryptophan uptake into the brain, which in turn may favour 5-HT synthesis. In vitro studies proposed that insulin-mediated increased serotonin levels could be explained by another mechanism resulting from the

inhibition of the degrading serotonin enzymes [ie, the monoamine oxidases A and B (MAO-A/B)].⁷⁰ However, conflicting results have been yielded because other data from the literature showed that the peripheral administration of insulin increases 5-HT turnover. Thus, peripheral injection of insulin is considered to increase CSF and brain 5-hydroxyindoleacetic acid (5-HIAA) levels, suggesting that this hormone decreases 5-HT levels.⁸⁶⁻⁸⁹ Additionally, single unit extracellular electrophysiological recordings showed that peripheral insulin injection decreases the firing rate of 5-HT neurones recorded in the raphe pallidus and raphe obscurus.⁹⁰ A limitation of the use of peripheral injections of insulin is the induction of iatrogenic hypoglycaemia. Thus, it is not possible to determine whether the effects of insulin on 5-HT neurotransmission are a result of its action on the brain or whether they result from decreased plasma glucose levels. To overcome this limitation, i.c.v. injection of insulin has been used to evaluate the effects of insulin on the central serotonergic system without inducing hypoglycaemia. For example, using in vivo intracerebral microdialysis, it has been reported that i.c.v. insulin increases 5-HT and 5-HIAA in the raphe magnus, indicating that insulin increases serotonergic neuronal activity.⁹¹ These studies suggest that insulin acts on 5-HT neurones, although it could be hypothesised that insulin does not act directly onto 5-HT neurones but, instead, modulates their activity by acting on other neuronal subpopulations. The IR is expressed all over the brain and 5-HT neurones receive projections from many brain areas.⁹² Thus, ex vivo studies such as patch-clamp recordings on brain slices are required to tackle the issue of the direct effect of insulin on 5-HT neurones.

An important point to take into consideration is that IGF-1R mRNA expression has been reported in 5-HT neurones.⁸³ As discussed before, more studies are required to determine whether the effect of insulin on 5-HT neurones and the control of mood are dependent of IR signalling. In particular, studies knocking out the insulin receptor specifically in 5-HT neurones would be crucial for demonstrating the key role of IR-dependent insulin signalling to the serotonergic system with respect to the control of emotional behaviours.

4.3 | Evidence for insulin action on 5-HT sensitive cells

IR expression is enriched in the cortex and the hippocampus, comprising two post-synaptic serotonergic regions endowed with a remarkable potential for morphological changes. This has prompted research aiming to investigate how insulin may influence different forms of plasticity and related functions, such as learning, memory and emotionality. In the hippocampus, neuronal stem cells (NSCs) proliferate and differentiate, giving rise to mature neurones integrating into pre-existing neuronal networks. NSCs may also produce astrocytes and oligodendrocytes, which are important for the regulation of emotional states.^{93,94} Multiple sources of evidence demonstrate that insulin can regulate all of these processes. In particular, insulin has been shown to promote adult hippocampal neurogenesis by

stimulating the survival, proliferation and differentiation of NSCs.⁹⁵⁻⁹⁷ By contrast, lower expression or function of insulin receptor detected in genetic (db/db) or environmental (HFD) models of metabolic disorders have been associated with an impairment of adult neurogenesis.⁹⁸⁻¹⁰¹ Although the molecular determinants of these deficits are not fully elucidated, the findings strongly suggest that insulin sensitivity in the brain plays a crucial role. In agreement with this hypothesis, and as illustrated in Figure 1, insulin has been reported to increase the phosphorylation of Akt and GSK3 β , both involved in adult hippocampal neurogenesis,¹⁰² whereas a 16-week-long HFD prevents these effects.¹⁰³ Remarkably, HFD-induced brain insulin resistance was also associated with an attenuation of the activation of the phosphoinositide 3-kinase (PI3K)/Akt/GSK3 β pathway in response to 5-HT in this area.¹⁰³ Besides this pathway, it is also well documented that mammalian target of rapamycin (mTOR) complex 1 can be activated in response to both insulin and serotonin.¹⁰⁴ This is further supported by the observation that insulin and serotonin are able to stimulate postsynaptic density protein 95 through the PI3K/mTOR signalling pathway^{105,106} whereas HFD elicits detrimental effects on spine density and synapse formation^{107,108} (Figure 1). These findings pave the way for a cross-talk between insulin and 5-HT that might underlie the link between metabolic and depressive disorders. It is noteworthy that the adult hippocampal neurogenesis also involves a finely tuned interaction between NSCs and astrocytes.^{109,110} These glial cells express both insulin and serotonergic receptors^{75,110} and their activation would favour the synthesis and release of neurotrophic factors such as brain-derived neurotrophic factor (BDNF).¹¹⁰ In marked contrast, HFD-fed mice displaying insulin resistance and depression-like behaviours show a lower production of BDNF, as well as shortened astrocytic processes along with a down-regulation of the expression of astrocytic neuroplasticity-related proteins.¹¹¹ Collectively, these results indicate that insulin and serotonin converge to modulate brain plasticity (Figure 1). Further experiments are warranted to determine to what extent the genetic

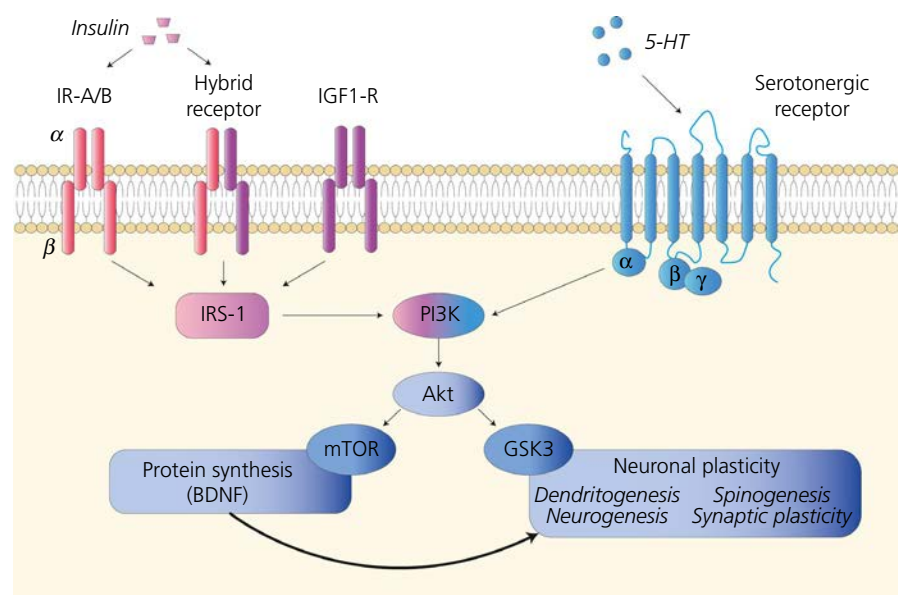
or pharmacological manipulation of both systems may synergistically interfere with these processes and how a better knowledge of their cross-talk at the cellular and molecular levels may help with the development of new antidepressant strategies.

4.4 | Clues for insulin action on the 5-HT system through the use of animal models of T1D and T2D

Indirect evidence also suggests that insulin modulates the brain serotonergic system. This originates from studies showing that this specific circuit is altered in animal models of T1D or T2D displaying impaired insulin action. For example, using the STZ-induced T1D rodent model, impaired insulin production has been associated with a significant attenuation of brain 5-HT levels not only in the whole brain,¹¹² but also in specific areas including the hypothalamus, hippocampus, cortex and brainstem.¹¹³⁻¹¹⁵ More recently, it has been proposed that such a decrease in brain 5-HT content in STZ-injected animals could rely on increased MAO-A/MAO-B activities.^{112,116} Consistent with these tissues analyses, *in vivo* intracerebral microdialysis studies reported lower hippocampal and hypothalamic extracellular 5-HT levels in STZ-treated rodents compared to controls.¹¹⁷⁻¹¹⁹ A higher capacity of 5-HT reuptake by the SERT has also been advanced to explain this dampened serotonergic activity.¹²⁰ Among the mechanisms at play, the role of plasma level of branched-chain amino acids (BCAAs) levels has also been proposed. Indeed, BCAAs are significantly increased in STZ-injected rodents and this could negatively impact the serotonergic system because these amino acids are known to compete with tryptophan to cross the blood brain barrier through the transporter L-type amino acid transporter 1.¹²¹

With respect to T2D animal models, we recently conducted an *in vivo* intracerebral microdialysis to demonstrate that HFD-induced insulin resistance decreased hippocampal extracellular

FIGURE 1 Putative cross-talk between insulin and serotonin pathways in relation to neuronal plasticity. Insulin and serotonergic receptors converge towards PI3K, which is a node underpinning neuronal plasticity through mTOR and GSK3 signalling. 5-HT, 5-hydroxytryptamine; AKT, protein kinase B; BDNF, brain-derived neurotrophic factor; GSK3, glycogen synthase kinase-3; IGF1-R, insulin-like growth factor 1 receptor; IR-A/B, insulin receptor A/B; IRS-1, insulin receptor substrate 1; mTOR, mechanistic target of rapamycin; PI3K, phosphoinositide 3-kinase



5-HT levels.³⁵ Although exaggerated stimulation of central MAO-A/B activities could account for such neurochemical changes,¹²² we investigated another putative cause for such 5-HT deficiency. It is well known that the activity of DRN 5-HT neurones is finely regulated by inhibitory 5-hydroxytryptamine A1 (5-HT_{1A}) autoreceptors.¹²³ Thus, our recent results indicate that HFD-fed mice display a more robust hypothermic response to the 5-HT_{1A} receptor agonist 8-OHDPAT than controls, providing clear-cut evidence that insulin resistance was associated with an hypersensitisation of this inhibitory autoreceptor.³⁵ Using *ex vivo* patch-clamp experiments, we also showed that DRN 5-HT neurones from T2D HFD-fed mice display a decreased firing rate frequency and altered intrinsic electrophysiological properties,¹²⁴ confirming the idea that the main brain serotonergic circuit arising from the DRN is blunted in this animal model. In the later study, we also showed that improving insulin sensitivity using the antidiabetic drug metformin restores the activity of DRN 5-HT neurones, hippocampal 5-HT levels and HFD-induced mood disorders,¹²⁴ thereby reinforcing the hypothesis that alteration in brain 5-HT network may be a critical factor in the development of T2D-induced mood disorders.

5 | ANTIDEPRESSANT EFFECTS OF ANTIDIABETIC DRUGS IN RELATION WITH THE ACTIVATION OF THE SEROTONERGIC SYSTEM

As mentioned earlier in this review, antidepressant-like activity of antidiabetic drugs is gaining growing interest. This enthusiasm first emerged from a pilot study showing the efficacy of insulin sensitising agent as an add-on treatment to relieve depressive symptoms in depressed patients with insulin resistance.¹²⁵ The evidence also demonstrates that metformin potentiates the ability of fluoxetine to attenuate chronic mild stress-induced anhedonia.¹²⁶ These results suggest that antidiabetic drugs display antidepressant-like activities even in animals without metabolic impairments. Antidiabetic drugs thus represent a potent new repurposed medication for treating brain insulin resistance-related neuropsychiatric disorders. Accordingly, studies have revealed that several of these compounds are able to cross the BBB to improve cerebral plasticity and to elicit neuroprotective effects.¹²⁷ Given such properties, putative antidepressant-like activity of several antidiabetic drugs has been largely investigated in clinical and animal studies (Table 1); for a review, see also Essmat et al¹²⁸. Table 1 also shows whether the potential mechanisms of action of these antidiabetics have been proposed and whether the serotonergic system might be involved.

Next, we focus on the antidiabetic drugs affecting the serotonergic neurocircuit. In this respect, it has been shown that subchronic treatment with metformin elicits antidepressant-like responses and prevents STZ-induced decrease in cortical 5-HT levels.¹²⁹ In line with this finding, we have recently reported that chronic treatment with metformin reverses emotional disorders induced by HFD mice¹²⁴ by increasing ventral hippocampal 5-HT levels and producing a

complete reversal of HFD-induced alteration in DRN 5-HT neuronal excitability. These data strongly support the hypothesis that improving serotonergic neurotransmission is a key mechanism in the antidepressant effects of antidiabetic drugs. Interestingly, this property of the 5-HT system is not restricted to metformin, such that antidepressant-like effects accompanied by an enhancement of the serotonergic system in the cortex and the hippocampus were reported with vildagliptin, pioglitazone and glyburide in animal models of T2D.¹³⁰

Moreover, antidepressant-like activity of antidiabetic drugs has also been described in animal models of depression without metabolic impairments. For example, the PPAR- γ agonist pioglitazone prevents anhedonia and despair-like behaviours induced by the *i.c.v.* injection of LPS¹³¹ and reverses such phenotype in a mouse model of reserpine-induced depressive symptoms.¹³⁰ In both studies, the antidiabetic drug used prevents or reverses the decrease in cortical and hippocampal 5-HT levels. Taken together, these results show that antidiabetic drugs display antidepressant-like properties both in clinical and preclinical studies and that such properties are mediated, in part, through the enhancement of serotonergic neurotransmission.

6 | EFFECTS OF SEROTONERGIC ANTIDEPRESSANTS ON GLUCOSE HOMEOSTASIS

The deleterious outcomes of antidepressant treatments onto glucose homeostasis are still controversial. Indeed, several clinical studies reported increased incidence of T2D in patients treated with antidepressant drugs,¹³²⁻¹³⁴ whereas others found no significant association¹³⁵ or even protective effects.¹³⁶⁻¹³⁸ Understanding the mechanisms by which antidepressant drugs affect insulin sensitivity and glucose homeostasis is of great importance in the treatment of the comorbidity between diabetes and depression. Indeed, worsening insulin resistance by antidepressant drug treatment could compromise their therapeutic efficacy and ultimately lead to a vicious cycle. An important point to consider is the fact that the impact on glucose homeostasis may not be the same depending on the class of the antidepressant drugs.¹³⁸

Here, we describe the impact of selective serotonin reuptake inhibitors (SSRIs), the most often prescribe antidepressants, on glucose homeostasis. Potter van Loon et al¹³⁹ reported that the SSRI fluoxetine increases insulin action in obese patients with T2D and attenuates depressive symptoms. In agreement with these findings, fluoxetine was reported to improve insulin sensitivity independently of weight loss in obese patients with T2D.¹⁴⁰ In animal studies, chronic treatment with fluoxetine decreases blood glucose level in normal and T1D rats.¹⁴¹ Thus, SSRIs could be a relevant therapeutic strategy for diabetic patients. However, no study has proposed any mechanism of action for such beneficial effects of SSRIs on glucose homeostasis. By contrast, some preclinical and clinical studies defended the idea that the use of SSRIs could increase the risk of developing T2D.^{142,143} Negative effects

TABLE 1 Preclinical studies showing that antidepressant-like effects of the different classes of antidiabetic drug effects and the putative relationships with the serotonergic system

Molecule	Class	Dose (mg kg ⁻¹)	Treatment duration	Model	Main effects	Impact on 5-HT system	References
Glyburide	Sulphonylureas	5	28 days	HFD + STZ injection or Reserpine-induced depressive-like behaviour male Wistar rats	Antidepressant	Increased amount of hippocampal and cortical 5-HT	Soliman et al ¹³⁰
Vildagliptin	Gliptine	10					
Pioglitazone	Thiazolidinedione	10					
Metformin	Biguanides	100					
Pioglitazone	Thiazolidinedione	20	Once before LPS i.c.v. injection	LPS male C57BL/6J	Antidepressant and anxiolytic	Reduced amount of hippocampal IDO1 and 5-HT _{1A}	Liao et al ¹³¹
Metformin	Biguanides	25	11 days	STZ + foot shocks rats	Antidepressant	Increased amount of cortical 5-HT	Shivavedi et al ¹²⁹
		300	28 days	HFD male C57BL/6J	Antidepressant and anxiolytic	Increased 5-HT neurone excitability and increased amount of hippocampal 5-HT	Zemdegs et al ¹²⁴
		200	28 days	UCMS male C57BL/6	Metformin potentialises fluoxetine antidepressant effect	Not studied	Poggini et al ¹²⁶

Note: Preclinical studies mentioned in this review are highlighted, focusing on emotional related behaviours and the serotonergic system. These studies were performed using multiple models of depression and/or diabetes. Antidiabetic drugs were administered *per os*. Abbreviations: 5-HT, 5-hydroxytryptamine; 5-HT_{1A}, 5-hydroxytryptamine A1 receptor; HFD, high-fat diet; IDO1, indoleamine 2,3-dioxygenase-1; LPS, lipopolysaccharide; STZ, streptozotocin; UCMS, unpredictable chronic mild stress.

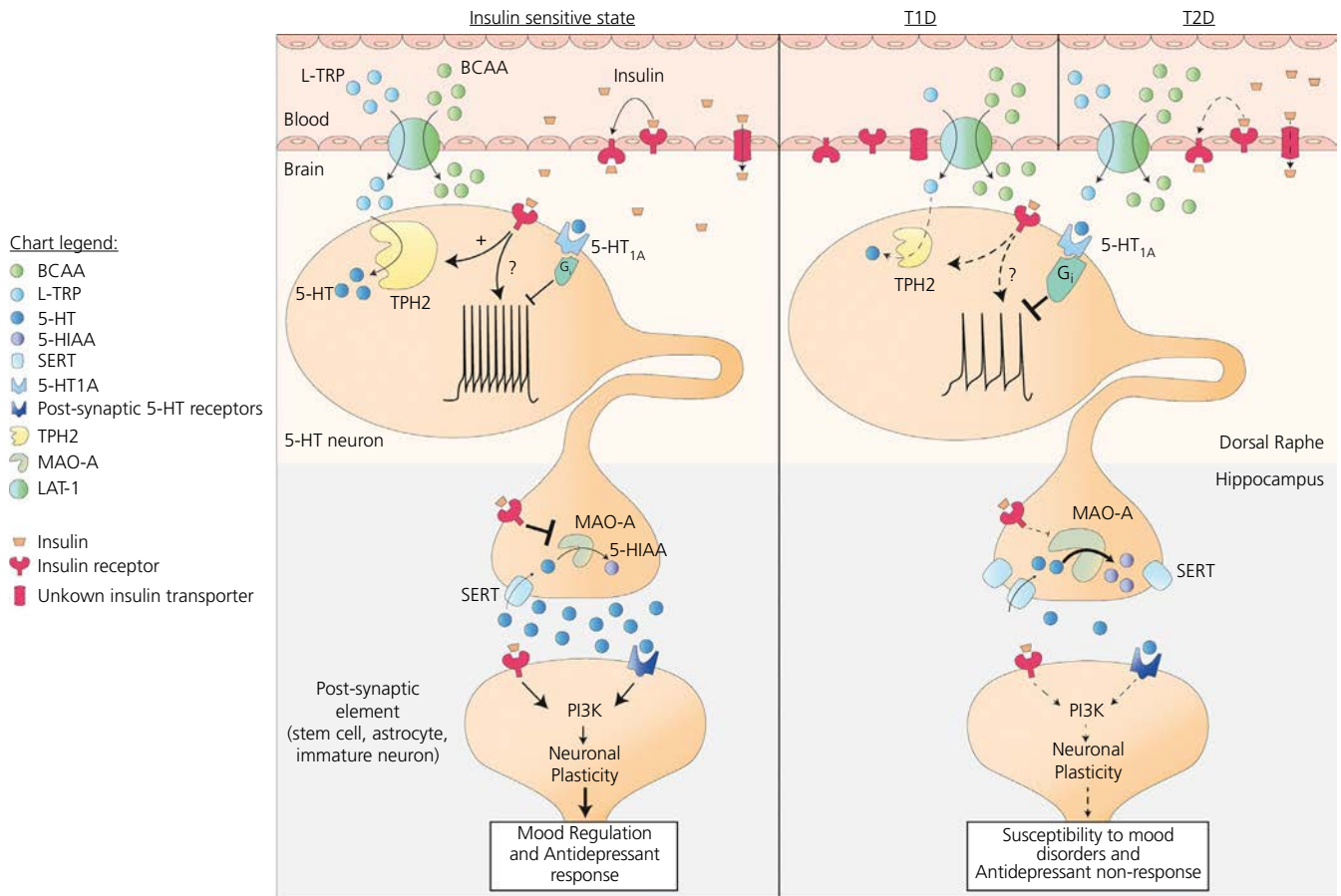


FIGURE 2 Alteration of insulin signalling in the serotonergic system during type 1 or type 2 diabetes (T1D or T2D). Insulin sensitive state (left): L-tryptophan (L-TRP) competes with branched-chain amino acids (BCAAs) to enter the brain through the large amino acid transporter 1 (LAT-1), although BCAAs have greater affinity for LAT-1 than L-TRP. Insulin can cross the blood-brain barrier (BBB) through transcytosis of its own receptor or by other unknown mechanisms. L-TRP is converted to serotonin (5-HT) by the enzyme tryptophan hydroxylase-2 (TPH2), which is positively modulated by insulin, improving serotonin production. At the synapse, after reuptake of 5-HT by serotonin transporter (SERT), monoamine oxidase-A (MAO-A) catabolises serotonin to 5-hydroxyindoleacetic acid (5-HIAA) at the pre-synaptic level. MAO-A expression is negatively regulated by insulin receptor signalling. On the post-synaptic element, activation of both serotonergic receptors and insulin receptor induces neuronal plasticity through activation of phosphoinositide 3-kinase (PI3K), which is the common factor of these pathways. Such mechanisms contribute to mood regulation and an effective antidepressant response. Pathological conditions (right): In T1D, beta-cell loss leads to a lack of insulin secretion with known deleterious effect on glucose homeostasis. L-TRP levels are significantly decreased in plasma, resulting in diminished tryptophan transport and availability in brain. Regarding T2D in which blood insulin level varies along the evolution of the pathology, insulin receptor signalling is altered leading to insulin resistance. Moreover, BCAAs levels are increased and thus favour transit of BCAAs through the BBB at the expense of L-TRP, resulting (as in T1D) in a decreased availability of L-TRP in the brain. Under both conditions, such lower levels of precursor result in lower levels of brain 5-HT. Furthermore, impaired insulin receptor signalling lacks positively modulating TPH2 activity, which also contributes to a decreased level of brain serotonin. The firing rate activity of median raphe nuclei (DRN) 5-HT neurones is decreased presumably as a result of increased sensitivity of inhibitory G_i-coupled 5-HT_{1A} autoreceptors that have been reported under such conditions. Decreased serotonin release is a possible consequence of not only the decreased firing rate of DRN 5-HT neurones, but also the increased activity of MAO-A breakdown activity as a result of blunted insulin action on 5-HT neurones. At the post-synaptic level, impaired insulin receptor signalling and decreased serotonin levels weakly activate PI3K pathway and thus fail to induce neuronal plasticity. Such pathological mechanisms contribute to the susceptibility to mood disorders and antidepressant non-response

on glucose homeostasis were observed in experiments using an acute injection of the SSRIs fluoxetine or fluvoxamine, which induces a significant increase in blood glucose level.¹⁴⁴ In vitro data report that SSRIs decrease insulin signalling in immortalised hepatocytes¹⁴⁵ and also decrease glucose-induced insulin secretion in a model of pancreatic β -cell line.¹⁴⁶ Interestingly, the depletion of serotonin by *p*-chlorophenylalanine prevents hyperglycaemia

induced by fluvoxamine, suggesting a partial involvement of central serotonin in this specific SSRI-induced hyperglycaemia.¹⁴⁴ Taken together, these results suggest that SSRIs might impair insulin secretion and glucose homeostasis by both central and peripheral mechanisms.

From these data, it is not easy to provide definitive conclusions about the beneficial or deleterious effects of SSRIs on glucose

homeostasis and/or the development of diabetes. Nevertheless, considering the state of knowledge on antidepressant drugs incidence risk on diabetes, SSRIs might be a safer treatment option for diabetic-depressed patients than tricyclic antidepressants and norepinephrine reuptake inhibitors, with both presenting important cardiovascular side effects¹⁴⁷ in addition to also impairing glucose homeostasis.¹⁴⁸

7 | CONCLUSIONS

Does insulin modulate emotional behaviours? From the literature, we argue that the action of this hormone on the brain results in neurobehavioural changes. Another question that needs to be addressed is whether or not 5-HT neurones are involved in the action of insulin? This review shows that there are several arguments supporting the idea that insulin may act at serotonergic cell body and/or nerve terminal levels as summarised in Figure 2. In particular, the most convincing clues come from animal models of T2D or T1D.

Improving or stimulating brain insulin signalling and particularly insulin signalling in 5-HT neurones could comprise an interesting approach for relieving depressive symptoms or enhancing the treatment response because it has been shown that patients with diabetes are less sensitive to antidepressants.¹⁴⁹ Thus, additional animal and clinical studies need to be performed to support this hypothesis and determine the relevance of insulin sensitising strategies either alone or as an add-on strategy for patients suffering from depressive symptoms and metabolic diseases.

ACKNOWLEDGEMENTS

HM is supported by a fellowship INRAE-Région Nouvelle Aquitaine. This work was supported in part by research awards from the Société Française du Diabète (SFD) (XF), Fondation Bordeaux Université - FMC (XF).

CONFLICT OF INTERESTS

The authors declare that they have no conflicts of interest.

AUTHOR CONTRIBUTIONS

Hugo Martin: Writing – original draft; Writing – review & editing. **Sébastien Bullich:** Writing – original draft; Writing – review & editing. **Bruno Pierre Guiard:** Writing – original draft; Writing – review & editing. **Xavier Fioramonti:** Funding acquisition; Writing – original draft; Writing – review & editing.

PEER REVIEW

The peer review history for this article is available at <https://publons.com/publon/10.1111/jne.12928>.

ORCID

Bruno P. Guiard  <https://orcid.org/0000-0002-6873-9966>

Xavier Fioramonti  <https://orcid.org/0000-0003-1713-4817>

REFERENCES

- Anderson RJ, Freedland KE, Clouse RE, Lustman PJ. The prevalence of comorbid depression in adults with diabetes: a meta-analysis. *Diabetes Care*. 2001;24:1069-1078.
- Buchberger B, Huppertz H, Krabbe L, Lux B, Mattivi JT, Siafarikas A. Symptoms of depression and anxiety in youth with type 1 diabetes: a systematic review and meta-analysis. *Psychoneuroendocrinology*. 2016;70:70-84.
- Ali S, Stone MA, Peters JL, Davies MJ, Khunti K. The prevalence of co-morbid depression in adults with Type 2 diabetes: a systematic review and meta-analysis. *Diabet Med*. 2006;23:1165-1173.
- Roy T, Lloyd CE. Epidemiology of depression and diabetes: a systematic review. *J Affect Disord*. 2012;142(Suppl):S8-S21.
- Silverstein J, Cheng P, Ruedy KJ, et al. 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*. 2015;38:2341-2343.
- Bak E, Marcisz-Dyla E, Młynarska A, Sternal D, Kadłubowska M, Marcisz C. Prevalence of depressive symptoms in patients with type 1 and 2 diabetes mellitus. *Patient Prefer Adherence*. 2020;14:443-454.
- Herder C, Schmitt A, Budden F, et al. Association between pro- and anti-inflammatory cytokines and depressive symptoms in patients with diabetes-potential differences by diabetes type and depression scores. *Transl Psychiatry*. 2018;7:1.
- Chien I-C, Wu E-L, Lin C-H, Chou Y-J, Chou P. Prevalence of diabetes in patients with major depressive disorder: a population-based study. *Compr Psychiatry*. 2012;53:569-575.
- Phillips CM, Perry IJ. Depressive symptoms, anxiety and well-being among metabolic health obese subtypes. *Psychoneuroendocrinology*. 2015;62:47-53.
- Réus GZ, Carlessi AS, Silva RH, Ceretta LB, Quevedo J. Relationship of oxidative stress as a link between diabetes mellitus and major depressive disorder. *Oxid Med Cell Longev*. 2019;2019:1-6.
- Black CN, Bot M, Scheffer PG, Cuijpers P, Penninx BWJH. Is depression associated with increased oxidative stress? A systematic review and meta-analysis. *Psychoneuroendocrinology*. 2015;51:164-175.
- Ceretta LB, Réus GZ, Stringari RB, et al. Imipramine treatment reverses depressive-like behavior in alloxan-diabetic rats. *Diabetes Metab Res Rev*. 2012;28:139-144.
- Tang Z-J, Zou W, Yuan J, et al. Antidepressant-like and anxiolytic-like effects of hydrogen sulfide in streptozotocin-induced diabetic rats through inhibition of hippocampal oxidative stress. *Behav Pharmacol*. 2015;26:427-435.
- Youssef DA, El-Fayoumi HM, Mahmoud MF. Beta-caryophyllene alleviates diet-induced neurobehavioral changes in rats: the role of CB2 and PPAR- γ receptors. *Biomed Pharmacother*. 2019;110:145-154.
- Tan BL, Norhaizan ME. Effect of high-fat diets on oxidative stress, cellular inflammatory response and cognitive function. *Nutrients*. 2019;11:2579.
- Solleiro-Villavicencio H, Rivas-Arancibia S. Effect of chronic oxidative stress on neuroinflammatory response mediated by CD4+T cells in neurodegenerative diseases. *Front Cell Neurosci*. 2018;12:114.
- Calle MC, Fernandez ML. Inflammation and type 2 diabetes. *Diabetes Metab*. 2012;38:183-191.
- Ford ES. Body mass index, diabetes, and C-reactive protein among U.S. adults. *Diabetes Care*. 1999;22:1971-1977.
- Barzilay JI, Abraham L, Heckbert SR, et al. The relation of markers of inflammation to the development of glucose disorders in the elderly: the Cardiovascular Health Study. *Diabetes*. 2001;50:2384-2389.

20. Pradhan AD, Manson JE, Rifai N, Buring JE, Ridker PM. C-reactive protein, interleukin 6, and risk of developing type 2 diabetes mellitus. *JAMA*. 2001;286:327-334.
21. Schmidt MI, Duncan BB, Sharrett AR, et al. Markers of inflammation and prediction of diabetes mellitus in adults (Atherosclerosis Risk in Communities study): a cohort study. *Lancet Lond Engl*. 1999;353:1649-1652.
22. Delgado I, Huet L, Dexpert S, et al. Depressive symptoms in obesity: relative contribution of low-grade inflammation and metabolic health. *Psychoneuroendocrinology*. 2018;91:55-61.
23. Gomes JMG, de Costa JA, Alfenas RCG. Metabolic endotoxemia and diabetes mellitus: a systematic review. *Metabolism*. 2017;68:133-144.
24. Breder CD, Hazuka C, Ghayur T, et al. Regional induction of tumor necrosis factor alpha expression in the mouse brain after systemic lipopolysaccharide administration. *Proc Natl Acad Sci USA*. 1994;91:11393-11397.
25. Layé S, Parnet P, Goujon E, Dantzer R. Peripheral administration of lipopolysaccharide induces the expression of cytokine transcripts in the brain and pituitary of mice. *Brain Res Mol Brain Res*. 1994;27:157-162.
26. Chiodini I, Torlontano M, Scillitani A, et al. Association of sub-clinical hypercortisolism with type 2 diabetes mellitus: a case-control study in hospitalized patients. *Eur J Endocrinol*. 2005;153:837-844.
27. Wong M-L, Kling MA, Munson PJ, et al. Pronounced and sustained central hypernoradrenergic function in major depression with melancholic features: Relation to hypercortisolism and corticotropin-releasing hormone. *Proc Natl Acad Sci USA*. 2000;97:325-330.
28. Lewis-Tuffin LJ, Cidlowski JA. The physiology of human glucocorticoid receptor beta (hGRbeta) and glucocorticoid resistance. *Ann NY Acad Sci*. 2006;1069:1-9.
29. Pace TWW, Hu F, Miller AH. Cytokine-effects on glucocorticoid receptor function: relevance to glucocorticoid resistance and the pathophysiology and treatment of major depression. *Brain Behav Immun*. 2007;21:9-19.
30. Raison CL, Miller AH. When not enough is too much: the role of insufficient glucocorticoid signaling in the pathophysiology of stress-related disorders. *Am J Psychiatry*. 2003;160:1554-1565.
31. Sakoda H, Ogihara T, Anai M, et al. Dexamethasone-induced insulin resistance in 3T3-L1 adipocytes is due to inhibition of glucose transport rather than insulin signal transduction. *Diabetes*. 2000;49:1700-1708.
32. Duthheil S, Ota KT, Wohleb ES, Rasmussen K, Duman RS. High-fat diet induced anxiety and anhedonia: impact on brain homeostasis and inflammation. *Neuropsychopharmacology*. 2016;41:1874-1887.
33. Hassan AM, Mancano G, Kashofer K, et al. High-fat diet induces depression-like behaviour in mice associated with changes in microbiome, neuropeptide Y, and brain metabolome. *Nutr Neurosci*. 2019;22:877-893.
34. Yang JL, Liu DX, Jiang H, Pan F, Ho CSH, Ho RCM. The effects of high-fat-diet combined with chronic unpredictable mild stress on depression-like behavior and Leptin/LepRb in male rats. *Sci Rep*. 2016;6:35239.
35. Zemdegs J, Quesseveur G, Jarrault D, Pénicaud L, Fioramonti X, Guiard BP. High-fat diet-induced metabolic disorders impairs 5-HT function and anxiety-like behavior in mice. *Br J Pharmacol*. 2016;173:2095-2110.
36. Dinel A-L, André C, Aubert A, Ferreira G, Layé S, Castanon N. Cognitive and emotional alterations are related to hippocampal inflammation in a mouse model of metabolic syndrome. *PLoS One*. 2011;6:e24325.
37. Li S, Zhai X, Rong P, et al. Therapeutic effect of vagus nerve stimulation on depressive-like behavior, hyperglycemia and insulin receptor expression in Zucker fatty rats. *PLoS One*. 2014;9:e112066.
38. Miyata S, Hirano S, Kamei J. Diabetes attenuates the antidepressant-like effect mediated by the activation of 5-HT1A receptor in the mouse tail suspension test. *Neuropsychopharmacology*. 2004;29:461-469.
39. Huang C-W, Hong T-W, Wang Y-J, et al. Ophiocordyceps formosana improves hyperglycemia and depression-like behavior in an STZ-induced diabetic mouse model. *BMC Complement Altern Med*. 2016;16:310.
40. Pan Y, Hong Y, Zhang Q-Y, Kong L-D. Impaired hypothalamic insulin signaling in CUMS rats: restored by icariin and fluoxetine through inhibiting CRF system. *Psychoneuroendocrinology*. 2013;38:122-134.
41. Delanogare E, de Souza RM, Rosa GK, Guanabara FG, Rafacho A, Moreira ELG. Enriched environment ameliorates dexamethasone effects on emotional reactivity and metabolic parameters in mice. *Stress Amst Neth*. 2020;23:466-473.
42. Tsuneki H, Tokai E, Sugawara C, Wada T, Sakurai T, Sasaoka T. Hypothalamic orexin prevents hepatic insulin resistance induced by social defeat stress in mice. *Neuropeptides*. 2013;47:213-219.
43. Sestile CC, Maraschin JC, Rangel MP, Cuman RKN, Audi EA. Antidepressant-like effect of insulin in streptozotocin-induced type 2 diabetes mellitus rats. *Basic Clin Pharmacol Toxicol*. 2016;119:243-248.
44. Miyata S, Yamada N, Hirano S, Tanaka S, Kamei J. Diabetes attenuates psychological stress-elicited 5-HT secretion in the prefrontal cortex but not in the amygdala of mice. *Brain Res*. 2007;1147:233-239.
45. Elgee NJ, Williams RH, Lee ND. Distribution and degradation studies with insulin I131. *J Clin Invest*. 1954;33:1252-1260.
46. Haugaard N, Vaughan M, Haugaard ES, Stadie WC. Studies of radioactive injected labeled insulin. *J Biol Chem*. 1954;208:549-563.
47. Margolis RU, Altszuler N. Insulin in the cerebrospinal fluid. *Nature*. 1967;215:1375-1376.
48. Stein LJ, Dorsa DM, Baskin DG, et al. Immunoreactive insulin levels are elevated in the cerebrospinal fluid of genetically obese Zucker rats. *Endocrinology*. 1983;113:2299-2301.
49. Woods SC, Porte D. Relationship between plasma and cerebrospinal fluid insulin levels of dogs. *Am J Physiol*. 1977;233:E331-334.
50. Banks WA, Kastin AJ. Differential permeability of the blood-brain barrier to two pancreatic peptides: insulin and amylin. *Peptides*. 1998;19:883-889.
51. Baura GD, Foster DM, Porte D, et al. 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*. 1993;92:1824-1830.
52. Duffy KR, Pardridge WM. Blood-brain barrier transcytosis of insulin in developing rabbits. *Brain Res*. 1987;420:32-38.
53. Gray SM, Aylor KW, Barrett EJ. Unravelling the regulation of insulin transport across the brain endothelial cell. *Diabetologia*. 2017;60:1512-1521.
54. Rhea EM, Rask-Madsen C, Banks WA. Insulin transport across the blood-brain barrier can occur independently of the insulin receptor: insulin transport across the BBB. *J Physiol*. 2018;596:4753-4765.
55. Mazucanti CH, Liu Q-R, Lang D, et al. Release of insulin produced by the choroid plexis is regulated by serotonergic signaling. *JCI Insight*. 2019;4:e131682.
56. Garwood CJ, Ratcliffe LE, Morgan SV, et al. Insulin and IGF1 signalling pathways in human astrocytes in vitro and in vivo; characterisation, subcellular localisation and modulation of the receptors. *Mol Brain*. 2015;8:51.
57. Joost HG. Structural and functional heterogeneity of insulin receptors. *Cell Signal*. 1995;7:85-91.
58. Dou J-T, Chen M, Dufour F, Alkon DL, Zhao W-Q. Insulin receptor signaling in long-term memory consolidation following spatial learning. *Learn Mem*. 2005;12:646-655.

59. Fernandez AM, Torres-Alemán I. The many faces of insulin-like peptide signalling in the brain. *Nat Rev Neurosci*. 2012;13:225-239.
60. Zhao W-Q, Chen H, Quon MJ, Alkon DL. Insulin and the insulin receptor in experimental models of learning and memory. *Eur J Pharmacol*. 2004;490:71-81.
61. Yamaguchi Y, Flier JS, Benecke H, Ransil BJ, Moller DE. Ligand-binding properties of the two isoforms of the human insulin receptor. *Endocrinology*. 1993;132:1132-1138.
62. Havrankova J, Roth J, Brownstein M. Insulin receptors are widely distributed in the central nervous system of the rat. *Nature*. 1978;272:827-829.
63. Bohringer A, Schwabe L, Richter S, Schachinger H. Intranasal insulin attenuates the hypothalamic-pituitary-adrenal axis response to psychosocial stress. *Psychoneuroendocrinology*. 2008;33:1394-1400.
64. Benedict C. Intranasal insulin improves memory in humans. *Psychoneuroendocrinology*. 2004;29:1326-1334.
65. Ferreira de Sá DS, Römer S, Brückner AH, Issler T, Hauck A, Michael T. Effects of intranasal insulin as an enhancer of fear extinction: a randomized, double-blind, placebo-controlled experimental study. *Neuropsychopharmacology*. 2020;45:753-760.
66. Beirami E, Oryan S, Seyedhosseini Tamijani SM, Ahmadiani A, Dargahi L. Intranasal insulin treatment alleviates methamphetamine induced anxiety-like behavior and neuroinflammation. *Neurosci Lett*. 2017;660:122-129.
67. Marks DR, Tucker K, Cavallin MA, Mast TG, Fadool DA. Awake intranasal insulin delivery modifies protein complexes and alters memory, anxiety, and olfactory behaviors. *J Neurosci*. 2009;29:6734-6751.
68. Mueller PL, Pritchett CE, Wiechman TN, Zharikov A, Hajnal A. Antidepressant-like effects of insulin and IGF-1 are mediated by IGF-1 receptors in the brain. *Brain Res Bull*. 2018;143:27-35.
69. Rasgon NL, Kenna HA. Insulin resistance in depressive disorders and Alzheimer's disease: revisiting the missing link hypothesis. *Neurobiol Aging*. 2005;26(Suppl 1):103-107.
70. Kleinridders A, Cai W, Cappellucci L, et al. Insulin resistance in brain alters dopamine turnover and causes behavioral disorders. *Proc Natl Acad Sci USA*. 2015;112:3463-3468.
71. Grillo CA, Piroli GG, Kaigler KF, Wilson SP, Wilson MA, Reagan LP. Downregulation of hypothalamic insulin receptor expression elicits depressive-like behaviors in rats. *Behav Brain Res*. 2011;222:230-235.
72. Grillo CA, Piroli GG, Lawrence RC, et al. Hippocampal insulin resistance impairs spatial learning and synaptic plasticity. *Diabetes*. 2015;64:3927-3936.
73. Soto M, Cai W, Konishi M, Kahn CR. Insulin signaling in the hippocampus and amygdala regulates metabolism and neurobehavior. *Proc Natl Acad Sci USA*. 2019;116:6379-6384.
74. Heni M, Hennige AM, Peter A, et al. Insulin promotes glycogen storage and cell proliferation in primary human astrocytes. *PLoS One*. 2011;6:e21594.
75. Cai W, Xue C, Sakaguchi M, et al. Insulin regulates astrocyte gliotransmission and modulates behavior. *J Clin Invest*. 2018;128:2914-2926.
76. Muzerelle A, Scotto-Lomassese S, Bernard JF, Soiza-Reilly M, Gaspar P. Conditional anterograde tracing reveals distinct targeting of individual serotonin cell groups (B5-B9) to the forebrain and brainstem. *Brain Struct Funct*. 2016;221:535-561.
77. Mann JJ. Role of the serotonergic system in the pathogenesis of major depression and suicidal behavior. *Neuropsychopharmacology*. 1999;21:99-105.
78. Ohmura Y, Tanaka KF, Tsunematsu T, Yamanaka A, Yoshioka M. Optogenetic activation of serotonergic neurons enhances anxiety-like behaviour in mice. *Int J Neuropsychopharmacol*. 2014;17:1777-1783.
79. Abela AR, Browne CJ, Sargin D, et al. Median raphe serotonin neurons promote anxiety-like behavior via inputs to the dorsal hippocampus. *Neuropharmacology*. 2020;168:107985.
80. Teissier A, Chemiakine A, Inbar B, et al. Activity of raphé serotonergic neurons controls emotional behaviors. *Cell Rep*. 2015;13:1965-1976.
81. Urban DJ, Zhu H, Marcinkiewicz CA, et al. Elucidation of the behavioral program and neuronal network encoded by dorsal raphe serotonergic neurons. *Neuropsychopharmacology*. 2016;41:1404-1415.
82. Li S, Yao W-Q, Tao Y-Z, Ma L, Liu X. Serotonergic neurons in the median raphe nucleus mediate anxiety- and depression-like behavior. *Sheng Li Xue Bao*. 2018;70:228-236.
83. Okaty BW, Freret ME, Rood BD, et al. Multi-scale molecular deconstruction of the serotonin neuron system. *Neuron*. 2015;88:774-791.
84. Fernstrom JD, Wurtman RJ. Elevation of plasma tryptophan by insulin in rat. *Metabolism*. 1972;21:337-342.
85. MacKenzie RG, Trulsson ME. Effects of insulin and streptozotocin-induced diabetes on brain tryptophan and serotonin metabolism in rats. *J Neurochem*. 1978;30:205-211.
86. Danguir J, Elghozi JL, Laude D. Increased dopamine and serotonin metabolites in CSF during severe insulin-induced hypoglycemia in freely moving rats. *Neurochem Int*. 1984;6:71-75.
87. Juskiewicz M. The effect of insulin on the central serotonergic system of the rat. *Pol J Pharmacol Pharm*. 1985;37:591-600.
88. Orosco M, Nicolaidis S. Insulin and glucose-induced changes in feeding and medial hypothalamic monoamines revealed by microdialysis in rats. *Brain Res Bull*. 1994;33:289-297.
89. Smythe GA, Bradshaw JE, Nicholson MV, Grunstein HS, Storlien LH. Rapid bidirectional effects of insulin on hypothalamic noradrenergic and serotonergic neuronal activity in the rat: role in glucose homeostasis. *Endocrinology*. 1985;117:1590-1597.
90. Martin-Cora FJ, Fornal CA, Metzler CW, Jacobs BL. 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*. 2002;16:722-734.
91. Balali Dehkordi S, Sajedianfard J, Owji AA. 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*. 2019;22:915-921.
92. Braz JM, Enquist LW, Basbaum AI. Inputs to serotonergic neurons revealed by conditional viral transneuronal tracing. *J Comp Neurol*. 2009;514:145-160.
93. Boda E. Myelin and oligodendrocyte lineage cell dysfunctions: new players in the etiology and treatment of depression and stress-related disorders. *Eur J Neurosci*. 2019. <https://doi.org/10.1111/ejn.14621>
94. Quesseveur G, Gardier AM, Guiard BP. The monoaminergic tripartite synapse: a putative target for currently available antidepressant drugs. *Curr Drug Targets*. 2013;14:1277-1294.
95. Aberg MAI, Aberg ND, Palmer TD, et al. IGF-I has a direct proliferative effect in adult hippocampal progenitor cells. *Mol Cell Neurosci*. 2003;24:23-40.
96. Lindqvist A, Mohapel P, Bouter B, et al. High-fat diet impairs hippocampal neurogenesis in male rats. *Eur J Neurol*. 2006;13:1385-1388.
97. Lv H, Tang L, Guo C, et al. Intranasal insulin administration may be highly effective in improving cognitive function in mice with cognitive dysfunction by reversing brain insulin resistance. *Cogn Neurodyn*. 2020;14:323-338.
98. Murata Y, Narisawa Y, Shimono R, et al. 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*. 2017;209:209-216.

99. Nam SM, Kim JW, Kwon HJ, et al. 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.* 2017;42:3149-3159.
100. Okuyama S, Shinoka W, Nakamura K, et al. 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.* 2018;82:1384-1395.
101. Ramos-Rodriguez JJ, Molina-Gil S, Ortiz-Barajas O, et al. Central proliferation and neurogenesis is impaired in type 2 diabetes and prediabetes animal models. *PLoS One.* 2014;9:e89229.
102. Eom T-Y, Jope RS. Blocked inhibitory serine-phosphorylation of glycogen synthase kinase-3 α /3 β impairs in vivo neural precursor cell proliferation. *Biol Psychiatry.* 2009;66:494-502.
103. Papazoglou IK, Jean A, Gertler A, Taouis M, Vacher C-M. Hippocampal GSK3 β as a molecular link between obesity and depression. *Mol Neurobiol.* 2015;52:363-374.
104. Lesch K-P, Waider J. Serotonin in the modulation of neural plasticity and networks: implications for neurodevelopmental disorders. *Neuron.* 2012;76:175-191.
105. Jones KA, Srivastava DP, Allen JA, Strachan RT, Roth BL, Penzes P. Rapid modulation of spine morphology by the 5-HT_{2A} serotonin receptor through kalirin-7 signaling. *Proc Natl Acad Sci USA.* 2009;106:19575-19580.
106. Lee S-H, Zabolotny JM, Huang H, Lee H, Kim Y-B. Insulin in the nervous system and the mind: functions in metabolism, memory, and mood. *Mol Metab.* 2016;5:589-601.
107. Arnold SE, Lucki I, Brookshire BR, et al. High fat diet produces brain insulin resistance, synaptodendritic abnormalities and altered behavior in mice. *Neurobiol Dis.* 2014;67:79-87.
108. Stranahan AM, Norman ED, Lee K, et al. Diet-induced insulin resistance impairs hippocampal synaptic plasticity and cognition in middle-aged rats. *Hippocampus.* 2008;18:1085-1088.
109. Cassé F, Richetin K, Toni N. Astrocytes' contribution to adult neurogenesis in physiology and Alzheimer's disease. *Front Cell Neurosci.* 2018;12:432.
110. Quesseveur G, David DJ, Gaillard MC, et al. BDNF overexpression in mouse hippocampal astrocytes promotes local neurogenesis and elicits anxiolytic-like activities. *Transl Psychiatry.* 2013;3:e253.
111. Tsai S-F, Wu H-T, Chen P-C, et al. High-fat diet suppresses the astrocytic process arborization and downregulates the glial glutamate transporters in the hippocampus of mice. *Brain Res.* 2018;1700:66-77.
112. Gupta D, Kurhe Y, Radhakrishnan M. Antidepressant effects of insulin in streptozotocin induced diabetic mice: modulation of brain serotonin system. *Physiol Behav.* 2014;129:73-78.
113. Abraham PM, Paul J, Paulose CS. Down regulation of cerebellar serotonergic receptors in streptozotocin induced diabetic rats: effect of pyridoxine and Aegle marmelose. *Brain Res Bull.* 2010;82:87-94.
114. Barber M, Kasturi BS, Austin ME, Patel KP, MohanKumar SMJ, MohanKumar PS. Diabetes-induced neuroendocrine changes in rats: role of brain monoamines, insulin and leptin. *Brain Res.* 2003;964:128-135.
115. Sandrini M, Vitale G, Vergoni AV, Ottani A, Bertolini A. Streptozotocin-induced diabetes provokes changes in serotonin concentration and on 5-HT_{1A} and 5-HT₂ receptors in the rat brain. *Life Sci.* 1997;60:1393-1397.
116. Mayanil CS, Kazmi SM, Baquer NZ. Changes in monoamine oxidase activity in rat brain during alloxan diabetes. *J Neurochem.* 1982;38:179-183.
117. Kino M, Yamato T, Aomine M. Simultaneous measurement of nitric oxide, blood glucose, and monoamines in the hippocampus of diabetic rat: an in vivo microdialysis study. *Neurochem Int.* 2004;44:65-73.
118. Ohtani N, Ohta M, Sugano T. Microdialysis study of modification of hypothalamic neurotransmitters in streptozotocin-diabetic rats. *J Neurochem.* 1997;69:1622-1628.
119. Yamato T, Misumi Y, Yamasaki S, Kino M, Aomine M. Diabetes mellitus decreases hippocampal release of neurotransmitters: an in vivo microdialysis study of awake, freely moving rats. *Diabetes Nutr Metab.* 2004;17:128-136.
120. Petrisić MS, Augood SJ, Bicknell RJ. Monoamine transporter gene expression in the central nervous system in diabetes mellitus. *J Neurochem.* 1997;68:2435-2441.
121. Fernstrom JD. Large neutral amino acids: dietary effects on brain neurochemistry and function. *Amino Acids.* 2013;45:419-430.
122. Pratap Singh D. Altered monoamine metabolism in high fat diet induced neuropsychiatric changes in rats. *J Obes Weight Loss Ther.* 2014;4:234.
123. Blier P, Piñeyro G, el Mansari M, Bergeron R, de Montigny C. Role of somatodendritic 5-HT autoreceptors in modulating 5-HT neurotransmission. *Ann NY Acad Sci.* 1998;861:204-216.
124. Zemdegs J, Martin H, Pintana H, et al. Metformin promotes anxiolytic and antidepressant-like responses in insulin-resistant mice by decreasing circulating branched-chain amino acids. *J Neurosci.* 2019;39:5935-5948.
125. Rasgon NL, Kenna HA, Williams KE, Powers B, Wroolie T, Schatzberg AF. Rosiglitazone add-on in treatment of depressed patients with insulin resistance: a pilot study. *ScientificWorldJournal.* 2010;10:321-328.
126. Poggini S, Golia MT, Alboni S, et al. Combined fluoxetine and metformin treatment potentiates antidepressant efficacy increasing IGF2 expression in the dorsal hippocampus. *Neural Plast.* 2019;2019:1-12.
127. El-Mir M-Y, Demaille D, R-Villanueva G, et al. Neuroprotective role of antidiabetic drug metformin against apoptotic cell death in primary cortical neurons. *J Mol Neurosci.* 2008;34:77-87.
128. Essmat N, Soliman E, Mahmoud MF, Mahmoud AAA. Antidepressant activity of anti-hyperglycemic agents in experimental models: a review. *Diabetes Metab. Syndr.* 2020;14:1179-1186.
129. Shivavedi N, Kumar M, Tej GNVC, Nayak PK. Metformin and ascorbic acid combination therapy ameliorates type 2 diabetes mellitus and comorbid depression in rats. *Brain Res.* 2017;1674:1-9.
130. Soliman E, Essmat N, Mahmoud MF, Mahmoud AAA. 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.* 2020;393:1391-1404.
131. Liao L, Zhang XD, Li J, et al. 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.* 2017;49:178-186.
132. Barnard K, Peveler RC, Holt RIG. Antidepressant medication as a risk factor for type 2 diabetes and impaired glucose regulation: systematic review. *Diabetes Care.* 2013;36:3337-3345.
133. Bhattacharjee S, Bhattacharya R, Kelley GA, Sambamoorthi U. Antidepressant use and new-onset diabetes: a systematic review and meta-analysis. *Diabetes Metab Res Rev.* 2013;29:273-284.
134. Salvi V, Grua I, Cerveri G, Mencacci C, Barone-Adesi F. The risk of new-onset diabetes in antidepressant users – a systematic review and meta-analysis. *PLoS One.* 2017;12:e0182088.
135. Knol MJ, Geerlings MI, Egberts AC, Gorter KJ, Grobbee DE, Heerdink ER. No increased incidence of diabetes in antidepressant users. *Int Clin Psychopharmacol.* 2007;22:382-386.
136. Brieler JA, Lustman PJ, Scherrer JF, Salas J, Schneider FD. Antidepressant medication use and glycaemic control in co-morbid type 2 diabetes and depression. *Fam Pract.* 2016;33:30-36.
137. Hennings JM, Schaaf L, Fulda S. Glucose metabolism and antidepressant medication. *Curr Pharm Des.* 2012;18:5900-5919.

138. McIntyre RS, Soczynska JK, Konarski JZ, Kennedy SH. The effect of antidepressants on glucose homeostasis and insulin sensitivity: synthesis and mechanisms. *Expert Opin Drug Saf.* 2006;5:157-168.
139. Potter van Loon BJ, Radder JK, Frölich M, Krans HM, Zwinderman AH, Meinders AE. Fluoxetine increases insulin action in obese nondiabetic and in obese non-insulin-dependent diabetic individuals. *Int J Obes Relat Metab Disord.* 1992;16:79-85.
140. Maheux P, Ducros F, Bourque J, Garon J, Chiasson JL. Fluoxetine improves insulin sensitivity in obese patients with non-insulin-dependent diabetes mellitus independently of weight loss. *Int J Obes Relat Metab Disord.* 1997;21:97-102.
141. Erenmemisoglu A, Ozdogan UK, Saraymen R, Tutus A. Effect of some antidepressants on glycaemia and insulin levels of normoglycaemic and alloxan-induced hyperglycaemic mice. *J Pharm Pharmacol.* 1999;51:741-743.
142. Andersohn F, Schade R, Suissa S, Garbe E. Long-term use of antidepressants for depressive disorders and the risk of diabetes mellitus. *Am J Psychiatry.* 2009;166:591-598.
143. Nguyen TTH, Roussin A, Rousseau V, Montastruc J-L, Montastruc F. Role of serotonin transporter in antidepressant-induced diabetes mellitus: a pharmacoepidemiological-pharmacodynamic study in VigiBase®. *Drug Saf.* 2018;41:1087-1096.
144. Yamada J, Sugimoto Y, Inoue K. Selective serotonin reuptake inhibitors fluoxetine and fluvoxamine induce hyperglycemia by different mechanisms. *Eur J Pharmacol.* 1999;382:211-215.
145. Levkovitz Y, Ben-Shushan G, Hershkovitz A, et al. Antidepressants induce cellular insulin resistance by activation of IRS-1 kinases. *Mol Cell Neurosci.* 2007;36:305-312.
146. Isaac R, Boura-Halfon S, Gurevitch D, Shainskaya A, Levkovitz Y, Zick Y. Selective serotonin reuptake inhibitors (SSRIs) inhibit insulin secretion and action in pancreatic β cells. *J Biol Chem.* 2013;288:5682-5693.
147. Mago R, Tripathi N, Andrade C. Cardiovascular adverse effects of newer antidepressants. *Expert Rev Neurother.* 2014;14:539-551.
148. Chen Y-C, Shen Y-C, Hung Y-J, Chou C-H, Yeh C-B, Perng C-H. Comparisons of glucose-insulin homeostasis following maprotiline and fluoxetine treatment in depressed males. *J Affect Disord.* 2007;103:257-261.
149. Woo YS, McIntyre RS, Kim J-B, et al. 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.* 2016;203:190-198.

How to cite this article: Martin H, Bullich S, Guiard BP, Fioramonti X. The impact of insulin on the serotonergic system and consequences on diabetes-associated mood disorders. *J Neuroendocrinol.* 2021;33:e12928. <https://doi.org/10.1111/jne.12928>

IV. Impact de la sérotonine sur la signalisation de l'insuline

1- Au niveau périphérique

A l'heure actuelle, nous sommes loin de connaître précisément l'influence de la sérotonine sur la modulation de la sécrétion de l'insuline par le pancréas. Cependant, au cours des 50 dernières années, différentes études se sont intéressées à ce sujet. Des études princeps témoignent de la présence d'amines dans le pancréas de différentes espèces animales (Falck and Hellman, 1963) et plus précisément de 5-HT dans les cellules α et β (Jaim-etcheverry and Zieher, 1968 ; Ekholm et al., 1971). Il a même été suggéré que la 5-HT pourrait être co-sécrétée avec l'insuline lors d'une stimulation par le glucose (Glyfe et al., 1978). Tout cela est d'autant plus plausible que ces cellules expriment tous les éléments moléculaires participant au processus de recapture de la 5-HT tels que le SERT et le VMAT2 (Almaça et al., 2016). De plus, les cellules pancréatiques expriment les enzymes de synthèse et de dégradation de la sérotonine (TPH1/2 et MAO-A/B) (Ohta et al., 2011 ; Ganic et al., 2015). Enfin, ces cellules sont également dotées d'un large éventail de récepteurs sérotoninergiques dont les récepteurs 5-HT_{1A-1B-1D-1F-2A}, 5-HT_{2B}, 5-HT_{3A-3C-3D-3E}, 5-HT₆ et le 5-HT₇ (Amisten et al., 2013 ; Ohara-imaizumi et al., 2013 ; Bennet et al., 2016).

Le rôle de ces différents récepteurs est encore très peu connu vis à vis de la sécrétion d'insuline (pour revue : Bascuñan et al., 2018), mais quelques travaux ont pu appréhender certains effets et proposer des modèles de régulation. Il semblerait que la 5-HT puisse promouvoir mais également inhiber la sécrétion d'insuline en fonction du sous-type de récepteur activé, ce qui pourrait être en adéquation avec une sécrétion pulsatile (Paulmann et al., 2009). En effet, il a été montré que la 5-HT inhibe la sécrétion d'insuline en conditions basales (Coulie et al., 1998) ou stimulée par le glucose (Bennet et al., 2015) via l'activation du récepteur 5-HT_{1D}. En revanche, l'action de l'insuline sur les récepteurs 5-HT_{2A-B} du pancréas potentialiserait la sécrétion d'insuline glucose-dépendante (Bennet et al., 2016 ; Bennet et al., 2015 ; Yamada et al., 1989 ;). Par ailleurs, en accord avec sa fonction de récepteur-canal, l'action de la 5-HT sur le récepteur 5-HT₃ semblerait également favoriser la sécrétion d'insuline induite par le glucose mais plutôt dans un contexte « pathologique » comme la gestation ou l'exposition de souris à un régime HFD (Kim et al., 2015 ; Ohara-Imaizumi et al., 2013).

La sérotonine intracellulaire joue également un rôle important puisqu'il a été montré que le processus de sérotonylation active constitutivement les GTPases Rab3a et Rab27a impliquées dans l'exocytose de l'insuline (Paulmann et al., 2009).

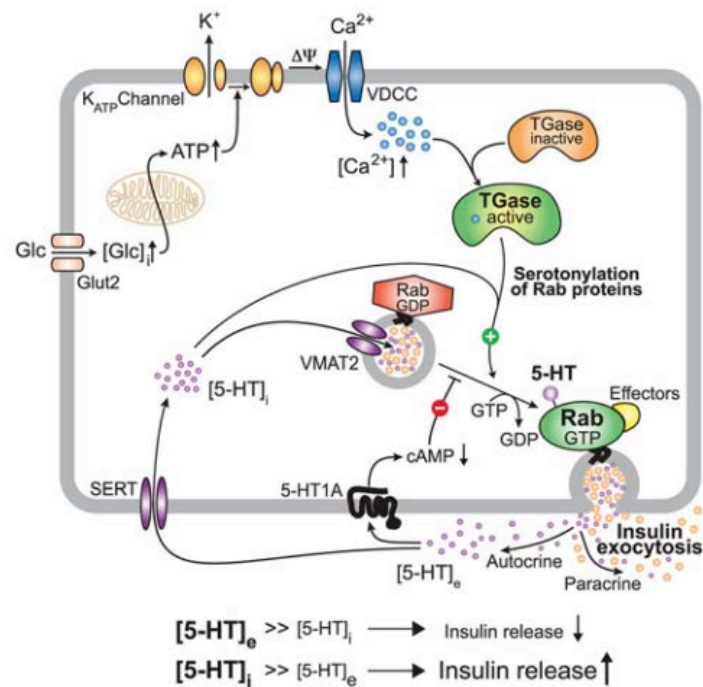


Figure 17. Exemples de modulation de la sécrétion d'insuline par le système sérotoninergique. D'après Paulmann et al., 2009.

Compte tenu que les effets de la 5-HT sur la sécrétion d'insuline dépendent de la nature du sous-type récepteur sérotoninergique stimulé, il est difficile d'anticiper l'action des antidépresseurs sur ce processus. Les travaux actuellement disponibles révèlent que les ISRS, TCA ou les IMAO (inhibiteurs de monoamine oxydases) exercent des effets négatifs sur le système insuline. En effet dans les études précliniques, la sertraline et la fluoxétine (ISRS) inhibent la sécrétion d'insuline de cellules β en culture (Cataldo et al., 2015 ; Isaac et al., 2013) tout comme l'imipramine (TCA) (El-dakhkhny et al., 1996, Antoine et al., 2004). Pour les IMAO, les preuves ne sont pas très récentes et semblent dépendre de la dose utilisée (Aleyassine and Gardiner 1975). Chez l'humain, le même type de résultat a été rapporté chez des patients non diabétiques traités avec des ISRS qui possèdent une insulïnémie plus faible (Noordam et al., 2016).

2- Au niveau central

Outre les effets modulateurs du système sérotoninergique au niveau pancréatique, il semblerait que la sérotonine module la signalisation insulinergique centrale. En effet, une étude investiguant la libération d'insuline par les plexus choroïdes révèle une diminution d'expression du gène *Ins2* murin dans les plexus après ablation des neurones sérotoninergiques du DRN (Mazucanti et al., 2019). Dans cette étude, les auteurs montrent également que la sérotonine induit la libération calcium-dépendante d'insuline par ces plexus choroïdes.

D'autres travaux réalisés sur tranches d'hippocampe ont montré que dans le gyrus denté de souris, la 5-HT augmente la phosphorylation de GSK3 tandis que cet effet est perdu chez les animaux nourris avec un régime HFD et donc présentant probablement une insulino-résistance centrale (Papazoglou et al., 2015). De manière un peu plus indirecte, ce même groupe a montré que l'injection intrapéritonéale de dexfenfluramine, un agent pharmacologique stimulant la libération de 5-HT, augmente l'activation d'Akt au niveau de l'hypothalamus (Papazoglou et al., 2012) renforçant l'idée d'une interaction fonctionnelle entre ces deux systèmes.

Le système insulinergique est un système très largement exprimé tant au niveau périphérique que dans le système nerveux central. Si son impact d'un point de vue du métabolisme et des comportements alimentaires sont relativement bien décrits, les liens éventuels entre les systèmes insulinergique et sérotoninergique centraux, et donc les comportements anxio-dépressifs, restent encore à être caractérisés. Ce travail est d'autant plus nécessaire que les preuves cliniques et précliniques décrivant le lien bidirectionnel entre troubles métaboliques et psychiatriques s'accumulent.

PARTIE 3 :

**LA RESISTANCE À L'INSULINE ET SON
IMPLICATION DANS L'ÉTIOLOGIE DE LA
DEPRESSION MAJEURE**

I. Insulino-résistance : Généralité et Définition

La résistance à l'insuline est définie comme l'incapacité des tissus à répondre normalement à la stimulation par l'insuline et donc à induire une réduction de la glycémie. En conditions d'insulino-résistance, des concentrations plus importantes d'insuline sont requises pour induire la réduction de la glycémie après un repas. C'est la caractéristique majeure du DT2 et surtout celle qui est détectable en premier (DeFronzo and Tripathy, 2009 ; Martin et al., 1992). Depuis le début des années 2000, la notion d'insulino-résistance centrale est de plus en plus présente dans la littérature. L'origine et les conséquences de cette insulino-résistance centrale sont encore floues et représentent un réel enjeu afin de mieux comprendre son implication potentielle dans les pathologies du système nerveux central et envisager de nouvelles stratégies thérapeutiques. A travers cette Partie 3, nous allons décrire les mécanismes moléculaires à l'origine de l'insulino-résistance ainsi que leurs conséquences sur le système sérotoninergique et les comportements associés.

II. Origines moléculaires de l'insulino-résistance :

a. Origines génétiques de l'insulino-résistance

Comme nous avons pu le voir précédemment, la voie de la signalisation de l'insuline comprend de nombreux acteurs. Ainsi, toute dérégulation d'expression et/ou de phosphorylation peut perturber l'équilibre activation/inhibition de la voie de signalisation, ce qui va entraîner une insulino-résistance. Par exemple, des polymorphismes d'IRS-1 sont associés à une diminution de l'activité de PI3K entraînant une diminution de la signalisation de l'insuline (Almind et al., 1996 ; Hribal et al., 2008 ; Burguete-Garcia et al., 2010 ; Martinez-Gomez et al., 2011). C'est également le cas pour un polymorphisme génétique de PTEN (phosphatase and TENsin homolog), inhibiteur de la voie de l'insuline en déphosphorylant PIP₃. En effet, ce polymorphisme entraîne une augmentation de l'activité de PTEN rendant la signalisation de l'insuline plus difficile (Ishihara et al., 2003). On peut retrouver d'autres acteurs de la voie impactés par des polymorphismes comme l'IR, AKT ou IRS2 (pour revue : Boucher et al., 2014)

b. Lipotoxicité

La lipotoxicité s'installe lorsque la capacité de stockage du tissu adipeux a atteint sa capacité maximale. Lorsque cela arrive, les lipides vont alors s'accumuler dans les muscles et le foie qui vont alors dysfonctionner et devenir insulino-résistants. Les acides gras libres (free fatty-acid, FFA) sont plus facilement générés par le tissu adipeux viscéral ce qui explique que la quantité de ce tissu adipeux est associé au risque de développer un diabète et serait à l'origine d'une plus forte incidence du diabète chez l'humain (Ibrahim, 2010 ; Power et Shulkin., 2007). En effet, au niveau du muscle et du foie, les FFA, et notamment le diacylglycérol, ont pour conséquence l'activation de la PKC qui inhibe alors la signalisation de l'insuline menant vers l'insulino-résistance (Itani et al., 2001 ; Griffin et al., 1999 ; Gassaway et al., 2018). Un excès d'acides gras saturés et insaturés va augmenter la synthèse et l'accumulation de céramides qui vont également inhiber la signalisation de l'insuline en activant des sérines kinases telle que la PKC ou encore en inhibant Akt (Stratford et al., 2004 ; Schenk et al., 2008). Dans la même idée, l'inhibition de la synthèse de novo de céramide par l'administration de myriocin améliore considérablement la tolérance au glucose de rats Zucker obèses (Holland et al., 2007). De manière intéressante, l'administration ICV de myriocin chez ces mêmes rats améliore la sensibilité à l'insuline dans l'hypothalamus témoignant ainsi de l'impact central de la lipotoxicité (Campana et al., 2018). Dans la même idée, l'injection ICV de triglycérides induit l'altération de la sécrétion d'insuline et de la production hépatique de glucose (Clément et al., 2002). Ces phénomènes seraient liés à la détection hypothalamique des lipides circulants (Lam et al., 2005).

c. Inflammation

Dans un contexte d'obésité, les patients présentent une inflammation de bas grade connue pour être impliquée dans le développement de la résistance à l'insuline (Osborn and Olefsky 2012 ; Heilbronn and Campbell, 2008). En effet, de nombreuses cytokines et médiateurs inflammatoires sont associées à l'insulino-résistance, notamment la protéine C-réactive (CRP) mais aussi les interleukines IL-6 et TNF- α (Hotamisligil et al., 1993 ; Xu et al., 2003) (Figure 18). Certains de ces marqueurs inflammatoires prédisent même l'incidence du DT2 (Duncan et al., 2003).

Si on réduit cette inflammation, par exemple via l'inactivation génétique du TNF- α , cela protège les souris de l'induction de l'insulino-résistance par un régime HFD (Uysal et al.,

1997, *Ventre et al., 1997*). D'un point de vue mécanistique il semblerait que le TNF- α active des sérine/thréonine kinases qui vont pouvoir inhiber IRS-1 (*Peraldi and Spiegelman, 1998*). Cependant des essais cliniques utilisant une protéine capable de neutraliser le TNF- α circulant n'ont pas permis de mettre en évidence d'amélioration de l'insulino-résistance ni chez des patients à risque de développer un DT2 ni chez des patients obèses et diabétiques de type 2 (*Dominguez et al., 2005 ; Martinez-Abundis et al., 2007*).

Les adipocytes sécrètent également une chimiokine appelé chimiokine ligand 2 (CCL2) ou encore 'monocyte chemotactic protein-1' (MCP-1) permettant l'accumulation de macrophage dans le tissu adipeux (*Kanda et al., 2006*). Il y a été montré que MCP-1 induit un dysfonctionnement du tissu adipeux ainsi que de l'insulino-résistance au niveau de ce tissu (*Sartipy and Loskutoff, 2003 ; Kamei et al., 2006*). De la même façon que pour TNF- α , l'inactivation génétique de MCP-1 améliore la résistance à l'insuline chez des souris nourries avec un régime HFD (*Kanda et al., 2006*).

Concernant l'interleukine 6 (IL-6), elle induit l'ubiquitynilation d'IRS-1 et IRS-2 de manière dépendante de SOCS1 et SOCS3 (suppressor of cytokine signaling 1 and 3) et donc inhibe la signalisation de l'insuline (*Rui et al., 2002*). L'IL-1 β , quant à elle, est connue pour diminuer la sécrétion d'insuline par les cellules β du pancréas (*Jhala et al., 1994 ; Hughes et al., 1990*).

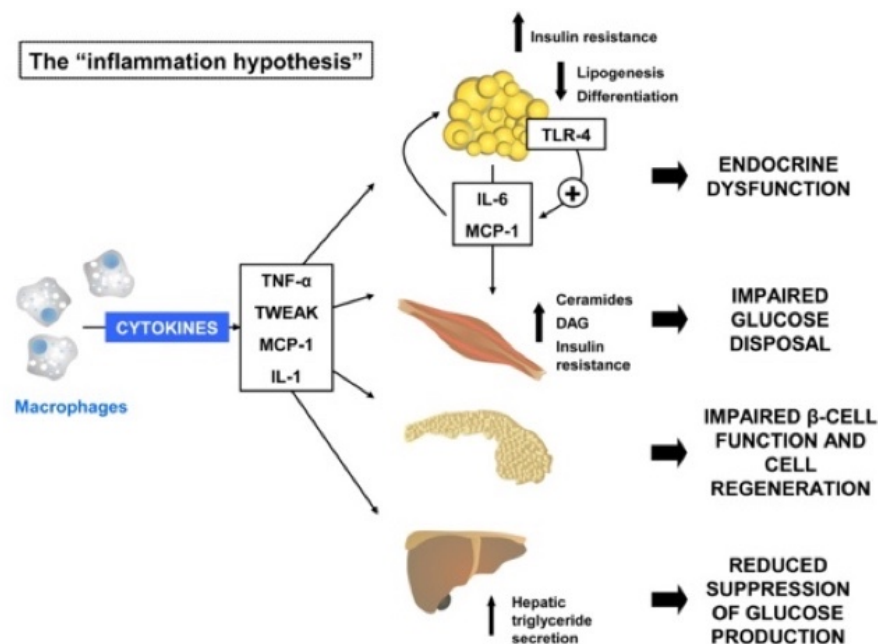


Figure 18. Hypothèse inflammatoire de la résistance à l'insuline. D'après Chadt et al., 2018.

d. Hyperglycémie, Dysfonctionnement mitochondrial et stress du réticulum endoplasmique

Dans le cadre d'une hyperglycémie, la formation de protéines glyquées ainsi que de produits avancés de glycosylation est plus importante. Des études montrent que ces éléments aussi appelés AGE (Advanced Glycosylation End) peuvent altérer la signalisation de l'insuline notamment en stimulant la sécrétion d'IL-6 et en activant des sérine/thréonine kinases inhibant IRS-1 (Miele et al., 2003 ; Riboulet-Chavey et al., 2006).

L'hyperglycémie serait également à l'origine d'une augmentation de la production de ROS (Luc et al., 2019 ; Fiorentino et al., 2019 ; Lu et al., 2020). Ces ROS entraînent un stress oxydatif puis un dysfonctionnement mitochondrial qui eux aussi ont été associés à l'insulino-résistance aussi bien au niveau périphérique (Urakawa et al., 2003) que central (Kleinridders et al., 2013). De la même façon que pour l'hyperglycémie, il a été montré que l'ensemble de ces altérations convergerait vers l'activation de kinases inhibitrices de la voie de signalisation de l'insuline (Evans et al., 2005).

Le stress chronique du RE induit également l'accumulation de ROS (Cullinan and Diehl, 2006) mais aussi des voies de signalisation qui mènent à l'activation de JNK (Urano et al., 2000) et de la voie NFK-B-IKK (Hu et al., 2006) impliquées dans la production d'acteurs de l'inflammation et tendant toutes les deux vers l'insulino-résistance.

Il apparaît clairement que l'ensemble des phénomènes décrits dans ce chapitre (lipotoxicité, inflammation, dysfonctionnement mitochondrial et stress du RE) sont intimement liés et interconnectés, et convergent vers un dysfonctionnement métabolique, dont l'insulino-résistance. Le dénominateur commun à toutes ces voies semble être l'activation de sérine/thréonine kinases vers lesquelles ces mécanismes cellulaires et moléculaires convergent (Figure 19).

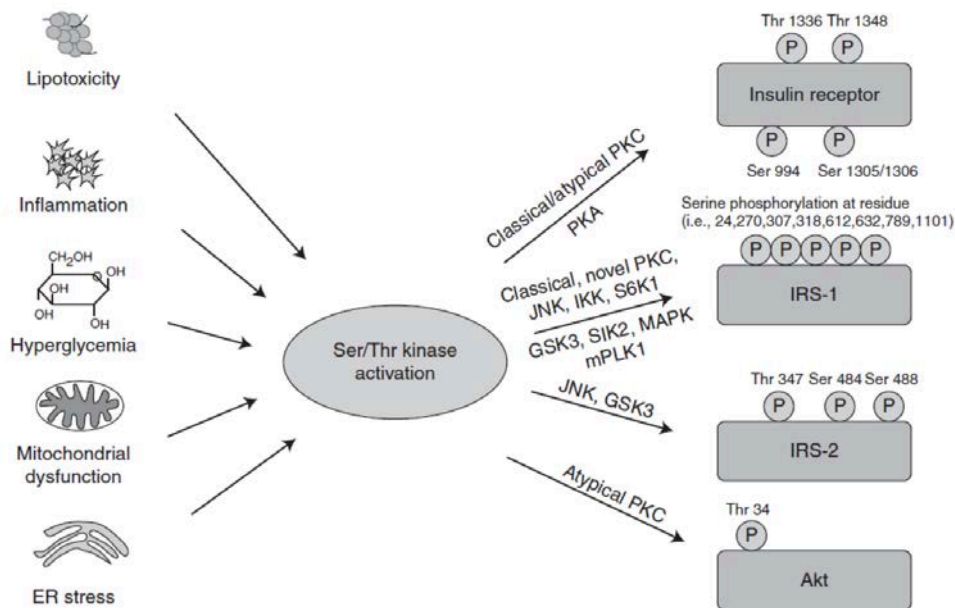


Figure 19. Voies de signalisation de l'insulino-résistance. D'après Boucher et al., 2014.

III. Insulino-résistance centrale et troubles émotionnels

A l'heure actuelle, il est très difficile d'isoler la résistance à l'insuline centrale de la résistance à l'insuline périphérique et cela représente un réel enjeu concernant l'étude de son impact sur les fonctions cérébrales. Cependant certaines stratégies ont permis d'amener des éléments de réponse notamment vis à vis de son impact sur les comportements émotionnels.

Une façon drastique d'appréhender l'effet de l'insulino-résistance centrale sur les troubles émotionnels repose sur l'invalidation génétique du récepteur à l'insuline spécifiquement dans des populations cellulaires du système nerveux central. C'est ce que le groupe de Ronald Kahn a fait à travers plusieurs études. Ils ont tout d'abord invalidé le récepteur à l'insuline dans tous les neurones (souris NIRKO), ce qui a conduit à des troubles de type anxio-dépressifs chez la souris (Kleinridders et al., 2015). Ces troubles sont associés à des taux élevés de MAO-A et B, les enzymes de dégradation des monoamines. De plus ces anomalies comportementales sont corrigées par le traitement avec un IMAO. Dans une autre étude, ces mêmes auteurs ont analysé le knock-out du récepteur à l'insuline spécifiquement dans la glie (GIRKO) (Cai et al., 2018). Ils ont ainsi constaté le même type d'altérations comportementales chez ces souris associées à une diminution de l'activation astrocytaire et une diminution de libération de dopamine. Enfin, une troisième étude menée par le même groupe a utilisé une approche lentivirale pour inactiver le gène du récepteur à l'insuline et le récepteur à IGF1 dans l'hippocampe et l'amygdale. En accord avec les résultats précédent, ces manipulations ont

conduit à une augmentation de l'anxiété et des perturbations mnésiques chez les souris (Soto et al., 2019).

De plus, une étude a utilisé l'administration intracérébrale de céramide C16 pour induire une insulino-résistance centrale localisée. Cette approche entraîne une augmentation du comportement de résignation et d'anxiété chez la souris. (Zoicas et al., 2020).

L'ensemble de ces résultats indiquent que la résistance à l'insuline centrale joue un rôle dans les troubles émotionnels notamment par la modulation du système dopaminergique et éventuellement de manière plus globale des systèmes monoaminergiques. L'insulino-résistance pourrait donc représenter un mécanisme privilégié pour développer de nouvelles stratégies antidépresseurs seules ou en associations avec des traitements actuellement disponibles.

IV. Effets antidépresseurs des stratégies insulino-sensibilisatrices/-sécrétrices

Au cours des dernières décennies, au regard des preuves précliniques mais aussi cliniques soulignant le lien entre l'insulino-résistance périphérique et/ou centrale et la DM, les effets des antidiabétiques sur l'humeur ont été étudiés. Bien que les recherches actuelles se limitent à des études observationnelles, un faisceau d'argument plaide en faveur d'effets bénéfiques de l'insuline et des antidiabétiques oraux dans les troubles dépressifs. Cette partie récapitule les principales données précliniques et cliniques mettant en évidence les effets antidépresseurs des différentes classes d'antidiabétiques et les quelques données mécanistiques disponibles.

A. Études précliniques

1. L'insuline

À l'heure actuelle, les effets comportementaux de l'insuline sur les comportements de type anxio-dépressifs ont été examinés de manière très parcourue. Seulement quelques études ont testé les effets de cette hormone sur le comportement de résignation dans le test de nage forcée ou de suspension caudale (Gupta et al., 2014; Sestile et al., 2016). Plus précisément, il a

été montré que l'injection intrapéritonéale d'insuline (1 ou 2 UI/kg) atténue l'augmentation du temps d'immobilité induit par la STZ chez la souris Swiss. Cette étude montre également que l'injection d'insuline ré-augmente les niveaux tissulaires de sérotonine dans le cerveau, un effet associé à une diminution de l'activité de la MAO-A (Gupta et al., 2014). Chez des rats présentant un diabète induit par la STZ, le traitement chronique à l'insuline (1 ou 2 UI/kg, i.p.) entraîne également une diminution de l'immobilité comparable au groupe traité avec un ISRS (Sestile et al., 2016).

2. Les insulino-sécréteurs

2.1 Les sulfonylurés

L'un d'entre eux, le glibenclamide, a particulièrement attiré l'attention puisque de nombreuses études montrent que son injection chronique améliore la résignation évaluée dans le test de nage forcée dans le modèle HFD (Soliman et al., 2020). Cet effet de type antidépresseur s'applique aussi dans différents modèles de dépression sans troubles métaboliques apparents dont le modèle UCMS et le modèle de dépression induite par la réserpine (Esmaeili et al., 2018 ; Soliman et al., 2020 ; Su et al., 2017). Cet effet de type antidépresseur s'accompagne d'une diminution de l'hyperactivité de l'axe HPA et du stress oxydatif ainsi qu'une inhibition des mécanismes pro-inflammatoires. De manière intéressante, l'injection ICV de glibenclamide permet de reproduire un effet de type antidépresseur chez des femelles Swiss mais pas chez les males (Moretti et al., 2012 ; Bortolatto 2010 ; Kaster et al., 2005). Ces résultats suggèrent un possible effet du genre et soulignent que les sulfonylurés exerceraient des effets bénéfiques sur les troubles de l'humeur en mobilisant des mécanismes différents (centraux et/ou périphériques) chez l'homme ou la femme. L'administration ICV de glibenclamide exerce également des effets bénéfiques (Kaster et al., 2005).

En accord avec ces données, il a récemment été démontré que la sécrétion d'insuline par les cellules β -pancréatiques en réponse à l'inhibition pharmacologique du canal potassique TREK-1 par la Spadine (Hivelin et al., 2016), induit des effets de type antidépresseurs chez des rats soumis aux tests de suspension caudale et de nage forcée (Mazela et al., 2010 ; Moha Ou Maati et al., 2012) et réduit l'anxiété dans le test d'alimentation supprimée par la nouveauté (Djilani et al., 2017) en conditions basales ou chez les rats préalablement soumis à un stress chronique de type UCMS (Qi et al., 2018).

2.2 Gliptines et incrétino-mimétiques

Les gliptines ont été peu étudiés vis à vis de leur effet antidépresseur potentiel. Une étude récente montre toutefois des effets de type antidépresseurs de ces agents pharmacologiques dans les tests de suspension caudale et de nage forcée chez des souris naïves mais également dans différents modèles de dépression (Kamble et al., 2016 ; Soliman et al., 2020). En revanche, les effets des agonistes directs du récepteur au GLP-1 sont beaucoup plus documentés dans la littérature notamment par l'étude de l'exenatide et du liraglutide. Si ces deux composés ne produisent pas d'effets antidépresseurs suite à leur administration unique systémique, ils exercent des effets bénéfiques suite à leur administration prolongée (Isacson et al., 2011 ; Ventorp et al., 2017 ; Anderberg et al., 2016 ; Krass et al., 2012). Le traitement chronique avec le liraglutide induit un effet anxiolytique dans le labyrinthe en croix surélevé et le test de champ ouvert chez des rats Wistar injectés avec de la STZ ou des souris C57BL/6N exposées à la corticostérone. Cependant ce phénotype est associé à un effet antidépresseur dans le test de suspension caudale et le test de nage forcée. Concernant les pistes mécanistiques, ces études montrent que le liraglutide améliore la plasticité et le voie de signalisation de mTOR au niveau de l'hippocampe (Palleria et al., 2017 ; Weina et al., 2018). Il est intéressant de noter que l'injection unique ICV ou locale d'exenatide au niveau du raphé dorsal promeut des effets anxiogéniques évalués dans le labyrinthe en croix surélevé et la boîte sombre/clair (Anderberg et al., 2016). On retrouve également une amélioration de la résignation chez le rat ayant reçu un agoniste de GLP-1, l'exendin-4, de manière chronique par voie ICV (Anderberg et al., 2016).

3. Les insulino-sensibilisateurs

3.1 Les thiazolidinediones

Le pioglitazone et le rosiglitazone ont montré des effets bénéfiques dans le test de nage forcée dans un large panel de modèles de diabète chez le rongeur comme chez des rats exposés à la combinaison HFD+STZ, des souris STZ ou db/db (Soliman et al., 2020 ; Sharma et al., 2012 ; Patel et al., 2019). Ces effets de type antidépresseurs ont également été observés chez des souris injectées avec du LPS. Dans le but de déterminer les mécanismes sous-jacents, il a été montré que la pioglitazone réduit le taux de TNF- α dans l'hippocampe et module positivement le système sérotoninergique en diminuant l'expression locale de l'indoleamine 2,3-dioxygénase (IDO), l'enzyme de la voie de dégradation du tryptophane (Li et al., 2018 ; Liao et al., 2017). Les thiazolidinediones présentent aussi des effets bénéfiques dans des

modèles rongeurs de dépression dont le modèle UCMS, l'association HFD+UCMS ou en réponse à l'injection de réserpine (Zhao et al., 2017 ; Soliman et al., 2020 ; Kurhe et al., 2016).

3.2 Les biguanides

Nous avons récemment montré au sein de notre groupe que la metformine administrée dans l'eau de boisson reverse les comportements anxio-dépressifs induit par un régime HFD chez la souris. Associé à ce phénotype expérimental, nous avons noté une augmentation de l'excitabilité des neurones sérotoninergiques du noyau du raphé dorsal et des taux extracellulaires de 5-HT dans l'hippocampe ventral (Zemdegs et al., 2019). De plus, ces effets bénéfiques de la metformine s'étendent à d'autres modèles de dépression. Par exemple, dans le modèle UCMS ou de défaite, la metformine exerce des effets de type antidépresseurs dans les tests de préférence au sucrose, de nage forcée et de suspension caudale (Fang et al., 2019 ; Du & Bu, 2020). Dans le modèle de dépression induit par le LPS, la metformine améliore également l'état de résignation dans les tests de suspension caudale et de nage forcée accompagné d'une diminution de l'expression de cytokines pro-inflammatoires (IL1- β et IL-6) dans l'amygdale (Yang et al., 2020).

4. Combinaison Antidépresseurs et Antidiabétiques

Des évidences précliniques relativement récentes montrent aussi qu'un traitement antidiabétique peut potentialiser les effets des antidépresseurs. Tout d'abord, il a été rapporté que la metformine potentialise l'effet de la fluoxétine chez des rats soumis à un stress chronique de contention et nourris avec un régime HFD dans le test d'interaction sociale (Kehdr et al., 2018). Le fait que le groupe stressé et nourri avec du régime standard ne montre pas cette potentialisation suggère un effet potentialisateur plus spécifique aux animaux présentant des troubles métaboliques associés aux comportements anxio-dépressifs. De plus, la metformine potentialise l'effet antidépresseur dans le test de préférence au sucrose après une semaine de traitement dans un modèle de stress chronique (Poggini et al., 2019). Enfin, on peut noter que l'injection ICV de glibenclamide potentialise les effets antidépresseurs de la venlafaxine dans le test de nage forcée chez la souris swiss mâle (Bortolatto et al., 2010) supposant que les effets bénéfiques des antidiabétiques oraux sur l'efficacité des antidépresseurs passent par des mécanismes centraux.

*L'ensemble des résultats présentés dans cette partie met clairement en lumière les effets bénéfiques de l'insuline et des antidiabétiques oraux sur les comportements anxio-dépressifs dans les modèles animaux. Ces données expérimentales, regroupées dans le **Tableau 3**, ont motivé la réalisation d'études cliniques visant à identifier le même type d'effet sur des cohortes de patients.*

Publication	Date	Name	Drug						Preclinical paradigm and results			
			Class	Dose	Route	Duration	Model	Tests	Main Results			
Nazari	2016	Glibenclamide	Sulfonylureas	0,3/1/3 mg/kg	IP	Once 45min before	NMRI mice	FST	3mg/kg glibenclamide reduces immobility time			
Kaster	2005	Glibenclamide	Sulfonylureas	0.0005/0,05/5 ng/site	ICV	Once	Female Swiss mice	FST	0,05 & 5 ng/site glibenclamide reduces immobility time			
Esmaeili	2018	Glibenclamide	Sulfonylureas	6 mg/kg/day	PO	20 days	B-amyloid brain injection in Wistar rats	SPT/FST/LD/EPM	antidepressant and anxiolytic (but no effect in control group)			
Soliman	2020	Glibenclamide	Sulfonylureas	5 mg/kg/day	PO	27 days	HFD Wistar rats + STZ injection	FST	glibenclamide reduces immobility time			
		Glibenclamide	Sulfonylureas	5 mg/kg/day	PO	27 days	Reserpine / Wistar rats	FST	glibenclamide reduces immobility time			
Su	2017	Glibenclamide	Sulfonylureas	10 mg/kg/day	IP	12 weeks	CUMS C57BL/6	SPT/TST/OF	glibenclamide reduces immobility time and improves anhedonia			
Ostadhadi	2017	Glibenclamide	Sulfonylureas	0,3/1/3 mg/kg	IP	Once 45min before	NMRI mice	FST	3mg/kg glibenclamide reduces immobility time			

Shakiba	2019	Glibenclamide	Sulfonylureas	0,3/1/3 mg/kg	IP	Once 45min before	Swiss mice	OF/FST/TST	3 mg/kg glibenclamide reduces immobility time in FST and TST
Bortolatto	2010	Glibenclamide	Sulfonylureas	0,5 pg/site	ICV	Once 15 min before	Male Swiss mice	OF/FST	no effect of glibenclamide but it potentiates venlafaxine subeffective dose in FST
Gainey	2016	Glibenclamide	Sulfonylureas	6.6 mg/kg	IP	Once 4h before	HFD (3 weeks exposition) C57BL/6	EZM	glibenclamide protects from HFD-induced anxiety
Moretti	2012	Glibenclamide	Sulfonylureas	0,5 pg/site	ICV	Once 15 min before	Swiss mice	TST	no effect of glibenclamide
Nikoui	2016	Glibenclamide	Sulfonylureas	1mg/kg	IP	Once 45min before	NMRI mice	FST/TST/HBT	no effect of glibenclamide (subactif)
Ahmed	2018	Sitagliptine	Gliptine	50mg/kg/day	PO	4 weeks	HFD (8weeks) C57BL/6	SPT	no effect of sitagliptine
Kamble	2016	Sitagliptine	Gliptine	6 mg/kg	IP	7 days	Male Wistar rats & Swiss mice	FST/TST	Sitagliptine reduces immobility time in TST and FST

Soliman	2020	Vildagliptin	Gliptine	10 mg/kg/day	PO	4 weeks	HFD Wistar rats + STZ injection	FST	Vildagliptin reduces immobility time
		Vildagliptin	Gliptine	10 mg/kg/day	PO	4 weeks	Reserpine / Wistar rats	FST	Vildagliptin reduces immobility time
Celikyurt	2014	Exenatide	GLP-1 Agonist	0,1 mg/kg	SC	twice daily for 2 weeks	STZ Male BALB/cByJ mice	EPM/FST	Exenatide increases the time spend in the open arms
Volke	2015	Exenatide	GLP-1 Agonist	10 ug/kg twice daily	SC	2 weeks	Male C57BL/6 mice	LD/FST	no effects
Krass	2012	Exenatide	GLP-1 Agonist	1-20 mg/kg	SC	Once 90min before	Male C57BL/6J mice	DL/FST	no effects
Weina	2018	Liraglutide	GLP-1 Agonist	5/20 nmol/kg	IP	15 days	male CORT C57BL/6N	TST/FST/OF/EPM	20 nmol/kg Liraglutide improves CORT deficits in TST/FST/OF
Palleria	2017	Liraglutide	GLP-1 Agonist	300ug/kg	SC	6 weeks	STZ Wistar rats	OF/FST/EP	Liraglutide increases immobility time in FST and center time in the OF et temps BO EPM

Krass	2012	Liraglutide	GLP-1 Agonist	200/1200 mg/kg	SC	Once 90min before	Male C57BL/6J mice	DL/FST	no effects
Sharma	2014	Liraglutide	GLP-1 Agonist	50mg/kg	IP	Once	Female Wistar rats	FST	Liraglutide decreases immobility time
Géa	2020	Exendin-4	GLP-1 Agonist	0,1/0,3/0,5 mg/kg	IP	1, 19 and 23h before FST	LPS Male Wistar rats	FST	no effect of Exendin-4
Isacson	2011	Exendin-4	GLP-1 Agonist	0,1 mg/kg	IP	Once 1h before	Male CD-1	FST	no effect
		Exendin-4	GLP-1 Agonist	0,1 mg/kg	IP	Twice daily for 1 week	Mace CD-1	FST	antidepressive (FST)
Ventorp	2017	Exendin-4	GLP-1 Agonist	0,5 mg/kg	IP	5 days	LPS Male Wistar rats	FST	Exendin-4 reduces immobility time
Anderberg	2016	Exendin-4	GLP-1 Agonist	0,1/1 mg/kg	IP	Once 20min before	Male Sprague-Dawley rats	EPM/OF	anxiogenic (EPM, OF)
		Exendin-4	GLP-1 Agonist	0,15 mg	LV	Once 20min before	Male Sprague-Dawley rats	DL/EPM/OF/FST	anxiogenic (EPM, OF,DL)

			Exendin-4	GLP-1 Agonist	0,05 mg	DR	Once 20min before	Male Sprague-Dawley rats	DL/EPM	anxiogenic (EPM,DL)
			Exendin-4	GLP-1 Agonist	0,2 mg /day	LV	9 days	Male Sprague-Dawley rats	FST/EPM	antidepressive (FST)
			GLP-1	GLP-1 Agonist	10 mg	LV	Once 20min before	Male Sprague-Dawley rats	DL/EPM/ OF/FST	anxiogenic (DL,OF)
			GLP-1	GLP-1 Agonist	2 mg	DR	Once 20min before	Male Sprague-Dawley rats	DL/EPM	anxiogenic (EPM,DL)
Ahmed	2009	Rosiglitazone	Thiazolidinedione	6/12 mg/kg	PO	5 days	Male Wistar rats	FST	antidepressant effect (6 and 12 mg/kg)	
		Rosiglitazone	Thiazolidinedione	8,5/17 mg/kg	PO	5 days	Male Swiss mice	TST	antidepressant effect (8,(and 17 mg/kg)	
Zong	2018	Rosiglitazone	Thiazolidinedione	20 mg/kg	PO	7 days	Spinal nerve transection / Sprague-Dawley rats	FST/SPT/ TST	antidepressant (FST, TST, SPT)	

Sharma	2012	Rosiglitazone	Thiazolidinedione	20 mg/kg	PO	5 weeks	Male db/db C57BL/KsJ	FST	antidepressant
Patel	2016	Rosiglitazone	Thiazolidinedione	5mg/kg	PO	21 days	Chronic unpredictable stress Male Swiss mice	FST/TST	antidepressant (FST, TST)
Zhao	2017	Rosiglitazone	Thiazolidinedione	5mg/kg	IP	6 weeks	Chronis unpredictable stress Male C57BL/6	FST/SPT/OF	antidepressant (TST, SPT); anxiolytic (OF)
Guo	2016	Rosiglitazone	Thiazolidinedione	10 mg/kg	IP	3 times/24H	C57BL/6J	FST/EPM/NSF	anxiolytic (EPM), antidepressant (FST,NSF)
Patel	2018	Rosiglitazone	Thiazolidinedione	5mg/kg	PO	8 weeks	STZ Male swiss mice	FST/TST/EPM/SPT	antidepressant (FST, TST, SPT) anxiolytic (EPM)
Zhao	2016	Pioglitazone	Thiazolidinedione	2,5/5/10/20 mg/kg	PO	3 weeks	Chronic unpredictable stress Male C57BL/6	TST/FST/SPT	2,5/5mg/kg antidepressant (FST, TST, SPT)
Li	2018	Pioglitazone	Thiazolidinedione	20 mg/kg	PO	Once 2h before	LPS C57BL/6	FST/SPT	antidepressant (FST,SPT)
Salchi-Sadaghiani	2011	Pioglitazone	Thiazolidinedione	5/10/20 mg/kg	PO	once 4h before	Male Naval Medical Research Institute mice	FST	20 mg/kg antidepressant (FST)

Murad	2015	Pioglitazone	Thiazolidinedione	20 mg/kg	PO	7 days (post op)	Chronic constriction injury / Male Sprague-Dawley rats	FST	antidepressant
Shahsavarian	2014	Pioglitazone	Thiazolidinedione	5/10/20 mg/kg	PO	once 4h before	Male NMRI mice	FST	10/20 mg/kg antidepressant
Liao	2017	Pioglitazone	Thiazolidinedione	20 mg/kg	PO	Once	LPS Male C57BL/6J	SPT/FST/OF	antidepressant (FST,SPT) anxiolytic (OF)
Li	2016	Pioglitazone	Thiazolidinedione	10 mg/kg	PO	20 days	Chronic costicostrone / Male ICR mice	FST/SPT	no effect
Garg	2017	Pioglitazone	Thiazolidinedione	4,5/9 mg/kg	IP	28 days	Chronic constriction injury / Wistar Rats	FST	antidepressant
Soliman	2020	Pioglitazone	Thiazolidinedione	10 mg/kg/day	PO	27 days	HFD Wistar rats + STZ injection	FST	Vildagliptin reduces immobility time
Soliman	2020	Pioglitazone	Thiazolidinedione	10 mg/kg	PO	4 weeks	Reserpine / Wistar rats	FST	antidepressant
Qin	2020	Pioglitazone	Thiazolidinedione	30 mg/kg	PO	2 weeks	UCMS and UCMS Male ob/ob mice	SPT/TST	antidepressant (TST, SPT)

Kurhe & Mahesh	2016	Pioglitazone	Thiazolidinedione	30	PO	2 weeks	HFD+UCMS Male Swiss mice	TST/FST/EPM	no antidepressant and anxiolytic effects on control group / antidepressant and anxiolytic effect on others
Soliman	2020	Metformin	Biguanides	100 mg/kg	PO	4 weeks	Reserpine / Wistar rats	FST	antidepressant
		Metformin	Biguanides	100 mg/kg	PO	4 weeks	HFD Wistar rats + STZ injection	FST	antidepressant
Wang	2019	Metformin	Biguanides	200 mg/kg	IP ?	7 days	Spatial Restraint stress Institute of Cancer Research male mice	TST/FST	antidepressant
Liu	2019	Metformin	Biguanides	5mg/mL	drinking water	5 weeks	Male C56BL/6	SPT/FST/OF	antidepressant (SPT) anxiolytic (OF)
Zemdegs	2019	Metformin	Biguanides	300mg/kg	drinking water	4 weeks	HFD C57/B6J	EPM/NSF/TST	anxiolytic and antidepressant
Fang	2019	Metformin	Biguanides	200 mg/kg	PO	21 days	Social Defeat stress Male C57BL/6 mice	SI/SPT/FST/TST	antidepressant

Murad	2015	Metformin	Biguanides	50 mg/kg	PO	7 days (post op)	Chronic constriction injury / Male Sprague-Dawley rats	FST	no effect
Du & Bu	2020	Metformin	Biguanides	200 mg/kg	IP	4 weeks	Chronic mild stress mice	SPT/TST/ FST	antidepressant
Ai	2019	Metformin	Biguanides	10/50/100/200 mg/kg	IP	Once 60min before	male C56BL/6	TST/FST	50/100/200 mg/kg antidepressant effect
		Metformin	Biguanides	50 mg/kg	IP	Once 60min before	chronic restraint stress male C56BL/6	TST/FST/ SPT	antidepressant
Yang	2020	Metformin	Biguanides	200 mg/kg	IP	7 days	LPS male C57/B6	FST/TST	antidepressant
Magdy	2017	Metformin	Biguanides	30 mg/kg	PO	4 weeks	HFD+CRS Wistar rats	FST/OF/SI	antidepressant and anxiolytic effects
Shivavedi	2017	Metformin	Biguanides	25 mg/kg	PO	11 days	STZ+Foot shocks rats	FST	antidepressant
Fan	2018	Metformin	Biguanides	100 mg/kg	IP	Once 30min before	Male Sprague Dawley rats	OF/EPM	anxiolytic effect

Poggini	2019	Metformin	Biguanides	200 mg/kg	drinking water	4 weeks	UCMS male C57BL/6	SPT	metformin potentialize fluoxetine antidepressant effect
Gupta	2014	Insulin	Insulin	1/2 UI/kg	IP	2 weeks	STZ Swiss mice	FST/TST	antidepressant
Sestile	2016	Insulin	Insulin	1/2 UI/kg	IP	21 days	STZ Wistar rats	FST	antidepressant

Tableau 3. Synthèse des effets antidépresseurs de l'insuline et des antidiabétiques oraux.

B. Etudes Cliniques :

De la même façon, il existe des preuves cliniques de l'effet antidépresseur des antidiabétiques mais cela reste encore peu documenté.

1. L'insuline

Concernant l'insuline, deux études ont étudié l'effet de son injection sous-cutané chez des patients atteints de DT2. La première rapporte des effets bénéfiques de l'insuline sur l'humeur comparés à des patients traités avec une combinaison de gliclazide, metformine et acarbose (Reza et al., 2002). La seconde ne montre que de faibles améliorations (Hendra et al., 2004). Cependant, d'autres études se sont intéressées à l'injection intranasale d'insuline (IN) afin de limiter les effets hypoglycémiantes périphériques et de cibler plus efficacement le cerveau. Des effets bénéfiques de l'insuline IN ont pu être mesurés sur l'extroversion, la confiance en soi et le bien-être chez des patients ne souffrant d'aucune pathologie chronique (Benedict et al., 2004). Par contre aucune amélioration n'a pu être mise en évidence chez des patients dépressifs ayant reçu l'insuline IN notamment ceux résistants aux traitements pharmacologiques (Cha et al., 2017).

2. Les insulino-sensibilisateurs

Outre l'insuline, les antidiabétiques oraux sont les molécules les plus testées pour leurs potentiels effets antidépresseurs et notamment les insulino-sensibilisateurs. Dans un contexte de syndrome métabolique, il a été montré que la pioglitazone, améliore les scores de dépression sans toutefois montrer de corrélation avec des modifications de l'insulino-résistance (Roohafza et al., 2014). Cette même molécule a également des effets bénéfiques chez des patients atteints de troubles métaboliques (obésité abdominale, syndrome métabolique, insulino-résistance et DT2) associés à des troubles de l'humeur allant de la dépression modérée à sévère ou de troubles bipolaires (Kemp et al., 2012 ; Hu et al., 2015 ; Kemp et al., 2014). L'une de ces études corrèle même la diminution de l'insulino-résistance avec l'amélioration de la sévérité de la dépression (Kemp et al., 2012). De plus, la pioglitazone ainsi que le rosiglitazone montrent des effets positifs sur l'humeur chez des patients atteints de dépression sans troubles métaboliques (Rasgon et al., 2010 ; Sepanjnia et al., 2012 ; Lin et al., 2015). Alors que ces dernières études ne révèlent pas de corrélations entre des variables endocrines et l'amélioration des scores de dépression (Rasgon et al., 2010), une autre rapporte une corrélation positive entre l'amélioration

des scores de dépression et celle de la régulation du glucose lors d'une OGTT réalisée chez des patients insulino-résistants (Lin et al., 2015).

Concernant la metformine, elle a également fait l'objet de quelques études cliniques au regard de son potentiel effet antidépresseur. Dans un contexte de perturbations métaboliques, des patients présentant une mauvaise tolérance au glucose, un pré-diabète, ou un DT2 avéré montrent une amélioration des scores de dépression en réponse à cet antidiabétique (Ackermann et al., 2009 ; Krysiak et al., 2017). Des résultats similaires ont également été rapportés chez des patients souffrant de DT2 et de dépression avec une corrélation entre l'amélioration des scores de dépression et le niveau de HbA1c (Guo et al., 2014).

3. Les insulino-sécréteurs

Dans le cas des insulino-sécréteurs, peu d'études rapportent leur potentiel antidépresseur chez l'humain. Une étude focalisée sur l'administration de liraglutide chez des patients atteints de DT2 et traités à l'insuline, ne montre pas d'amélioration des symptômes dépressifs (De Wit et al., 2014). En revanche un travail étudiant l'effet du liraglutide chez des patients dépressifs sans troubles métaboliques montre une amélioration des capacités cognitives (Mansur et al., 2016). Quant à l'exenatide, un autre agoniste GLP-1, cet agent pharmacologique a montré sa capacité à améliorer les scores de dépression chez des patients atteints de DT2 (Grant et al., 2011). Une étude pilote très récente a investigué l'impact de la sitagliptine, un inhibiteur DPP-4, sur les comportements anxio-dépressifs de patients souffrant de DT2 mais n'a pas réussi à mettre en évidence d'amélioration supérieure à l'effet placebo (Moulton et al., 2021).

La résistance à l'insuline est présente aussi bien en périphérie qu'au niveau du système nerveux central où son impact est encore peu documenté. Des preuves ont vu le jour concernant l'implication de l'insulino-résistance dans les troubles de l'humeur et plus particulièrement son impact sur le système dopaminergique. Il a même été démontré que les antidiabétiques basés sur l'amélioration de la signalisation de l'insuline améliorent les comportements anxio-dépressifs en pré-clinique. Cependant, l'insulino-résistance est un phénomène complexe régulé par de très nombreux facteurs qu'il est nécessaire de mieux comprendre afin d'envisager de nouvelles stratégies thérapeutiques pour la dépression.

PARTIE 4 :

**L'APELINE, UNE ADIPOKINE AUX EFFETS
ANTIDÉPRESSEURS À L'INTERFACE
DIABETE-DÉPRESSION ?**

I. Le système apelinergique

A. L'apeline et son récepteur APJ

L'apeline est un peptide découvert en 1998 par Tatemoto (Tatemoto et al., 1998) qui se fixe à son récepteur « orphelin » APJ découvert 5 ans plus tôt (O'Dowd et al., 1993). Son gène est localisé sur le chromosome X et code pour un pré-pro-peptide de 77AA dont la séquence est fortement conservée entre les espèces (Lee et al., 2000). Ce pré-pro-peptide, aussi appelé pré-pro-apeline, est clivé en plusieurs étapes pour donner l'apeline. Pour cela, des endopeptidases vont d'abord couper ce pré-pro-peptide pour former un peptide de 55AA. Ensuite, une série de clivages enzymatiques de la partie C-terminale s'enchaîne pour générer plusieurs formes d'apeline : l'apeline 36, 17, 13 et 13 pyroglutaminée (plus stable grâce au résidu glutamate) (Tatemoto et al., 1998). Toutes ces formes sont capables de se lier et d'activer le récepteur APJ. En revanche l'expression des différentes formes varient selon les organes. Ainsi il a pu être montré que l'apeline 36 était majoritaire dans les poumons, les testicules et l'utérus chez le rat (Kawamata et al., 2001) (Figure 20). Au niveau plasmatique, les deux formes les plus retrouvées sont l'apeline 17 et l'apeline 13 pyroglutaminée (Zhen et al., 2013 ; Azizi et al., 2008 ; De Mota et al., 2004). L'apeline est également très largement exprimée au niveau central puisqu'elle est retrouvée dans de nombreuses structures comme l'hypothalamus, l'hippocampe, le striatum, la substance noire, l'amygdale, le cortex, le cervelet et le noyau du raphé dorsal (Medhurst et al., 2003 ; Reaux et al., 2001 ; O'Carroll et al., 2000, De Mota et al., 2000).

Concernant APJ, ce récepteur est couplé à différentes protéine G présentant environ 30% d'homologie avec le récepteur à l'angiotensine II (De Mota et al., 2000 ; O'Dowd et al., 1993). Cependant le récepteur APJ ne lie pas l'angiotensine II mais il peut inhiber sa signalisation par hétéro-dimérisation avec ce dernier (Siddiquee et al., 2013). Au niveau périphérique, APJ est exprimé dans les poumons, le cœur, la thyroïde, le tissu adipeux et dans une moindre mesure dans les reins, l'intestin, le pancréas, la rate, le muscle squelettique et le foie (Medhurst et al., 2003, Hosoya et al., 2000). Au niveau central, sa distribution coïncide avec celle de l'apeline décrite ci-dessus.

De manière intéressante, un nouveau ligand d'APJ a récemment été découvert. Elabela, encore appelé Toddler ou Apela (Chng et al., 2013 ; Pauli et al., 2014) agit sur le développement embryonnaire, cardiaque, le déplacement cellulaire, le renouvellement des cellules souches et possède également des fonctions sur l'organisme adulte dont la modulation de l'activité cardiaque et vasculaire (Xu et al., 2018 ; Shin et al., 2017).

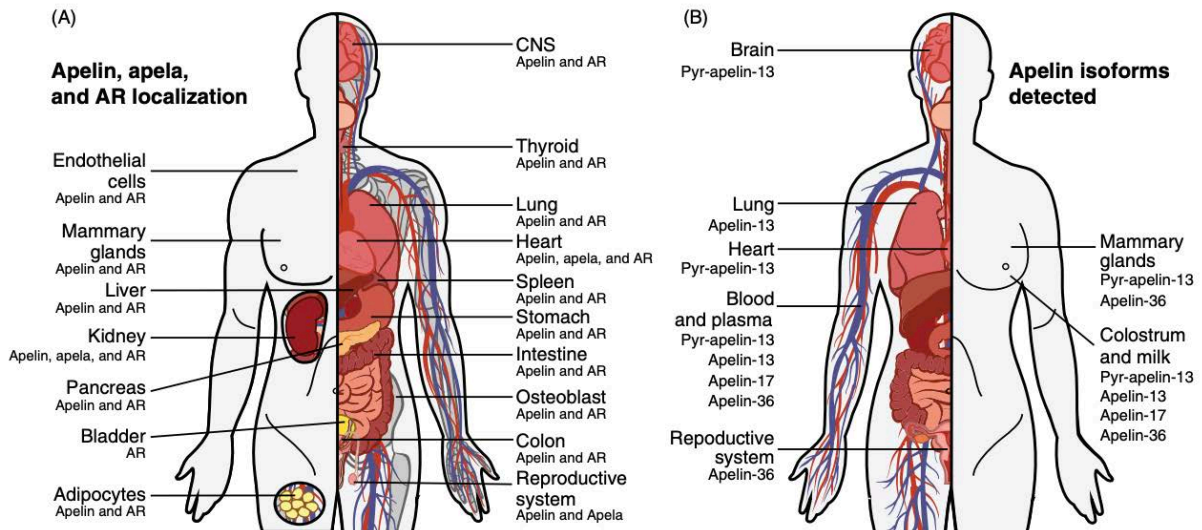


Figure 20. Expression du système apelinergique. D'après Shin et al., 2017. (A) Localisation de l'apeline, apela et du récepteur à l'apeline ici abrégé AR. (B) Formes prédominantes de l'apeline dans des organes spécifiques.

B. Production d'apeline

L'apeline est sécrétée par de nombreux organes périphériques comme le tissu adipeux, les muscles squelettiques, le cœur ou encore les cellules endothéliales (Ronkainen et al., 2007 ; Vinel et al., 2018 ; Boucher et al., 2005 ; Kleinz et al., 2005). Sa sécrétion est directement régulée par l'insuline qui va stimuler sa production au niveau des adipocytes murins et humains (Boucher et al., 2005 ; Dray et al., 2010 ; Glassford et al., 2007 ; Wei et al., 2005). Chez la souris, il a été montré que des adipocytes isolés de souris traitées à la STZ présentent des taux moins élevés d'apeline (Boucher et al., 2005). Dans cette même étude, les auteurs montrent également que les taux plasmatiques d'apeline sont plus élevés chez les patients obèses. D'autre part, l'apelinémie corrèle positivement avec l'insulinémie mais également la glycémie et les taux d'HbA1C suggérant clairement un rôle de cette hormone dans le DT2 (Dray et al., 2010). Au vu de son rôle dans l'inflammation (que l'on développera plus tard), la production d'apeline est également régulée par de nombreuses cytokines inflammatoires comme le TNF- α , l'IL-6 ou l'INF- γ (Han et al., 2008 ; Daviaud et al., 2006).

C. Signalisation de l'apeline

Comme mentionné précédemment, APJ est un RCPG couplé à plusieurs types de protéines G. Son activation peut être accompagnée de l'activation d'une protéine Gi entraînant la diminution d'APMc cellulaire comme démontré par l'inhibition de la voie de signalisation

en présence de toxine pertussique, inhibiteur de la protéine Gi/o (Hosoya et al., 2000 ; Masri et al., 2002) (Figure 21). Cela permet donc l'inhibition de la voie de la PKA connue pour augmenter la dégradation du glycogène tout en inhibant la synthèse de glycogène et la synthèse lipidique (Sassone-Corsi, 2012). Il a également été montré que le récepteur APJ pouvait être couplé à une protéine Gq ou Gα13 selon le type cellulaire (Kang et al., 2013 ; Yue et al., 2011). En aval des protéines G, ce récepteur peut activer différentes voies cellulaires comme la voie PI3K/Akt, la voie des MAPK notamment dans les adipocytes (Than et al., 2012), les myocytes (Dray et al., 2008), les cellules endothéliales (Berta et al., 2014 ; Masri et al., 2006) et les neurones (O'Donnell et al., 2007 ; Yang et al., 2014). La voie de l'AMPK est aussi sollicitée permettant la régulation du métabolisme énergétique. Enfin, la signalisation de l'apeline entraîne l'activation de la voie de eNOS (endothelial nitric oxygen synthase) induisant la production de NO impliqué dans de nombreuses fonctions (Duparc et al., 2011).

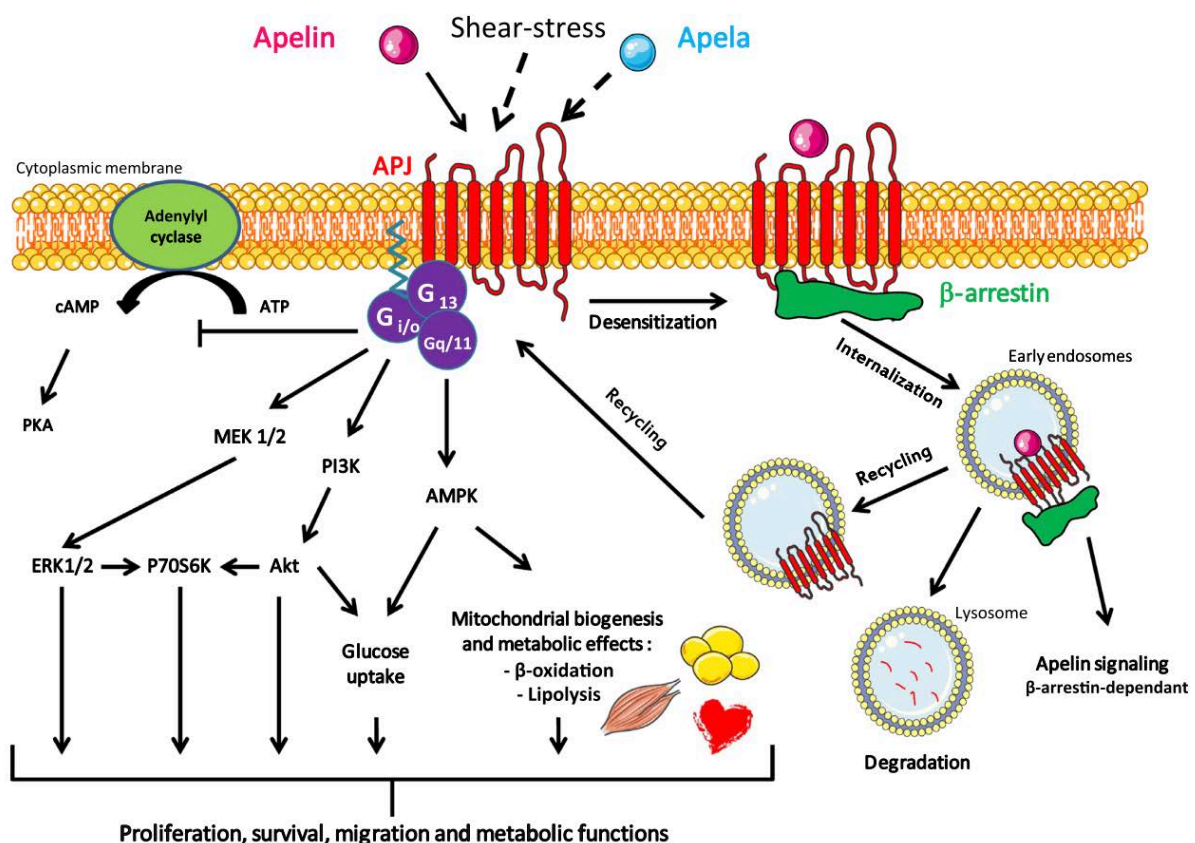


Figure 21. Schéma de la signalisation de l'apeline et son récepteur APJ. D'après Chaves-Almagro et al., 2015.

II. Rôles physiologiques de l'apeline

A. Rôles de l'apeline en périphérie

Les effets métaboliques de l'apeline passent par l'activation des voies mentionnées dans le chapitre précédent. En effet, l'apeline augmente le transport du glucose du lumen vers la circulation sanguine au niveau de la barrière intestinale en promouvant la phosphorylation de l'APMK et en augmentant l'expression de GLUT2 à la membrane des cellules épithéliales intestinales (Dray et al., 2013). Elle augmente l'entrée mais aussi l'utilisation du glucose basal au niveau du muscle squelettique grâce à l'activation de la voie PI3K/Akt et de eNOS, (Dray et al., 2008, Yue et al., 2011) et des adipocytes en activant la voie AMPK (Attane et al., 2011) permettant la diminution de la glycémie et une meilleure tolérance au glucose chez des souris normales ou obèses et insulino-résistantes (Dray et al., 2008). De manière intéressante, ces effets sont accompagnés d'une réduction de la sécrétion d'insuline. En effet l'apeline régule négativement la sécrétion d'insuline en agissant via le récepteur APJ exprimé au niveau pancréatique induisant la dégradation de l'AMPc (Sorhede Winzell et al., 2005 ; Ringstrom et al., 2010 ; Guo et al., 2009). Cependant, des souris knock-out pour l'apeline présentent une insulino-résistance, une hyperinsulinémie et une diminution du transport du glucose dans les muscles squelettiques (Yue et al., 2010).

Concernant les effets de l'apeline sur le tissu adipeux, elle inhibe l'adipogenèse (de manière MAPK/ERK dépendante) et la lipolyse (de manière AMPK dépendante) (Than et al., 2012), et promeut le brunissement adipocytaire en augmentant l'expression de marqueurs spécifiques de celui-ci comme UCP1 (Than et al., 2015). Comme sur le muscle, l'apeline stimule l'entrée de glucose dans les adipocytes et augmente la translocation de GLUT4 au niveau membranaire et améliore la sensibilité à l'insuline (Attané et al., 2011 ; Zhu et al., 2011). Chez l'humain, il a été montré que les taux d'apeline circulants sont plus élevés chez les patients souffrant de DT1 et DT2 et que cette augmentation en apeline était associée à de meilleure capacité de régulation de la glycémie (Habchi et al., 2014, Dray et al., 2010). Par la suite, l'effet bénéfique de l'apeline sur la sensibilité à l'insuline suite à son administration unique a pu être appréhendé chez des sujets en surpoids au cours d'un clamp euglycémique-hyperinsulinémique (Gourdy et al., 2017). En revanche, l'effet à long terme de l'apeline reste peu investigué chez des patients atteints de DT2. Cependant, des preuves cliniques montrent que les stratégies thérapeutiques chroniques actuelles, qu'elles soient médicamenteuses ou basées sur l'activité

physique, augmentent les taux plasmatiques d'apeline suggérant un effet bénéfique à long terme de cette hormone (Kadaglou et al., 2010 ; 2012).

B. Rôles de l'apeline en central

Comme évoqué au début de cette Partie 4, l'apeline ainsi que son récepteur APJ sont très largement exprimés dans le cerveau. En comparaison aux autres régions cérébrales, le récepteur APJ est plus dense au niveau de l'hypothalamus, notamment dans les noyaux supra-optique et paraventriculaires mais aussi au niveau de l'épiphyse et l'hypophyse. L'apeline a même été identifiée par immunohistochimie à l'intérieur des neurones des noyaux hypothalamiques pouvant suggérer un potentiel rôle de neurotransmetteur (Reaux et al., 2001). Le récepteur APJ est également retrouvé, mais dans une moindre mesure, dans d'autres structures cérébrales dont la substance noire, le cortex entorhinal, l'hippocampe et même le DRN (De Mota et al., 2000). Outre la présence du système apelinergique au sein même du système nerveux central, il a été montré que l'apeline franchit la BHE et participe également à son intégrité (Chu et al., 2017 ; Higuchi et al., 2007 ; Sinen and BülBül, 2020). L'apeline peut donc provenir à la fois de la périphérie et du cerveau pour exercer ses effets centraux.

1. Métabolisme énergétique

Jusqu'à présent, le rôle le plus étudié de l'apeline au niveau du système nerveux central est son implication dans la modulation du métabolisme énergétique et notamment la prise alimentaire et le métabolisme glucidique. En effet, l'apeline est exprimée au niveau des neurones POMC et il a été montré qu'elle peut dépolariser ces cellules et ainsi engendrer la libération du neuropeptide anorexigène α -MSH (Reaux-Le Goazigo et al., 2011 ; Lee et al., 2015). Cependant la littérature n'est pas si tranchée vis à vis des effets de l'apeline sur la prise alimentaire puisque les études rapportent des effets contradictoires. Par exemple, l'injection ICV d'apeline chez le rat nourri avec un régime standard diminue la prise alimentaire et de boisson mais n'exerce aucun effet suite à un régime HFD (Clarke et al., 2009). Cela semble cohérent avec le fait que l'on retrouve une diminution d'expression du récepteur AJP dans l'hypothalamus des rats exposée à un régime HFD (Clarke et al., 2009). En revanche, aucun effet sur la prise alimentaire n'a été constaté chez des souris knock-out pour l'apeline (Sawane et al., 2013).

Dans la même idée, des études montrent que l'injection ICV d'une faible dose d'apeline chez la souris diminue la glycémie alors qu'une forte dose (équivalent à un taux d'apeline de souris diabétiques) entraîne une hyperglycémie et une hyperinsulinémie à jeun en augmentant la production de glucose par le foie (Duparc et al., 2011, Drougard et al., 2014). De manière intéressante, l'effet bénéfique de la faible dose est perdu chez des souris HFD (Duparc et al., 2011) suggérant encore une fois des effets dépendants du statut métabolique.

Les effets centraux de l'apeline sur le métabolisme énergétique sont indéniables et relativement bien élucidés. Nous allons maintenant voir que l'apeline possède d'autres effets centraux qui attisent la curiosité des neuroscientifiques depuis ces dix dernières années.

2. Apeline et mémoire

De par son expression hippocampique, l'apeline a suscité l'intérêt des neurobiologistes sur ses effets potentiels dans les processus mnésiques. Son impact positif dans différents modèles de troubles de la mémoire a pu être rapporté au cours de ces dernières années. Dans un modèle de maladie d'Alzheimer induite par l'injection ICV de STZ, un traitement chronique avec l'apeline améliore les performances mnésiques de souris dans le test de la piscine de Morris (Nasseri et al., 2020). Cet effet pro-mnésique de l'apeline dans ce modèle passerait, du moins en partie, par l'activation de la signalisation du BDNF et du récepteur TrkB (Luo et al., 2019). Les mêmes effets bénéfiques ont été rapportés dans le test de reconnaissance d'objet et celui du labyrinthe en Y à la fois dans un modèle de défaite sociale chez le rat (Tian et al., 2018) mais également dans un modèle combinant un stress d'immersion et de contrainte via l'augmentation de l'expression de BDNF (Shen et al., 2019). Le même type d'effet bénéfique a été observé dans le test de reconnaissance d'objet et de piscine de Morris chez des rats modèles de la maladie de Parkinson lié à la destruction des neurones dopaminergiques (Haghparast et al., 2018). En revanche, il est important de noter que les études ayant testé l'effet de l'apeline chez des souris naïves ne présentant pas de troubles de mémoire, aucun effet bénéfique n'a été révélé.

Les hypothèses des mécanismes pouvant sous-tendre ces effets sont nombreuses notamment l'impact sur le métabolisme du peptide A β , l'état d'oxydation des cellules, l'activité mitochondriale, l'inflammation ou encore la mort neuronale.

Tout d'abord, de part son impact sur l'activité de la eNOS, il a été proposé que l'apeline pourrait augmenter production de NO (Tatemoto et al., 2001 ; Zhong et al., 2007) permettant la sécrétion d'ACh (acétylcholine) connue pour son effet promnésique (Prast and Philippu, 2001) mais aussi son rôle dans la clairance du peptide A β (Austin et al., 2013 and 2011).

Toujours par le biais de cette augmentation de NO, l'apeline pourrait augmenter la biogénèse mitochondriale (Nisoli et al., 2004) et ainsi rendre compte de ses propriétés antioxydantes. Il a ainsi été proposé que l'apeline améliorerait les fonctions mitochondriales en diminuant la production de ROS dans le cerveau (Zeng et al., 2010) possiblement via l'activité de la CAT (catalase), SOD (superoxyde dismutase) et GSH-Px (glutathione peroxidase), des enzymes réduisant la formation de radicaux libres, comme démontré dans le cœur (Than et al., 2014).

L'apeline permet aussi la protection neuronale grâce à l'activation des voies de signalisation impliquées dans la survie cellulaire (IP3, PKC, MEK, ERK et PKB) mais également en inhibant l'excitotoxicité en diminuant l'activité NMDA (Cook et al., 2011 ; O'Donnell et al., 2007). Dans cette même idée de neuroprotection, l'apeline agit comme un facteur anti-apoptotique suite à l'administration de Pentylentetrazole ou de corticostérone in vitro ou même dans un modèle d'ischémie/reperfusion chez le rat (Yan et al., 2015 ; Zou et al., 2016). Dans ce même modèle, l'apeline réduit l'inflammation en diminuant l'expression de cytokines inflammatoires comme IL1B et TNF- α pour les plus connues (Xin et al., 2016).

Cette sous-partie illustre l'engouement porté pour le système apelinergique au cours de ces dix dernières années dans le domaine de la mémoire ainsi que la diversité des systèmes qu'elle peut impacter en lien avec la maladie d'Alzheimer. Nous allons maintenant aborder l'impact de l'apeline sur les comportements anxio-dépressifs qui sont bien moins documentés.

3. Apeline et comportements anxio-dépressifs

L'une des premières études s'intéressant à l'impact de l'apeline sur les comportements anxio-dépressifs a mis en évidence un effet pro-dépresseur de celle-ci. En effet les souris ayant reçu une injection ICV d'apeline montrent une augmentation de la résignation reflétée par le temps d'immobilité dans les tests de nage forcée et de suspension caudale (Lv et al., 2012). Ces résultats sont cohérents avec l'augmentation plasmatique d'ACTH et de corticostérone induite par l'injection ICV d'apeline rapportée 10 ans plus tôt (Taheri et al., 2002). Cependant seuls ces deux articles sont en accord avec un effet pro-dépresseur du système apelinergique dans le modèle rongeur. En effet, la littérature plus récente contient exclusivement des travaux mettant en lumière des effets anxiolytiques et/ou antidépresseurs de l'apeline. Par exemple, suite à l'injection ICV d'apeline, une amélioration de la résignation a été rapportée dans différents modèles murins de dépression tels que celui de défaite sociale (Tian et al. 2018, Xiao et al., 2018), de nage forcée répétée (Dai et al., 2018), des chocs électriques (Li et al., 2016), de LPS ou encore d'UCMS (Zhang et al., 2019). Il a également été retrouvé une diminution de l'anhédonie dans le test de de préférence au sucrose associé à une diminution de l'hyperactivité de l'axe HPA (Dai et al., 2018, Zhang et al., 2019). Enfin, dans un modèle de souris anxieuse induite par une hypoxie chronique, l'injection ICV d'apeline améliore l'anxiété mesurée dans les tests d'EPM et de D/L (Fan et al., 2018).

L'ensemble de ces résultats semblent converger vers l'hypothèse d'un effet antidépresseur et anxiolytique de l'apeline. De manière remarquable, ces données font écho à certaines études cliniques qui mettent en évidence l'existence de polymorphismes de l'apeline (ou de son récepteur) associés à une diminution de leur expression et à un risque plus élevé de développer des troubles anxio/dépressifs (Wang et al., 2020 ; Mishra et al., 2015). Une étude clinique portant sur une cohorte d'une quarantaine de patients montre que les patients dépressifs ont des taux plasmatiques d'apeline plus élevés que les patients non-dépressifs (Gok Oguz et al., 2016).

Cependant l'ensemble de ces études restent très descriptives et aucun lien avec un système de neurotransmetteur n'a été démontré. C'est pourquoi, au regard de l'implication de l'apeline dans l'insulino-sensibilité, le métabolisme glucidique et à plus large échelle dans la physiopathologie du diabète, nous avons envisagé que cette hormone pouvait participer à la comorbidité entre le diabète et la DM.

L'apeline est une adipokine majoritairement sécrétée par le tissu adipeux mais est très largement exprimée, ainsi que son récepteur APJ, dans l'ensemble de l'organisme. Son implication dans l'absorption et l'utilisation du glucose au sein de nombreux organes en fait un élément majeur dans la régulation du métabolisme glucidique. Bien que le système apelinergique soit extensivement exprimé au niveau central, son impact sur le cerveau est encore peu documenté. Cependant, des données récentes suggèrent que l'apeline pourrait être impliquée dans les processus de mémoire et dans la régulation de l'humeur, faisant d'elle un élément à l'interface entre le métabolisme glucidique et les fonctions cognitives et émotionnelles.

OBJECTIFS DES TRAVAUX DE THÈSE

La connaissance du rôle de l'insuline dans le système nerveux central s'est longtemps limitée aux effets sur le métabolisme énergétique. Cependant des preuves naissantes concernant l'impact potentiel de cette hormone sur les fonctions cognitives et les troubles de l'humeur occupent une place de plus en plus importante dans la littérature. Ces avancées dans la compréhension des mécanismes d'action de l'insuline dans le cerveau permettent de mieux saisir les liens entre certaines pathologies métaboliques notamment le diabète avec la maladie d'Alzheimer ou la DM. C'est ainsi qu'est née la notion de « *diabète du cerveau* » qui pourrait découler sur l'identification de nouvelles stratégies thérapeutiques préventives ou curatives ayant pour cible l'insulino-sensibilité centrale. En effet, l'insulino-résistance centrale pourrait être la pierre angulaire des comorbidités entre troubles métaboliques et psychiatriques tandis que l'amélioration de la signalisation de l'insuline, une piste innovante pour promouvoir des effets anxiolytiques/antidépresseurs.

Au cours de cette thèse, nous avons donc étudié l'impact de l'insuline sur le système sérotoninergique, un des acteurs clés de la régulation des comportements anxio-dépressifs et de la réponse aux antidépresseurs.

Ces travaux se sont alors articulés autour de 3 grandes questions donnant lieu aux 3 chapitres de la partie « Résultats » de ce manuscrit :

I. Quels sont les effets centraux de l'insuline sur le système sérotoninergique et les comportements anxio-dépressifs associés dans un contexte physiologique ?

Au cours de ce premier axe de recherche, nous avons cherché à identifier, dans un contexte physiologique, la présence du récepteur à l'insuline sur les neurones sérotoninergiques et la conséquence de son activation par *l'insuline* sur *l'activité fonctionnelle* de ce système et le *comportement de type anxio-dépressif* des souris. Pour cela, nous avons mis en place des études *d'électrophysiologie in- et ex-vivo* et de *microdialyse intracérébrale chez la souris éveillée libre de ses mouvements*. Nous avons également réalisé différents tests comportementaux suite à l'administration *intra-nasale* ou *intra-raphé* d'insuline afin de cibler/moduler la zone d'intérêt.

Ce premier objectif permet d'ores et déjà d'obtenir des réponses relativement claires concernant l'implication de l'insuline dans la régulation des comportements anxio-dépressifs via la modulation du système sérotoninergique.

Ce travail nous a ensuite conduit à appréhender le lien entre la signalisation de l'insuline et le système sérotoninergique dans des conditions pathologiques d'insulinopénie ou d'insulino-résistance. Ceci représente le deuxième volet de ma thèse répondant à la question suivante :

II. Quel est l'impact d'une modulation négative de la signalisation de l'insuline sur le système sérotoninergique et les comportements associés :

- i. Dans un modèle de souris de DT1 recevant la streptozotocine (STZ) ?**
- ii. Dans un modèle de souris de DT2 combinant des facteurs de risque génétiques (système apelinergique) et environnementaux (alimentation hyper-lipidique) ?**

Au cours de ce second axe, nous avons tout d'abord utilisé le modèle STZ afin d'étudier l'impact d'une réduction de la quantité et donc de la signalisation de l'insuline, sur l'activité électrique des neurones sérotoninergiques ainsi que les répercussions comportementales éventuelles.

Nous avons ensuite utilisé un modèle de souris génétiquement modifiées privées de l'apeline ou de son récepteur qui ont été nourries avec un régime standard ou hyper-lipidique (HFD).

L'apeline, majoritairement sécrétée par le tissu adipeux exerçant un effet bénéfique sur la sensibilité à l'insuline, nous avons ainsi créé un modèle d'insulino-résistance marquée reposant sur la combinaison de facteurs de risques génétiques et environnementaux du DT2. Ce modèle nous est apparu pertinent au regard de l'aspect multifactoriel qui caractérise ce trouble métabolique. Sachant que les patients obèses sont plus aptes à développer du diabète et/ou un épisode dépressif, l'apeline pourrait représenter une piste intéressante pour ces troubles ou leur comorbidité.

Au cours de cette étude, nous nous sommes donc intéressés à la modulation du système sérotoninergique et au phénotype anxio-dépressif dans ces deux modèles.

Enfin, dans le but d'apporter un élément de preuve concernant le lien causal entre la signalisation de l'insuline, l'activité du système sérotoninergique et la régulation des comportements anxio-dépressifs, nous avons tenté de répondre à une troisième question :

III. Est-ce que la Metformine, un agent insulino-sensibilisateur, permet d'améliorer les altérations comportementales dans ces différents modèles ?

Dans cette dernière partie, nous avons étudié les effets métaboliques et comportementaux de l'administration systémique de la metformine, dans les deux modèles expérimentaux de comorbidité diabète-dépression. Notre hypothèse est que si l'amélioration de l'insulino-résistance périphérique dans ces deux modèles s'accompagnent d'une correction du phénotype anxio-dépressif alors ce processus est bien un élément clé de la comorbidité entre les troubles métaboliques et psychiatriques.

Il est important de noter que lors d'un travail (dont je suis co-auteur) et ayant motivé cette thèse, nous avons étudié les effets de la metformine sur le système sérotoninergique et montré que cet agent pharmacologique augmentait l'activité du circuit DRN→hippocampe (Zemdegs et al., 2019).

Pour finir, il est important de souligner que ma thèse s'inscrit dans le cadre d'un travail collaboratif mobilisant différents laboratoires nationaux et internationaux spécialisés dans le domaine du métabolisme et/ou des neurosciences et de la neuropharmacologie. Je tiens ici à remercier chaleureusement ces collaborateurs qui nous ont permis de confirmer ou de compléter certaines données expérimentales :

- l'Unité Mixte de Recherche 1286 INRAE (Xavier Fioramonti) de Bordeaux,
- l'Unité Mixte de Recherche 1301-Inserm 5070-CNRS (Philippe Valet) de Toulouse,
- l'Université Fédérale de Santa Catarina (Eduado Moreira) de Florianópolis (Brésil),

Les données issues de cette thèse s'inscrivent dans la thématique générale de Recherche réalisée au sein de l'équipe REMEMBER du CRCA, visant à préciser les mécanismes neurobiologiques sous-tendant les effets comportementaux de différentes stratégies pharmacologiques susceptibles d'améliorer la prise en charge de patients souffrant de déclin cognitif et/ou de troubles de l'humeur.

MATERIELS ET METHODES

Cette section contient le descriptif des expérimentations réalisées par mes soins au cours de ce travail de thèse mais n'aborde pas les techniques utilisées par nos collaborateurs.

1. Autorisation à expérimenter

L'ensemble des expérimentations ayant eu lieu au cours de cette thèse ont été réalisées en respectant la réglementation européenne (directive 86/609/EE) mais également française (87/848) concernant le bien-être animal. Le projet a ensuite été évalué puis validé par le ministère de l'Enseignement Supérieur, de la Recherche et de l'Innovation ainsi que par un comité d'éthique local (APAFIS : #12342-2017082111489451 v6)

2. Animaux

A. Hébergement

Les animaux ont été hébergés au sein de l'animalerie du Centre de Recherches sur la Cognition Animale (CRCA, CNRS UMR5169). Les souris ont eu un accès ad libitum à l'eau et à la nourriture et ont été exposées à un rythme circadien 12:12h avec une température de $23^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$.

B. Lignées de souris

Des souris C57Bl/6J mâles ont été utilisées pour l'ensemble des expérimentations. Sur ce même fond génétique des **souris génétiquement modifiées pour le récepteur APJ ou son ligand, l'apeline** ont été générées. Les souris knock-out privées d'apeline ont été générées par recombinaison homologue au niveau de cellules souches embryonnaires (Genoway, Lyon, France). Brièvement, des blastocystes de souris C57Bl/6J injectés avec les cellules embryonnaires modifiées ont été implantés chez des mères porteuses afin de produire des animaux chimères. La descendance d'intérêt invalidée pour le gène de l'apeline a été identifiée par PCR et Southern blot formant la lignée nommée $Ap^{-/-}$. Concernant les souris hétérozygotes $APJ^{+/-}$, la lignée a été maintenue par des croisements successifs de souris C57Bl/6J « littermates » avec des souris hétérozygotes pour la mutation (Deltagen, San Carlos, CA, USA).

Concernant le **modèle STZ**, une injection unique de STZ a été réalisée par voie intrapéritonéale à la dose de 150mg/Kg. La STZ a été dissoute dans du tampon citrate 0,1M à un pH de 4,5 et l'injection a été réalisée dans le quart d'heure suivant la préparation de la solution à cause de l'instabilité de la molécule. Deux jours plus tard, la glycémie des souris a été mesurée et toutes les souris ayant une glycémie inférieure à 200mg/dL ont reçu une seconde dose afin que toutes les souris présentent une glycémie >200mg/dL. Nous avons ensuite attendu 15 jours avant le phénotypage comportemental.

Pour le **modèle HFD**, des souris C57Bl6 ont été nourries avec un régime riche en gras ad libitum provenant du fournisseur SAFE et de référence 251HF dont l'apport énergétique provient à 45% du gras et donc la composition est détaillée dans le Tableau 4.

Composition du régime	STD	HFD
Protéines (kcal%)	26,2	20
Carbohydrates (kcal%)	60	35
Lipides (kcal%)	3,1	45
Contenu énergétique (kcal/kg)	2791	4727
Tryptophane (mg/kg)	1,9	2,1

Tableau 4. Composition des régimes alimentaires.

3. Traitements pharmacologiques

La metformine, un agent insulino-sensibilisateur (Sigma-Aldrich, France), a été administrée par voie orale (per os) dans l'eau de boisson à raison de 300mg/kg/jour. Cette dose a été ajustée selon la consommation hydrique des animaux vérifiée deux fois par semaine. Cette voie d'administration permet une exposition relativement constante du produit.

L'insuline utilisée pour les injections intra-raphé était de l'insuline humaine (Actarapid) administrée de manière unique à la dose de 100µU/0,5µL.

4. Injection intra-raphé d'insuline

Les souris ont été anesthésiées à l'aide d'hydrate de chloral à raison de 400mg/kg. Les souris ont ensuite été placées dans un appareil stéréotaxique de manière à implanter une canule d'injection à l'intersection de la suture sagittale et de la suture lambdoïde à une profondeur

de 2,5mm selon les coordonnées stéréotaxiques décrites dans l'atlas de Franklin et Paxinos (Franklin and Paxinos, 2000). Quarante-huit heures plus tard, la moitié des souris ont été injectées avec 0,5 μ L de liquide céphalo-rachidien artificiel (LCRa) (147 mM NaCl, 2.7 mM KCl, 1 mM MgCl₂, et 1.2 mM CaCl₂, ajusté à pH 7,4 avec un tampon de phosphate de sodium à 2 mM). L'autre moitié a été injectée avec 100 μ UI d'insuline dans un volume de 0,5 μ L de LCRa. Le débit d'injection était de 0,1 μ U/min et les tests comportementaux ont été réalisés 10 minutes après la fin de l'injection.

5. Analyses comportementales

Avant chaque test comportemental, les souris ont été amenées dans la salle d'expérimentation et nous avons respecté une période de 1h d'acclimatation (25lux, 22°C \pm 2) avant leur manipulation. En particulier, les souris étaient sorties de leur pièce d'hébergement aux alentours de 8h du matin (après l'allumage des lumières) et l'expérience commençait vers 9h du matin. Les tests ont été réalisés dans un ordre précis depuis le(s) moins stressant(s) vers le(s) plus stressant(s).

5.1. Tests d'anxiété

5.1.1. *Test de Champ ouvert (Open Field, OF)*

Ce test est basé sur l'anxiété naturelle des rongeurs envers les espaces ouverts laissant place à la prédation mais aussi sur la néophilie. Les animaux ont été placés dans une arène éclairée cylindrique opaque de diamètre de 40cm. Chaque animal était libre d'explorer le dispositif pendant dix minutes. L'ensemble de l'expérience était filmée par une caméra et analysée par un logiciel de trajectométrie (Ethovision, Noldus Tech, Netherlands). L'arène était fictivement divisée en deux compartiments : un compartiment central circulaire et un compartiment périphérique bordant le périmètre de l'arène. Le centre de l'arène représente la zone la plus anxiogène pour l'animal puisqu'elle est dépourvue de bordure. Le temps passé au centre/périphérie, mais aussi le nombre d'entrée au centre/périphérie et la distance totale parcourue ont été mesurés au cours de ces dix minutes. Dans ce test, plus une souris passe du temps au centre et/ou se rend au centre, moins elle est anxieuse. Afin de normaliser l'anxiété par l'activité locomotrice pouvant différer d'un individu à l'autre et/ou d'un groupe à l'autre, le ratio du temps passé au centre sur la distance parcourue a été calculé.

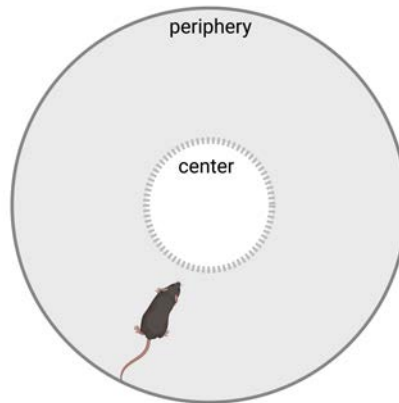


Figure 22. Dispositif de test de champ ouvert.

5.1.2. Test de la boîte claire/obscur (Dark/Light Test, DL)

Ce test se base sur l'aversion innée des souris vis à vis de la lumière pouvant refléter un état anxieux. Les souris ont été placées dans ce dispositif composé de deux chambres rectangulaires (40x20x25, divisé au tier) reliées par une petite porte. L'une des chambres possède quatre murs opaques (compartiment sombre) alors que la deuxième comporte trois murs transparents exposés à une lumière de 60W. Pendant dix minutes, la souris était libre d'explorer l'ensemble du dispositif. Le nombre d'entrées ainsi que le temps passé dans chaque chambre ont été comptabilisés. Le résultat de ce test a été exprimé en pourcentage de temps passé dans le compartiment sombre. Plus la souris passe du temps dans le compartiment sombre, plus elle est considérée comme anxieuse.

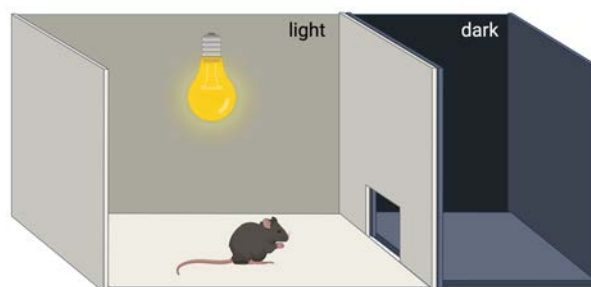


Figure 23. Dispositif de la boîte claire/sombre.

5.1.3. Test du labyrinthe en croix surélevé (Elevated-plus maze, EPM)

Ce test est basé sur l'anxiété naturelle des rongeurs envers les espaces ouverts laissant place à la prédation mais aussi sur la néophilie. Le labyrinthe en croix surélevé était composé de 4 bras dont 2 bras fermés par des murs et 2 bras ouverts vers l'extérieur (dépourvus de murs). Les bras mesurent 30 cm de long pour 5cm de large. D'après le même principe que l'OF, ce test repose sur la compétition entre la néophilie (l'envie d'explorer) et l'anxiété liée aux compartiments anxiogènes (ici les bras ouverts). La souris était libre d'explorer le dispositif pendant cinq minutes. Elle était considérée comme étant dans un compartiment lorsque ses quatre pattes sont dans un des bras. Le nombre d'entrée dans chaque bras ainsi que le temps passé dans ceux-ci ont été mesurés. Le résultat principal a été représenté en pourcentage du temps passé dans les bras ouverts puisque la zone centrale est considérée comme un compartiment neutre et n'entre donc pas dans le calcul. Plus la souris passe du temps dans les bras ouverts, moins elle est anxieuse.

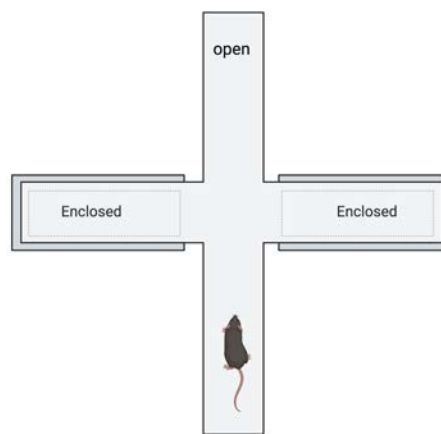


Figure 24. Dispositif du labyrinthe en croix surélevé.

5.2. Test de résignation, sociabilité et d'incurie

5.2.1. *Test de suspension caudale (Tail suspension test, TST)*

Le test de suspension caudale permet de mesurer la résignation des souris, un symptôme majeur de la DM. Pour cela, les souris ont été attachées sur un crochet à l'aide d'un ruban adhésif. Le dispositif est composé de 3 compartiments séparés par des parois afin de limiter les stimulations sensorielles (essentiellement la vue) entre les animaux et ainsi interférer avec leur comportement. Le test durait 6 minutes au cours desquelles la durée d'immobilité totale des souris a été mesurée. Le comportement « standard » d'une souris est de se débattre pour se

libérer de cette situation inconfortable. De ce fait, plus une souris est immobile, plus elle est résignée et réciproquement.

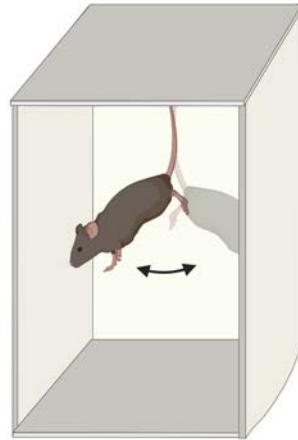


Figure 25. Dispositif du test de suspension caudale.

5.2.2. *Test d'interaction sociale (Social interaction test, SI)*

Ce test repose sur l'interaction avec un congénère présenté dans un dispositif à 3 chambres. Ce dispositif était constitué d'une chambre centrale vide donnant accès à 2 autres chambres latéralement opposées par le biais d'une petite porte. Dans chacune de ces chambres latérales se trouve une cage de démonstration (cage cylindrique à barreaux, 8x16). Lors d'un premier jour dit de familiarisation, les souris étaient libres d'explorer le dispositif ainsi que les 2 cages vides pendant 10min. Le jour suivant, les souris étaient à nouveau placées dans le dispositif mais cette fois-ci une souris appelée souris présentatrice était placée dans une des cages de présentation, l'autre cage restant vide. De manière très simple, plus une souris interagit avec la cage contenant le congénère et/ou directement avec le congénère, plus son comportement est considéré comme social.

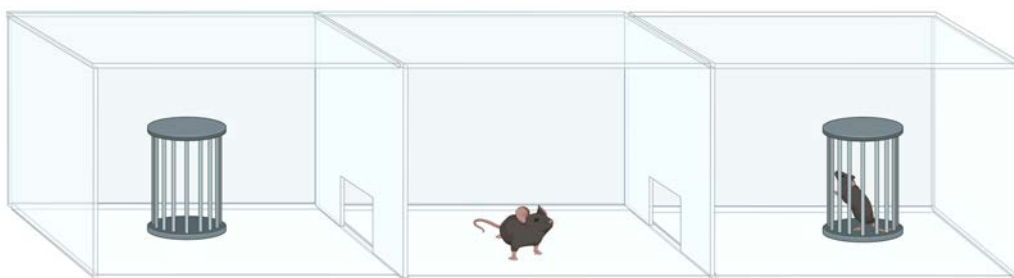


Figure 26. Dispositif du test d'interaction sociale.

5.2.3. Test d'éclaboussure (*Splash test, ST*)

Le test d'éclaboussure repose sur le toilettage des souris et permet de mesurer l'incurie, un autre symptôme important de la DM. Au cours de ce test, une solution de saccharose 10% a été appliquée sur le dos des souris qui ont ensuite été placées seule dans leur cage d'hébergement. Les toilettes longues essentiellement réalisées sur la partie dorsale des animaux ont été mesurées pendant 5min. Plus une souris se toilette, moins son comportement d'incurie est prononcé et réciproquement.

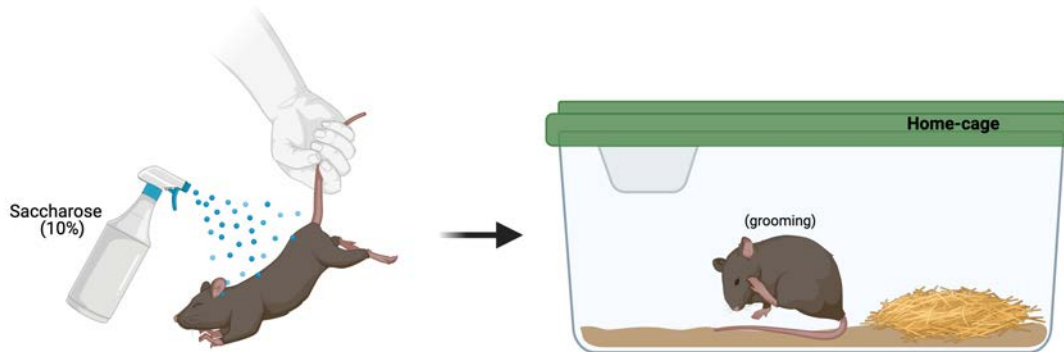


Figure 27. Principe du test d'éclaboussure.

5.3. Test de mémoire

5.3.1. Test de reconnaissance d'objet (*Object recognition, OR*)

Ce test repose sur la néophilie des souris. Lors d'une première session les souris ont été familiarisées avec l'arène cylindrique (40cm de diamètre) qu'elles étaient libres d'explorer pendant 10min (*Familiarisation*). Le jour suivant, deux objets identiques ont été disposés au sein de l'arène et les souris avaient encore une fois 10min pour explorer et interagir avec les objets (*Acquisition*). Au cours de cette première étape, le temps d'interaction avec les deux objets ont été mesurés. Le lendemain, le jour du test, l'objet avec lequel la souris a eu le moins d'interaction était remplacé par un nouvel objet différent de par sa forme et couleur (*Test*). Si la souris se rappelle correctement avoir vu le premier objet la veille, alors elle passe plus de temps à explorer le nouvel objet le jour du test. Nous avons ainsi mesuré le temps d'interaction avec les deux objets et calculé le pourcentage de préférence pour le nouvel objet. Si celui-ci est supérieur à 50% alors on estime que la souris se souvient de l'objet et présente donc de bonnes capacités mnésiques.

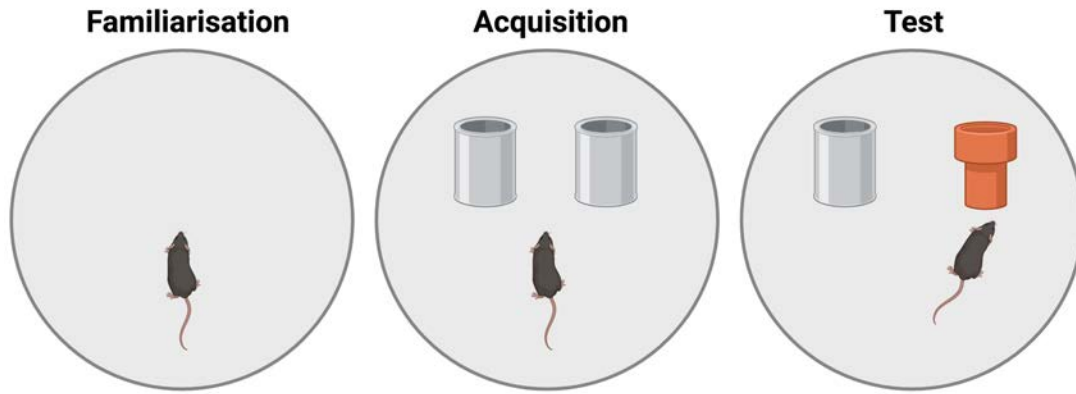


Figure 28. Principe et dispositif du test de reconnaissance d'objet.

5.4. Z-score anxieux et Z-score dépressif

Afin de rendre compte de l'anxiété générale ainsi que des symptômes dépressifs, un z-score d'anxiété ainsi qu'un z-score de dépression ont été calculés. Cela permet de prendre en compte tous les résultats comportementaux obtenus au regard de l'anxiété ou de la dépression et d'en obtenir un seul score pour chaque souris en réduisant la variabilité intrinsèque de chaque test (Guilloux et al., 2011). Pour cela, chaque paramètre de chaque individu a été moyenné à partir du groupe contrôle puis divisé par l'écart type du groupe contrôle (voir formule, Figure 29). Cela a permis d'obtenir un score par souris pour chaque paramètre de chaque test. Ces scores ont ensuite été moyennés afin d'obtenir un score général d'anxiété ou de dépression. Lors de ce calcul, nous avons attribué le même poids à chaque test au sein du z-score. Le signe de chaque score était ajusté selon le paramètre afin qu'un score négatif reflète une amélioration du paramètre par rapport au groupe contrôle, à l'inverse, un score positif représente une détérioration de celui-ci. Concernant le z-score d'anxiété, le pourcentage de temps passé dans les bras ouverts ainsi que le pourcentage de temps passé dans les compartiments sombres ont été pris en compte. Pour le z-score de dépression, le pourcentage d'interaction sociale ainsi que le temps d'immobilité dans le test de suspension caudale ont été utilisés pour le calcul.

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

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

Figure 29. Formule permettant le calcul du z-score.

6. Electrophysiologie in-vivo

Les souris ont été anesthésiées à l'aide d'hydrate de chloral (400mg/kg, ip) puis placées dans un appareil stéréotaxique. L'enregistrement unitaire des neurones sérotoninergiques localisés dans le noyau du raphé dorsal (DRN) a été réalisé en utilisant une micropipette de verre (Stoelting, Wood Dale, IL, USA) étirée par une étireuse gravitationnelle (Narishige, London, United-Kingdom) et remplie avec une solution de NaCl de 2M pour atteindre une impédance de 2,5 à 5 MΩ. Cette pipette était descendue dans le DRN soit 0,2-0,5mm en postérieur de la suture sagittale et à 2,5-3,5mm de profondeur en dessous de la surface du cerveau. Les neurones sérotoninergiques ont été caractérisés en utilisant deux critères majeurs : un taux de décharge régulier, allant de 0,5 à 2,5 Hz, et une longue durée de potentiel d'action. Plusieurs descentes ont été réalisées par souris afin de mesurer la fréquence moyenne de décharge ainsi que le nombre moyen de neurones enregistrés par descente. Les neurones sérotoninergiques à burst ont été caractérisés par un intervalle interspike <12ms et leur fréquence ainsi que la moyenne de potentiel d'action/burst ont été également analysés chez cette sous-population neuronale. Concernant l'enregistrement des neurones dopaminergiques, la même procédure d'anesthésie a été utilisée ainsi que le même matériel d'électrophysiologie. La micropipette d'enregistrement a été descendue dans l'aire tegmentale ventrale (ATV) en utilisant les coordonnées suivantes : -3 à -3,3mm en postérieur, 0,3 à 0,6mm en latéral depuis le bregma et 4,1 à 4,6mm en profondeur depuis la surface du cerveau. Les neurones dopaminergiques ont été identifiés selon les critères précédemment décrits par Grace et Bunney ([Grace and Bunney, 1983](#)). Les neurones dopaminergiques ont été caractérisés comme des neurones dopaminergiques à burst si l'intervalle interspike est <80ms. La fréquence des bursts et le nombre de spike moyen par burst ont été mesurés.

7. Microdialyse intracérébrale

Les souris ont été anesthésiées à l'aide d'hydrate de chloral (400mg/kg ; ip) puis placées dans un appareil stéréotaxique permettant l'implantation de sonde de microdialyses (effectives sur 2mm) dans l'hippocampe ventral. Basé sur l'atlas du cerveau des souris C57Bl/6, les coordonnées d'implantation par rapport au bregma étaient (en mm) : antéro-postérieur : -2.5; lateral (L), ±2.7; and dorso-ventral (DV), -3.0. Un jour plus tard, les sondes de microdialyses ont été reliées d'une part à une pompe péristaltique permettant la perfusion régulière et continue de LCra (147 mM NaCl, 2.7 mM KCl, 1 mM MgCl₂, et 1.2 mM CaCl₂, ajusté à pH 7,4 avec

un tampon de phosphate de sodium à 2 mM), et de l'autre à un tube de sortie permettant le recueil de ce même liquide chargé de neurotransmetteurs. En effet, la membrane poreuse à l'extrémité de la sonde située dans la structure d'intérêt permet, grâce au phénomène d'osmolarité, de laisser passer les neurotransmetteurs de faibles poids moléculaires présents au niveau de la structure d'intérêt. Après une phase dite d'acclimatation et de stabilisation au cours de laquelle le débit est de 3µL/min, celui-ci est réduit à 1,5µL/min et les échantillons sont recueillis toutes les 15 minutes pendant trois heures.

Une fois récoltés, les dialysats ont été dosés par chromatographie liquide à haute performance (CLHP) équipée d'une colonne analytique (50x3.0mm ; Accucore, Thermo Fisher Scientific) couplée à un système de détection électrochimique (Dionex Ultimate 3000, Thermo Fisher Scientific). Pour cela, une phase mobile spécifique pour le dosage de la sérotonine est utilisée (NaH₂PO₄ 150mM ; acide citrique 4,76mM ; EDTA 50µM ; SDS 2mM ; acétonitrile 15%, méthanol 10% ; pH 5,60). Une colonne d'affinité Accucore C18, 50mm x 3mm, Thermo Scientific a été utilisée pour séparer la sérotonine afin de la quantifier à l'aide du logiciel Chroméléon Lab 7.2 (Chroméléon Chromatography Data System, ThermoFisher, USA).

Les quatre premiers prélèvements ont été utilisés pour déterminer le niveau basal de 5-HT extracellulaire avant d'injecter des doses cumulatives d'insuline (0,75 and 1,5IU/kg, ip) à des souris pré-traitées avec une solution saline ou du WAY100635, un antagoniste du récepteur 5-HT_{1A}. L'évolution des concentrations de 5-HT extracellulaire ont été exprimées en pourcentage de la valeur basale.

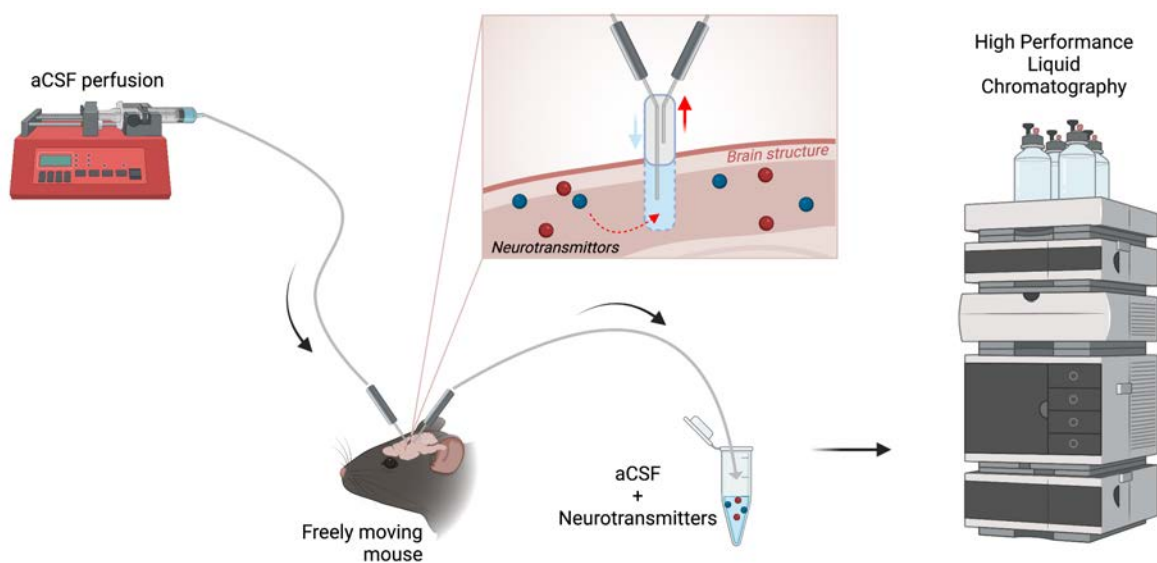


Figure 30. Principe de la microdialyse intracérébrale. aCSF = artificial cerebro-spinal fluid.

8. Analyses métaboliques

8.1. Glycémie à jeun et test de tolérance au glucose suite à une injection intra-péritonéale de glucose (IPGTT)

Tout d'abord les souris ont été mises à jeun à 8h du matin afin de réaliser 5h de jeun avant l'IPGTT. Pour cela la nourriture est retirée des cages et la sciure est changée. À 14h, la glycémie à jeun est mesurée à l'aide d'un lecteur (Accu-chek Performa) par prélèvement d'une goutte de sang au niveau de la queue après section de 1mm de l'extrémité de la queue. Ensuite, les souris ont été injectées avec une solution de D-glucose à 2g/kg par voie intrapéritonéale et la glycémie a été mesurée 15, 30, 45, 60, 90 et 120min après l'injection. L'aire sous la courbe de chaque profil a été calculée afin de rendre compte de la tolérance au glucose de chaque animal.

8.2. Test de tolérance à l'insuline (ITT)

Tout d'abord les souris ont été mises à jeun à 8h du matin afin de réaliser 5h de jeun avant l'ITT. Pour cela la nourriture a été retirée des cages et la sciure changée. À 14h, la glycémie à jeun a été mesurée à l'aide d'un lecteur (Accu-chek Performa) par prélèvement d'une goutte de sang au niveau de la queue après section de 1mm de l'extrémité de la queue. Ensuite, les souris ont été injectées avec de l'insuline à 0,5U/kg par voie intrapéritonéale et la glycémie mesurée 15, 30, 45, 60, 90 et 120minutes après l'injection.

8.3. Insulinémie

Lors d'une expérience d'IPGTT, après la prise de la glycémie à T0 et avant l'injection de glucose, le sang a été prélevé par la queue dans des tubes recouverts d'EDTA (Microcuvette CB300 EDTA K2, Sarstedt). Après centrifugation pendant 15min à 13 500rpm à 4°C, le plasma a été récupéré puis stocké à -80°C jusqu'au dosage. L'insulinémie a été mesurée à l'aide d'un kit ELISA (Mouse insulin ELISA #1247, Mercodia).

8.4. HOMA-IR

L'HOMA-IR, ou 'homeostasis model assessment of insulin resistance' a été calculé en utilisant la formule suivante : $[\text{glycémie à jeun (mg/dL)}] \times [\text{insulinémie à jeun (ng/mL)}] / 405$. Cette valeur reflète la résistance à l'insuline de l'individu (Matthews et al., 1985).

9. Western Blot

Quantification du récepteur à l'insuline dans le DRN

Les souris ont été euthanasiées par dislocation cervicale. Les cerveaux ont été récupérés puis disséqués afin d'isoler l'hypothalamus et le DRN. Ces tissus ont immédiatement été congelés à l'aide d'azote liquide puis conservés à -80°C jusqu'à utilisation. Les protéines totales ont été extraites (Protein Assay, BioRad Laboratories, CA) puis homogénéisées dans du Laemmli buffer (Sigma-Aldrich) puis chauffées à 70°C pendant 10 minutes. Les homogénats ont été ensuite soniqués et bouillis à 100°C pendant 5 min pour inactiver les protéases. Ces homogénats ont ensuite été centrifugés à 13 000rpm pendant 5 min et les surnageants collectés. La concentration de protéine a été déterminée (RC-DC protein assay, BioRad Laboratories, CA) et les aliquots ont été stockés à -80°C jusqu'à leur utilisation. Concernant l'immunoblotting, 20µg de protéine ont été déposés dans un gel NuPAGE Novex 10% Bis-tris (Thermo Fisher Scientific Inc.) et séparés par électrophorèse durant 3h30 à 80V. Les protéines ont ensuite été transférées sur membrane (Amersham, NJ, USA) grâce à un transfert semi-sec (Trans-Blot SD Semi-Dry Transfer Cell, Biorad). Les membranes ont été bloquées par incubation avec du PBS-T (Phosphate-Buffered Saline à 0.01% Tween-20) contenant 5% de lait pendant 1h à température ambiante puis incubées avec l'anticorps primaire tout au long de la nuit à 4°C dilués dans le solution de blocage. Les anticorps primaires suivants ont été utilisés : mouse anti-insulin receptor β (1:500; SantaCruz Biotechnology) and rabbit anti-GAPDH (1:20000; Abcam). Après lavage, les anticorps secondaires suivants ont été incubés pendant 1h à température ambiante et à l'abri de la lumière : goat anti-mouse IRDye 680RD (1:10000; Odyssey, LI-COR) or goat anti-rabbit IRDye 800CW (1:10 000; Odyssey, LI-COR). Les membranes ont été visualisées à l'aide d'un lecteur LI-COR Odyssey® (LI-COR Biosciences). La quantification du signal a été réalisée à l'aide du logiciel FIJI (<http://imagej.nih.gov/ij>, NIH, USA). Les données sont exprimées par le ratio InsR/GFAP afin de normaliser les résultats par la quantité de protéine.

10. Statistiques

L'ensemble des analyses statistiques a été réalisé à l'aide du logiciel GraphPad Prism 8.0 (GraphPad Software, San Diego, USA). Pour l'ensemble des études statistiques le risque alpha a été fixé à 5%.

- Comparaison entre deux échantillons :
 1. La distribution Normale des échantillons a été déterminée à l'aide d'un test de Shapiro-Wilk avec un intervalle de confiance de 95%.
 2. En fonction de la distribution, un test non paramétrique de Mann-Whitney ou un test paramétrique de Student (t-test) a été utilisé.

- Comparaison d'un échantillon à une valeur théorique : pour le pourcentage de temps passé dans le compartiment sombre, le pourcentage de temps passé à interagir avec un congénère ou le pourcentage de préférence d'objet, les moyennes de chaque groupe a été comparée à une valeur fixe de 50%, valeur du niveau de chance. Pour cela un t-test à un échantillon a été utilisé.

- Comparaison entre plus de deux échantillons avec deux facteurs de variabilités :
 1. La distribution Normale ainsi que l'homoscédasticité ont été analysées
 2. En fonction de la Normalité et de l'égalité des variances, un test paramétrique Two-way ANOVA ou un test non paramétrique de Kruskal-Wallis a été réalisé.
 3. Les comparaisons deux à deux ont été faites par des analyses post-hoc s'appuyant sur de Tuckey

Pour les figures présentes dans ce manuscrits, les données statistiques sont présentées dans les légendes des figures.

RESULTATS

Partie 1 : Lien entre l'insuline et le système sérotoninergique en condition physiologique

Puisque les études épidémiologiques témoignent d'une prévalence plus élevée de la dépression chez les sujet diabétiques (Anderson et al., 2001) et que le système sérotoninergique est largement impliqué dans la modulation des comportements dépressifs (Hamon et Blier 2013), nous avons légitimement émis l'hypothèse que l'insuline pouvait avoir un impact sur ce trouble psychiatrique. C'est pourquoi, la première partie de ces travaux de thèse s'est focalisée sur l'impact de l'insuline sur le système sérotoninergique dans un contexte physiologique, c'est à dire chez des souris saines. Cette étude a été réalisée en étroite collaboration avec les docteurs Xavier Fioramonti et Hugo Martin (Laboratoire NutriNeuro, INRAE 1286, Bordeaux).

Tout d'abord, nous avons cherché à déterminer si le récepteur à l'insuline était présent dans le DRN et éventuellement dans quelle(s) population(s) neuronale(s). Pour cela nous avons utilisé des techniques de western blot (WB) et d'hybridation in situ (FISH). Par la suite nous avons utilisé des techniques d'électrophysiologies in-vivo et ex-vivo afin de mieux comprendre l'impact de l'insuline sur les propriétés électriques des neurones sérotoninergiques. Avec l'aide de nos collaborateurs, nous avons caractérisé les paramètres électriques des neurones Pet1 positifs du DRN, en réponse à l'insuline, sur des tranches de cerveau en patch clamp. Nous avons complété ces études électrophysiologiques in vitro par des études électrophysiologiques in vivo puis par des expériences de microdialyse intracérébrale. Cette approche neurochimique nous a permis d'appréhender la résultante de ces modulations induites par l'insuline sur les concentrations extracellulaires de sérotonine dans l'hippocampe, une aire de projection des neurones 5-HT.

Une fois les effets directs sur les neurones sérotoninergiques identifiés, nous avons cherché à comparer les conséquences comportementales d'une injection locale (c-a-d, intraraphé) ou intranasale d'insuline. Cette dernière voie d'administration est particulièrement intéressante puisqu'elle est applicable à l'être humain.

Cet article questionne l'impact de l'insuline sur le système sérotoninergique et met en évidence les modulations comportementales associées.

ARTICLE 2 :

L'insuline cérébrale module le comportement émotionnel à travers un mécanisme dépendant de l'insuline

Martin Hugo^{1#}, **Bullich Sébastien**^{2#}, Olivry Clara¹, Martinat Maud¹, Chataigner Mathilde¹, Di Miceli Mathieu¹, Simon Vincent³, James Samantha³, Justine Buttler⁴, Chaouloff Francis³, De Deurwaerdere Philippe⁴, Cota Daniela³, Kleinridders André⁵, Layé Sophie¹, Guiard Bruno², Fioramonti Xavier¹

¹Laboratoire NutriNeuro UMR1286 INRAE, Bordeaux University, Bordeaux INP, Neurocampus, Bordeaux, France

²Centre de Recherches sur la Cognition Animale, Université Paul Sabatier, Toulouse, France

³Neurocentre Magendie, UMR INSERM, Bordeaux University, Neurocampus, Bordeaux, France

⁴INCIA, UMR CNRS, Bordeaux University, Neurocampus, Bordeaux, France

⁵University of Potsdam, Institute of Nutritional Science, Nuthetal, Germany

Ce papier est en fin de rédaction et sera soumis prochainement. Les résultats de ce papier sont discutés dans la partie discussion du manuscrit de thèse.

Résumé :

Le diabète de type 2 (DT2) est essentiellement caractérisé par une résistance à l'insuline accompagnée de nombreuses comorbidités dont avec la dépression majeure (DM). En effet, les patients DT2 sont deux fois plus de risque de souffrir de DM et des études cliniques ont montré que l'insulino-résistance corrèle avec la sévérité de la dépression. Chez des animaux nourris avec un régime enrichi en gras, utilisé pour modéliser un DT2 associé à des troubles émotionnels, plusieurs études mettent en évidence une altération du système sérotoninergique (5-HT) associé à l'insulino-résistance. Ensemble, ces résultats suggèrent que l'insuline pourrait moduler le système 5-HT impactant les comportements anxio-dépressifs et que l'insulino-résistance au niveau des neurones 5-HT pourrait contribuer au développement des troubles de l'humeur dans un contexte de DT2. Dans cette étude, nous nous sommes focalisés sur le rôle de l'insuline dans la modulation des comportements émotionnels selon un mécanisme dépendant de la sérotonine. In vivo, l'insuline inhibe l'activité des neurones 5-HT ainsi que la libération de sérotonine au niveau hippocampique de manière dépendante du récepteur 5-HT1A impliqué dans le rétrocontrôle négatif. Nos résultats montrent que ces mécanismes sont nécessaires pour l'effet

anxiolytique de l'insuline administrée par voie intra-nasale. De manière intéressante, l'insuline perd son effet chez les animaux nourris avec un régime enrichie en gras associé à l'insulino-résistance des neurones 5-HT du noyau du raphé dorsal. Ces données suggèrent que l'insuline module directement l'activité des neurones 5-HT en diminuant la neurotransmission 5-HT impactant les comportements anxieux. L'altération de la sensibilité à l'insuline de ces neurones pourrait donc être critique dans le développement de troubles dépressifs associés à un diabète de type 2.

Contribution personnelle :

Au cours de ce travail :

- J'ai réalisé les injections intra-raphé d'insuline chez la souris et les études comportementales associées,
- J'ai réalisé les études électrophysiologiques in-vivo et de microdialyse intracérébrale, et des western blot dirigés contre le récepteur à l'insuline dans le DRN et l'hypothalamus,
- J'ai participé à la rédaction et à la révision du manuscrit.

Insulin modulates emotional behavior through a serotonin-dependent mechanism

Running title:

Insulin modulates the 5-HT system to control mood

Martin Hugo^{1,}, Bullich Sébastien^{2,*}, Martinat Maud¹, Chataigner Mathilde¹, Di Miceli Mathieu¹, Simon Vincent³, James Samantha³, Justine Buttler⁴, Mareike Schell⁵, Simran Chopra⁵, Chaouloff Francis³, Kleinridders Andre⁵, Cota Daniela³, De Deurwaerdere Philippe⁴, Pénicaud Luc⁶, Layé Sophie¹, Guiard P. Bruno^{2,#}, Fioramonti Xavier^{1,#}*

¹Laboratoire NutriNeuro UMR1286 INRAE, Bordeaux University, Bordeaux INP, Neurocampus, Bordeaux, France

²Centre de Recherches sur la Cognition Animale (CRCA), Centre de Biologie Intégrative (CBI), CNRS UMR5169, Toulouse, France

³Neurocentre Magendie, UMR INSERM, Bordeaux University, Neurocampus, Bordeaux, France

⁴INCIA, UMR CNRS, Bordeaux University, Neurocampus, Bordeaux, France

⁵University of Potsdam, Institute of Nutritional Science, Nuthetal, Germany

⁶RESTORE, UMR INSERM 1301/CNRS 5070/Université Paul Sabatier/EFS/ENVT, Toulouse, France

*, #: These authors equally contributed to this work

✉ Corresponding authors :

Dr. Xavier FIORAMONTI

NutriNeuro

UMR 1286 INRAE, Bordeaux University, Bordeaux INP

Bâtiment UFR Pharmacie

146 rue Léo Saignat

33076 BORDEAUX

France

Phone: +33 5 57 57 12 48

email: xavier.fioramonti@inrae.fr

Abstract

Type-2 Diabetes (T2D) is mainly characterized by insulin resistance and accompanied by comorbidities including major depressive disorders (MDD). Patients with T2D are twice more likely to suffer from MDD and clinical studies have shown that insulin resistance is positively correlated with the severity of depressive symptoms. However the potential contribution of central insulin signaling in MDD in T2D patients remains elusive. We hypothesized that insulin modulates the serotonergic (5-HT) system to control emotional behavior and that insulin resistance in 5-HT neurons contributes to the development of mood disorders in T2D. Our results show that insulin directly modulates the activity of dorsal raphe (DR) 5-HT neurons to dampen 5-HT neurotransmission through a 5-HT_{1A} receptor-mediated inhibitory feedback. In addition, insulin-induced 5-HT neuromodulation is necessary to promote acute anxiolytic-like effect in response to intranasal insulin delivery. Interestingly, the anxiolytic-like effect of intranasal insulin as well as the response of DR 5-HT neurons to insulin are blunted in high fat diet-fed T2D animals.

Altogether, these findings point to a novel mechanism by which insulin directly modulates the activity of DR 5-HT neurons to dampen 5-HT neurotransmission and control emotional behaviors, and emphasize the idea that impaired insulin-sensitivity in these neurons is critical for the development of T2D-associated mood disorders.

Introduction

Type 2 diabetes (T2D) is among the most prevalent chronic disease worldwide, and it is strongly associated with comorbidities including Major Depressive Disorder (MDD). Recent epidemiological studies indicate that prevalence of MDD is at least twice as high among patients suffering from T2D (1). Interestingly, clinical evidence suggests that impairment of insulin signaling, resulting from insulin resistance, might be one of the underlying mechanisms for the development of MDD in patients with T2D. (2–4). Preclinical studies support this hypothesis since it has been repeatedly shown that insulin resistant animal models of T2D exhibit both depressive- and anxiety-like behaviors (5–9). Nevertheless, it remains unclear whether peripheral or brain insulin resistance plays a causal role in T2D-associated mood disorders.

The impact of impaired brain insulin signaling on mood has been investigated using transgenic animal models presenting a deletion of the insulin receptor (IR) in selective brain cells or structures (13). For instance, Neuronal Insulin Receptor Knock-Out (NIRKO) mice displaying neuronal IR deletion, exhibit spontaneous depressive- and anxiety-like behaviors (14). These findings support the hypothesis that brain IR signaling is crucial for the regulation of emotional behavior. The dopaminergic system is known to modulate mood and is targeted by insulin (15,16). However, the effect of insulin on the dopaminergic system does not seem to impact anxiety- or depressive-like behaviors (17). As such, the identity of the neuronal networks underlying the effects of insulin on mood still needs to be determined.

The serotonergic (5-HT) neurotransmission is a well-established monoaminergic system involved in the etiology of psychiatric disorders and more specifically in the pathophysiology of MDD (18). This system is also the main target of antidepressant drugs such as Selective Serotonin Reuptake Inhibitors (SSRIs), which represent the most prescribed class of antidepressants. Previous studies from our group have demonstrated that 5-HT

neurotransmission is impaired in animal models of T2D-associated mood disorders (6,7,13). Thus, we hypothesized that insulin directly modulates the 5-HT system to control emotional behavior.

Here, we have used multiple approaches to assess the role of insulin in the modulation of 5-HT neurons and associated emotional behaviors. Our data reveal that insulin directly controls the activity of DR 5-HT neurons. In addition, we provide evidence that anxiolytic-like effect of insulin requires the action on the 5-HT system. Finally, we show that DR 5-HT neurons become resistant to the action of insulin in a model of T2D-associated mood disorders. Altogether, these findings identify a new mechanism by which insulin directly modulates the activity of DR 5-HT neurons to control emotional behaviors.

Materials and Methods

Animals.

Adult male mice (8-12 weeks) from different strains were housed in conventional style housing cages at NutriNeuro Laboratory, University of Bordeaux. Animals were maintained on a 12 hours light-dark cycle (7:7) with *ad libitum* access to food and water. All experimental procedures were conducted in accordance with the European directive 2010/63/UE and approved by the French Ministry of Research and local ethic committees (APAFIS#: 16853; 12898; 22415; 8928). C57BL/6J were purchased from Janvier laboratory (Le Genest-Saint-Isle, France). Pet1-cre-mCherry mice were obtained by crossing Pet1-cre mice (gift from Dr. P Gaspar, (19) with B6.Cg-Gt(ROSA)26Sortm9(CAG-tdTomato)Hze/J mice (Jackson Laboratory, Bar Harbor, Maine, USA). SeIRKO (**S**erotonin **I**nsulin **R**eceptor **K**nock-**O**ut; cre⁺::IRflox^{+/+}::mCherry^{+/-}) mice were obtained by crossing IR^{lox/lox} (cre⁻::flox^{+/+}) mice (Jackson Laboratory) and Pet1-cre-mCherry (cre⁺::mCherry^{+/-}) to specifically study insulin default of action only in serotonergic neurons. Littermates with cre⁺::flox^{-/-}::mCherry^{+/-} genotype were used as controls for the SeIRKO mice. To model type-2 diabetes-associated emotional disorders in rodents, a sub-group of mice was fed a high fat diet (HFD; #U8955P, Research Diet, New Brunswick, NJ, USA) or standard diet (STD; #A04, Research Diet) for 16 weeks as previously described (6,7).

Drugs and treatments.

Serotonergic modulators: To deplete serotonin levels, mice were injected with p-chlorophenylalanine (pCPA, 150 mg/kg; Sigma, St-Quentin-Fallaviers, France) twice per day (9.00 AM and 6.00 PM) for three consecutive days prior to experiments. The 5-HT_{1A} antagonist

WAY 100635 (0.5 - 1 mg/kg; Tocris, Bristol, UK) was injected i.p. one hour before behavior assays.

Intranasal delivery procedure: Mice were handled and then habituated to intranasal delivery (IND) injections two weeks prior to testing. The day of the experiment, mice were fasted for 18 hours before IND delivery of Human recombinant insulin (7 μ g/ μ l insulin, diluted in NaCl 0.9%; Sigma) or vehicle (NaCl 0.9%) into mouse nares (5 μ l/nare) to reach a final dose of 2IU insulin (20). Mice were replaced into their home cage and tested 60 minutes after IND injections.

Intra-raphé insulin injection: Mice were anesthetized with chloral hydrate (400 mg/kg, i.p.) and placed in a stereotaxic apparatus. A cannula was implanted 0.5 mm posterior to the interaural line on the midline and lowered into the DR, attained at 2.5mm depth from the brain surface. Two days after half of the mice received 0.5 μ L of artificial cerebro-spinal fluid (aCSF) (147 mM NaCl, 2.7 mM KCl, 1 mM MgCl₂, et 1.2 mM CaCl₂, adjusted to pH 7.4 with sodium phosphate buffer 2mM). The other half received 100 μ IU of insulin in 0.5 μ L aCSF. The injection flow was fixed to 0.1 μ U/min and behavioral tests were performed 10min after the end of the injection.

Antidepressant add-on treatment experiment: One hour prior to be subjected to the tail suspension test, mice were injected with an appropriate combination intranasal (insulin 2IU or vehicle NaCl 0.9%) and intraperitoneal treatment (fluoxetine-hydrochloride 18 mg/kg (free base?); Sigma; or vehicle 0.9%).

Behavioral experiments.

Animals were tested in different anxiety-like and depressive-like behavioral paradigms as previously described (Supplementary table 1; (6,7)). Tests were spaced by three days of recovery time and increasing in term of stress-related paradigm, starting with the less stressful test. Mouse behavior was tracked and analyzed with *Smart* (Panlab, Barcelona, Spain) or *Bioseb* (Bioseb, Vitrolles, France) software. All behavioral experiments were subject-randomized and blind analyzed.

FISH for IR combined with IHC for TPH2

Digoxigenin-labeled riboprobe against mouse *Insr* (IR-DIG, Allen Brain Atlas, #RP_050503_02_H08) was prepared as previously described (47) (Supplementary Table 2).

Tissue sampling and high-pressure liquid chromatography coupled to electrochemical detection (HPLC-ECD).

Tissue sampling and conditioning for HPLC-ECD have been performed as previously described (21,22) (Supplementary Table 2).

In vivo single-unit recordings of 5-HT neurons in the DR.

Mice were anesthetized with chloral hydrate (400 mg/kg, i.p; Sigma) and extracellular recordings of DR 5-HT neurons were performed using single glass micropipettes (Stoelting Europe, Dublin, Ireland) pulled on a pipette puller (Narishige, Tokyo, Japan) and preloaded with a 2 M NaCl solution. Micropipettes were positioned 0.2–0.5 mm posterior to the interaural line on the midline and lowered into the DR, attained at a depth between 2.5 and 3.5 mm from the brain surface. 5-HT neurons were identified using the following criteria: a slow (0.5–2.5 Hz) and regular firing rate and a long-duration positive action potential. In each mouse, presumed 5-HT neuron was identified based on these criteria and their spontaneous firing rate

was recorded for 2 min. Insulin was then injected at doses of 0.75 and 1.5 IU/kg (i.p) given either alone or in combination with WAY100635.

Intracerebral microdialysis in the ventral hippocampus of awake freely moving mice.

Mice were implanted with microdialysis probes in the ventral hippocampus (vHP). Stereotaxic coordinates from bregma were as follows (in mm): antero-posterior (AP), -2.5; lateral (L), ± 2.7 ; and dorso-ventral (DV), -3.0. Twenty-four hours later, probes were connected to a microinjection pump for a continuous perfusion (flow rate: 1.5 μ l/min) of artificial cerebrospinal fluid (147 mM NaCl, 2.7 mM KCl, 1 mM MgCl₂, and 1.2 mM CaCl₂, adjusted to pH 7.4 with 2 mM sodium phosphate buffer) containing the 5-HT reuptake inhibitor escitalopram (1 μ M) as previously described (23). Samples (15 μ l) were collected every 15 min. The four initial fractions were used to determine the basal extracellular levels of serotonin ([5-HT]_{ext}) before injecting insulin in mice pre-treated with saline or WAY100635 (0.5 mg/kg; i.p.). The amount of 5-HT in dialysate samples post-insulin injection was expressed as percentage of the basal value. Samples were analyzed using high-performance liquid chromatography system equipped with a 2.6 μ m C18 reverse-phase analytical column (50 x 3.0 mm; Accucore, Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA) coupled with electrochemical detection (Dionex Ultimate 3000, Thermo Fisher Scientific).

Brain slice patch clamp recordings of DR 5-HT neurons

Ex-vivo patch-clamp recordings were performed on brain slices from Pet1-cre-mCherry mice as previously described (7). Briefly, mice were intracardially perfused during euthanasia (exagon/lidocaine: 300/30 mg/kg, i.p) with ice-cold NMDG solution containing the following (in mM): 1.25 NaH₂PO₄, 2.5 KCl, 7 MgCl₂, 20 HEPES, 0.5 CaCl₂, 28 NaHCO₃, 8 D-glucose, 5 L(+)-ascorbate, 3 Na-pyruvate, 2 thiourea, 93 NMDG, and 93 HCl 37%; pH: 7.3–7.4;

osmolarity: 305–310 mOsM. Brains were quickly removed and 250 μm slices containing the DR were cut with a vibroslice (Leica VT1000S, Wetzlar, Germany) and transferred at room temperature into aCSF solution (containing the following in mM: 124 NaCl, 2.5 KCl, 1.25 NaH_2PO_4 , 2 MgCl_2 , 2.5 CaCl_2 , 2.5 D-glucose, and 25 NaHCO_3 ; pH: 7.3–7.4; osmolarity: 305–310mOsM) for at least 1 hour. For whole cell recording, borosilicate pipette (4–6 $\text{M}\Omega$; 1.5 mm OD, Sutter Instrument) were filled with an intracellular Kgluconate solution (containing the following (in mM): 128 Kgluconate, 20 NaCl, 1 MgCl_2 , 1 EGTA, 0.3 CaCl_2 , 2 $\text{Na}_2\text{-ATP}$, 0.3 Na-GTP, 0.2 cAMP, and 10 HEPES; pH: 7.3–7.4; osmolarity: 280–290 mOsM), cesium chloride (containing the following (in mM): 150 CsCl, 2 MgCl_2 , 1 EGTA, 2 $\text{Na}_2\text{-ATP}$, 0.2 Na-GTP, 0.2 cAMP, 10 HEPES) or filled with filtered aCSF for cell-attached recording. Recordings were made using a Multiclamp 700B amplifier, digitized using the Digidata 1440A interface and acquired at 2 kHz using pClamp 10.5 software (Axon Instruments, Molecular Devices, San José, CA, USA). Pipette and cell capacitances were fully compensated and junction potential was corrected off-line.

Firing frequency of DR 5-HT neurons was recorded in cell-attached mode. Because DR 5-HT neurons are silent *ex-vivo*, phenylephrine (PHE, 5 μM ; Tocris) was perfused to stimulate basal action potential activity for 5 minutes before application of insulin (300 nM) and recorded for 10 additional minutes. Change in firing rate frequency was analyzed during the last minute of insulin application. Spontaneous excitatory (sEPSC) or inhibitory (sIPSC) postsynaptic currents were recorded in whole-cell Vclamp mode on cells hold at a holding potential of -60 mV. Gabazine (5 μM ; Tocris) was added into the bath to record sEPSC while DAP-V (10 μM ; Tocris) and CNQX (10 μM ; Tocris) were added to monitor sIPSC. Spontaneous EPSC and IPSC frequency was recorded before and after 10 minutes insulin (300 nM; Sigma) perfusion period and analyzed during the last minute of each period.

Statistical analysis

Statistical analysis was performed using *Prism Graphpad 7* (San Diego, CA, USA). Data are expressed as mean \pm SEM and individual values are plotted on graph when possible. After normal Gaussian distribution was assessed using Shapiro-Wilk test, appropriate parametric (unpaired or paired Student's t-test) or non-parametric (Mann-Whitney or Wilcoxon matched-pairs signed rank test) tests were chosen to compare two population samples. One way ANOVA was used when comparing one variable of several population samples and two way ANOVA was used when analysis accounted for two distinct factors. Post-hoc analysis is mentioned in each figure legend. Statistics are detailed in supplementary table 2.

Results

Insulin increases firing activity of DR 5-HT neurons. We first verified that the IR is expressed at the mRNA and protein level in the DR ([Supplementary Fig. S1A, B](#)). To determine whether the IR is expressed in DR 5-HT neurons, we used *in situ* fluorescence hybridization targeting IR mRNA combined with an immunodetection against the rate limiting serotonin synthesis enzyme Tryptophan Hydroxylase 2 (TPH2), which is specifically expressed in 5-HT neurons. This analysis showed that the IR is expressed in DR 5-HT neurons ([Fig. 1A](#)). The functional activity of the IR expressed onto DR 5-HT neurons was assessed using cell-attached patch-clamp recording on Pet1-cre-mCherry mice ([Fig. 1B](#)). Insulin (300 nM) increases action potentials frequency in 80 % of DR 5-HT neurons by 164 ± 21 % ([Fig. 1C](#): 10/12 neurons tested). The IR inhibitor S961 blocks the excitatory effect of insulin ([Fig. 1D](#)). In the DR, the IR is expressed in both 5-HT and non-5-HT neurons ([Fig. 1A](#)), thus we assessed whether or not the action of insulin onto 5-HT neurons is direct rather than mediated by pre-synaptic inputs. We found that insulin fails to modulate the frequency of both spontaneous excitatory (EPSC) and inhibitory (IPSC) postsynaptic currents ([Fig. 1E-F](#)). To further confirm that insulin directly activates DR 5-HT neurons, we evaluated the response of DR 5-HT neurons to insulin in mice lacking the IR selectively in 5-HT neurons (SeIRKO mice; [supplementary Fig. S1D, E](#); [Fig. 1G](#)). Similarly to what we observed in naïve mice, insulin increases action potentials frequency of DR 5-HT neurons in control animals but fails to activate 5-HT neurons in SeIRKO mice ([Fig. 1H](#)).

Insulin inhibits the serotonergic system in vivo through a 5-HT_{1A} receptor-dependent mechanism. Extracellular recordings of DR 5-HT neurons were then performed to study the effects of insulin on this neuronal population *in vivo*. While we were expecting an increase in the activity of DR 5-HT neurons, we found that the intraperitoneal administration of 0.75 or 1.5

UI insulin produces, on average, a reduction of firing by $30 \pm 3\%$ and $20 \pm 4\%$, respectively, relative to baseline (Figs. 2A,B). This non-intuitive, inhibitory response of DR 5-HT neurons *in vivo* could be consequent to the recruitment of autoinhibitory mechanisms inherent to the raise in DR 5-HT neurons excitability induced by insulin *in vitro*. Interestingly, the ability of insulin to inhibit DR 5-HT neuronal activity is completely prevented by the selective 5-HT_{1A} receptor antagonist WAY100635. Indeed, the firing rate of DR 5-HT neurons in mice receiving the combination of insulin and WAY100635 is significantly higher compared to the group injected with insulin alone at both doses (Figs. 2A,B).

Based on the importance of 5-HT projections in the ventral-hippocampal (vHP) in the control of mood, we then conducted intra-vHP microdialysis to determine to what extent the intraperitoneal administration of insulin influences 5-HT release at the nerve terminals. Acute administration of insulin decreases extracellular 5-HT levels ([5-HT]_{ext}) in the hippocampus relative to baseline whereas it fails to do so when combined with WAY100635 (Figs. 2C). Analysis of the area under the curves indicates that differences between the two groups are statistically significant (Figs. 2D) demonstrating that the inhibitory effect of insulin on vHP [5-HT]_{ext} is blunted when the inhibitory feedback exerted by the 5-HT_{1A} autoreceptor upon the serotonergic system is pharmacologically inactivated.

Anxiolytic-like effect of brain insulin requires 5-HT neurotransmission. Clinical and preclinical studies have suggested that insulin modulates emotional behaviors by acting onto the brain (24,25). In the present study, we determined whether the action of insulin on mood requires the 5-HT system. Intranasal insulin delivery has been widely used to assess brain insulin effect in both rodents and humans in order to avoid symptomatic insulin-induced hypoglycemia bias (26). Accordingly, our results showed that intranasal insulin delivery does

not modify peripheral blood glucose ([supplementary figure S2A](#)). However, it significantly decreases tissue 5-HT content in both the amygdala and nucleus accumbens (NAc), with a non-significant trend in the vHP ([supplementary figure S2B](#)). Remarkably, overall, no modifications in brain noradrenaline (NA) and dopamine (DA) contents were detected thereby highlighting the specificity of insulin action on 5-HT neurons ([supplementary figure S2C, D](#)).

In the forced swim test (FST), intranasal insulin does not affect the time of immobility compared to intranasal vehicle treatment ([Fig. 3A](#)). Intranasal insulin does not modify latency to feed in the novelty suppressed feeding (NSF) test ([Fig. 3B](#)) or the time spent in the light compartment of the Light-dark box test ([Fig. 3C](#)), either. However, intranasal insulin increases the time spent in the open arms in the elevated plus maze (EPM) ([Fig. 3D](#)). Consistent with the latter, intranasal insulin also elicits an anxiolytic-like effect since it increases the time spent in the center of the open field (OF) without any changes in the locomotor activity ([Fig. 3E](#)). Interestingly, injection of insulin directly in the DR produces a similar increase in the time spent in the open arm in the EPM ([Fig. 3F](#)). To confirm the contribution of the 5-HT system in the anxiolytic effects of insulin, mice were pre-treated with the 5-HT₂ inhibitor pCPA. As expected, pCPA treatment significantly decreases tissue 5-HT levels in all brain areas analyzed without overall change of tissue dopamine or noradrenaline contents ([supplementary figure S3](#)). At the behavioral level, pCPA treatment prevents the anxiolytic-like response of intranasal insulin assessed in the EPM ([Fig. 3G](#)). Importantly, the anxiolytic-like effect of intranasal insulin in the EPM is also blunted in *5-HT_{1A}* KO animals as compared to their wild-type littermates ([Fig. 3H](#)). Finally, since we found that the 5-HT_{1A} receptor is involved in insulin-induced inhibition of 5-HT tone *in vivo*, we sought to determine to what extent the pharmacological inactivation of this receptor influences insulin behavioral response. Our results show that the 5-HT_{1A} receptor antagonist WAY100635 blocks the anxiolytic-like effect of intranasal insulin in the EPM ([Fig. 3I](#)).

DR 5-HT neurons harbor insulin-resistance in a model of T2D. We previously showed that HFD fed mice display T2D-associated anxiety- and depressive-like behaviors as well as alterations in the activity of DR 5-HT neurons (6,7). In the present study, we aimed at determining whether such alteration in 5-HT tone is associated with impaired response to insulin in DR 5-HT neurons. We found that insulin (300 nM) fails to increase action potentials frequency of DR 5-HT neurons in Pet1-cre-mCherry mice fed an HFD for 16 weeks (Fig. 4A). Interestingly, the anxiolytic-like response to intranasal insulin is blunted in both the EPM (Fig. 4B) and the OF (Fig. 4C) raising the possibility that DR 5-HT neurons are insulin-resistant in a model of HFD-induced T2D.

Potentiated antidepressant response to fluoxetine in combination with intranasal insulin delivery. Since insulin signaling pathway has been shown to cross-talk with 5-HT signaling (27), we investigated whether intranasal insulin potentiates the antidepressant response of acute fluoxetine administration. Consistent with our previous experiments assessing despair behavior in the FST, intranasal insulin treatment does not modify immobility time in the tail suspension test (TST) in both STD- (Fig. 4D) and HFD-fed (Fig. 4E) animals whereas fluoxetine (18 mg/kg) significantly decreases this parameter compared to vehicle treated animals in both STD- (Fig. 4D) and HFD-fed (Fig. 4E) animals. Interestingly, the combination of intranasal insulin and fluoxetine further reduces the immobility time compared to fluoxetine treatment alone in STD-fed mice (Fig. 4D). This potentiating effect of insulin is however hindered in HFD-fed animals (Fig. 4E). These data show that brain insulin signaling improves antidepressant response in normal but not T2D animals.

Discussion

Our study demonstrates that insulin inhibits the 5-HT system to elicits an anxiolytic-like response in mice. Such effect is mediated by direct action of insulin onto DR 5-HT neurons through a 5-HT_{1A}R-dependent mechanism. We also show that, in HFD-fed T2D mice, insulin fails to modulate the electrical activity of DR 5-HT neurons nor to promote anxiolytic-like effect. This study provides novel mechanistic insights into how insulin modulates the serotonergic system to influence emotional behavior.

Previous studies have reported inconsistent findings on the neuronal response to insulin including increase (28) or decrease (29) in 5-HT neurotransmission. Using complementary approaches consisting in *ex-vivo* patch-clamp electrophysiology, *in vivo* electrophysiology and intracerebral microdialysis, our data suggest that the action of insulin on the 5-HT system is more complex than originally thought. Indeed, using patch-clamp, we show that insulin increases the electrical activity of DR 5-HT neurons. This effect of insulin on DR 5-HT neurons is direct since insulin does not modify the frequency of IPSC nor EPSC thereby excluding a modulation from gabaergic or glutamatergic inputs. In addition, insulin fails to increase DR 5-HT neurons firing frequency in SeIRKO mice, which lack the IR selectively in 5-HT neurons. While these *ex-vivo* experiments suggest that insulin activates the serotonergic system, *in vivo* studies show, on the contrary, that its systemic administration elicits inhibitory responses. Indeed, *in vivo*, insulin decreases both the firing rate frequency of DR 5-HT neurons and the tissue or extracellular 5-HT levels ([5-HT]_{ext}) in different brain areas including the hippocampus. The latter data echo previous findings showing that peripheral insulin administration decreases the firing rate of 5-HT neurons in both the Raphe Pallidus and the Raphe Obscurus (30). Going one step further, we demonstrate the involvement of a 5HT_{1A} receptor (5-HT_{1A}R)-dependent mechanism in the inhibitory effects of insulin *in vivo*. Studies

have repeatedly shown that activation of 5HT_{1A} autoreceptors located at the somatodendritic level of DR 5-HT neurons may silence these neurons and decrease [5-HT]_{ext} in forebrain projections (31,32). Thus, we hypothesized that insulin first activates DR 5-HT neurons and consequently accumulating endogenous [5-HT]_{ext} level in the DR that would ultimately inhibits DR 5-HT neurons through the 5-HT_{1A}R in a very short timescale (Fig. 5A). Accordingly, our findings show that the 5-HT_{1A}R antagonist WAY100635 prevents the inhibition of firing rate frequency of DR 5-HT neurons as well as the drop in ventral hippocampal [5-HT]_{ext} in response to insulin. Thus, we reveal the excitatory effects of insulin by blocking 5-HT_{1A} autoreceptor *in vivo*. One could wonder why such 5-HT_{1A} receptor-dependent mechanism is not observed during patch-clamp recordings *ex vivo*. Studies have suggested that in *ex-vivo* patch-clamp conditions the 5HT_{1A}R-inhibition tone cannot be assessed due to the depletion of endogenous 5-HT release (33–36).

On another note, anxiolytic-like effect of intranasal insulin has already been investigated (25). Yet, neuronal circuits underpinning such behavioral outcome have not been unraveled. Here, we demonstrate using pharmacological and genetic-based approaches that anxiolysis induced by intranasal insulin relies, at least in part, on the serotonergic system. Indeed, both 5-HT depletion and selective deletion of the IR in 5-HT neurons result in a lack of anxiolytic-like effect of intranasal insulin. Interestingly, we found that intranasal insulin significantly reduces 5-HT level in the ventral hippocampus, the amygdala and the NAc. Importantly, decrease in 5-HT levels or lesion of serotonergic projections to the amygdala have been shown to mitigate anxiety-like behavior (37,38). This suggests that such a drop in 5-HT in response to intranasal insulin drives the associated anxiolytic-like effect (Fig. 5A). In support of this, we also show that blocking decreased 5-HT level using the 5HT_{1A}R antagonist WAY100635 prevents the anxiolytic effect of intranasal insulin administration (Fig. 5B).

Our data show that intranasal injection of insulin promotes anxiolytic-like effects. Interestingly, we did not find any antidepressant-like effects in response to acute intranasal insulin administration in the FST or in the TST. According to the RDoC approach (39), we can assume that the acute effect of insulin might be involved in the anxiety dimension of MDD, a core symptom of the disease. However, in animal models of T2D induced by a HFD, both anxiety- and depressive-like symptoms have been reported (5–7,40). In these models, insulin resistance has been found in several discrete brain areas including the hippocampus, ventral tegmental area and, striatum (41,42). Here, we provide the first evidence that such resistance also targets DR 5-HT neurons after high-fat feeding and that such impairment likely explains our previous observation that 5-HT neurons display a lower electrical activity in response to a HFD (7). Thus, we could hypothesize that insulin resistance at the level of 5-HT neurons takes a major part in the development of anxiety-like symptoms whereas decreased insulin sensitivity in other neuronal populations would rather promote depressive-like symptoms.

Clinical data show that antidepressant response efficacy is not optimal as only one third of patients present an adequate treatment response following the first antidepressant trial (43). Add-on treatment strategy represents a relevant approach to increase antidepressant response efficiency (44). Interestingly, the insulin-sensitizer agent metformin has been shown to potentiate the antidepressant effect of fluoxetine (45). Thus, in a translational perspective, we investigated whether acute intranasal insulin could also potentiate fluoxetine antidepressant efficacy. In STD-fed animals, we observed that intranasal insulin indeed increases the antidepressant-like response of fluoxetine. By contrast, such potentiating effect of insulin is abrogated in HFD-fed animals suggesting that the insulin response of neuronal networks, including the 5-HT system, is crucial for insulin to potentiate antidepressant efficacy. Clinical investigations are needed to support our data suggesting that enhancing insulin signaling

represents an original therapeutic approach for patients with MDD not presenting comorbid metabolic disorders associated to insulin resistance.

Acknowledgments

HM has been supported by grant from Région Nouvelle-Aquitaine and INRAE. XF has been supported by the Société Française du Diabète and the Fondation Université de Bordeaux. Authors are grateful to Pr. Vanessa H. Routh (Rutgers University, NJ, USA) and Pr. Thierry Alquier for their insightful comments on the manuscript.

Conflict of interest

The authors declare no competing interests

Supplementary information is available at MP's website

References

1. Anderson RJ, Freedland KE, Clouse RE, Lustman PJ. The prevalence of comorbid depression in adults with diabetes: a meta-analysis. *Diabetes Care*. 2001 Jun;24(6):1069–78.
2. Lee J-H, Park SK, Ryoo J-H, Oh C-M, Mansur RB, Alfonsi JE, et al. The association between insulin resistance and depression in the Korean general population. *J Affect Disord*. 2017 Jan;208:553–9.
3. Kan C, Silva N, Golden SH, Rajala U, Timonen M, Stahl D, et al. A systematic review and meta-analysis of the association between depression and insulin resistance. *Diabetes Care*. 2013 Feb;36(2):480–9.
4. Phillips CM, Perry IJ. Depressive symptoms, anxiety and well-being among metabolic health obese subtypes. *Psychoneuroendocrinology*. 2015 Dec;62:47–53.
5. Duthheil S, Ota KT, Wohleb ES, Rasmussen K, Duman RS. High-fat diet induced anxiety and anhedonia: impact on brain homeostasis and inflammation. *Neuropsychopharmacology*. 2016;41(7):1874–87.
6. Zemdegs J, Quesseveur G, Jarriault D, Pénicaud L, Fioramonti X, Guiard BP. High-fat diet-induced metabolic disorders impairs 5-HT function and anxiety-like behavior in mice. *Br J Pharmacol*. 2016 Jul;173(13):2095–110.
7. Zemdegs J, Martin H, Pintana H, Bullich S, Manta S, Marqués MA, et al. Metformin promotes anxiolytic and antidepressant-like responses in insulin-resistant mice by decreasing circulating branched-chain amino acids. *J Neurosci*. 2019;39(30):5935–48.
8. Hassan AM, Mancano G, Kashofer K, Fröhlich EE, Matak A, Mayerhofer R, et al. High-fat diet induces depression-like behaviour in mice associated with changes in microbiome, neuropeptide Y, and brain metabolome. *Nutr Neurosci*. 2019 Dec 2;22(12):877–93.
9. Papazoglou IK, Jean A, Gertler A, Taouis M, Vacher C-M. Hippocampal GSK3 β as a Molecular Link Between Obesity and Depression. *Mol Neurobiol*. 2015 Aug;52(1):363–74.
10. Grattan DR, Andrews ZB. Insulin as a neuroendocrine hormone. *J Neuroendocrinol*. 2021;33(4):e12966.
11. Aberg MAI, Aberg ND, Palmer TD, Alborn A-M, Carlsson-Skwirut C, Bang P, et al. IGF-I has a direct proliferative effect in adult hippocampal progenitor cells. *Mol Cell Neurosci*. 2003 Sep;24(1):23–40.
12. Lee C-C, Huang C-C, Wu M-Y, Hsu K-S. Insulin stimulates postsynaptic density-95 protein translation via the phosphoinositide 3-kinase-Akt-mammalian target of rapamycin signaling pathway. *J Biol Chem*. 2005 May 6;280(18):18543–50.
13. Martin H, Bullich S, Guiard BP, Fioramonti X. The impact of insulin on the serotonergic system and consequences on diabetes-associated mood disorders. *J Neuroendocrinol*. 2021 Jan 28;33(4):e12928.

14. Kleinridders A, Cai W, Cappellucci L, Ghazarian A, Collins WR, Vienberg SG, et al. Insulin resistance in brain alters dopamine turnover and causes behavioral disorders. *Proc Natl Acad Sci*. 2015 Mar 17;112(11):3463–8.
15. Labouèbe G, Liu S, Dias C, Zou H, Wong JCY, Karunakaran S, et al. Insulin induces long-term depression of VTA dopamine neurons via an endocannabinoid-mediated mechanism. *Nat Neurosci*. 2013 Mar;16(3):300–8.
16. Könnner AC, Hess S, Tovar S, Mesaros A, Sánchez-Lasheras C, Evers N, et al. Role for insulin signaling in catecholaminergic neurons in control of energy homeostasis. *Cell Metab*. 2011 Jun 8;13(6):720–8.
17. Evans MC, Kumar NS, Inglis MA, Anderson GM. Leptin and insulin do not exert redundant control of metabolic or emotive function via dopamine neurons. *Horm Behav*. 2018 Nov;106:93–104.
18. Yohn CN, Gergues MM, Samuels BA. The role of 5-HT receptors in depression. *Mol Brain*. 2017 Jun 24;10(1):28.
19. Kiyasova V, Fernandez SP, Laine J, Stankovski L, Muzerelle A, Doly S, et al. A genetically defined morphologically and functionally unique subset of 5-HT neurons in the mouse raphe nuclei. *J Neurosci Off J Soc Neurosci*. 2011 Feb 23;31(8):2756–68.
20. Hanson LR, Fine JM, Svitak AL, Faltsek KA. Intranasal administration of CNS therapeutics to awake mice. *J Vis Exp JoVE*. 2013 Apr 8;(74).
21. Dellu-Hagedorn F, Fitoussi A, De Deurwaerdère P. Correlative analysis of dopaminergic and serotonergic metabolism across the brain to study monoaminergic function and interaction. *J Neurosci Methods*. 2017 Mar 15;280:54–63.
22. Puginier E, Bharatiya R, Chagraoui A, Manem J, Cho YH, Garret M, et al. Early neurochemical modifications of monoaminergic systems in the R6/1 mouse model of Huntington’s disease. *Neurochem Int*. 2019 Sep 1;128:186–95.
23. Guiard BP, Przybylski C, Guilloux J-P, Seif I, Froger N, De Felipe C, et al. Blockade of substance P (neurokinin 1) receptors enhances extracellular serotonin when combined with a selective serotonin reuptake inhibitor: an in vivo microdialysis study in mice. *J Neurochem*. 2004 Apr;89(1):54–63.
24. Ferreira de Sá DS, Römer S, Brückner AH, Issler T, Hauck A, Michael T. Effects of intranasal insulin as an enhancer of fear extinction: a randomized, double-blind, placebo-controlled experimental study. *Neuropsychopharmacol Off Publ Am Coll Neuropsychopharmacol*. 2020;45(5):753–60.
25. Marks DR, Tucker K, Cavallin MA, Mast TG, Fadool DA. Awake Intranasal Insulin Delivery Modifies Protein Complexes and Alters Memory, Anxiety, and Olfactory Behaviors. *J Neurosci*. 2009 May 20;29(20):6734–51.
26. Schmid V, Kullmann S, Gfrörer W, Hund V, Hallschmid M, Lipp H-P, et al. Safety of intranasal human insulin: A review. *Diabetes Obes Metab*. 2018 Jul;20(7):1563–77.

27. Papazoglou I, Berthou F, Vicaire N, Rouch C, Markaki EM, Bailbe D, et al. Hypothalamic serotonin–insulin signaling cross-talk and alterations in a type 2 diabetic model. *Mol Cell Endocrinol.* 2012 Mar;350(1):136–44.
28. MacKenzie RG, Trulson ME. Effects of insulin and streptozotocin-induced diabetes on brain tryptophan and serotonin metabolism in rats. *J Neurochem.* 1978 Jan;30(1):205–11.
29. Orosco M, Nicolaidis S. Insulin and glucose-induced changes in feeding and medial hypothalamic monoamines revealed by microdialysis in rats. *Brain Res Bull.* 1994;33(3):289–97.
30. Martín-Cora FJ, Fornal CA, Metzler CW, Jacobs BL. 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.* 2002 Aug;16(4):722–34.
31. Chaput Y, de Montigny C, Blier P. 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.* 1986 Aug;333(4):342–8.
32. Czachura JF, Rasmussen K. 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.* 2000 Sep;362(3):266–75.
33. Liu R-J, Lambe EK, Aghajanian GK. Somatodendritic autoreceptor regulation of serotonergic neurons: dependence on L-tryptophan and tryptophan hydroxylase-activating kinases. *Eur J Neurosci.* 2005 Feb;21(4):945–58.
34. Craven R, Grahame-Smith D, Newberry N. WAY-100635 and GR127935: effects on 5-hydroxytryptamine-containing neurones. *Eur J Pharmacol.* 1994 Dec 12;271(1):R1-3.
35. Fletcher A, Forster EA, Bill DJ, Brown G, Cliffe IA, Hartley JE, et al. Electrophysiological, biochemical, neurohormonal and behavioural studies with WAY-100635, a potent, selective and silent 5-HT_{1A} receptor antagonist. *Behav Brain Res.* 1996;73(1–2):337–53.
36. Johnson DA, Gartside SE, Ingram CD. 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.* 2002 Nov;43(6):959–65.
37. Deryabina IB, Andrianov VV, Muranova LN, Bogodvid TK, Gainutdinov KL. Effects of Tryptophan Hydroxylase Blockade by P-Chlorophenylalanine on Contextual Memory Reconsolidation after Training of Different Intensity. *Int J Mol Sci.* 2020 Mar 18;21(6).
38. Johnson PL, Molosh A, Fitz SD, Arendt D, Deehan GA, Federici LM, et al. Pharmacological depletion of serotonin in the basolateral amygdala complex reduces anxiety and disrupts fear conditioning. *Pharmacol Biochem Behav.* 2015 Nov;138:174–9.
39. Insel T, Cuthbert B, Garvey M, Heinssen R, Pine DS, Quinn K, et al. Research domain criteria (RDoC): toward a new classification framework for research on mental disorders. *Am J Psychiatry.* 2010 Jul;167(7):748–51.

40. Sharma S, Fulton S. Diet-induced obesity promotes depressive-like behaviour that is associated with neural adaptations in brain reward circuitry. *Int J Obes*. 2013;37(3):382.
41. Liu Z, Patil IY, Jiang T, Sancheti H, Walsh JP, Stiles BL, et al. High-fat diet induces hepatic insulin resistance and impairment of synaptic plasticity. *PloS One*. 2015;10(5):e0128274.
42. Kothari V, Luo Y, Tornabene T, O'Neill AM, Greene MW, Geetha T, et al. High fat diet induces brain insulin resistance and cognitive impairment in mice. *Biochim Biophys Acta Mol Basis Dis*. 2017 Feb;1863(2):499–508.
43. Trivedi MH, Rush AJ, Wisniewski SR, Nierenberg AA, Warden D, Ritz L, et al. Evaluation of Outcomes With Citalopram for Depression Using Measurement-Based Care in STAR*D: Implications for Clinical Practice. *Am J Psychiatry*. 2006 Jan 1;163(1):28–40.
44. Blier P, Ward H. Toward optimal treatments for major depression. *CNS Spectr*. 2002 Feb;7(2):148–50, 153–4.
45. Poggini S, Golia MT, Alboni S, Milior G, Sciarria LP, Viglione A, et al. Combined Fluoxetine and Metformin Treatment Potentiates Antidepressant Efficacy Increasing IGF2 Expression in the Dorsal Hippocampus. *Neural Plast*. 2019 Jan 21;2019:1–12.
46. Chataigner M, Martin M, Lucas C, Pallet V, Layé S, Mehaignerie A, et al. Fish Hydrolysate Supplementation Containing n-3 Long Chain Polyunsaturated Fatty Acids and Peptides Prevents LPS-Induced Neuroinflammation. *Nutrients*. 2021 Mar 2;13(3):824.
47. Marsicano G, Wotjak CT, Azad SC, Bisogno T, Rammes G, Cascio MG, et al. The endogenous cannabinoid system controls extinction of aversive memories. *Nature*. 2002 Aug 1;418(6897):530–4.
48. Saucisse N, Mazier W, Simon V, Binder E, Catania C, Bellocchio L, et al. Functional heterogeneity of POMC neurons relies on mTORC1 signaling. *Cell Rep*. 2021 Oct 12;37(2):109800.

Figures legends

Figure 1: Insulin increases DR 5-HT neurons firing frequency by direct activation of insulin receptor expressed onto that neuronal population. **A.** Representative confocal image of TPH2-positive 5-HT neurons (red) and IR mRNA punctae (green) using fluorescence *in situ* hybridization. *Right panel:* magnification of the white dotted square area from left panel. Scale: 10 μ m. **B.** Pet1-cre-mCherry mice were used for patch-clamp experiments to specifically visualize fluorescent mCherry-DR 5-HT neurons. Scale: 10 μ m. **C, D.** Quantification of firing rate and representative traces of cell-attached mode recording before and after insulin (300 nM) perfusion and of DR 5-HT neurons under control condition (**C**) or during bath application of the IR inhibitor S961 (100 nM, **D**). **E-F.** Frequency of spontaneous excitatory postsynaptic currents (EPSC, **E**) or inhibitory postsynaptic currents (IPSC, **F**) onto DR 5-HT neurons before and after insulin (300 nM) perfusion. **G.** SeIRKO mice were obtained by crossing Pet1-cre-mCherry mice with IR^{lox/lox} mice allowing selective deletion of IR only in 5-HT neurons. **H.** Quantification of firing rate and representative traces of cell-attached mode recording before and after insulin (300 nM) perfusion of DR 5-HT neurons in control (*Left panel*) and in SeIRKO (*Right panel*) mice. The data are represented as mean \pm SEM. Statistics: Student's paired t-test: *p<0,05; **p<0,01.

Figure 2: Insulin decreases DR 5-HT neurons *in vivo* through a 5-HT_{1A} receptor-dependent mechanism. **A-B.** *In vivo* extracellular recordings of DR 5-HT neurons. **A.** Data are mean \pm SEM of DR 5-HT firing rate (% of baseline) in response to the intraperitoneal (i.p.) administration of insulin alone (0.75 UI, n=5 and 1.5 UI, n=14) or in combination with the 5-HT_{1A} receptor antagonist (WAY100635: 0.5 mg/kg, n=6). **B.** Examples of integrated firing histograms showing the effects of cumulative doses of insulin. In these firing rate histograms, the arrows indicate the compounds administered and the time at which the injection of the specified doses was complete. **(C-D)** *In vivo* intracerebral microdialysis in the ventral hippocampus. **(C)** Time course of the effect of cumulative doses of insulin alone (n=5) or in combination with WAY100635 (0.5 mg/kg; i.p, n=5) given at T0 on 5-HT release. **(D)** Data are means \pm SEM of Area under the curve reflecting extracellular 5-HT concentrations ([5-HT]_{ext}) over the 0-150 min post-treatment injections and expressed as percentages of basal values. Basal [5-HT]_{ext} in mice before treatment with either vehicle/insulin or WAY100635/insulin are (in fmol/20 μ l): 1.5 \pm 0.2 and 1.2 \pm 0.3, respectively. ##p<0.01 and #p<0.05: significantly

different from baseline (theoretical value of 0). ** $p < 0.01$; *** $p < 0.001$: significantly different from mice receiving insulin alone.

Figure 3: The anxiolytic like effect of intranasal insulin delivery relies on the central serotonergic system. **A-E.** Immobility time in the FST (**A**), latency to feed in the NSF (**B**), time spent in light box of the the L/D (**C**), time in the center (left panel, **D**) and locomotor activity in the OF (right panel, **D**) and time spent in the open arms of the EPM (**E**) in response to intranasal 2IU or vehicle delivery in naïve mice. **F.** Time spent in the open arms of the EPM in response to intra-DR injection of insulin (100 μ IU) or vehicle in naïve mice. **G-I.** Time spent in the open arms of the EPM in naïve mice pre-treated with PCPA (300 mg/kg/day for three consecutive days; **G**), in control and SeIRKO animals (**H**) or naïve mice pre-treated with WAY100635 (1 mg/k; **I**) in response to intranasal insulin 2IU or vehicle delivery. Data are represented as mean \pm SEM. Statistics: Student's unpaired t-test: * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$.

Figure 4: DR 5-HT neurons are insulin resistant in T2D HFD-fed mice. **A.** Pet1-cre-mCherry mice were fed a HFD for 16 weeks prior to *ex-vivo* electrophysiology experiments. Quantification of firing rate and representative trace of cell-attached mode recording before and after insulin (300 nM) perfusion of DR 5-HT. **B-C.** Time spent in the open arms of the EPM (**B**), time spent in the center of the OF (*left panel*, **C**) and locomotor activity in the OF (*right panel*, **C**) of HFD-fed mice in response to intranasal insulin 2 IU or vehicle delivery. **D-E.** Immobility time of STD- (**D**) and HFD-fed (**E**) mice in the tail suspension test in response to different treatment groups: veh (intranasal vehicle; i.p vehicle), INI (intranasal insulin 2IU; i.p vehicle), FLX (intranasal vehicle; i.p fluoxetine 18 mg/kg), INI + FLX (intranasal insulin 2IU; i.p fluoxetine 18 mg/kg). Data are represented as mean \pm SEM. Statistics: One-way ANOVA ($F_{3,26}=16,70$; $p < 0,001$); Tuckey's multiple comparisons post-hoc test: * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$. Kruskall Wallis; Dunn's multiple comparisons post-hoc test: ## $p < 0,01$; ### $p < 0,001$.

Figure 5: Schematic representation of the action of insulin onto DR 5-HT neurons in the control of emotional behaviors. **A.** At resting state, the 5-HT_{1A} autoreceptor provide a tonic inhibition to regulate DR 5-HT neurons activity. **B.** Insulin binding to IR onto DR 5-HT neurons

increases action potential firing activity and presumably extracellular 5-HT release in both projection areas and the DR through collaterals in a short timescale. **C.** Increased endogenous extracellular 5-HT levels consequently activate the autoinhibitory 5-HT_{1A} receptor resulting in a decrease in action potential firing activity and endogenous extracellular 5-HT release in an expand timescale. Such drop in 5-HT levels, in putative regions such as the amygdala, might be responsible to the anxiolysis induced by intranasal insulin administration.

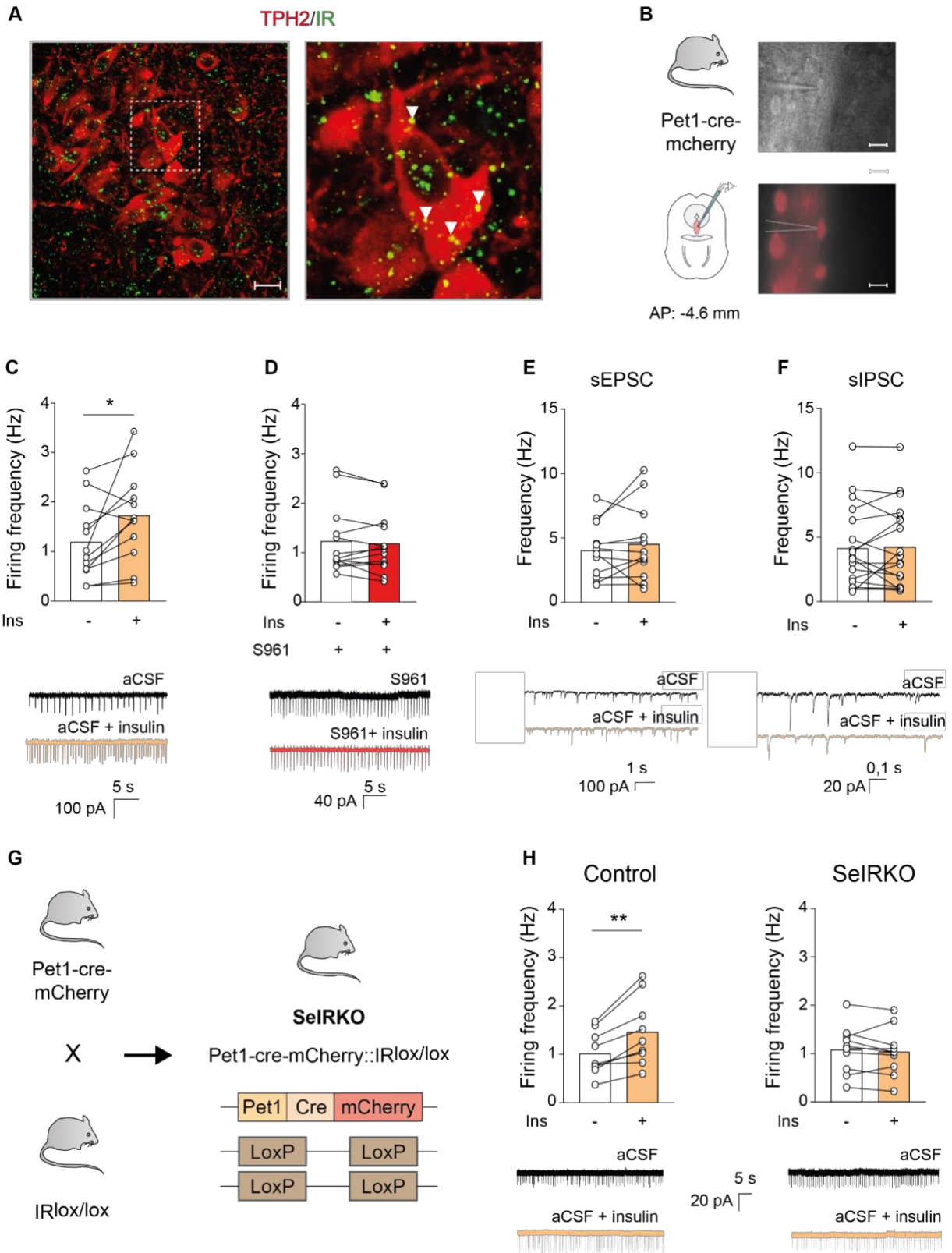


Figure 1: Insulin increases DR 5-HT neurons firing frequency by direct activation of insulin receptor

- Ins
- WAY100635 + Ins

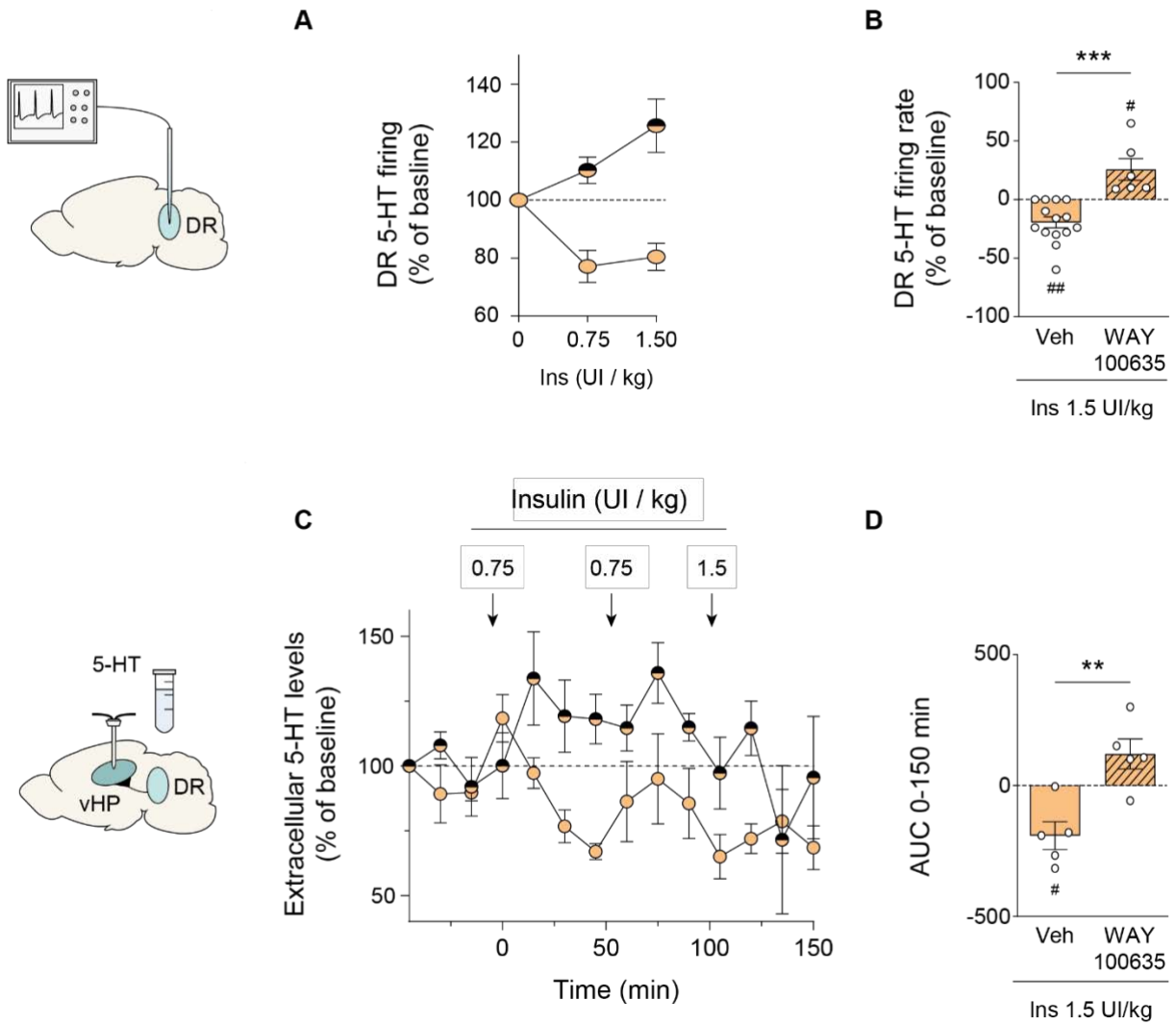


Figure 2: Insulin decreases DR 5-HT neurons activity *in vivo* through a 5-HT_{1A} receptor-dependent mechanism.

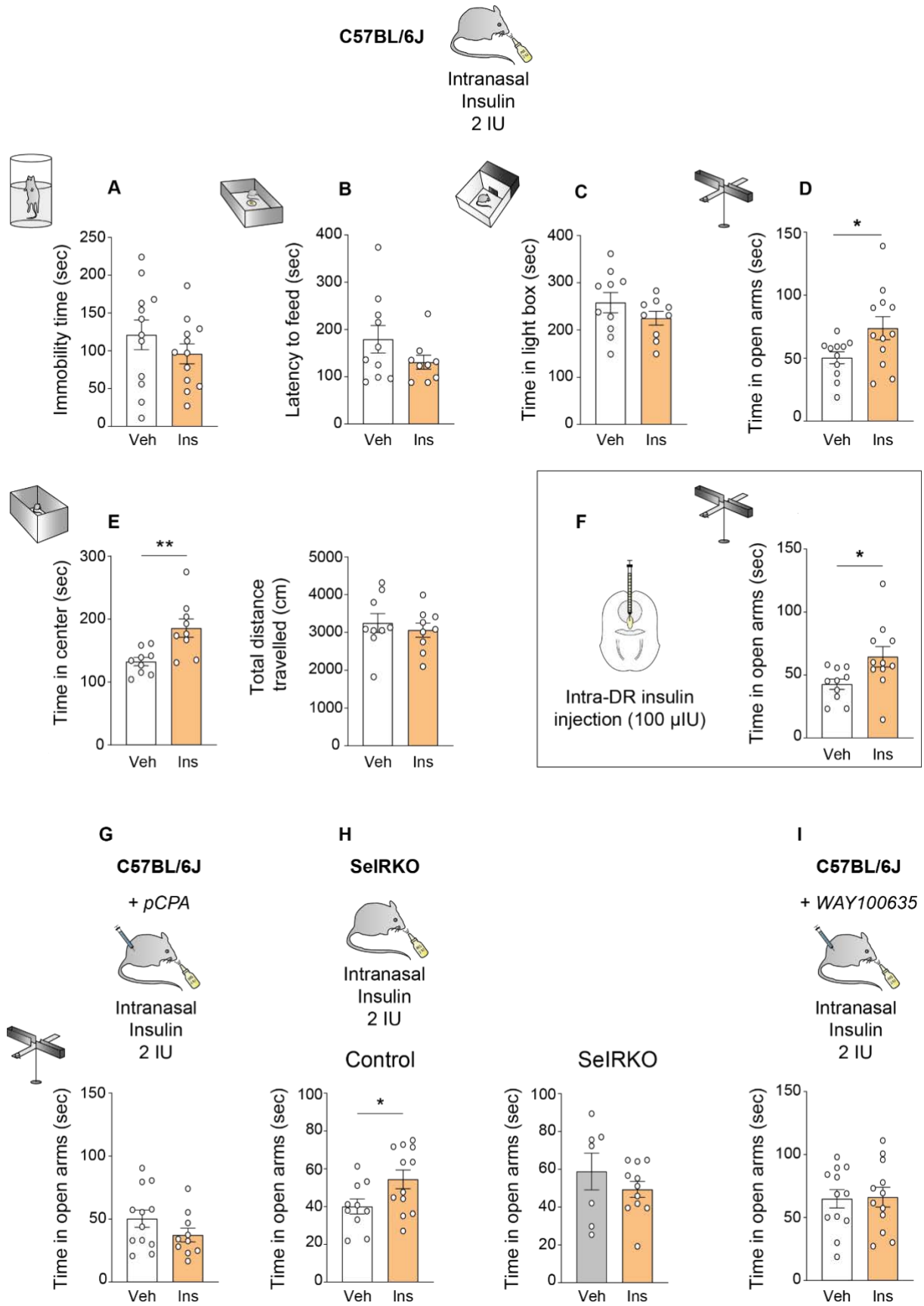


Figure 3: The anxiolytic-like effect of intranasal insulin delivery relies on the central serotonergic system.

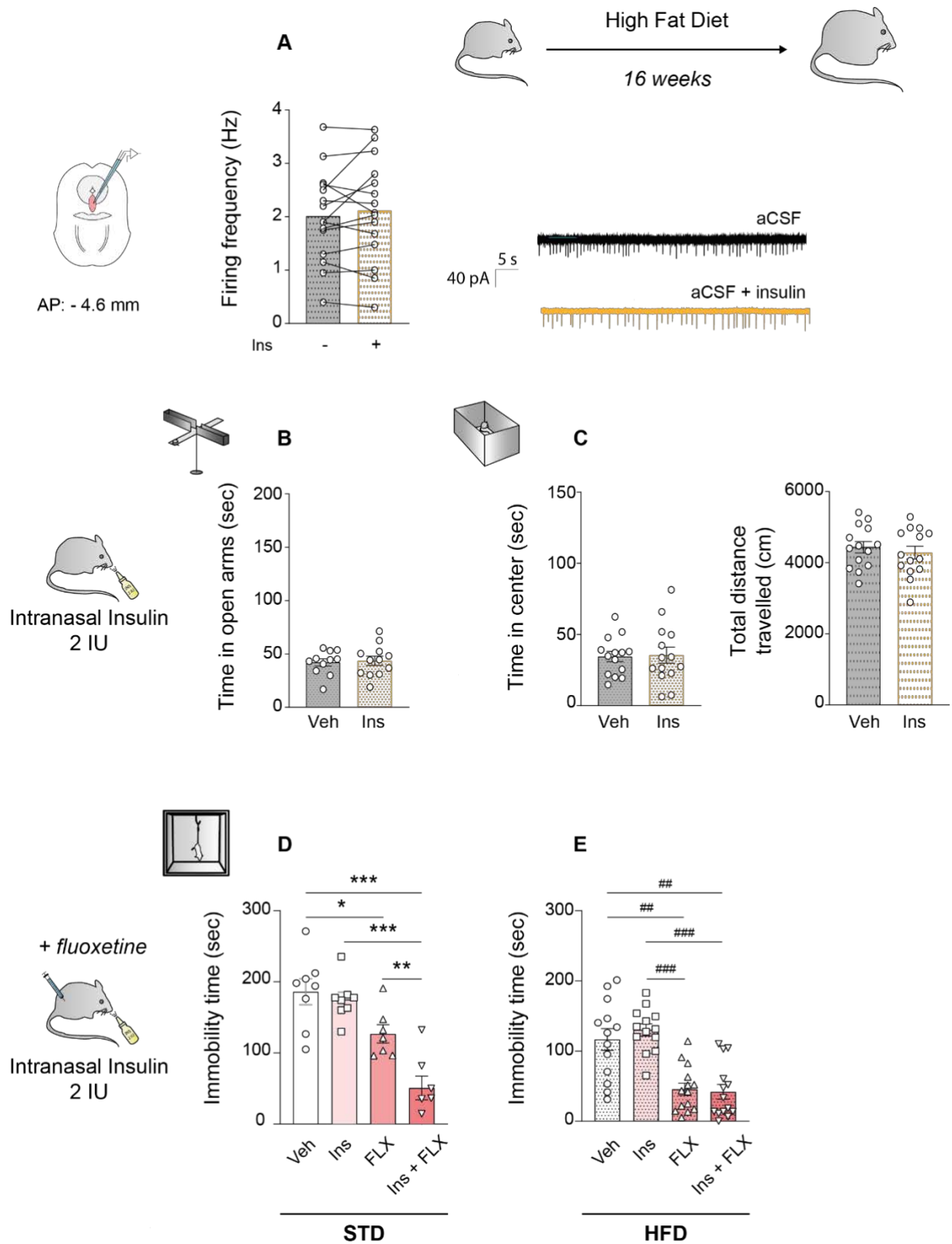


Figure 4: HFD-induced Insulin-resistance in DR 5-HT neurons hinders antidepressant response

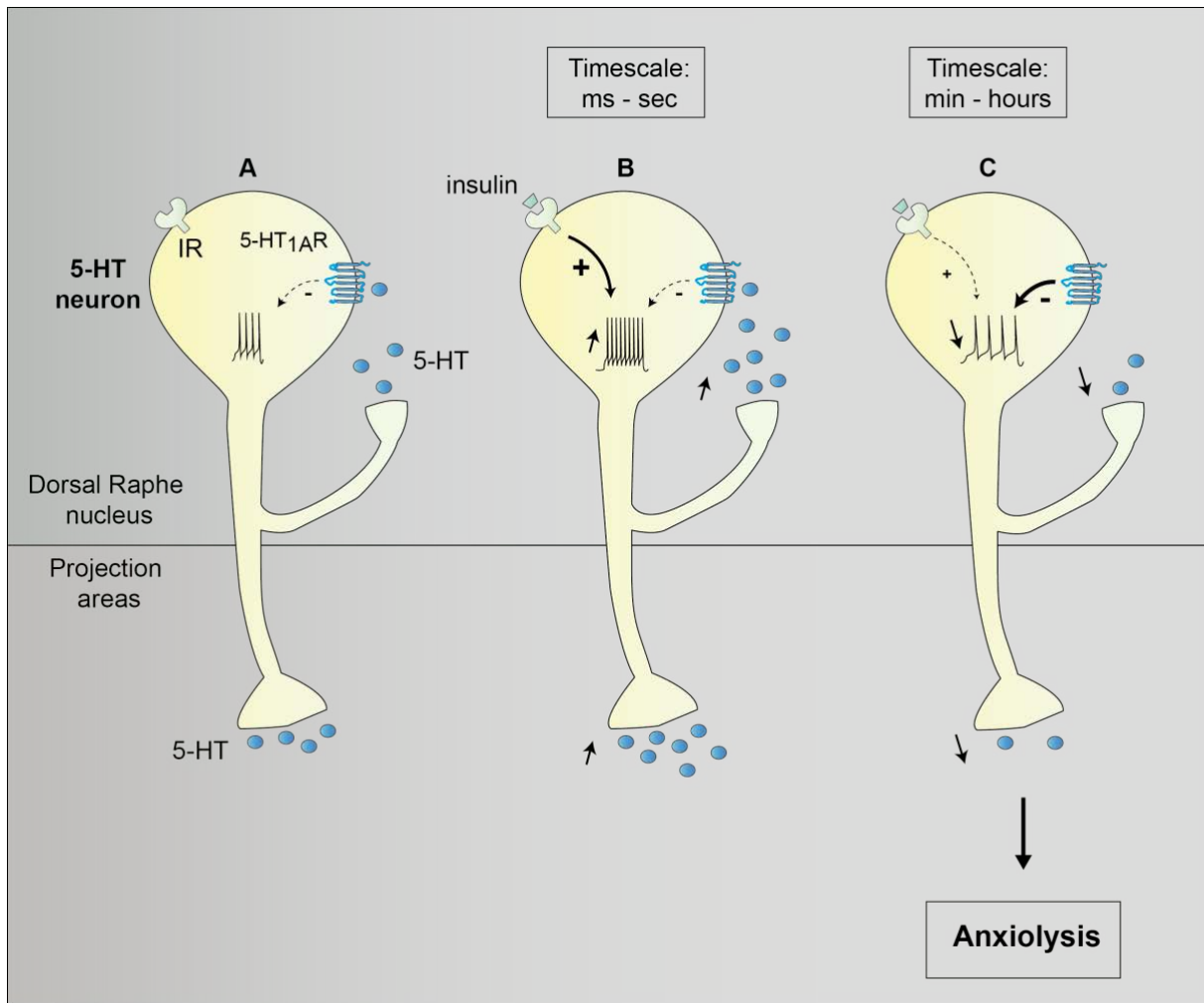
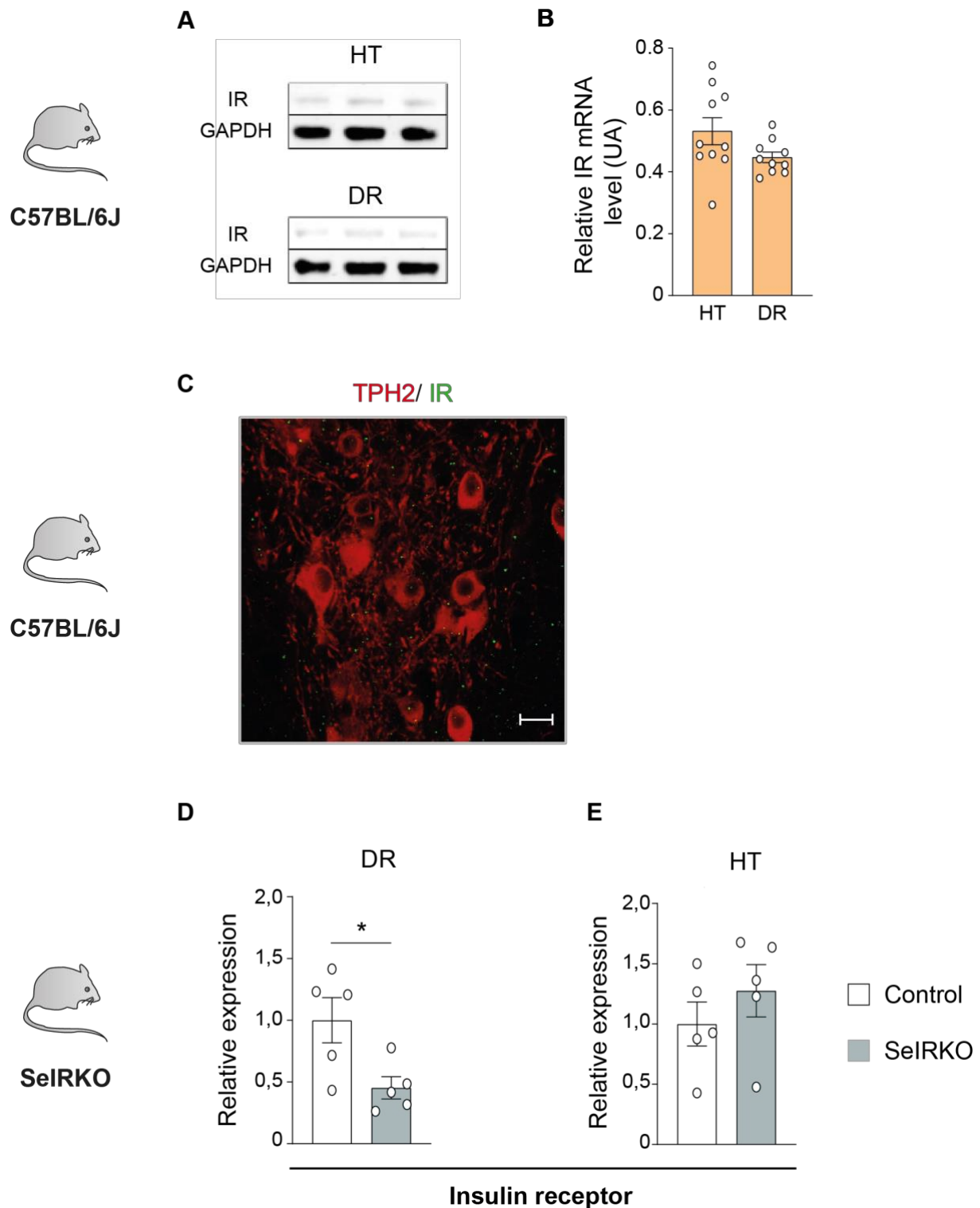


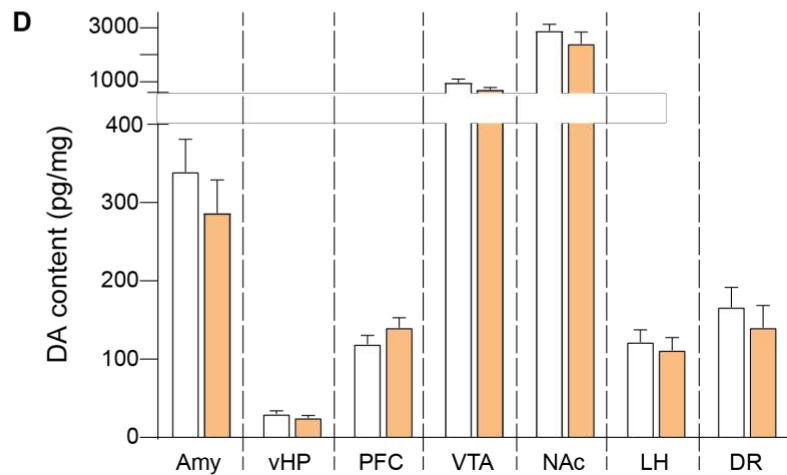
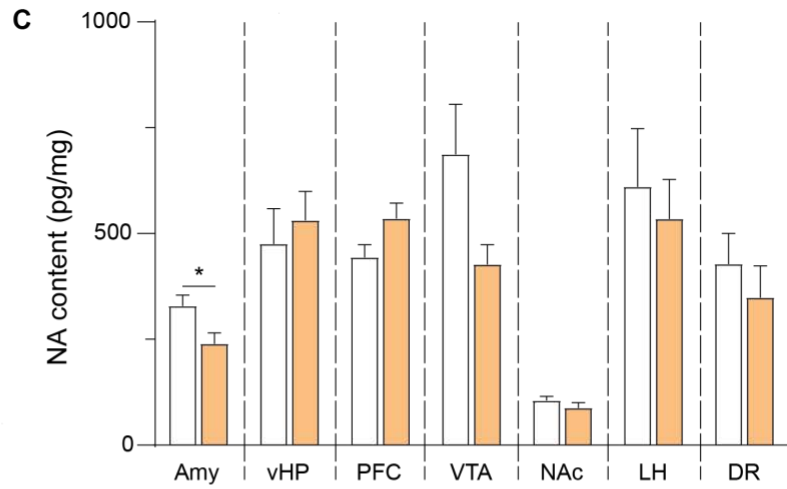
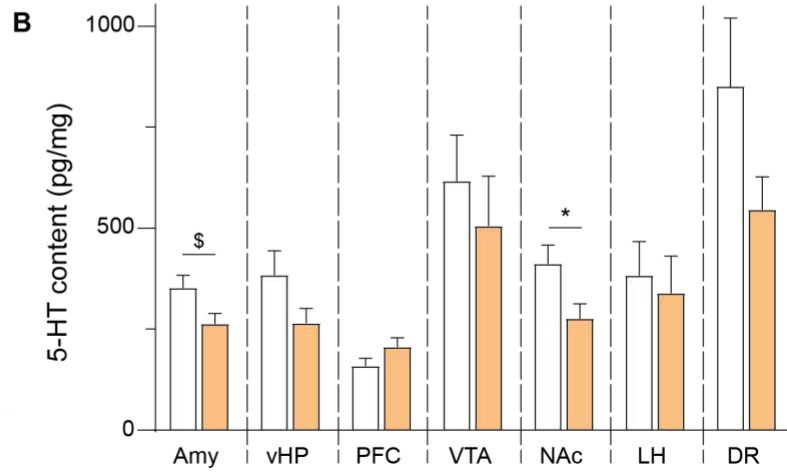
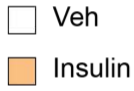
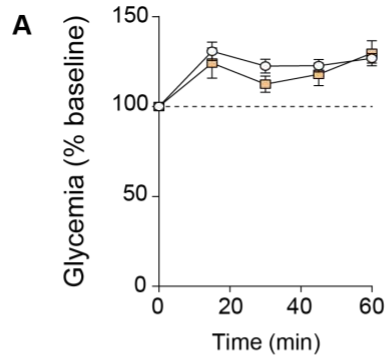
Figure 5: Schematic representation of the action of insulin onto DR 5-HT neurons in the control of emotional behaviors.

Supplementary Information

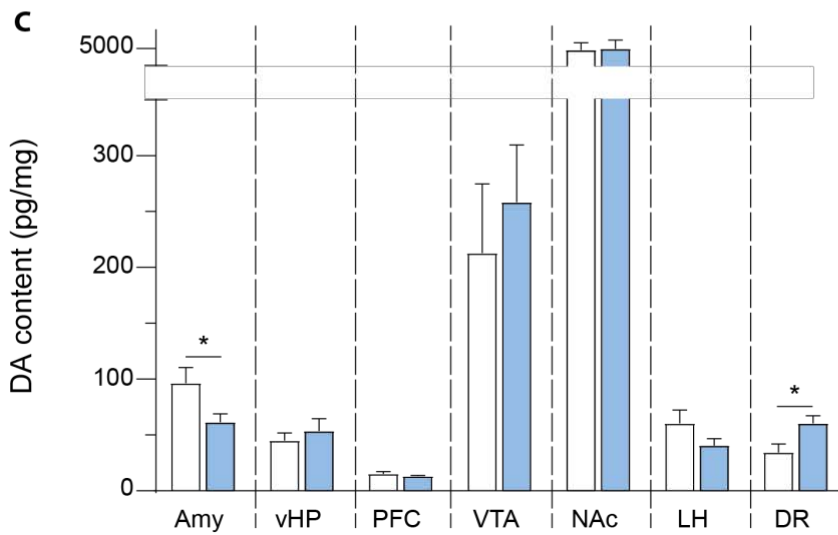
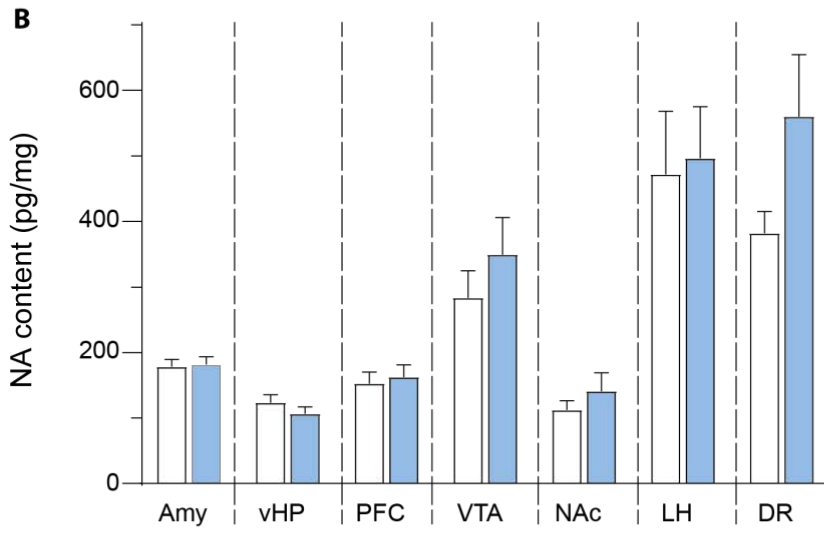
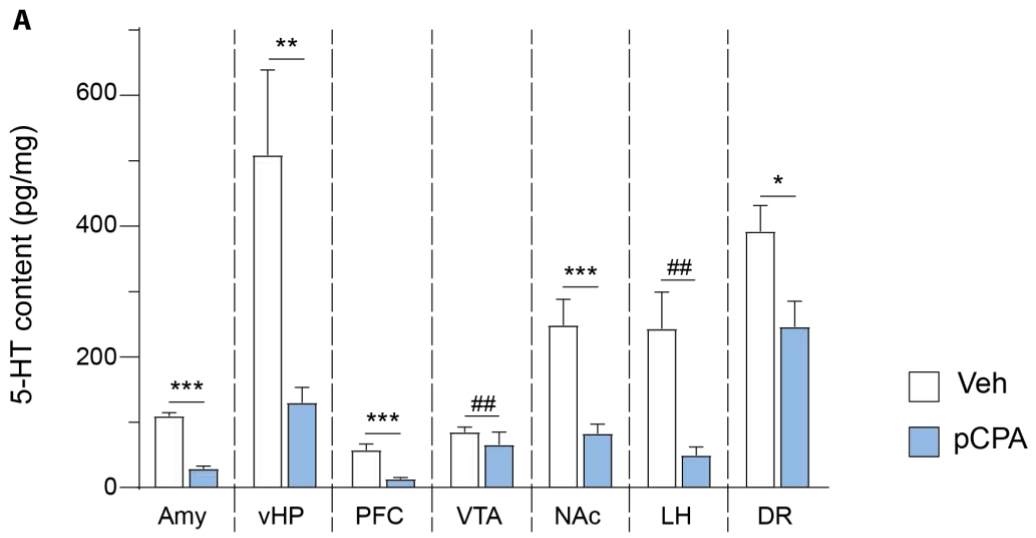


Supplementary figure 1: Expression of the IR in the DR and hypothalamus in C57BL/6J and SeIRKO mice. A-B. Representative western blot (A) and quantification of the relative mRNA level by RT-qPCR (B) of the IR in the hypothalamus (HT; control structure known to

express the IR) and the DR. **C.** Representative confocal image of TPH2-positive 5-HT neurons (red) and IR mRNA punctae (green) using fluorescence *in situ* hybridization using control sense riboprobe. Scale: 10 μ m. **D-E.** Quantitative expression of the IR in DR (**D**) and in the HT (**E**) of control and SeIRKO mice. The data are represented as mean \pm SEM. Statistics: Student's unpaired t-test: * $p < 0,05$. As expected, since 5-HT neurons represent almost 50% of the neurons present in the DR, RT-qPCR quantification show the expression of IR is reduced by half in the whole DR. As expected, since 5-HT neurons represent almost 50% of the neurons present in the DR, RT-qPCR quantification show the expression of the IR is reduced by half in the whole DR.

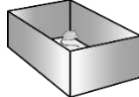
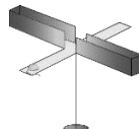

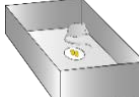
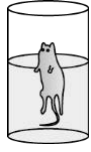



Supplementary figure 2: Effect of intranasal insulin administration on blood glucose and tissular monoamine level in different brain areas. **A.** Blood glucose (A) in response to intranasal insulin (2IU) or vehicle delivery. **B-D.** Level of tissue serotonin (5-HT, **B**), noradrenaline (NA, **C**) and dopamine (DA, **D**) content measured in different brain areas in response to intranasal insulin (2IU) or vehicle delivery (Amy: amygdala; vHP: ventral hippocampus; PFC: prefrontal cortex; VTA: ventral tegmental area; NAc: nucleus accumbens; LH: lateral hypothalamus; DR: dorsal raphe). The data are represented as mean \pm SEM. Statistics: Student's unpaired t-test: * $p \leq 0,05$; \$ $p = 0,05$.



Supplementary figure 3: Tissue monoamine level in different brain areas in response to pCPA injection. Tissue level of serotonin (5-HT; **A**), noradrenaline (NA; **B**) and dopamine (DA; **C**) measured in different brain areas (Amy: amygdala; vHP: ventral hippocampus; PFC: prefrontal cortex; VTA: ventral tegmental area; NAc: nucleus accumbens; LH: lateral hypothalamus; DR: dorsal raphe) following subchronic pCPA treatment (300 mg/kg/day over three consecutive days prior to testing). The data are represented as mean \pm SEM. Statistics: Student's unpaired t-test: * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$. Mann-Whitney test: ## $p < 0,01$.

Supplementary table 1. Protocol of behavioural tests

Test	Pictogram	Concept	Duration	Outcome measured
Open field (OF)		OF test was performed in 40x40 cm white wood boxes to assess anxiety-like behavior	10 min	1- Time spent in the center 2- Locomotor activity
Elevated Plus Maze (EPM)		EPM test was performed in an apparatus elevated to 120 cm from the floor, including two 35 cm length and 5cm wide open arms and two closed arms with same dimensions and surrounded with 15 cm high wall. Assessment of anxiety-like behavior	5 min	Time spent in the open arms
Dark/light box (D/L)		The dark-light box is divided in a light compartment (60% of the apparatus) and a dark compartment. Assessment of anxiety-like behavior	8 min	Time spent in light box
Novelty Suppressed Feeding test (NSF)		NSF was performed in the open field apparatus (40x40 cm) coated with litter where a food pellet on a white square filter paper is placed at the center of the arena under a bright light (~60W). Mice are first food deprived for 24 hours with free access to water ad libitum. Assessment of anxiety-like behaviour relying on hyponeophagia	cut-off: 10 min	Latency to feed
Forced Swim test (FST)		The FST was carried out using a Plexiglas cylinder tank fill with water (26 \pm 1°C) in a manner that the mouse cannot reach the floor with its tail. Assessment of despair-like behavior	6 min	Immobility time
Tail suspension test (TST)		TST was performed using BIOSEB's tail suspension test apparatus. Power and energy expended by mice movements were measure to ensure the absence of any locomotor bias. Assessment of despair-like behavior	6 min	Immobility time

Supplementary table 2. Detailed methods

Method	Description
Quantitative real-time RT-qPCR	<p>The expression of the different genes of interest was evaluated by real-time quantitative PCR as described by Chataigner et al. (46). These analyses were performed on dorsal raphe nucleus and hypothalamus. Briefly, total RNAs were extracted from dorsal raphe nucleus and hypothalamus using TRIzol (Invitrogen, Life Technologies, Saint Aubin, France). The purity and quantity of RNA for each sample were measured by spectrophotometry (Nanodrop, Life technologies, Saint Aubin, France). One microgram of RNA were reverse transcribed into complementary DNA (cDNA) using Superscript III (Invitrogen, Life Technologies, Saint Aubin, France). Specific primers for the insulin receptor (InsR – F: 5'- CGAGTGCCCGTCTGGCTATA-3'; R: 5'-GGCAGGGTCCCAGACATG-3') and 18S (F: 5'-ACCGCAGCTAGGAATAATGGA-3'; R: 5'-GCCTCAGTTCGAAAACCAA-3') were designed using PrimerBlast (NCBI, Bethesda, MD) and purchased from Eurogentec (Eurogentec, Seraing, Belgium). 18S was used as housekeeping gene. Specificity of the primers was confirmed by nucleotide BLAST (NCBI, Bethesda, MD). The protocol of quantitative real-time PCR was as following: 3µL of cDNA (2.5ng/µL), 5µL of SYBR Green (Takara, Ozyme, Saint-Cyr-l'Ecole, France), 1.4µL of RNase free water, and 0.6µL of target primer were mixed together. Fluorescence was determined on a LightCycler® 480 instrument II (Roche, La Rochelle, France). Data were analyzed using the comparative threshold cycle (Ct) method and results were expressed as relative fold change to control target mRNA expression.</p>
Western blot analysis	<p>"Mice were euthanized by cervical dislocation. Brains were rapidly removed, and dissected to isolate the hippocampus, and the dorsal raphe. Tissues were immediately frozen on dry ice and kept at -80°C until used. Total proteins were extracted by homogenizing the tissue with ice-cold Laemmli sample buffer (Sigma-Aldrich) and heated at 70°C for 10 minutes. Tissue homogenates were sonicated and boiled at 100°C for 5 minutes to inactivate proteases. The homogenates were centrifuged at 13 000 rpm for 5 minutes and supernatants collected. Protein concentration was determined (RC-DC protein assay, BioRad Laboratories, CA) and aliquots were stored at -80°C until used. For immunoblotting, 20 µg of total proteins were resolved onto NuPAGE Novex 10% Bis-Tris gel (Thermo Fisher Scientific Inc.) and separated by electrophoresis. Proteins were transferred from the gel to nitrocellulose membrane (Amersham, NJ, USA) in semi-dry conditions (Trans-Blot SD Semi-Dry Transfer Cell, BioRad). Membranes were blocked by incubation in PBS-T (Phosphate-Buffered Saline with 0.01% Tween-20) containing 5% non-fat milk for 1 hour at room temperature, and then were further incubated overnight at 4 °C in primary antibodies diluted in the blocking solution: mouse anti-insulin receptorβ(1:500; SantaCruz Biotechnology); rabbit anti-IR at tyrosine phosphorylation (p-IR Tyr1162/1163; 1:1000; Santa Cruz Biotechnology); rabbit anti-Akt/PKB (1:1000, Santa Cruz Biotechnology) rabbit anti-Phospho-Akt</p>

	<p>at serine 473 (1:200; Santa Cruz Biotechnology); mouse anti-GSK3β(1:500; Santa Cruz Biotechnology); rabbit anti-Phospho-GSK3β(1:500; Cell Signaling Technology) and rabbit anti-GAPDH (1:20000; Abcam). Membranes were washed with PBS-T and incubated for 1 hour with goat anti-mouse IRDye 680RD (1:10000; Odyssey, LI-COR) or goat anti-rabbit IRDye 800CW (1:10 000; Odyssey, LI-COR). Immunolabeled protein bands were visualized using LI-COR Odyssey® scanner and software (LI-COR Biosciences). Signal quantification was performed using ImageJ software. Scanned images were converted to 8-bit pictures and presented in the figures. Data are expressed as mean percentage (\pm SEM) normalized by the total level of protein in arbitrary unit. GAPDH was used for normalization for equal loading control"</p>
<p>FISH for IR combined with IHC for TPH2</p>	<p>Digoxigenin-labeled riboprobe against mouse Insr (IR-DIG, Allen Brain Atlas, #RP_050503_02_H08) was prepared as in (47). Pre-treatments, hybridization and post-hybridization washes were performed as in (48), after which sections were blocked in "TNB" blocking buffer (#FP1012; Akoya Biosciences, Marlborough, MA, USA) for 1 h and incubated for 2 h in sheep anti-DIG-POD antibody (#11207733910; Roche) diluted 1:1000 in TNB. Endogenous biotins were blocked using Avidin/Biotin blocking kit (#SP-2001; Vector Laboratories, Burlingame, CA, USA), after which sections were incubated overnight at 4°C in rabbit anti-TPH2 antibody (#PA1-778; Invitrogen, Waltham, MA, USA), diluted 1:500 in [PBS + 0.3 % Triton X-100]. The next day, sections were incubated for 30 min in Biotin-Tyramide (#FP1441, Akoya Biosciences) diluted 1:100 in 1 X Plus amplification diluent (#FP1498, Akoya Biosciences), then 1 h in streptavidin-HRP (#TS-000300, Akoya Biosciences) diluted 1:1000 in [PBS + 0.1 % Tween-20]. IR-DIG probes were revealed using Cy3-Tyramide (#TS-000202, Akoya Biosciences), diluted 1:100 in 1 X Plus amplification diluent for 30 min. After peroxidases quenching with 3% H₂O₂ diluted in PBS for 30 min, sections were incubated for 2 h in goat anti-rabbit-AF647 secondary antibody (#4414, Cell Signaling, Danvers, MA, USA) diluted 1:500 in [PBS + 0.3 % Triton X-100]. Sections were finally rinsed 3 times in 50 mM Tris-HCl (pH = 7.5) and mounted with ProLong Gold antifade reagent (#P36930, Invitrogen).</p>
<p>Tissue sampling and high-pressure liquid chromatography coupled to electrochemical detection (HPLC-ECD)</p>	<p>Briefly, using a cryostat set at -24°C, bilateral punches of discrete regions (supplementary Fig. S2 and S3) were made with stainless steel cannulae of 800-1200 μm inner diameter and stored at -80°C. Tissues were homogenized in 100μL of 0.1N HClO₄ and centrifuged at 13,000 rpm for 30 min at 4°C. Aliquots (10–20 μL) of the supernatants were injected into the HPLC column (Hypersyl C18, 150 x 4.6 mm, 5 mm). The mobile phase, delivered at 1.2 ml/min flow rate, was as follows (in mM): 60 NaH₂PO₄ , 0.1 disodium EDTA, and 2 octane sulfonic acid plus 7% methanol, adjusted to pH 3.9 with orthophosphoric acid and filtered through a 0.22 μm filter. Detection of noradrenaline (NA),</p>

	<p>dopamine (DA) and serotonin (5-HT) was performed with a coulometric detector (CoulchemII, ESA, Paris, France) coupled a dual-electrode analytic cell (model 5011). The potential of the electrodes was set at +350 and -270 mV. Limit of detection varied from 2pg for DA to 15 pg for HVA. Results are expressed as picogram per milligram of tissue, and each value is the mean \pm SEM.</p>
--	--

Supplementary table 3 : Statistical tests used.

Data	Statistical analysis	n	Outcome measure	P Value
Figure 1				
1C	Paired t-test	Before/after insulin: 12	DR 5-HT firing frequency	t=2,522; p=0,0284
1D	Wilcoxon matched-pairs signed rank test	Before/after insulin: 13	DR 5-HT firing frequency	W=-25,00; p=0,4041
1E	Paired t-test	Before/after insulin: 12	sEPCS frequency	t=0.9669; p=0.3544
1F	Wilcoxon matched-pairs signed rank test	Before/after insulin: 18	sIPCS frequency	W=0,000; p>0.9999
1H (left)	Paired t-test	Before/after insulin: 9	DR 5-HT firing frequency	t=4,435; p=0,0022
1H (right)	Paired t-test	Before/after insulin: 10	DR 5-HT firing frequency	t=0,814; p=0,4220
Figure 2				
2B	Unpaired t-test	Ins :14 Ins+WAY100635 :6	DR 5-HT firing frequency (%)	t=4,874; p=0,001
2B	One sample t-test compared to hypothetical value (0)	Ins: 14 Ins+WAY100635: 6	baseline	p=0.0010 (Ins) p=0.0388 (Ins+WAY100635)
2D	Unpaired t-test	Ins: 5 Ins+WAY100635: 5	AUC [5-HT]ext	t=3,615; p=0,0068
	One sample t-test compared to hypothetical value (0)	Ins: Ins+WAY100635:	(% baseline)	p=0.022 (Ins) p=0.11 (Ins+WAY100635)
Figure 3				
3A	Unpaired t-test	Veh: 12 INI 2IU: 12	TST: immobility time	t=1.066; p=0.2980
3B	Unpaired t-test	Veh: 10 INI 2IU: 9	NSF: latency to feed	t=1,438; p=0,1686
3C	Unpaired t-test	Veh: 10 INI 2IU: 9	L/D: time in light box	t=1,243; p=0,2306

3D	Unpaired t-test	Veh: 10 INI 2IU: 12	EPM: time in open arms	t=2,203; p=0,0395
3E (left)	Unpaired t-test	Veh: 9 INI 2IU: 9	OF: time in center	t=3,310; p=0,0044
3E (right)	Unpaired t-test	Veh: 9 INI 2IU: 9	OF: total distance	t=0,6055; p=0,5534
3F	Unpaired t-test	Veh: 10 INI 2IU: 11	EPM: time in open arms	t=2.324; p=0.0313
3G	Unpaired t-test	Veh: 12 INI 2IU: 10	EPM: time in open arms	t=1,442; p=0,1648
3H (left)	Unpaired t-test	Veh: 10 INI 2IU: 12	EPM: time in open arms	t=2,195; p=0,0401
3H (right)	Unpaired t-test	Veh: 7 INI 2IU: 11	EPM: time in open arms	t=1,017; p=0,3243
3I	Unpaired t-test	Veh: 11 INI 2IU: 12	EPM: time in open arms	t=0,2778; p=0,7840
Figure 4				
4A	Paired t-test	Before/after insulin: 15	DR 5-HT firing frequency	t=0,9890 ; p=0,3395
4B	Unpaired t-test	Veh: 11 INI 2IU: 12	EPM: time in open arms	t=0,2742; p=0,7866
4C (left)	Unpaired t-test	Veh: 14 INI 2IU: 14	OF: time in center	t=0,1523; p=0,8801
4C (right)	Unpaired t-test	Veh: 14 INI 2IU: 14	OF: total distance	t=0,6409; p=0,5272
Figure 5				
5A	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
5B	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
Supplementary figure 1				
S1B	Unpaired t-test	HT: 10 DR: 10	IR mRNA expression in DR vs HT	t=1.796; p=0.0893
S1D	Unpaired t-test	5-HT ^{IR-WT} : 5 5-HT ^{IR-KO} : 5	IR mRNA expression in DR	t=2,682; p=0,0278
S1E	Unpaired t-test	5-HT ^{IR-WT} : 5 5-HT ^{IR-KO} : 5	IR mRNA expression in HT	t=0,9737; p=0,3587
Supplementary figure 2				
S2A	Two-way RM ANOVA	Veh: 6 INI 2IU: 6	Fasting glycemia	F (4,40)=0,8293; p=0,5145
S2B	Unpaired t-test	Veh: 7 INI 2IU: 7	5-HT content in amygdala	t=2,163; p=0,0514
	Unpaired t-test	Veh: 7 INI 2IU: 6	5-HT content in vHP	t=1,633; p=0,1307
	Unpaired t-test	Veh: 7 INI 2IU: 6	5-HT content in PFC	t=1,142; p=0,2778
	Unpaired t-test	Veh: 6 INI 2IU: 7	5-HT content in VTA	t=0.6562; p=0.5252
	Unpaired t-test	Veh: 6 INI 2IU: 7	5-HT content in NAc	t=2,317; p=0,0408

	Unpaired t-test	Veh: 7 INI 2IU: 7	5-HT content in LH	t=0.3540; p=0.7295
	Unpaired t-test	Veh: 7 INI 2IU: 6	5-HT content in DR	t=1,521; p=0,1564
S2C	Unpaired t-test	Veh: 7 INI 2IU: 7	NA content in amygdala	t=2.476; p=0.0292
	Unpaired t-test	Veh: 7 INI 2IU: 6	NA content in vHP	t=0.5123; p=0.6185
	Unpaired t-test	Veh: 7 INI 2IU: 7	NA content in PFC	t=1.964; p=0.0732
	Unpaired t-test	Veh: 7 INI 2IU: 6	NA content in VTA	t=1.917; p=0.0815
	Unpaired t-test	Veh: 5 INI 2IU: 7	NA content in NAc	t=0.9759; p=0.3521
	Unpaired t-test	Veh: 7 INI 2IU: 7	NA content in LH	t=0.4558; p=0.6567
	Mann-Whitney test	Veh: 7 INI 2IU: 6	NA content in DR	U=18; p=0.4557
S2D	Unpaired t-test	Veh: 6 INI 2IU: 7	DA content in amygdala	t=0.8821; p=0.3966
	Unpaired t-test	Veh: 5 INI 2IU: 7	DA content in vHP	t=1.052; p=0.3175
	Unpaired t-test	Veh: 7 INI 2IU: 7	DA content in PFC	t=1.265; p=0.2298
	Unpaired t-test	Veh: 6 INI 2IU: 7	DA content in VTA	t=1.756; p=0.1069
	Unpaired t-test	Veh: 6 INI 2IU: 7	DA content in NAc	t=0.9336; p=0.3706
	Unpaired t-test	Veh: 5 INI 2IU: 7	DA content in LH	t=0.4541; p=0.6595
	Mann-Whitney test	Veh: 7 INI 2IU: 7	DA content in DR	U=17.50; p=0.4021
Supplementary figure 3				
S3A	Unpaired t-test	Veh: 6 pCPA: 10	5-HT content in amygdala	t=11,82; p<0,0001

	Unpaired t-test	Veh: 6 pCPA: 9	5-HT content in vHP	t=3,509; p=0,0038
	Unpaired t-test	Veh: 7 pCPA: 9	5-HT content in PFC	t=5,048; p=0,0002
	Mann-Whitney test	Veh: 7 pCPA: 8	5-HT content in VTA	U=4; p=0,0037
	Unpaired t-test	Veh: 6 pCPA: 9	5-HT content in NAc	t=4,538; p=0,0006
	Mann-Whitney test	Veh: 7 pCPA: 9	5-HT content in LH	U=6; p=0,0052
	Mann-Whitney test	Veh: 6 pCPA: 10	5-HT content in DR	U=9; p=0,0225
S3B	Unpaired t-test	Veh: 6 pCPA: 10	NA content in amygdala	t=0.2145; p=0.8332
	Mann-Whitney test	Veh: 6 pCPA: 9	NA content in vHP	U=19; p=0.3884
	T-test	Veh: 7 pCPA: 10	NA content in PFC	t=0.3540; p=0.7283
	Mann-Whitney test	Veh: 7 pCPA: 9	NA content in VTA	U=22; p=0.3510
	Mann-Whitney test	Veh: 7 pCPA: 9	NA content in NAc	U=28; p=0.7577
	T-test	Veh: 7 pCPA: 9	NA content in LH	t=0.1970; p=0.8467
	T-test	Veh: 6 pCPA: 10	NA content in DR	t=1.401; p=0.1830
	S3C	T-test	Veh: 6 pCPA: 10	DA content in amygdala
T-test		Veh: 6 pCPA: 8	DA content in vHP	t=0.1885; p=0.8536
T-test		Veh: 7 pCPA: 9	DA content in PFC	t=1.025; p=0.3227
Mann-Whitney test		Veh: 7 pCPA: 9	DA content in VTA	U=26; p=0.6065
T-test		Veh: 7 pCPA: 9	DA content in NAc	t=0.1072; p=0.9162

	Mann-Whitney test	Veh: 7 pCPA: 9	DA content in LH	t=1.573; p=0.1380
	T-test	Veh: 6 pCPA: 10	DA content in DR	t=2.412; p=0.0302

Partie 2 : Modulations négatives du système de l'insuline : impacts métaboliques et neurocomportementaux

Notre groupe ayant préalablement caractérisé le modèle HFD comme modèle de diabète insulino-résistant induisant des comportements anxio-dépressifs (Zemdegs et al., 2016), nous avons décidé d'utiliser au cours de ces travaux le modèle STZ afin d'analyser l'impact d'une insulino-pénie sur le système sérotoninergique et les comportements associés. Celui-ci a pour avantage de s'affranchir du caractère obésogène et de modéliser une diminution de la signalisation de l'insuline sans induire d'insulino-résistance à proprement-dite, mimant ainsi un DT1. La validation du phénotype métabolique induit par la STZ est présentée en **Figure 31**. On remarque une diminution d'environ 50% des taux plasmatiques d'insuline chez les souris STZ accompagnée d'une hyperglycémie (**Figures 31B et 31C**). Au cours du test de tolérance à l'insuline, on peut noter que les souris STZ régulent correctement leur glycémie puisque les valeurs finales rejoignent celles du groupe contrôle (**Figure 31D**). En revanche, leur poids est significativement inférieur au groupe contrôle dès le deuxième jour suivant l'injection de STZ (**Figure 31E**).

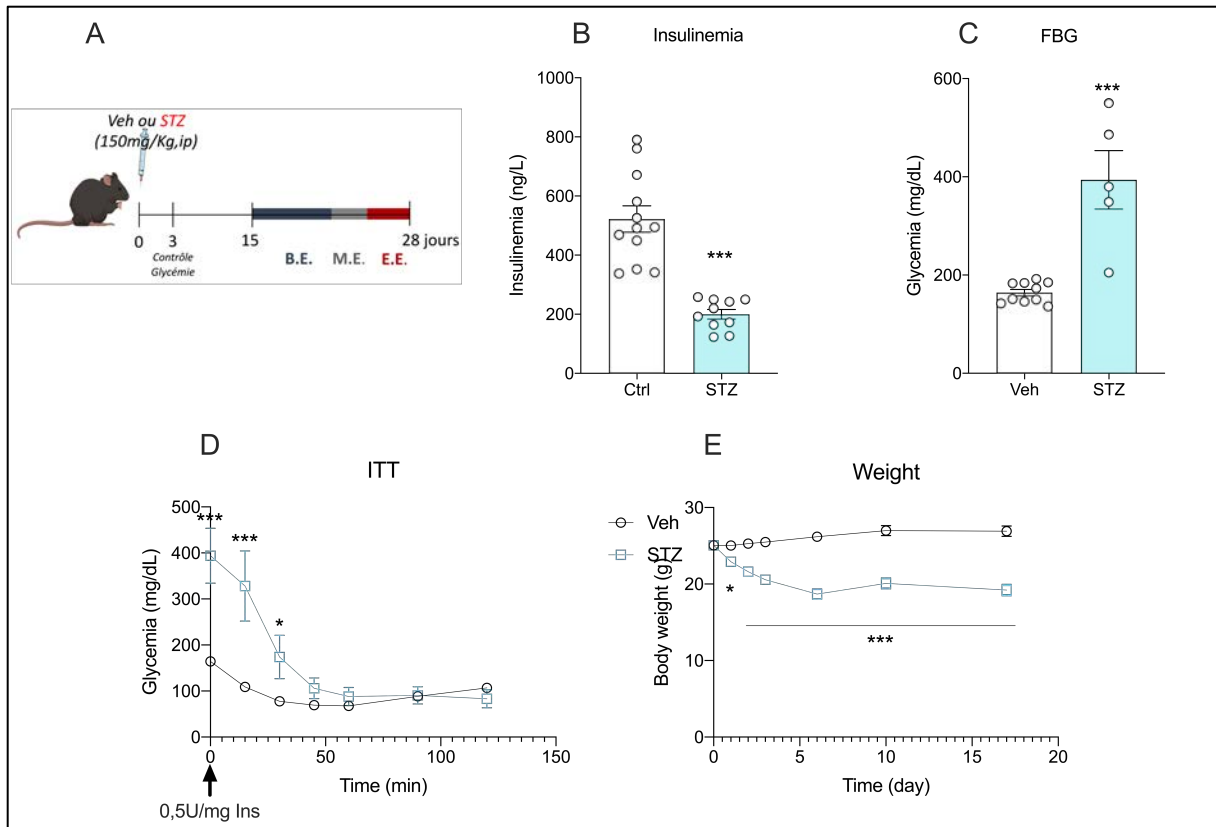


Figure 31. Validation métabolique du modèle STZ chez la souris C57Bl/6. (A) Schéma du protocole expérimental. BE = behavioral experiments, ME = metabolic experiments, EE = electrophysiology experiments. (B) Insulinémie à jeun en ng/L. T-test $p < 0,001$. (C) Glycémie à jeun en mg/dL. T-test $p < 0,001$. (D) Test de tolérance à l'insuline représenté par l'évolution de la glycémie (mg/dL) au cours du temps (min). 2-way ANOVA : interaction $F(6, 78) = 25,49$ $p < 0,001$; time $F(6, 78) = 58,57$ $p < 0,001$ et traitement $F(1, 13) = 11,6$ $p = 0,046$. Des tests de comparaison de Sidak ont été réalisés pour chaque temps. (E) Évolution du poids au cours du temps à partir de l'injection de STZ (g). Modèle mixte (en raison de valeurs manquantes suite au sacrifice de certains animaux) : interaction $F(6, 104) = 36,32$ $p < 0,001$; time $F(2.164, 37.52) = 12,37$ $p < 0,001$ et traitement $F(1, 18) = 58,26$ $p < 0,001$. Des tests de comparaison de Sidak ont été réalisés pour chaque temps. Les résultats sont représentés par la moyenne \pm SEM. * $p < 0,05$ et *** $p < 0,001$ significativement différent du groupe véhicule.

L'analyse électrophysiologique des neurones 5-HT du DRN des souris STZ a permis d'appréhender les effets d'une diminution drastique des taux plasmatiques d'insuline sur ce système **Figure 32**. On remarque que le taux de décharge des neurones 5-HT du DRN est significativement réduit chez les souris STZ.

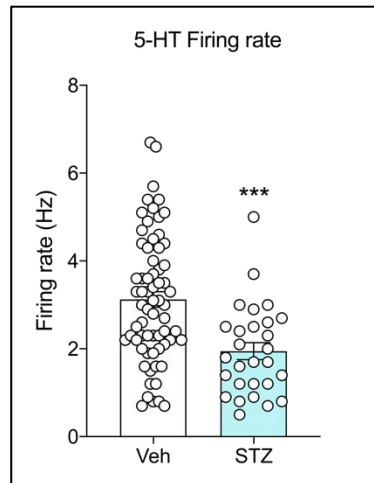


Figure 32. Taux de décharge des neurones 5-HT du DRN chez les souris STZ. Les résultats sont représentés par la moyenne \pm SEM. T-test $p < 0,001$. *** $p < 0,001$ significativement différent du groupe vehicule.

Concernant l'analyse comportementale, nous avons balayé différents symptômes de la dépression. Cependant, en raison de la trop forte perte de poids des animaux STZ, nous avons été obligés d'un point de vue éthique de sacrifier certains animaux réduisant ainsi l'effectif et donc la puissance statistique. Dans le test de suspension caudale, les souris STZ montrent un temps d'immobilité plus élevé que les souris contrôles (Figure 33A). L'interaction sociale, elle, reste inchangée (Figure 33B). Le temps passé à se toiletter est significativement plus court chez les souris STZ lors du test d'éclaboussures et il semblerait que les capacités mnésiques soient aussi perturbées chez ces souris testées dans l'OR puisque, le jour du test, ces dernières n'explorent pas le nouvel objet au-delà de 50% contrairement aux animaux contrôles (Figure 33C et 33D).

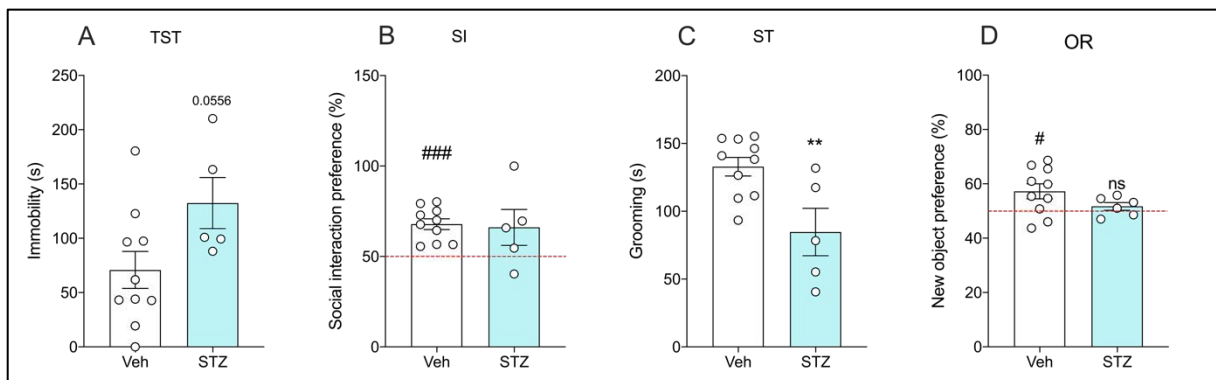


Figure 33. Les souris STZ présentent des comportements pseudo-dépressifs. (A) Temps d'immobilité (s) dans le test de suspension caudale T-test $p = 0,0556$. (B) Temps d'interaction sociale (%) au cours du test d'interaction sociale T-test $p = 0,8255$ et T-test à un échantillon (comparé à la valeur théorique 50%) : $p < 0,001$ (Veh) et $p = 0,1799$ (STZ). (C) Temps de toilette (s) au cours du test d'éclaboussure T-test $p = 0,0082$. (D) Préférence pour le nouvel

objet (%) au cours du test de reconnaissance d'objet T-test $p=0,1597$ et T-test à un échantillon (comparé à la valeur théorique 50%) : $p=0,0265$ (Veh) et $p=0,2802$ (STZ). Les résultats sont représentés par la moyenne \pm SEM. $^{***}p<0,01$ significativement différent du groupe vehicule ; $^{\#}p<0,05$ et $^{###}p<0,001$ significativement différent de la valeur 50%.

Suite aux résultats obtenus concernant l'anxiété au cours de la première partie, nous avons également centré notre analyse comportementale sur cet état chez les souris STZ (Figure 34). L'activité locomotrice des souris STZ dans le test de champ ouvert ainsi que le temps passé au centre sont significativement réduits par rapport aux contrôles. Cependant le ratio temps passé au centre/distance parcourue n'est pas modifié (Figure 34A, 34B et 34C). Dans le test de la boîte claire/sombre, les souris STZ passent significativement plus de temps dans le compartiment sombre, et enfin, dans le test du labyrinthe en croix surélevé, le temps passé et le nombre d'entrées dans les bras ouverts sont significativement plus faibles comparés aux animaux contrôles (Figure 34E et 34F). Par contre, le ratio temps passé/nombre d'entrée dans les bras ouverts n'est pas différent entre les deux groupes (Figure 34G).

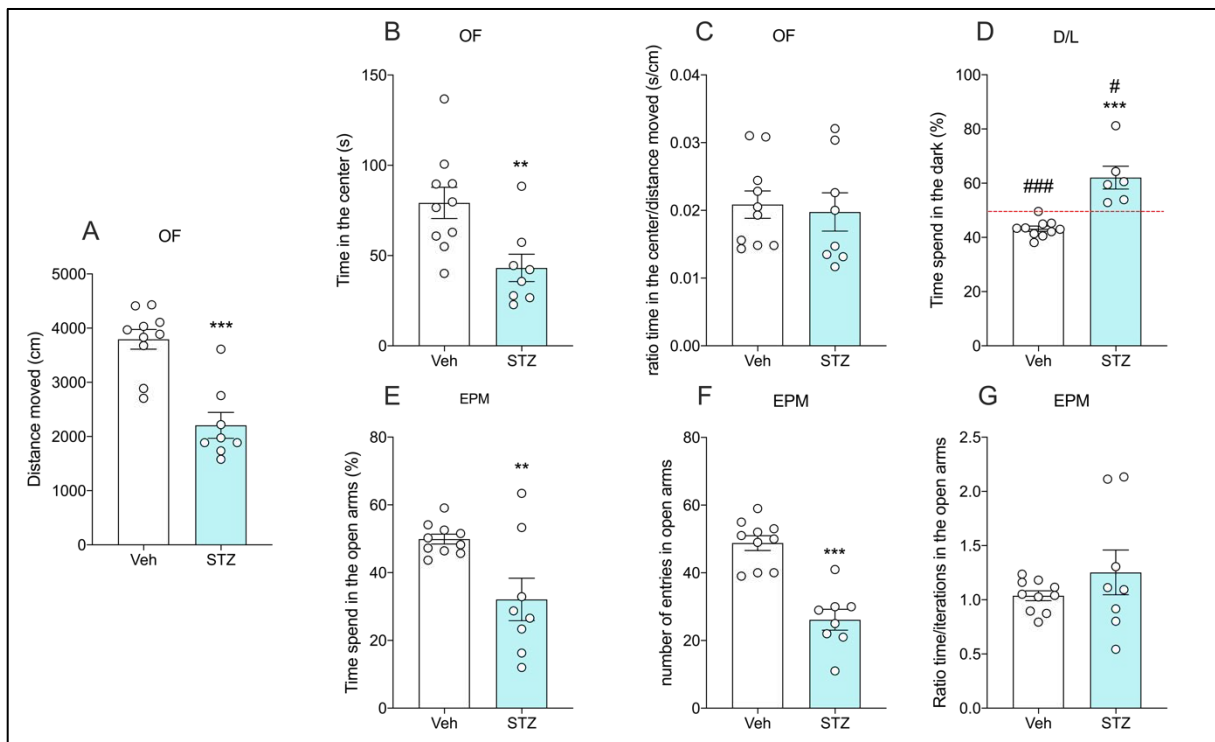


Figure 34. Les souris STZ présentent un phénotype anxieux. (A) Distance parcourue (cm), T-test $p<0,001$; (B) Temps passé au centre (s) T-test $p=0,0077$ et (C) Ratio temps au centre/distance parcourue T-test $p=0,7514$ dans le test de champ ouvert. (D) Temps passé dans le compartiment sombre (%) dans le test de la boîte claire/obscur. T-test $p<0,001$ et T-test à un échantillon (comparé à la valeur théorique 50%) : $p<0,001$ (Veh) et $p=0,0351$ (STZ). (E) Temps passé (%) T-test $p=0,0073$ et (F) nombre d'entrées dans les bras ouverts T-test $p<0,001$ et (G) Ratio temps/nombre d'entrées dans les bras ouverts T-test $p=0,2751$ dans le labyrinthe

en croix surélevé. Les résultats sont représentés par la moyenne \pm SEM. ** $p < 0,01$ et *** $p < 0,001$ significativement différent du groupe véhicule ; # $p < 0,05$ et ### $p < 0,001$ significativement différent de la valeur 50%.

L'ensemble de ces résultats obtenus sur le modèle STZ est concordant avec les données obtenues suite à l'administration périphérique ou centrale d'insuline (Partie 1) puisque nous retrouvons chez ces souris STZ certains marqueurs comportementaux communément associés à un état pseudo-dépressif tels que l'incurie dans le test d'éclaboussures, une forte tendance à la résignation dans le test de suspension caudale ainsi que des troubles de mémoire dans le test de reconnaissance d'objet. Mais c'est surtout le trait anxieux qui ressort fortement dans 3 tests différents, le test de champs ouvert, le labyrinthe en croix surélevé et le test de la boîte claire/sombre en dépit de différences d'activité locomotrice. Ces comportements sont également associés à une diminution de l'activité électrique des neurones sérotoninergiques du DRN.

Ayant caractérisé l'effet de l'administration de l'insuline ou, au contraire, d'un défaut de sa signalisation sur le système sérotoninergique et les comportements associés, nous avons choisi de porter notre attention sur l'étude de la résistance à l'insuline. Mieux comprendre l'insulino-résistance et déterminer si la diminution de la signalisation périphérique de l'insuline est un processus également observé dans le cerveau représente une question capitale dans la perspective de développer des traitements innovants de l'anxiété et/ou de la dépression. C'est pourquoi, au cours de ma thèse, nous avons décidé d'étudier l'implication de l'apeline dans le développement des symptômes anxio-dépressifs, puisque cette adipokine est connue pour ses effets insulino-sensibilisateurs.

Pour cela, nous avons exposé des souris hétérozygotes privées de 50% du récepteur APJ (APJ^{+/-}) ainsi que des souris knock-out pour l'apeline (Ap^{-/-}) exposées à un régime HFD (45%) pendant 6 semaines. Cette courte exposition a été décrite dans la littérature comme suffisante pour entraîner des perturbations métaboliques mais dont les répercussions sur l'activité du système 5-HT et le développement de comportements anxio-dépressifs ne sont pas connus. Les principaux résultats sont résumés dans notre article ci-dessous en cours de soumission.

ARTICLE 3 :

Maladaptive emotional response to metabolic stress : role of apelin signaling

Bullich S, Dortignac A, de Souto Barreto P, Dray C, Valet P and Guiard BP

¹*Centre de Recherches sur la Cognition Animale (CRCA), Centre de Biologie Intégrative (CBI), CNRS UMR5169, Toulouse, France*

²*Restore, UMR 1301-Inserm 5070-CNRS EFS*

³*Université de Toulouse III Université Paul Sabatier, Toulouse France*

⁴*Gérontopôle de Toulouse, Institut du Vieillissement, Toulouse, France*

Ce manuscrit est en cours de soumission.

Résumé :

L'apeline est un petit peptide sécrété par le tissu adipeux notamment en condition d'hyperglycémie induite par l'obésité. L'apeline exerce divers effets physiologiques en périphérie incluant l'amélioration de la sensibilité à l'insuline, l'augmentation de la force musculaire ou de la contractibilité cardiaque. De manière intéressante, le cerveau contient une forte densité en récepteur APJ, le récepteur de l'apeline, et des évidences grandissantes suggèrent une action centrale de cette adipokine. En particulier, des études récentes montrent que l'apeline régule l'état émotionnel après son injection en intracérébroventriculaire. Cependant, les résultats sont mitigés et ne permettent pas d'apporter des conclusions définitives sur l'impact de l'apeline sur le phénotype anxio-dépressif. Cette étude a pour objectif de déterminer l'impact de l'inactivation génétique de l'apeline ou de son récepteur, couplée à l'exposition à un régime riche en gras (HFD), sur les comportements anxio-dépressifs.

Les souris hétérozygotes pour le récepteur APJ (APJ^{+/-}) montrent une altération plus importante de la tolérance au glucose et de l'insulinémie à jeun associées à un phénotype anxieux plus robuste. De la même façon, les souris invalidées pour l'apeline soumises au régime HFD ont une insulinémie à jeun plus élevée associée avec un phénotype anxieux comparées au groupe contrôle. À la lumière de ces résultats, nous avons enregistré l'activité électrique des neurones sérotoninergiques et dopaminergiques du noyau dorsal du raphé et de l'aire tegmentale respectivement. Nos résultats indiquent une diminution de taux de dégarche de ces

deux populations neuronales chez les souris $Ap^{-/-}$ possiblement en lien avec le phénotype anxieux. Enfin, la metformine, un traitement insulino-sensibilisateur, n'a pas permis de corriger les paramètres métaboliques mais a permis de réduire le phénotype anxieux des souris $Ap^{-/-}$.

Ensemble, ces résultats confirment le rôle de l'apeline dans la régulation émotionnelle. Cependant des études supplémentaires sont nécessaires pour mettre en évidence le potentiel thérapeutique en psychiatrie de la manipulation du système apelinergique.

Contribution personnelle :

Au cours de ce travail :

- J'ai réalisé toutes les expériences faites sur les souris : métabolisme, comportement, électrophysiologie et traitements pharmacologiques,
- J'ai écrit le premier draft du manuscrit.

Maladaptive Emotional response to metabolic stress: role of apelin signaling

Bullich S^{1,3}, Dortignac A^{2,3}, de Souto Barreto P⁴, Valet P^{2,3} and Guiard BP^{1,3#}

¹Centre de Recherches sur la Cognition Animale (CRCA), Centre de Biologie Intégrative (CBI), CNRS UMR5169, Toulouse, France

²Restore, UMR 1301-Inserm 5070-CNRS EFS

³Université de Toulouse III Université Paul Sabatier, Toulouse France

⁴Gérontopôle de Toulouse, Institut du Vieillissement, Toulouse, France

#Corresponding author

Keywords : Apelin, Anxiety, Monoamines, Insulin resistance, Metformin

✉ **Pr. Bruno GUIARD**

Centre de Recherches sur la Cognition Animale (CRCA), Centre de Biologie Intégrative (CBI)

Bât4R3, 118 Route de Narbonne

31062 Toulouse cedex 09

France

Phone: +33 5 61 55 69 24

email: bruno.guiard@univ-tlse3.fr

ABSTRACT

Apelin is a small peptide secreted by the adipose tissue notably in conditions of obesity-induced hyper-insulinemia. Apelin exerts a range of physiological functions at the periphery including the improvement of insulin sensitivity, the increase of muscle strength or cardiac contractibility. Interestingly, the brain is endowed with a high density of APJ receptor, the preferred target of apelin, and growing evidence suggests a central action of this adipokine. In particular, recent studies reported that apelin regulates emotional states after its intracerebroventricular administration. However, the results are mixed and do not allow providing definitive conclusion about the impact of apelin on anxio-depressive-like phenotype. This study aims to determine the impact of the genetic APJ or apelin inactivation coupled with high-fat diet exposition on anxiodepressive-like behaviors.

APJ receptor heterozygous (APJ^{+/-}) mice showed stronger impairment of glucose tolerance and fasting insulinemia reminiscent of insulin resistance associated with a more robust anxious phenotype. Similarly, apelin knock-out (Ap^{-/-}) mice, displayed higher fasting insulinemia associated with an anxious phenotype compared to control group. In light with these results, we recorded serotonergic and dopaminergic neuronal activities in the dorsal raphe nucleus and the ventral tegmental area, respectively. Our results indicated a slower firing rate for both populations in Ap^{-/-} mice possibly congruent with their anxious phenotype. Finally, although the insulin sensitizing drug metformin failed to reversed HFD-induced insulin resistance Ap^{-/-} mice, but it reversed anxiety-like behavior.

Collectively, these results confirm the role of apelin in the regulation of emotional state. Further investigations are warranted to highlight the therapeutic potential of manipulating the apelinergic system in the field of psychiatry.

INTRODUCTION

As reported by the World Health Organization, diabetes and depression prevalence are both around 350 million people worldwide. These pathologies represent important healthcare burdens as well as critical economic issues due to their effects on disability, productivity and quality of life (Egede and Ellis, 2010). Interestingly, epidemiological studies revealed a bidirectional link between diabetes and depression pointing out a higher rate of depression in patients suffering from diabetes and vice-versa. In a meta-analysis, Anderson and collaborators showed that the prevalence of depression is at least doubled among diabetic patients compared to the general population (Anderson et al., 2001). This increase appears to be common of diabetes subtypes since such a relationship was reported not only in type 1 (Buchberger et al., 2016; Shaban et al., 2006; Gendelman et al., 2009) but also in type 2 diabetic patients (Ali et al., 2006; Roy and Lloyd et al., 2012; Wang et al., 2019). In a more advanced way, Phillips and Perry proposed that impairment of insulin signaling might represent a metabolic predictor of depressive symptoms notably in obese patients (Phillips and Perry, 2015). This hypothesis is congruent with animal studies conducted in mice and rats. Indeed, evidence indicates that mouse models of type 1 and type 2 diabetes, in response to streptozotocin (STZ) or high-fat diet (HFD) respectively, harbor anxio/depressive-like behaviors (Gupta et al., 2014; Zemdegs et al., 2016). Remarkably, it has been shown that the intraperitoneal insulin injection reverses STZ-induced depressive-like behaviors (Gupta et al., 2014) whereas long-term treatments with the insulin-sensitizing drug metformin produced similar beneficial effects in mice fed a HFD for 16 weeks (Zemdegs et al., 2019).

Type 2 diabetes is the most prevalent subtype of diabetes and is characterized by an inability to respond adequately to endogenous insulin. Although the mechanisms underpinning insulin resistance are not fully understood, it is well known that the adipose tissue (AT) plays a major role. Lipid-induced regulation of insulin sensitivity relies, at least in part, on AT secretory activity which promotes the release of a large variety of factors in plasma including adipokines (Rosen and Spiegelman, 2006). These hormones do not similarly influence insulin signaling. Adiponectin and leptin, for example, have been shown to improve insulin sensitivity whereas resistin and TNF-alpha would impair this physiological process (Dyck et al., 2006). Consequently, the contribution of various adipokines to the development of insulin resistance is complex and their putative role in the regulation of emotional state is drawing a particular attention (Liu et al., 2012, Nicolas et al., 2015; Cordeiro et al., 2019).

Apelin, a small peptide discovered by Fujinos' group in 1998 and secreted by the AT, has been recently characterized as an insulin sensitizer (Tatemoto et al., 1998; Dray et al., 2008; Yue et al., 2010). Its biological action is mediated by a high affinity G protein-coupled receptor named APJ. Both Apelin and APJ are found in several peripheral tissues such as kidney, muscle, liver and heart (Kawamata et al., 2001; Medhurst et al., 2003; Lee et al., 2001; O'Carroll et al., 2000) where they exert positive effects on peripheral energy metabolism by improving lipid oxidation, mitochondrial oxidative capacity and glucose utilization in muscles of HFD fed mice (Attané et al., 2012; Dray et al., 2008). Evidence demonstrates that Apelin and APJ are also widely present within the brain (O'Carroll et al., 2000). Although less documented, the effects of Apelin on neurobehavior have been addressed and its beneficial effects on emotionality have been yielded. In particular, it has been shown that the acute intracerebroventricular injection of apelin reverses the depressive-like behaviors of rats induced by chronic stress procedures such as the social defeat or unpredictable chronic mild stress models (Tian et al., 2018; Zhang et al., 2019). An upregulation of apelin and APJ expression was also been detected in the hippocampus of stressed rats (Xiao et al., 2018) raising the possibility that such response represents an adaptive process aimed at limiting the deleterious effects of this procedure. Although the mechanisms by which apelin could improve behavioral outcome has yet to be solved, several studies reported that it exerts similar effects than antidepressant drugs including the improvement of hypothalamic-pituitary-adrenal axis (HPA axis) reactivity (Dai et al., 2018; Shen et al., 2019).

In light of the data emphasizing the insulin sensitizing effects of apelin and its central effects, this study aimed at determining the impact of the genetic inactivation of the apelinergic system on different symptoms of depression in a context of T2D. To do so, the metabolic and neurobehavioral phenotypes of $Ap^{-/-}$ and $APJ^{+/-}$ mice exposed to a short-term HFD (ie, 6 weeks) were compared to wild-types. The impact of these genetic mutations on monoaminergic neuronal activities (ie, serotonergic and dopaminergic systems) was also determined to gain insight into the putative neurobiological circuits involved in the maladaptive emotional response induced by HFD.

METHODS

Animals

All animals and experimental procedures were conducted with respect to the European directive 2010/63/UE and approved by the French Ministry of Research (N° #12342-2017082111489451 v6) Apelin knock-out mice (Ap^{-/-}) were generated by homologous recombination in embryonic stem cells (Genoway, Lyon, France). Briefly, C57Bl/6J blastocysts injected with recombined embryonic stem cells were implanted into surrogate mothers to generate chimeric mice. PCR and Southern blot analysis were then used to identify homozygous male mice of interest. APJ heterozygous mice (APJ^{+/-}) were generated by mating of C57Bl6/J WT littermates and heterozygous mice for the APJ mutation (Deltagen, San Carlos, CA, USA). Twelve-week-old male Ap^{-/-}, APJ^{+/-} and C57/Bl6J mice (Charles River Lab) were used in this study. They were housed in standard conditions at the CRCA animal facility (12:12h light-dark cycle, 22°C, 60% relative humidity with ad libitum access to water and food).

Diets and Drugs

Mutants and wild-type mice were fed a Standard diet (STD A04; SAFE diets, Augy, France) during the first weeks of their life and then maintained on this regimen or exposed to a HFD (45% lipids) for 6 weeks (U8954P/251HF; SAFE diets, Augy, France) when they attained the age of 3 months. The insulin sensitizing agent metformin, was administered at the active dose of 300 mg/kg (Sigma-Aldrich, France) in the drinking water as previously used (Zemdegs et al., 2019). This route of administration allowed a constant amount of this compound during the exposition. Daily water consumption was monitored in order to adjust metformin concentration.

Metabolic parameters

Intraperitoneal glucose test tolerance. Animals were fasted for 5 hours with free access to water from 9 am to 2 pm. Blood glucose levels were monitored from tail sampling (Accu-check Performa glucometer; Roche, Boulogne-Billancourt, France) at 0, 15, 30, 45, 60, 90 and 120 min after the intraperitoneal glucose injection (2 g/kg).

Plasma insulin dosage. Blood samples were collected from the tip of the tail in EDTA coated tubes (Microcuvette CB300 EDTA K2, Sarstedt). Plasma was extracted after a 4°C centrifugation (13 500 rpm for 15min) and stored at -80°C. Insulin quantification was performed using an ELISA Kit (Mouse insulin ELISA #1247, Mercodia).

HOMA-IR. The homeostasis model assessment of insulin resistance was calculated using the following equation: fasting blood glucose (mg/dL) x fasting insulin (ng/mL)/405. This value reflects the individual level of insulin resistance (Matthews et al. 1985).

Behavioral tests

All behavioral experiments were assessed in the morning in order to avoid the impact of circadian rhythm on locomotor activity and metabolic parameters. During this behavioral phenotyping, mice were exposed once a day to a test from the less to the most stressful as follows: open field (OF), elevated plus maze (EPM), dark-light (DL), social interaction (SI) and tail suspension test (TST).

The OF was assessed in an opaque circular Plexiglas arena (\varnothing :40cm). Mice were placed the arena and were free to move for 10 minutes. They were then videotracked with Noldus software (Ethovision, Wageningen, The Netherlands) in order to measure the distance travelled and the time spent in the center, an anxiogenic compartment for the mice. To avoid any bias induced by locomotor activity, the time spent in the center was normalized by the distance travelled.

The EPM was performed in an apparatus composed of four 5 cm wide and 35 cm long arms. Two of them are opened (anxiogenic part) and the others are closed by 15 cm high walls. During 5 minutes, each mouse was free to explore the apparatus and the number of entries as well as the time spent in each the opened and closed arms were measured.

The DL was achieved in a two-chamber apparatus composed of a dark chamber and an enlightened one (mensuration). During 10 minutes the mouse was free to explore the apparatus and the time spent in each compartment was measured.

The SI test was realized in a three-chamber apparatus. During a first 10-minutes session, mice were allowed to explore the apparatus and two empty cages, one of them being used to contain an exhibited mouse. Indeed, during the second session, an exhibited familiar mouse was placed in one of the two empty cage and the tested mouse was free to explore and interact with its littermate or the empty cage. Social interaction was calculated as the percentage of interaction time with the exhibited mouse: $\text{time spent interacting with the mouse} / (\text{time spent interacting with the mouse} + \text{the empty cage}) \times 100$.

For *the TST*, mice were hanged by their tails with a tape to a hook for 6 minutes. Immobility time was manually scored.

Anxiety Z-score

Z-normalization was applied for anxiety (OF, EPM and DL) and depressive-like state (SI and TST) in order to obtain an integrative score reflecting these specific endophenotypes. For each mouse and parameter, normalized z-value was obtained by subtracting the average of the control population by the value of the individual and then divided by the standard derivation of the control population as described previously (Guilloux et al., 2011). This score included the center time/distance moved ratio of the OF, the time spent in the center in the EPM and the time spent in the dark in the DL and, all of them were attributed the same weight on the calculation of the z-score.

In vivo Electrophysiology

After behavioral and metabolic experiments mice were anesthetized with chloral hydrate (400mg/kg, ip) and then placed in a stereotaxic apparatus. Single-unit recordings of serotonergic neurons located in the dorsal raphe (DR) were performed using a glass micropipette (Stoelting, Wood Dale, IL, USA) prepared from a gravitational puller (Narishige, London, United-Kingdom) and filled with a 2M NaCl solution to reach an impedance ranging between 2.5 to 5 M Ω . Recording micropipettes were dipped into the DR using the following coordinates: 0.2-0.5 mm posterior to the interaural line on the midline and lowered at 3.5 mm from the brain surface. Serotonergic neurons were characterized using two main criteria: a regular firing rate (0,5 to 2,5 Hz) and a long-duration positive action potential. Several tracks were performed to measure the average discharge frequency of DR 5-HT neurons and the number of neurons recorded per track. We also characterized bursting 5-HT neurons with the peculiarity of an interspike interval <12ms. Their burst frequency and the mean of spike/burst were determined for this neuronal subpopulation.

Regarding the recording of dopaminergic neurons, micropipettes were dipped into the ventral tegmental area (VTA) using the following coordinates: -3 to -3,3 mm posterior, \pm 0,3 to 0,6 mm lateral and lowered at 4,1 to 4,6 mm from brain surface. Dopaminergic neurons were identified according to the criteria previously described by (Grace and Bunney, 1983). Regarding VTA DA neurons displaying a bursting mode, the onset of a burst was defined as two spikes occurring <80 ms apart, with the termination of the spike being defined as two spikes

occurring >160 ms apart. The burst frequency and the mean spike/burst were also calculated using Spike2 software (Cambridge Electronic Design).

Statistical analyses

Data were analyzed using Prism8 software (Graphpad, San Diego, USA). Results were represented as mean \pm SEM. Statistical analysis relied on two-tailed unpaired student's t-test and two-way ANOVA followed by Tukeys' post hoc test interaction when F-value for one main factor and/or the interaction was significant. The threshold of significance was set at $p < 0,05$.

RESULTS

To study the role of the apelinergic system on insulin sensitivity and their putative relation with anxio/depressive-like behaviors, we characterized for the first time the metabolic phenotypes and neurobehavior of Apelin knock-out ($Ap^{-/-}$) and APJ heterozygous knock-out ($APJ^{+/-}$) mice. For both groups, we performed longitudinal analyses allowing us to follow animals fed a normal diet (ND) or challenged with a high fat diet (HFD).

Impact of the apelinergic system on glucose metabolism and neurobehavior in mice fed a ND

While fed a ND, $APJ^{+/-}$ mice display normal fasting glycemia but a significant higher fasting insulinemia and HOMA-IR index compared to WT mice. No apparent difference was found between groups with respect to the IPGTT experiments (Supplemental Figure 1S). Regarding their innate anxiety, the time spent in the open arms in the EPM and the time spent in the dark in the DL were not different between $APJ^{+/+}$ and $APJ^{+/-}$ mice. However, a significant decrease of the time spent interacting with a littermate was unveiled in the SI test. No effect was unveiled in the TST. (Supplemental Figure 2S).

With respect to $Ap^{-/-}$ mice fed a ND, these mutants also showed normal fasting glycemia but a trend towards an increased insulinemia and HOMA-IR. Despite this apparent weak insulin-resistance in $Ap^{-/-}$ mice, a significant lower AUC of IPGTT curve was detected relative to controls (Supplemental Figure 3S). Regarding behavioral analysis, $Ap^{-/-}$ mice showed an anxiogenic-like phenotype in the DL and a significant impairment of sociability in the SI test. Again, behavioral performances in the TST did not differ between $Ap^{+/+}$ and $Ap^{-/-}$ mice (Supplemental Figure 4S).

Impact of the apelinergic system on glucose metabolism, neurobehavior and monoaminergic tone under HFD

Having shown that APJ^{+/-} and Ap^{-/-} mice displayed weak impairment of metabolic and neurobehavioral phenotypes, we then decided to challenged these strains with a HFD for 6-weeks. In these conditions, although fasting glycemia was not impacted in APJ^{+/-} mice relative to wild-types, heterozygous mice displayed a significant higher insulinemia and HOMA-IR index associated with a significant impairment of glucose tolerance (Figure 1). With respect to neurobehavior, APJ^{+/-} mice tended to be more anxious in the EPM and this phenotype became evident in the DL. The integration of these data into an anxiety z-score confirmed that APJ^{+/-} mice under HFD were more prone to develop anxiety than wild-types (Figures 2A-C). Interestingly, depressive symptoms assessed in the SI and TST were not impacted by the mutation (Figures 2D-F).

Regarding Ap^{-/-} mice, mutants displayed a significant higher fasting insulinemia and HOMA-IR without any alteration of glucose tolerance (Figure 3). These metabolic impairments were accompanied by behavioral anomalies since Ap^{-/-} mice harbored an anxiogenic-like profile relative to wild-types in the EPM and DL and this was further confirmed by the anxiety z-score (Figures 4A-C). Depressive-like behavior remained unchanged in these mutants (Figures 4D-F).

Going one step further and to identify the neurotransmitter that might be involved in the modulation of such behavioral phenotype, we then recorded the firing activities of DR 5-HT and VTA DA neurons in Ap^{+/+} and Ap^{-/-} mice fed a HFD. Our results indicated that the genetic inactivation of Apelin resulted in a significant decrease in monoaminergic neurons firing rates. In the DR the discharge of non-bursting 5-HT neurons was decreased by 25% (Figures 5B). Given that a proportion of DR 5-HT neurons discharge with a bursting activity, we also studied the firing rate of this neuronal sub-population. However, 5-HT neurons with this mode of discharge was not impacted by the mutation in term of firing rate, burst frequency and number of spikes/burst (Figures 5C-E). Regarding the VTA, the analysis of electrophysiological properties of DA neurons indicated that a lower firing frequency in Ap^{-/-} mice fed a HFD relative to wild-types under the same diet. Such a decrease was not related to a lower burst frequency and/or spikes/burst (Figures 5H-J)

Effects on the insulin sensitizer metformin in Ap^{-/-} mice fed a HFD

In an attempt to determine the putative causal relationship between insulin resistance and the higher level of anxiety, we then evaluated the metabolic and behavioral effects of the insulin sensitizing drug metformin. To do so, Ap^{+/+} and Ap^{-/-} mice were fed a HFD for 6 weeks while being administered with metformin or its vehicle for the last 4 weeks (Figure 6A). Regarding metabolic features, we noticed that metformin did not significantly improve fasting glycemia, insulinemia and HOMA-IR in Ap^{+/+} and Ap^{-/-} mice exposed to the short term of HFD. However, although metformin significantly improved glucose tolerance in wild-types, it failed to do so in Ap^{-/-} mice (Figure 6). At the behavioral level metformin had no effect in wild-type animals but significantly reversed HFD-induced anxiety in mutants as indicated by a significant decrease of the anxiety z-score in the latter group (Figures 6A-D).

DISCUSSION

The present study shows that the inactivation of the apelinergic system promoted metabolic impairments reminiscent of mild insulin resistance along with a higher degree of anxiety and lower serotonergic and dopaminergic tones in mice fed a HFD. Moreover, although the antidiabetic drug metformin failed to improve peripheral insulin sensitivity in mice lacking Apelin, it exerted anxiolytic-like effects in these mutants. These results lead us to envision that the enhancement of apelin signaling might mitigate HFD-induced anxiety and that such a beneficial effect could rely on direct actions of this adipokine in the brain to improve monoamine neurotransmission.

It is well accepted that T2D has a high comorbid frequency with psychiatric disorders (Chireh et al., 2019). In keeping with these data, preclinical studies also provided evidence for such a relationship. For instance, in animal models of T2D based on long term exposure to HFD (ie, 12 to 16 weeks), a high level of anxiety and depressive-like phenotype were repeatedly observed (Miyata et al., 2004; Ho et al., 2012; André et al., 2014; Gupta et al., 2014; Dutheil et al., 2016; Zemdegs et al., 2016; Zemdegs et al., 2019). In the present study, we fed mice a HFD for 6 weeks, a short period which is sufficient to promote signs of pancreatic beta-cells dysregulations and insulin resistance in mice (Adler et al., 2014; Santos et al., 2019). In these conditions particularly suitable to unveil a putative exacerbation of metabolic impairments, heterozygous mice lacking 50% of the APJ, displayed more pronounced signs of insulin resistance compared to wild-types as shown by a low ability to face a glucose challenge. This was not surprising in light of previous data demonstrating that the APJ receptor is widely

expressed in the body, notably in the pancreas. In agreement with the data reported herein, it was shown that the specific deletion of APJ in beta-cells produced an impairment of glucose tolerance, an attenuation of glucose-stimulated insulin secretion and a reduction of islet size, density and β -cell mass (Han et al., 2015). At the behavioral level, we provided evidence for the first time that the metabolic deficits detected in APJ^{+/-} mice fed a HFD were accompanied by a higher level of emotional disturbance. Using the z-score method normalizing and integrating emotional behaviors across complementary measures assessed in the EPM and DL, we observed that APJ^{+/-} mice displayed a high level of anxiety than their wild-type littermates. In a marked contrast, the depressive-like phenotype was not impacted suggesting that the apelinergic system regulates neuronal circuits that capture specific neurobehavior. Such a difference between anxiety and depressive-like phenotype might be explained by the short exposure to HFD since we previously demonstrated that long-term regimen negatively reverberates on both emotional dimensions (Zemdegs et al., 2016; Zemdegis et al., 2019). Our observations are also interesting because anxiety manifests as a predominant feature of depression that often precedes the onset of the pathology (Malhi and Mann, 2018). To go further in the characterization of the role of apelin signaling in this phenotype, we conducted the same metabolic and behavioral analyses in mice lacking the Apelin. Under short term HFD, Ap^{-/-} mice also displayed metabolic impairments but to a lower extent than APJ^{+/-} mice. These observations are consistent with the fact that Ap^{-/-} mice showed signs of insulin resistance and lower levels of the insulin-sensitizing hormone adiponectin (Yue et al., 2010). They also agree with previous data reporting the ability of Apelin to promote insulin sensitivity and to exert synergistic effect with insulin notably by increasing glucose uptake in skeletal muscle and AT of insulin-resistant mice compared to apelin alone (Dray et al., 2008). At the behavioral levels, under short term HFD, as shown with the APJ^{+/-} strain, Ap^{-/-} mice also exhibited a significant higher level of anxiety than wild-types whereas the depressive-like phenotype remained unchanged.

To gain insight into the mechanisms underlying the anxiogenic phenotype of Ap^{-/-} mice, we conducted *in vivo* electrophysiological recordings of monoaminergic neurons (ie, serotonergic and dopaminergic neurons). These systems are commonly associated with anxi/depressive-like phenotype (Sachs et al., 2013; Zarrindast and Khakpai, 2015; Nishitani et al., 2018) and their activity can be modulated by changes in peripheral glucose and insulin homeostasis (Kleinridders et al, 2015; Martin et al., 2021). In support of this hypothesis, we found that the firing rate of dorsal raphe (DR) 5-HT neurons was decreased in Ap^{-/-} mice. Since DR 5-HT neurons display different modes of discharge with single spikes or bursting activities

(Hajos and Sharp, 1996), we studied both subpopulations. Our results indicated that the firing rate DR 5-HT neurons was specifically decreased in the subpopulation of neurons discharging in a single spike manner. Consequently, one might assume that the extracellular levels of 5-HT could be decreased at the nerve terminals such as the amygdala, the frontal cortex or the ventral hippocampus but this question warrant further investigations. Indeed, it is believed that 5-HT release is mostly under the control of neuronal bursting compared to neurons displaying a regular pattern of firing. To the best of our knowledge, the influence of Apelin on the serotonergic system has been poorly investigated although the DR is endowed with a high density of APJ (De Mota et al., 2000). One study showed that the intracerebroventricular injection of Apelin-13 promoted anxiolytic effects that can be reversed by the 5-HT₂ receptor antagonist methysergide (Telegdy and Jaszberenyi, 2014) thereby raising the possibility that endogenous apelin favors 5-HT release to promote anxiolysis. With respect to the dopaminergic neurons in the VTA, another complex system comprising bursting and non-bursting neurons (Oster et al., 2015), we found a decrease in VTA DA neuronal activity specifically for the bursting dopaminergic subpopulation. It is thus possible that such electrophysiological effects favor the reduction of dopaminergic neurotransmission. The observation that the anxiolytic effects of the icv injection of Apelin-13 were also reversed by the D₂ receptor antagonist haloperidol supports this hypothesis (Telegdy and Jaszberenyi, 2014).

Dealing with a lack of knowledge regarding the triumvirate linking the apelinergic system, anxiety and the activity of monoaminergic neurons, we can only speculate on the mechanisms underpinning the metabolic and neurobehavioral effects detected in APJ^{+/-} and Ap^{-/-} mice. The first hypothesis that can be advanced is that the impairment of peripheral insulin sensitivity in APJ^{+/-} and Ap^{-/-} mice, is responsible for the behavioral and electrophysiological effects reported herein. We have recently shown that insulin resistance decreased the transport of tryptophan across the blood brain barrier thereby dampening DR 5-HT neuronal activity (Zemdegs et al., 2019). If such a process occurred in response to the genetic inactivation of the apelinergic system and notably in Ap^{-/-} mice, one might expect that the anxious behavior detected in these mutants would be accompanied by a lower serotonergic synthesis and release in the brain. To question the causal link between peripheral metabolism and neurobehavior, we treated wild-types and Ap^{-/-} mice with metformin. This compound is an insulin sensitizing drug whose beneficial effects on glucose metabolism have been attributed to several processes, including the activation of AMPK pathway, reduction in hepatic gluconeogenesis, and stimulation of glucose uptake in skeletal muscle (Rena et al. 2017) but clinical evidence indicated that metformin increases plasma levels of Apelin in patients with T2D (Kadoglou et

al., 2010; Fan et al., 2015; Al-Kuraishy et al., 2018). This could be an additional mechanism by which metformin could improve insulin sensitivity. Interestingly, our results showed that metformin did not improve glucose tolerance in $Ap^{-/-}$ mice emphasizing a treatment resistance that could result from the inability of the antidiabetic drug to increase plasma Apelin. In a marked contrast, metformin produced anxiolytic effects in $Ap^{-/-}$ mice which echo previous studies yielding similar effects in animal models of comorbid diabetes and anxiety/depressive-like phenotype (Garabadu and Krishnamurthy, 2014; Ji et al., 2019; Zemdegs et al., 2019). Together these findings suggest that the beneficial effects of metformin on anxiety in $Ap^{-/-}$ mice were independent from an improvement of peripheral metabolism. Instead, metformin activity could involve mechanisms occurring directly in the central nervous system (CNS). In particular, it would be possible that metformin promoted anxiolytic effects in $Ap^{-/-}$ mice fed a HFD by restoring normal insulin signaling in discrete brain that would be impaired in these mutants. This would be consistent with previous reports showing that metformin induced pro-cognitive and antidepressant-like responses by improving brain insulin sensitivity (Yarchoan and Arnold, 2014; Milnstein and Ferris, 2021).

Together, our findings obtained in $APJ^{+/-}$ and $Ap^{-/-}$ mice support a beneficial effect of apelin signaling in the regulation of HFD-induced anxiety. Although the underlying mechanisms have yet to be solved, we propose that the apelin system may directly interact with monoaminergic neurons in the brain to regulate emotional state. Such a central effect is possible given the widespread distribution of Apelin and its APJ receptor in the CNS. It is well known that many of the central effects of apelin are attributed to its expression in these PVN hypothalamic neuronal circuits (Newson et al., 2013) that are key structures in the regulation of stress responses. Since previous studies showed that changes in HPA activity reverberate on monoaminergic neurotransmission (Lanfumeijer et al., 2000; Barik et al., 2013), a new avenue opens for therapeutic interventions targeting the apelinergic system. In particular, future experiments are envisioned to test the acute and chronic effects of APJ agonists in animal models of anxiety with or without metabolic comorbidity.

REFERENCES

- Adler, B.J., Green, D.E., Pagnotti, G.M., Chan, M.E., Rubin, C.T., 2014. High fat diet rapidly suppresses B lymphopoiesis by disrupting the supportive capacity of the bone marrow niche. *PLoS One* 9, e90639. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0090639>
- Ali, S., Stone, M.A., Peters, J.L., Davies, M.J., Khunti, K., 2006. The prevalence of co-morbid depression in adults with Type 2 diabetes: a systematic review and meta-analysis: Review article. *Diabetic Medicine* 23, 1165–1173. <https://doi.org/10.1111/j.1464-5491.2006.01943.x>
- Al-Kuraishy, H., Al-Gareeb, A., Waheed, H., Al-Maiahy, T., 2018. Differential effect of metformin and/or glyburide on apelin serum levels in patients with type 2 diabetes mellitus: Concepts and clinical practice. *J Adv Pharm Technol Res* 9, 80. https://doi.org/10.4103/japtr.JAPTR_273_18
- Anderson, R.J., Freedland, K.E., Clouse, R.E., Lustman, P.J., 2001. The Prevalence of Comorbid Depression in Adults With Diabetes: A meta-analysis. *Diabetes Care* 24, 1069–1078. <https://doi.org/10.2337/diacare.24.6.1069>
- André, C., Dinel, A.-L., Ferreira, G., Layé, S., 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, Behavior, and Immunity* 41, 10–21. <https://doi.org/10.1016/j.bbi.2014.03.012>
- Attané, C., Foussal, C., Le Gonidec, S., Benani, A., Daviaud, D., Wanecq, E., Guzmán-Ruiz, R., Dray, C., Bezaire, V., Rancoule, C., Kuba, K., Ruiz-Gayo, M., Levade, T., Penninger, J., Burcelin, R., Pénicaud, L., Valet, P., Castan-Laurell, I., 2012. Apelin treatment increases complete Fatty Acid oxidation, mitochondrial oxidative capacity, and biogenesis in muscle of insulin-resistant mice. *Diabetes* 61, 310–320. <https://doi.org/10.2337/db11-0100>
- Barik, J., Marti, F., Morel, C., Fernandez, S.P., Lanteri, C., Godeheu, G., Tassin, J.-P., Mombereau, C., Faure, P., Tronche, F., 2013. Chronic Stress Triggers Social Aversion via Glucocorticoid Receptor in Dopaminergic Neurons. *Science* 339, 332–335. <https://doi.org/10.1126/science.1226767>
- Buchberger, B., Huppertz, H., Krabbe, L., Lux, B., Mattivi, J.T., Siafarikas, A., 2016. Symptoms of depression and anxiety in youth with type 1 diabetes: A systematic review and meta-analysis. *Psychoneuroendocrinology* 70, 70–84. <https://doi.org/10.1016/j.psyneuen.2016.04.019>
- Chirch, B., Li, M., D'Arcy, C., 2019. Diabetes increases the risk of depression: A systematic review, meta-analysis and estimates of population attributable fractions based on prospective studies. *Preventive Medicine Reports* 14, 100822. <https://doi.org/10.1016/j.pmedr.2019.100822>
- Cordeiro, R.C., Chaves Filho, A.J.M., Gomes, N.S., Tomaz, V. de S., Medeiros, C.D., Queiroz, A.I. de G., Maes, M., Macedo, D.S., Carvalho, A.F., 2019. Leptin Prevents Lipopolysaccharide-Induced Depressive-Like Behaviors in Mice: Involvement of Dopamine Receptors. *Front. Psychiatry* 10, 125. <https://doi.org/10.3389/fpsy.2019.00125>
- Dai, T.-T., Wang, B., Xiao, Z.-Y., You, Y., Tian, S.-W., 2018. Apelin-13 Upregulates BDNF Against Chronic Stress-induced Depression-like Phenotypes by Ameliorating HPA Axis and Hippocampal Glucocorticoid Receptor Dysfunctions. *Neuroscience* 390, 151–159. <https://doi.org/10.1016/j.neuroscience.2018.08.018>
- De Mota, N., Lenkei, Z., Llorens-Cortès, C., 2000. Cloning, Pharmacological Characterization and Brain Distribution of the Rat Apelin Receptor. *Neuroendocrinology* 72, 400–407. <https://doi.org/10.1159/000054609>
- Dray, C., Knauf, C., Daviaud, D., Waget, A., Boucher, J., Buléon, M., Cani, P.D., Attané, C., Guigné, C., Carpené, C., Burcelin, R., Castan-Laurell, I., Valet, P., 2008. Apelin Stimulates Glucose Utilization in Normal and Obese Insulin-Resistant Mice. *Cell Metabolism* 8, 437–445. <https://doi.org/10.1016/j.cmet.2008.10.003>

- Dutheil, S., Ota, K.T., Wohleb, E.S., Rasmussen, K., Duman, R.S., 2016. High-Fat Diet Induced Anxiety and Anhedonia: Impact on Brain Homeostasis and Inflammation. *Neuropsychopharmacol* 41, 1874–1887. <https://doi.org/10.1038/npp.2015.357>
- Dyck, D.J., Heigenhauser, G.J.F., Bruce, C.R., 2006. The role of adipokines as regulators of skeletal muscle fatty acid metabolism and insulin sensitivity. *Acta Physiol* 186, 5–16. <https://doi.org/10.1111/j.1748-1716.2005.01502.x>
- Egede, L.E., Ellis, C., 2010. Diabetes and depression: Global perspectives. *Diabetes Research and Clinical Practice* 87, 302–312. <https://doi.org/10.1016/j.diabres.2010.01.024>
- Fan, Y., Yang, J., Li, X., Zhang, Y., Zheng, H., Song, Y., Zhang, N., Shen, C., Fan, X., Ren, F., Shen, J., Ren, G., 2015. Treatment with metformin and a dipeptidyl peptidase-4 inhibitor elevates apelin levels in patients with type 2 diabetes mellitus. *DDDT* 4679. <https://doi.org/10.2147/DDDT.S85740>
- Garabadu, D., Krishnamurthy, S., 2014. Diazepam Potentiates the Antidiabetic, Antistress and Anxiolytic Activities of Metformin in Type-2 Diabetes Mellitus with Cooccurring Stress in Experimental Animals. *BioMed Research International* 2014, 1–15. <https://doi.org/10.1155/2014/693074>
- Gendelman, N., Snell-Bergeon, J.K., McFann, K., Kinney, G., Paul Wadwa, R., Bishop, F., Rewers, M., Maahs, D.M., 2009. Prevalence and Correlates of Depression in Individuals With and Without Type 1 Diabetes. *Diabetes Care* 32, 575–579. <https://doi.org/10.2337/dc08-1835>
- Grace, A.A., Bunney, B.S., 1983. Intracellular and extracellular electrophysiology of nigral dopaminergic neurons—1. Identification and characterization. *Neuroscience* 10, 301–315. [https://doi.org/10.1016/0306-4522\(83\)90135-5](https://doi.org/10.1016/0306-4522(83)90135-5)
- Guilloux, J.-P., Seney, M., Edgar, N., Sibille, E., 2011. Integrated behavioral z-scoring increases the sensitivity and reliability of behavioral phenotyping in mice: Relevance to emotionality and sex. *Journal of Neuroscience Methods* 197, 21–31. <https://doi.org/10.1016/j.jneumeth.2011.01.019>
- Gupta, D., Kurhe, Y., Radhakrishnan, M., 2014. Antidepressant effects of insulin in streptozotocin induced diabetic mice: Modulation of brain serotonin system. *Physiology & Behavior* 129, 73–78. <https://doi.org/10.1016/j.physbeh.2014.02.036>
- Hajós, M., Sharp, T., 1996. Burst-firing activity of presumed 5-HT neurones of the rat dorsal raphe nucleus: electrophysiological analysis by antidromic stimulation. *Brain Research* 740, 162–168. [https://doi.org/10.1016/S0006-8993\(96\)00869-4](https://doi.org/10.1016/S0006-8993(96)00869-4)
- Han, S., Englander, E.W., Gomez, G.A., Rastellini, C., Quertermous, T., Kundu, R.K., Greeley, G.H., 2015. Pancreatic Islet APJ Deletion Reduces Islet Density and Glucose Tolerance in Mice. *Endocrinology* 156, 2451–2460. <https://doi.org/10.1210/en.2014-1631>
- Ho, N., Balu, D.T., Hilario, M.R.F., Blendy, J.A., Lucki, I., 2012. Depressive phenotypes evoked by experimental diabetes are reversed by insulin. *Physiology & Behavior* 105, 702–708. <https://doi.org/10.1016/j.physbeh.2011.09.003>
- Ji, S., Wang, L., Li, L., 2019. Effect of Metformin on Short-Term High-Fat Diet-Induced Weight Gain and Anxiety-Like Behavior and the Gut Microbiota. *Front. Endocrinol.* 10, 704. <https://doi.org/10.3389/fendo.2019.00704>
- Kadoglou, N.P.E., Tsanikidis, H., Kapelouzou, A., Vrabas, I., Vitta, I., Karayannacos, P.E., Liapis, C.D., Sailer, N., 2010. Effects of rosiglitazone and metformin treatment on apelin, visfatin, and ghrelin levels in patients with type 2 diabetes mellitus. *Metabolism* 59, 373–379. <https://doi.org/10.1016/j.metabol.2009.08.005>
- Kawamata, Y., Habata, Y., Fukusumi, S., Hosoya, M., Fujii, R., Hinuma, S., Nishizawa, N., Kitada, C., Onda, H., Nishimura, O., Fujino, M., 2001. Molecular properties of apelin: tissue distribution and receptor binding. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Cell Research* 1538, 162–171. [https://doi.org/10.1016/S0167-4889\(00\)00143-9](https://doi.org/10.1016/S0167-4889(00)00143-9)

- Kleinridders, A., Cai, W., Cappellucci, L., Ghazarian, A., Collins, W.R., Vienberg, S.G., Pothos, E.N., Kahn, C.R., 2015. Insulin resistance in brain alters dopamine turnover and causes behavioral disorders. *Proc Natl Acad Sci U S A* 112, 3463–3468. <https://doi.org/10.1073/pnas.1500877112>
- Lanfume, L., La Cour, C.M., Froger, N., Hamon, M., 2000. 5-HT-HPA Interactions in Two Models of Transgenic Mice Relevant to Major Depression. *Neurochem Res* 25, 1199–1206. <https://doi.org/10.1023/A:1007683810230>
- Lee, D.K., Cheng, R., Nguyen, T., Fan, T., Kariyawasam, A.P., Liu, Y., Osmond, D.H., George, S.R., O'Dowd, B.F., 2001. Characterization of Apelin, the Ligand for the APJ Receptor. *Journal of Neurochemistry* 74, 34–41. <https://doi.org/10.1046/j.1471-4159.2000.0740034.x>
- Liu, J., Guo, M., Zhang, D., Cheng, S.-Y., Liu, M., Ding, J., Scherer, P.E., Liu, F., Lu, X.-Y., 2012. Adiponectin is critical in determining susceptibility to depressive behaviors and has antidepressant-like activity. *Proc Natl Acad Sci USA* 109, 12248–12253. <https://doi.org/10.1073/pnas.1202835109>
- Malhi GS, Mann JJ. Depression. *Lancet*. 2018 Nov 24;392(10161):2299-2312. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(18\)31948-2](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(18)31948-2).
- Martin, H., Bullich, S., Guiard, B.P., Fioramonti, X., 2021. The impact of insulin on the serotonergic system and consequences on diabetes-associated mood disorders. *J Neuroendocrinol* 33. <https://doi.org/10.1111/jne.12928>
- Matthews, D.R., Hosker, J.P., Rudenski, A.S., Naylor, B.A., Treacher, D.F., Turner, R.C., 1985. Homeostasis model assessment: insulin resistance and beta-cell function from fasting plasma glucose and insulin concentrations in man. *Diabetologia* 28, 412–419. <https://doi.org/10.1007/BF00280883>
- Medhurst, A.D., Jennings, C.A., Robbins, M.J., Davis, R.P., Ellis, C., Winborn, K.Y., Lawrie, K.W.M., Hervieu, G., Riley, G., Bolaky, J.E., Herrity, N.C., Murdock, P., Darker, J.G., 2003. Pharmacological and immunohistochemical characterization of the APJ receptor and its endogenous ligand apelin. *J Neurochem* 84, 1162–1172. <https://doi.org/10.1046/j.1471-4159.2003.01587.x>
- Milstein, J.L., Ferris, H.A., 2021. The brain as an insulin-sensitive metabolic organ. *Molecular Metabolism* 101234. <https://doi.org/10.1016/j.molmet.2021.101234>
- Miyata, S., Hirano, S., Kamei, J., 2004. Diabetes Attenuates the Antidepressant-Like Effect Mediated by the Activation of 5-HT_{1A} Receptor in the Mouse Tail Suspension Test. *Neuropsychopharmacol* 29, 461–469. <https://doi.org/10.1038/sj.npp.1300354>
- Newson, M.J.F., Pope, G.R., Roberts, E.M., Lolait, S.J., O'Carroll, A.-M., 2013. Stress-dependent and gender-specific neuroregulatory roles of the apelin receptor in the hypothalamic–pituitary–adrenal axis response to acute stress. *Journal of Endocrinology* 216, 99–109. <https://doi.org/10.1530/JOE-12-0375>
- Nicolas, S., Veyssière, J., Gandin, C., Zsürger, N., Pietri, M., Heurteaux, C., Glaichenhaus, N., Petit-Paitel, A., Chabry, J., 2015. Neurogenesis-independent antidepressant-like effects of enriched environment is dependent on adiponectin. *Psychoneuroendocrinology* 57, 72–83. <https://doi.org/10.1016/j.psyneuen.2015.03.017>
- Nishitani, N., Nagayasu, K., Asaoka, N., Yamashiro, M., Andoh, C., Nagai, Y., Kinoshita, H., Kawai, H., Shibui, N., Liu, B., Hewinson, J., Shirakawa, H., Nakagawa, T., Hashimoto, H., Kasparov, S., Kaneko, S., 2019. Manipulation of dorsal raphe serotonergic neurons modulates active coping to inescapable stress and anxiety-related behaviors in mice and rats. *Neuropsychopharmacol* 44, 721–732. <https://doi.org/10.1038/s41386-018-0254-y>
- O'Carroll, A.-M., Selby, T.L., Palkovits, M., Lolait, S.J., 2000. Distribution of mRNA encoding B78/apj, the rat homologue of the human APJ receptor, and its endogenous ligand apelin in brain and peripheral tissues. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Gene Structure and Expression* 1492, 72–80. [https://doi.org/10.1016/S0167-4781\(00\)00072-5](https://doi.org/10.1016/S0167-4781(00)00072-5)

- Oster, A., Faure, P., Gutkin, B.S., 2015. Mechanisms for multiple activity modes of VTA dopamine neurons. *Front. Comput. Neurosci.* 9. <https://doi.org/10.3389/fncom.2015.00095>
- Phillips, C.M., Perry, I.J., 2015. Depressive symptoms, anxiety and well-being among metabolic health obese subtypes. *Psychoneuroendocrinology* 62, 47–53. <https://doi.org/10.1016/j.psyneuen.2015.07.168>
- Rena, G., Hardie, D.G., Pearson, E.R., 2017. The mechanisms of action of metformin. *Diabetologia* 60, 1577–1585. <https://doi.org/10.1007/s00125-017-4342-z>
- Rosen, E.D., Spiegelman, B.M., 2006. Adipocytes as regulators of energy balance and glucose homeostasis. *Nature* 444, 847–853. <https://doi.org/10.1038/nature05483>
- Roy, T., Lloyd, C.E., 2012. Epidemiology of depression and diabetes: A systematic review. *Journal of Affective Disorders* 142, S8–S21. [https://doi.org/10.1016/S0165-0327\(12\)70004-6](https://doi.org/10.1016/S0165-0327(12)70004-6)
- Sachs, B.D., Rodriguiz, R.M., Siesser, W.B., Kenan, A., Royer, E.L., Jacobsen, J.P.R., Wetsel, W.C., Caron, M.G., 2013. The effects of brain serotonin deficiency on behavioural disinhibition and anxiety-like behaviour following mild early life stress. *International Journal of Neuropsychopharmacology* 16, 2081–2094. <https://doi.org/10.1017/S1461145713000321>
- Santos, E.W., Oliveira, D.C., Hastreiter, A., Silva, G.B., Beltran, J.S. de O., Rogero, M.M., Fock, R.A., Borelli, P., 2019. Short-term high-fat diet affects macrophages inflammatory response, early signs of a long-term problem. *Braz. J. Pharm. Sci.* 55, e17561. <https://doi.org/10.1590/s2175-97902019000117561>
- Shaban, M.C., Fosbury, J., Kerr, D., Cavan, D.A., 2006. The prevalence of depression and anxiety in adults with Type 1 diabetes: Short report. *Diabetic Medicine* 23, 1381–1384. <https://doi.org/10.1111/j.1464-5491.2006.02012.x>
- Shen, P., Yue, Q., Fu, W., Tian, S.-W., You, Y., 2019. Apelin-13 ameliorates chronic water-immersion restraint stress-induced memory performance deficit through upregulation of BDNF in rats. *Neurosci Lett* 696, 151–155. <https://doi.org/10.1016/j.neulet.2018.11.051>
- Tatemoto, K., Hosoya, M., Habata, Y., Fujii, R., Kakegawa, T., Zou, M.-X., Kawamata, Y., Fukusumi, S., Hinuma, S., Kitada, C., Kurokawa, T., Onda, H., Fujino, M., 1998. Isolation and Characterization of a Novel Endogenous Peptide Ligand for the Human APJ Receptor. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 251, 471–476. <https://doi.org/10.1006/bbrc.1998.9489>
- Telegdy, G., Jászberényi, M., 2014. Transmitter mediation of the anxiolytic action of apelin-13 in male mice. *Behavioural Brain Research* 263, 198–202. <https://doi.org/10.1016/j.bbr.2014.01.009>
- Tian, S.-W., Xu, F., Gui, S.-J., 2018. Apelin-13 reverses memory impairment and depression-like behavior in chronic social defeat stressed rats. *Peptides* 108, 1–6. <https://doi.org/10.1016/j.peptides.2018.08.009>
- Wang, F., Wang, S., Zong, Q. -Q., Zhang, Q., Ng, C.H., Ungvari, G.S., Xiang, Y. -T., 2019. Prevalence of comorbid major depressive disorder in Type 2 diabetes: a meta-analysis of comparative and epidemiological studies. *Diabet. Med.* 36, 961–969. <https://doi.org/10.1111/dme.14042>
- Xiao, Z.-Y., Wang, B., Fu, W., Jin, X., You, Y., Tian, S.-W., Kuang, X., 2018. The Hippocampus is a Critical Site Mediating Antidepressant-like Activity of Apelin-13 in Rats. *Neuroscience* 375, 1–9. <https://doi.org/10.1016/j.neuroscience.2018.02.001>
- Yarchoan, M., Arnold, S.E., 2014. Repurposing Diabetes Drugs for Brain Insulin Resistance in Alzheimer Disease. *Diabetes* 63, 2253–2261. <https://doi.org/10.2337/db14-0287>
- Yue, P., Jin, H., Aillaud, M., Deng, A.C., Azuma, J., Asagami, T., Kundu, R.K., Reaven, G.M., Quertermous, T., Tsao, P.S., 2010. Apelin is necessary for the maintenance of insulin sensitivity. *American Journal of Physiology-Endocrinology and Metabolism* 298, E59–E67. <https://doi.org/10.1152/ajpendo.00385.2009>

- Zarrindast, M.-R., Khakpai, F., 2015. The Modulatory Role of Dopamine in Anxiety-like Behavior. *Arch Iran Med* 18, 591–603. <https://doi.org/0151809/AIM.009>
- Zemdegs, J., Martin, H., Pintana, H., Bullich, S., Manta, S., Marqués, M.A., Moro, C., Layé, S., Ducrocq, F., Chattipakorn, N., Chattipakorn, S.C., Rampon, C., Pénicaud, L., Fioramonti, X., Guiard, B.P., 2019. Metformin Promotes Anxiolytic and Antidepressant-Like Responses in Insulin-Resistant Mice by Decreasing Circulating Branched-Chain Amino Acids. *J. Neurosci.* 39, 5935–5948. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.2904-18.2019>
- Zemdegs, J., Quesseveur, G., Jarriault, D., Pénicaud, L., Fioramonti, X., Guiard, B.P., 2016. High-fat diet-induced metabolic disorders impairs 5-HT function and anxiety-like behavior in mice: Correlation between metabolic disorders and anxiety. *British Journal of Pharmacology* 173, 2095–2110. <https://doi.org/10.1111/bph.13343>
- Zhang, Z., Li, E., Yan, J., Fu, W., Shen, P., Tian, S.-W., You, Y., 2019. Apelin attenuates depressive-like behavior and neuroinflammation in rats co-treated with chronic stress and lipopolysaccharide. *Neuropeptides* 77, 101959. <https://doi.org/10.1016/j.npep.2019.101959>

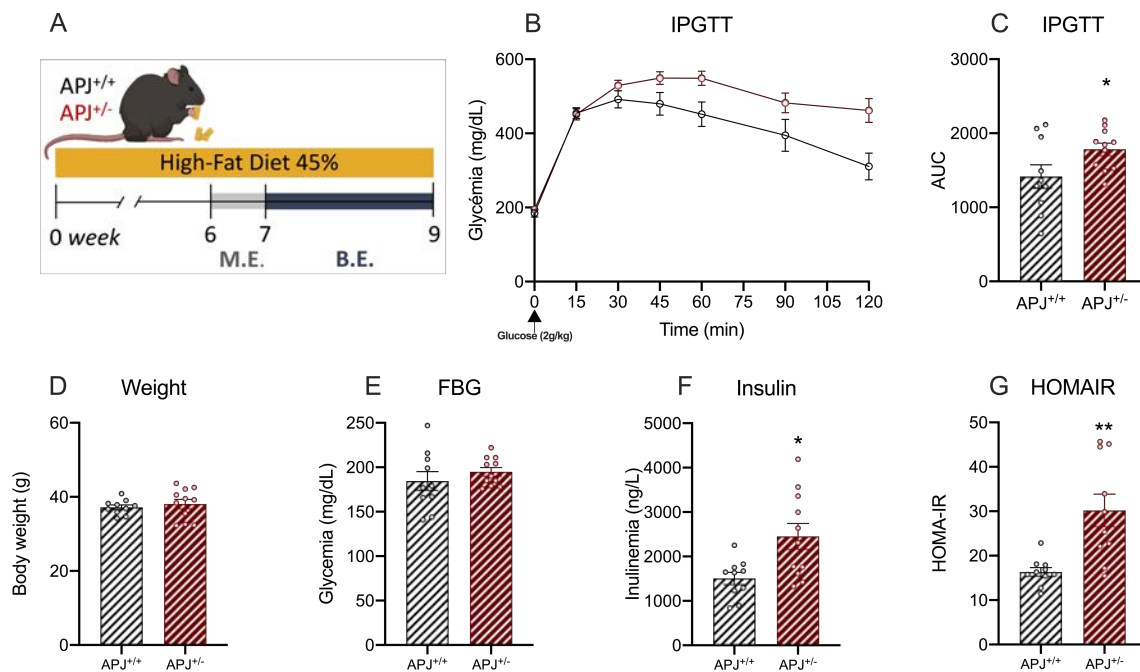


Figure 1 : Higher impairment of insulin sensitivity in APJ KO^{+/-} mice fed a HFD for 6 weeks. (A) Experimental protocol. M.E. = metabolic experiments, B.E. = behavioral experiments. (B) Time course of fasting glycemia (mg/dL) during an intraperitoneal glucose tolerance test (IPGTT). (C) Area Under the Curve (AUC) of IPGTT. T-test $p=0,0478$. (D) Mouse body weight (g). T-test $p=0,5625$. (E-F) Fasting blood glucose (mg/dL) and insulinemia (ng/L). T-test $p=0,3645$ and : $0,0107$; respectively. (G) Homeostasis model assessment of insulin resistance (HOMA-IR). T-test $p=0,0018$. Each value represents mean \pm SEM from at least 10 mice in each group. * $p<0,05$: significantly different from wild-type APJ^{+/+} mice.

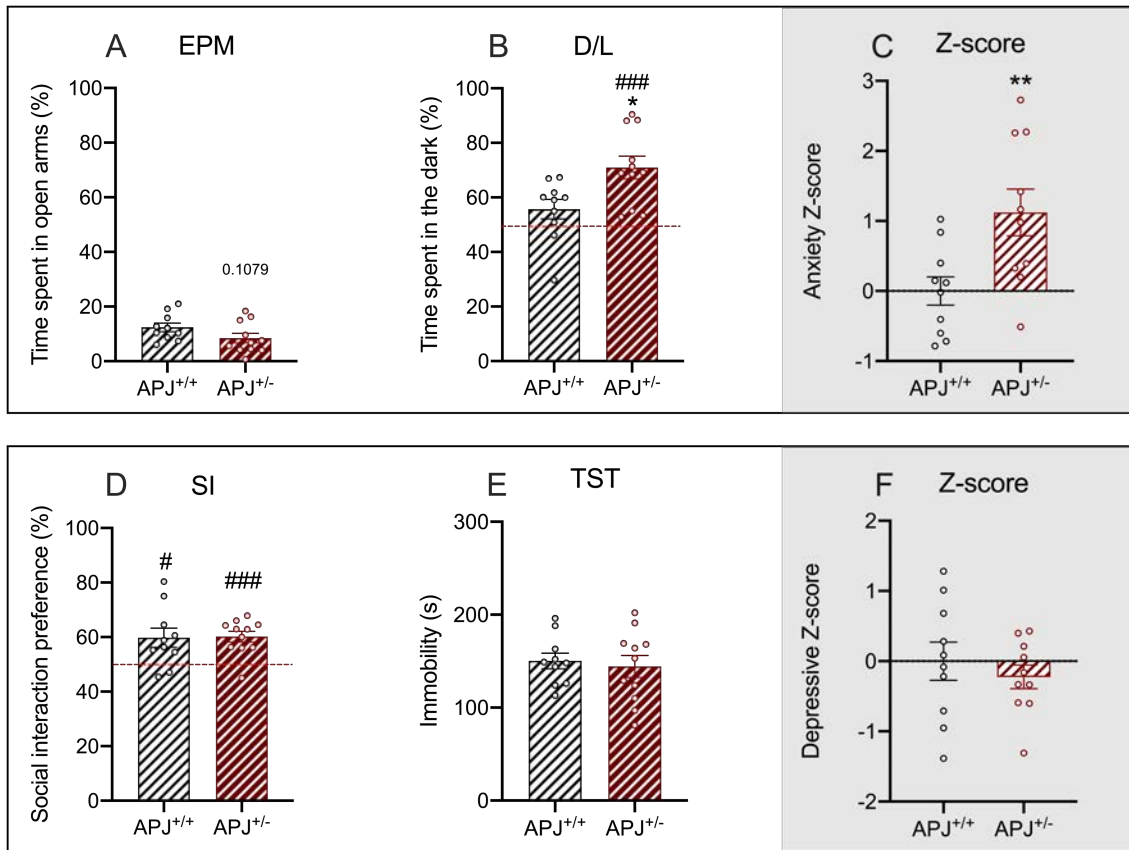


Figure 2 : Higher impairment of anxiety in APJ^{+/-} mice fed a HFD for 6 weeks. (A) Time spent in open arms (%) in the elevated plus-maze experiment (EPM). T-test $p=0,1079$. (B) Time spent in the dark compartment (%) in the dark-light (DL) test. T-test $p=0,0122$, One sample t-test compared to 50% p-values : $0,1414$ (APJ^{+/+}) and $0,0005$ (APJ^{+/-}). (C) Anxiety Z-score (parameters included : time spent in the open arms (EPM) and time spent in the dark compartment (D/L)). T-test $p=0,0098$ (D) Social interaction time (%) during the social interaction (SI) test. T-test $p=0,9282$, One sample t-test compared to 50% p-values : $0,0206$ (APJ^{+/+}) and $0,0004$ (APJ^{+/-}). (E) Time of immobility (sec) in the tail suspension test (TST). T-test $p=0,6915$. Each value represents mean \pm SEM from at least 10 mice in each group. (F) Depression Z-score (parameters included : social interaction preference (SI) and immobility time (TST)). T-test $p=0,4923$. * $p<0,05$ and ** $p<0,01$ significantly different from APJ^{+/+}; # $p<0,05$ and ### $p<0,001$ significantly different from chance level (50%).

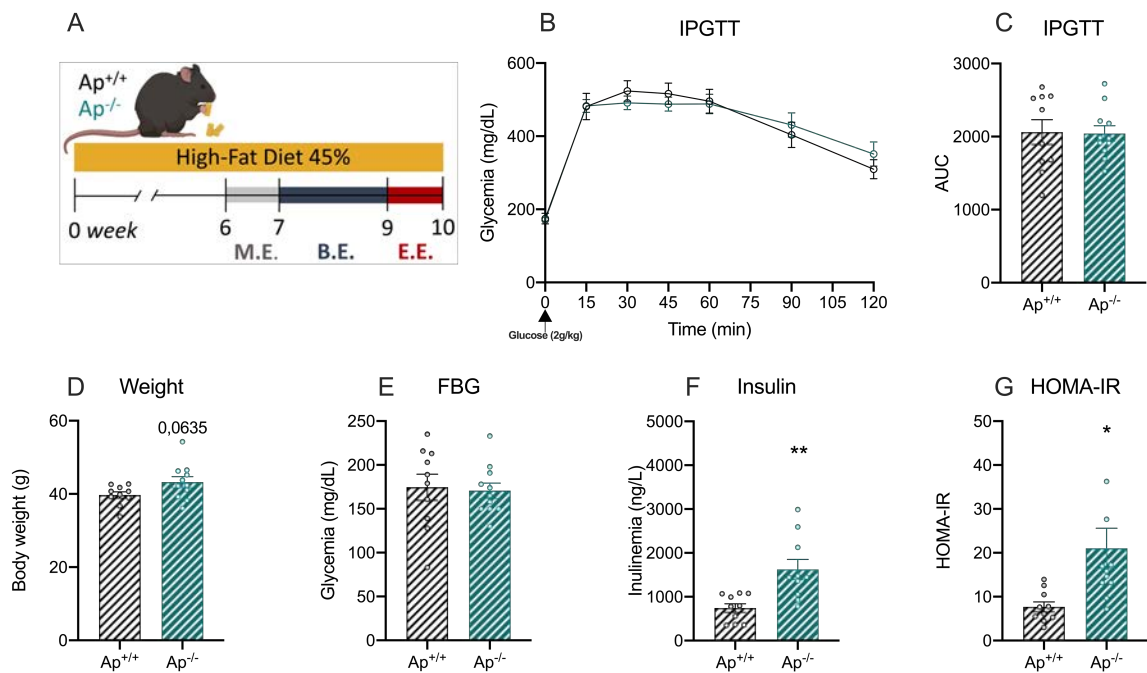


Figure 3 : Higher impairment of insulin sensitivity in Ap^{-/-} mice fed a HFD for 6 weeks. (A) Experimental protocol. M.E. = metabolic experiments, B.E. = behavioral experiments, E.E. = electrophysiology experiment. (B) Time course of fasting glycemia (mg/dL) during an intraperitoneal glucose test tolerance test (IPGTT). (C) Area Under the Curve (AUC) of IPGTT. T-test $p=0,9188$. (D) Mouse body weight (g). T-test $p=0,0635$. (E-F) Fasting blood glucose (mg/dL) and insulinemia (ng/L). T-test $p=0,8161$ and $: 0,0025$; respectively. (G) Homeostasis model assessment of insulin resistance (HOMA-IR). T-test $p=0,0139$. Each value represents mean \pm SEM from at least 10 mice in each group. * $p<0,05$: significantly different and ** $p<0,01$: significantly different from wild-type Ap^{+/+} mice.

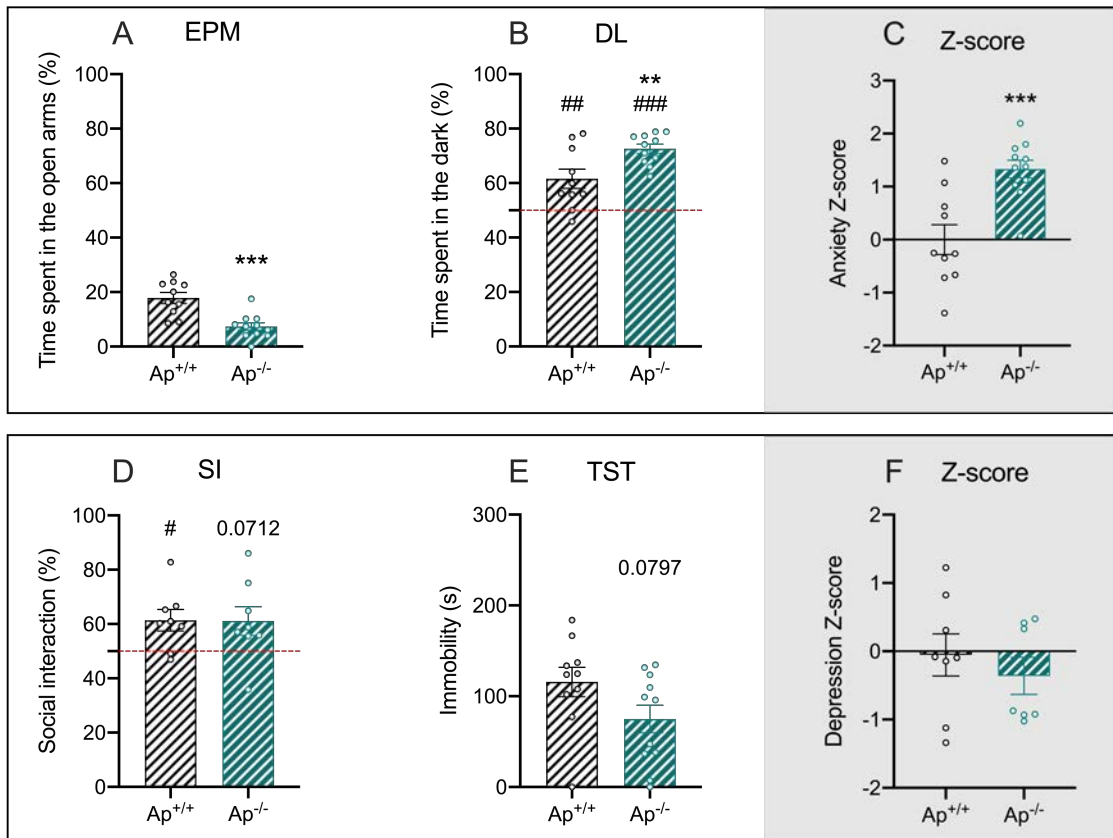


Figure 4 : Robust anxiety-like behavior in $Ap^{-/-}$ mice fed a HFD for 6 weeks ND. (A) Time spent in open arms (%) in the elevated plus-maze experiment (EPM). T-test $p=0,0003$. (B) Time spent in the dark compartment (%) in the dark-light (DL) test. T-test $p=0,0089$, One sample t-test compared to 50% p-values : 0,009 ($Ap^{+/+}$) and $<0,0001$ ($Ap^{-/-}$) (C) Anxiety Z-score (parameters included : time spent in the open arms (EPM) and time spent in the dark compartment (D/L)). T-test $p=0,0005$. (D) Social interaction time (%) in the social interaction (SI) test. T-test $p=0,9697$, One sample t-test compared to 50% p-values : 0,0229 ($Ap^{+/+}$) and 0,0712 ($Ap^{-/-}$). (E) Time of immobility (sec) in the tail suspension test (TST). T-test $p=0,0797$. Each value represents mean \pm SEM from at least 10 mice in each group. (F) Depression Z-score (parameters included : social interaction preference (SI) and immobility time (TST)). T-test $p=0,4736$. ** $p<0,01$ and *** $p<0,001$: significantly different from wild-type $Ap^{+/+}$ mice. ## $p<0,01$ and ### $p<0,001$ significantly different from chance level (50%).

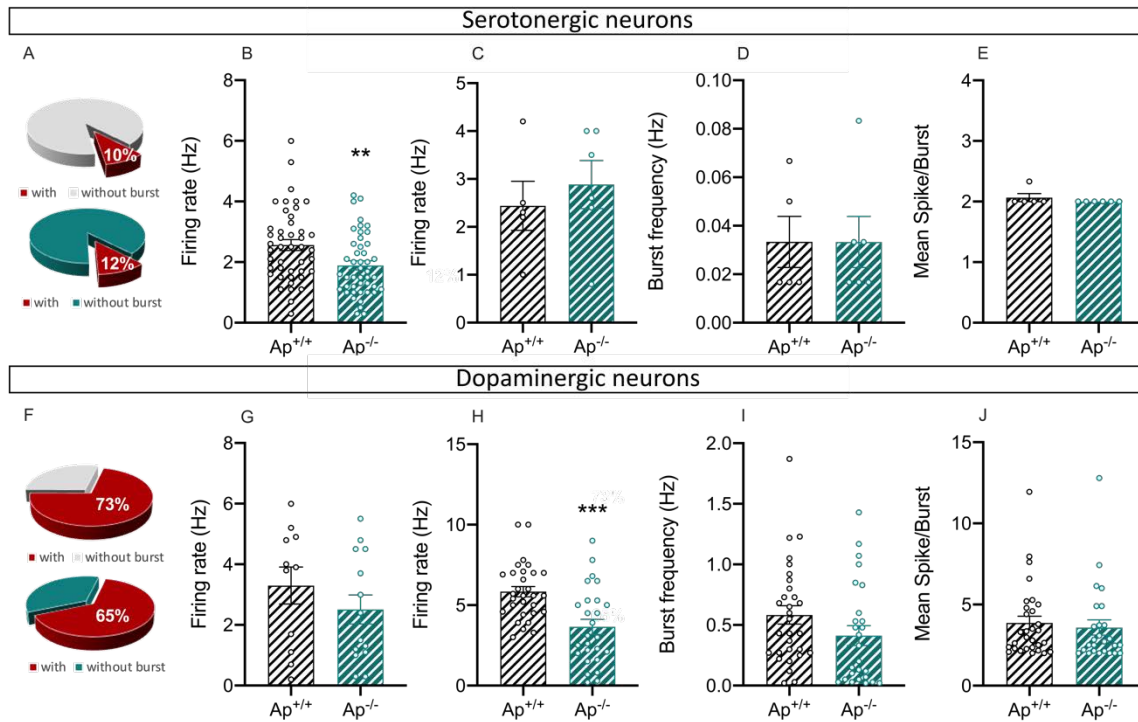


Figure 5: Decreased serotonergic and dopaminergic firing rate in Ap^{-/-} mice. *In vivo* electrophysiology on anesthetized mice: (A) Percentage of 5-HT bursting neurons; (B) Firing rate of non-bursting 5-HT neurons, T-test $p=0,0051$; (C) Firing rate, T-test $p=0,5542$, (D) burst frequency, T-test $p>0,9999$ and (E) mean spike per burst, T-test $p=0,2967$ of 5-HT bursting neurons of DRN. (F) Percentage of bursting neurons; (G) Firing rate of non-bursting DA neurons, T-test $p=0,0051$; (H) Firing rate of bursting DA neurons, T-test $p=0,5542$, (I) burst frequency, T-test $p=0,1309$ and (J) mean spike per burst, T-test $p=0,6495$ of DA bursting neurons of VTA. ** $p<0,01$ and *** $p<0,001$: significantly different from wild-type Ap^{+/+} mice.

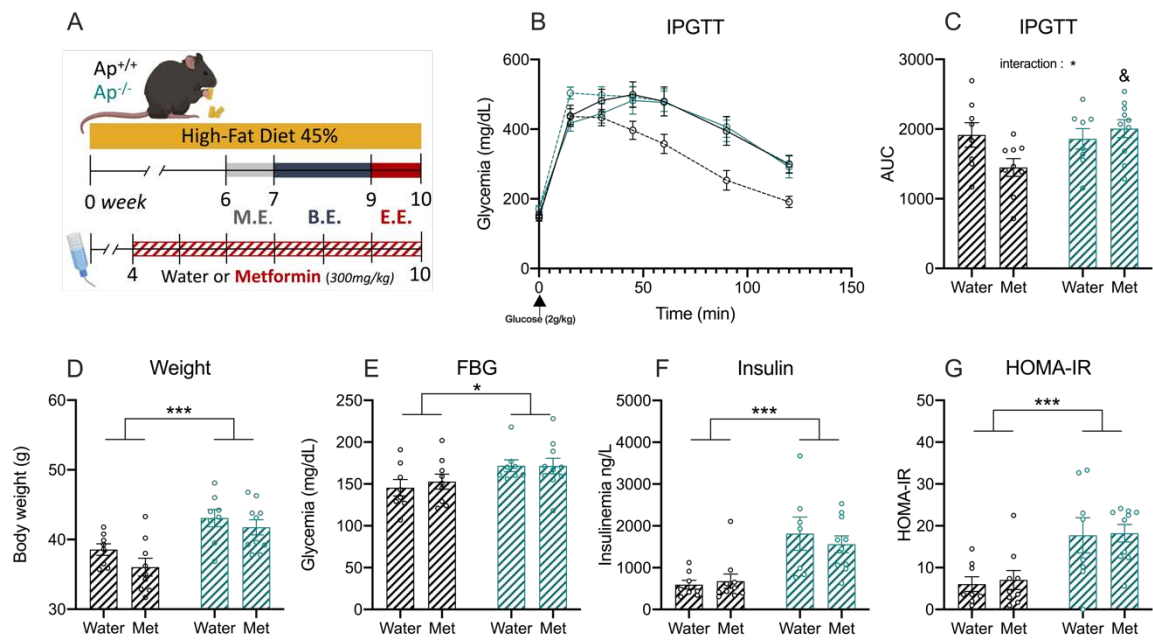


Figure 6 : Metformin resistance on insulin-sensitivity in $Ap^{-/-}$ mice. (A) Experimental protocol. &M.E. = metabolic experiments, B.E. = behavioral experiments. (B) Time course of fasting glycemia (mg/dL) during an intraperitoneal glucose test tolerance test (IPGTT). (C) Area Under the Curve (AUC) of IPGTT. ANOVA : Interaction $F(1,31)=4,572$ $p=0,0405$; Treatment $F(1,31)=1,248$ $p=0,2725$ & Genotype $F(1,31)=3,032$ $p=0,0916$. (D) Mouse body weight (g). ANOVA : Interaction $F(1,31)=0,2810$ $p=0,5998$; Treatment $F(1,31)=2,2878$ $p=0,0998$ & Genotype $F(1,31)=20,27$ $p<0,001$. (E-F) Fasting blood glucose (mg/dL) and insulinemia (ng/L) . ANOVA : Interaction $F(1,31)=0,1771$ $p=0,6767$; Treatment $F(1,31)=0,1544$ $p=0,6971$ & Genotype $F(1,31)=6,323$ $p=0,0173$ and ANOVA : Interaction $F(1,31)=0,5577$ $p=0,4608$; Treatment $F(1,31)=0,1397$ $p=0,7111$ & Genotype $F(1,31)=21,84$ $p<0,001$. (G) Homeostasis model assessment of insulin resistance (HOMA-IR). ANOVA : Interaction $F(1,31)=0,0078$ $p=0,9294$; Treatment $F(1,31)=0,0765$ $p=0,7839$ & Genotype $F(1,31)=18,25$ $p<0,001$. Each value represents mean \pm SEM from at least 8 mice in each group. * $p<0,05$, ** $p<0,01$ and *** $p<0,001$: significantly different from wild-type $Ap^{+/+}$ mice. & $p<0,05$: significantly different from $Ap^{+/+}$ Met mice.

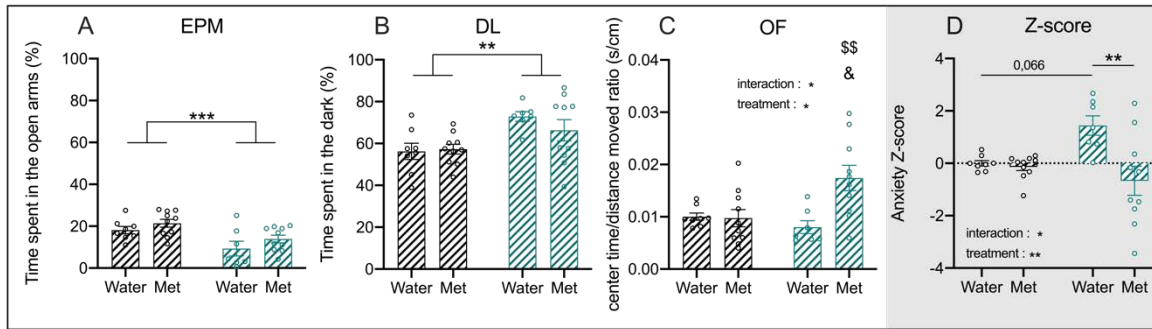


Figure 7 : Anxiolytic-like effects of Metformin in $Ap^{-/-}$ mice. (A) Time spent in open arms (%) during the elevated plus-maze (EPM). ANOVA : Interaction $F(1,31)=0,0876$ $p=0,7692$; Treatment $F(1,31)=3,143$ $p=0,0861$ & Genotype $F(1,31)=13,60$ $p<0,001$. (B) Time spent in the dark compartment (%) during the dark-light (DL) test. ANOVA : Interaction $F(1,31)=0,9987$ $p=0,3254$; Treatment $F(1,31)=0,5213$ $p=0,4757$ & Genotype $F(1,31)=11,36$ $p=0,002$. (C) Ratio of time spent in center (sec) / distance travelled (cm) in the open field (OF). ANOVA : Interaction $F(1,31)=7,237$ $p=0,0114$; Treatment $F(1,31)=6,377$ $p=0,0169$ & Genotype $F(1,31)=2,475$ $p=0,1258$. (D) Anxiety Z-score (parameters included : time spent in the open arms (EPM), time spent in the dark compartment (D/L) and center time/distance moved ratio (OF)). ANOVA : Interaction $F(1,31)=7,167$ $p=0,0118$; Treatment $F(1,31)=9,268$ $p=0,0047$ & Genotype $F(1,31)=1,527$ $p=0,2258$. Each value represents mean \pm SEM from at least 7 mice in each group. ** $p<0,01$ and *** $p<0,001$: significantly different from $Ap^{+/+}$ mice, \$\$ $p<0,01$: significantly different from $Ap^{-/-}$ Water mice, & $p<0,05$: significantly different from $Ap^{+/+}$ Met mice and # $p<0,05$: significantly different from chance level (50%).

Supplemental :

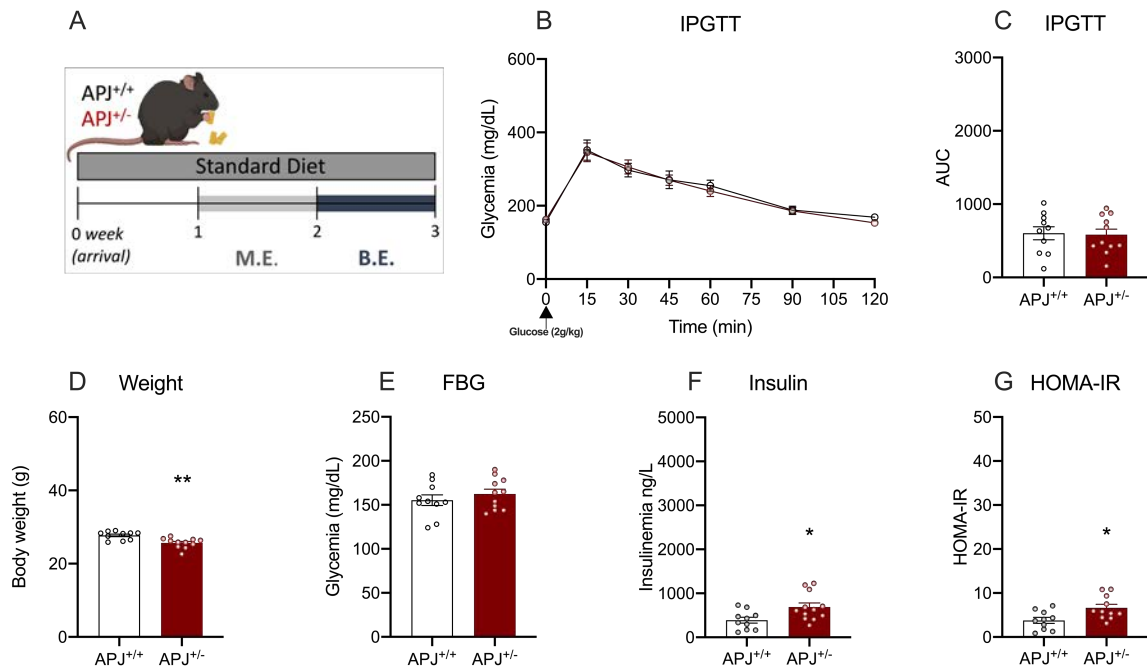


Figure 1S : Normal insulin sensitivity in APJ^{+/-} mice fed a ND. (A) Experimental protocol. (B) Time course of fasting glycemia (mg/dL) during an intraperitoneal glucose test tolerance test (IPGTT). (C) Area Under the Curve (AUC) of IPGTT. T-test p-value : 0,8666. (D) Mouse body weight (g). T-test p-value : 0,0014. (E-F) Fasting blood glucose (mg/dL) and insulinemia (ng/L). T-test p-value : 0,3856. and p-value : 0,0186; respectively (G) Homeostasis model assessment of insulin resistance (HOMA-IR). T-test p-value : p-value : 0,0146. Each value represents mean \pm SEM from at least 10 mice in each group. * $p < 0,05$ and ** $p < 0,01$: significantly different from wild-type APJ^{+/+} mice.

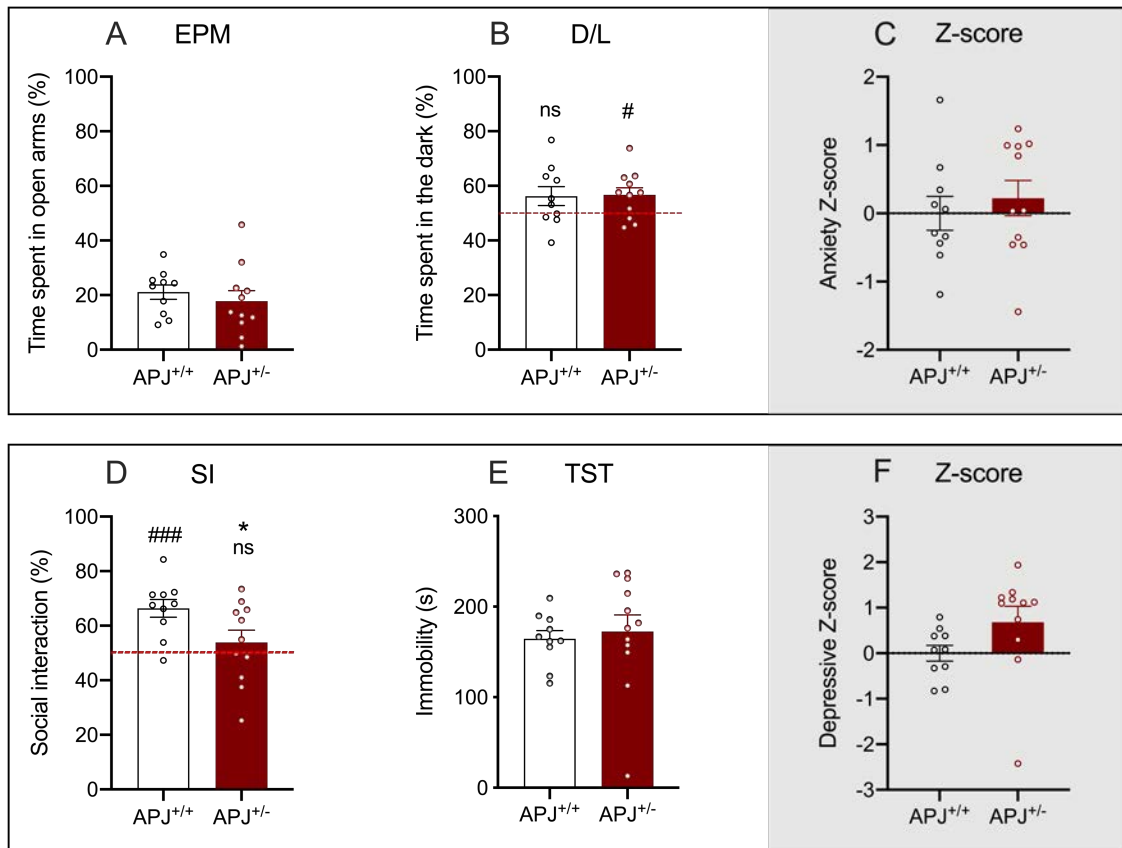


Figure 2S : Aberrant social behavior but normal level of innate anxiety and despair in APJ^{+/-} mice fed a ND. (A) Time spent in open arms (%) in the elevated plus-maze (EPM). T-test p-value : 0,4912. (B) Time spent in the dark compartment (%) in the dark-light (DL) test. T-test p-value : 0,9154. One sample t-test compared to 50% p-values : 0,1067 (APJ^{+/+}) and 0,0281 (APJ^{+/-}). (C) Anxiety Z-score (parameters included : time spent in the open arms (EPM) and time spent in the dark compartment (D/L)). T-test p=0,5435. (D) Social interaction time (%) in the social interaction (SI) test. T-test p-value : 0,0396, One sample t-test compared to 50% p-values : 0,0007 (APJ^{+/+}) and 0,4071 (APJ^{+/-}). (E) Time of immobility (sec) in the tail suspension test (TST). T-test p-value : 0,7117. (F) Depressive Z-score (parameters included : social interaction preference (SI) and immobility time (TST)). T-test p=0,1086. Each value represents mean ± SEM from at least 10 mice in each group. *p<0,05 : significantly different from wild-type APJ^{+/+} mice. #p<0,05 and ###p<0,001 significantly different from chance level (50%).

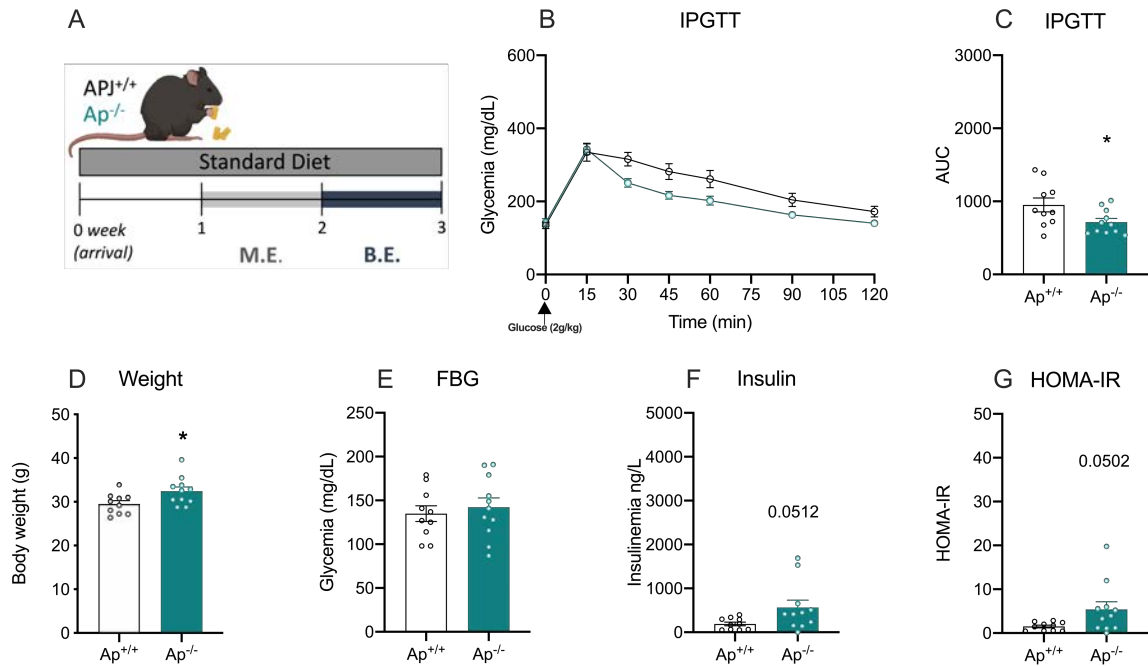


Figure 3S : Improved glucose tolerance in $Ap^{-/-}$ mice fed a ND. (A) Experimental protocol. (B) Time course of fasting glycemia (mg/dL) during an intraperitoneal glucose test tolerance test (IPGTT). (C) Area Under the Curve (AUC) of IPGTT. T-test p-value : 0,0371. (D) Mouse body weight (g). T-test p-value : 0,0292. (E-F) Fasting blood glucose (mg/dL) and insulinemia (ng/L). T-test p-value : 0,6100. and 0,0512; respectively. (G) Homeostasis model assessment of insulin resistance (HOMA-IR). T-test p-value : 0,0502. Each value represents mean \pm SEM from at least 10 mice in each group. $p < 0,05$ and $**p < 0,01$: significantly different from wild-type $Ap^{+/+}$ mice.

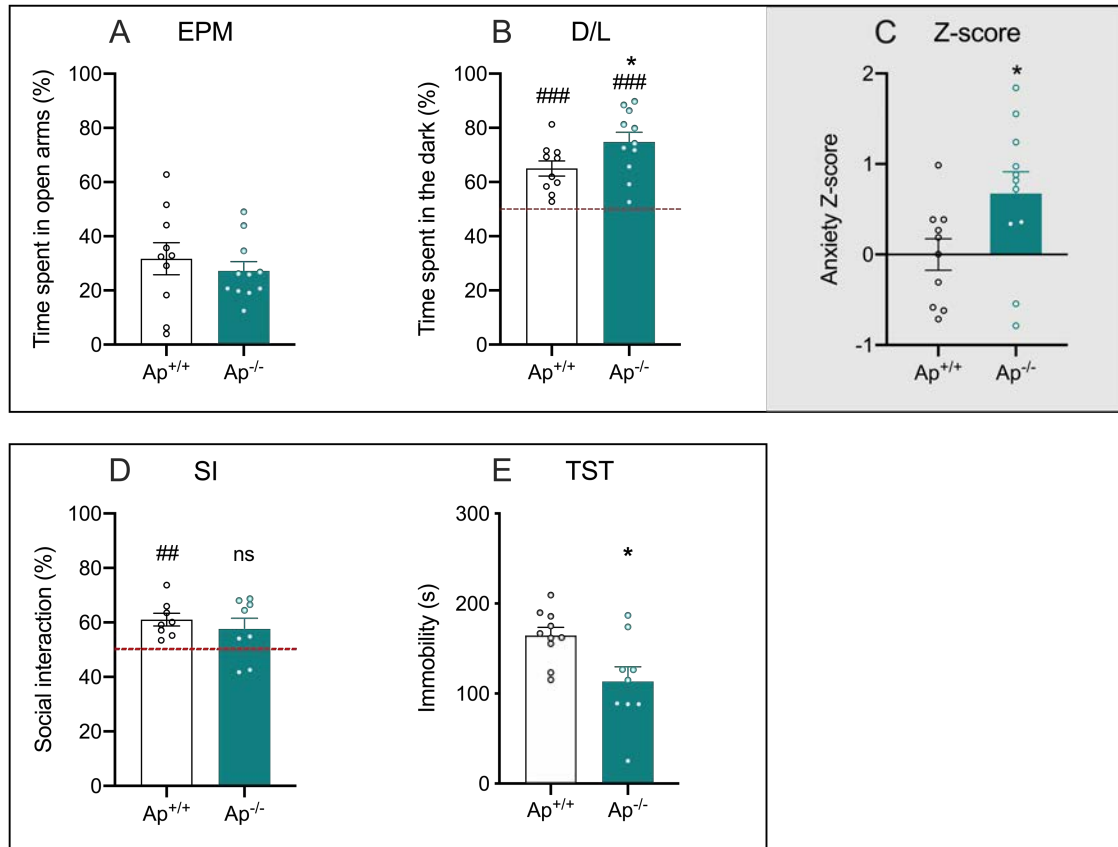


Figure 4S : Weak anxiety-like behavior in $Ap^{-/-}$ mice fed a ND. (A) Time spent in open arms (%) in the elevated plus-maze experiment (EPM). T-test p-value : 0,5075. (B) Time spent in the dark compartment (%) in the dark-light (DL) test. T-test p-value : 0,0487, One sample t-test compared to 50% p-values : 0,0004 ($Ap^{+/+}$) and <0,0001 ($Ap^{-/-}$). (C) Anxiety Z-score (parameters included : time spent in the open arms (EPM) and time spent in the dark compartment (D/L)). T-test p=0,0389. (D) Social interaction time (%) during the social interaction (SI) test. T-test p-value : 0,4694, One sample t-test compared to 50% p-values : 0,0021 ($Ap^{+/+}$) and 0,0908 ($Ap^{-/-}$). (E) Time of immobility (sec) in the tail suspension test (TST). T-test p-value : 0,0116. Each value represents mean \pm SEM from at least 10 mice in each group. * $p < 0,05$: significantly different from wild-type $Ap^{+/+}$ mice. ## $p < 0,01$ and ### $p < 0,001$: significantly different from chance level (50%).

Dans cette étude, nous montrons que l'inactivation génétique de l'apeline ou de son récepteur APJ promeut une plus grande susceptibilité au régime HFD d'un point de vue métabolique mais aussi neurocomportemental. En effet, les souris $Ap^{-/-}$ et $APJ^{+/-}$ présentent un phénotype anxieux exacerbé comparé aux souris sauvages associé à une diminution de l'activité électrique des neurones sérotoninergiques et dopaminergiques.

Ce travail mené sur un modèle combinant facteur génétique (déficit en apeline ou son récepteur) et environnemental (régime diabétogène ou HFD) confirme qu'une perturbation de la sensibilité à l'insuline reproduit les effets comportementaux et électrophysiologiques observés dans le modèle STZ.

Partie 3 : Etude de l'effet comportemental d'une stratégie insulino-sensibilisatrice (Metformine) dans des modèles de comorbidité diabète-depression

Face à ces résultats, et comme nous l'avons envisagé lors de la conception de ce projet de thèse, nous avons décidé de tester les effets antidépresseurs potentiels d'une stratégie insulino-sensibilisatrice avec l'administration chronique d'un antidiabétique oral, la metformine. Cet agent pharmacologique représente le traitement de première intention du DT2. Ce traitement à la metformine a été testé dans les trois modèles précédemment caractérisés au cours de ma thèse (ou juste avant celle-ci concernant le modèle HFD).

Si nous anticipions que la metformine devait avoir des effets métaboliques bénéfiques dans le modèle HFD, ce ne devrait pas être le cas dans le modèle STZ. Ainsi, en fonction des résultats neurocomportementaux observés, ce travail nous a conduit à préciser dans quelle mesure une action positive sur les paramètres métaboliques périphériques était un pré-requis à l'action de la metformine sur l'état émotionnel.

Les travaux présentés ci-dessous portent donc sur:

- 1) Les effets de la metformine dans le **modèle HFD** :

ARTICLE 4 :

La Metformine promeut une réponse anxiolytique et antidépresseur chez des souris insulino-résistantes en diminuant les acides aminés ramifiés circulants

Zemdegs J*; Martin H*, Pintana H*; **Bullich S**; Manta S, Marqués MA, Moro C, Layé S, Ducrocq F, Chattipakorn N, Chattipakorn SC, Rampon C, Pénicaud L; Fioramonti X[#]; Guiard BP[#]

¹*Centre de Recherches sur la Cognition Animale, Centre de Biologie Intégrative, Université de Toulouse, CNRS, 31000 Toulouse, France,*

²*Université de Bordeaux, Institut National de la Recherche Agronomique, Bordeaux INP, NutriNeuro, UMR 1286, F-33000 Bordeaux, France,*

³*Neurophysiology Unit, Cardiac Electrophysiology Research and Training Center, Faculty of Medicine, Chiang Mai University, Chiang Mai 50200, Thailand,*

⁴*INSERM, Paul Sabatier University, UMR 1048, Institute of Metabolic and Cardiovascular Diseases, Obesity Research Laboratory, 31000 Toulouse, France,*

⁵*UMR STROMALab, Université de Toulouse, CNRS ERL5311, Ecole Française du Sang, Institut National Polytechnique-Ecole Nationale Vétérinaire de Toulouse, INSERM U1031, BP 84225, F-31432, 31000 Toulouse Cedex 4, France, and*

⁶*Faculté de Pharmacie, Université Paris Sud, Université Paris-Saclay, 92290 Chatenay-Malabry, France*

JNeurosci, Juin 2019, <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.2904-18.2019>

Résumé :

Des études épidémiologiques indiquent que la résistance à l'insuline (IR), caractéristique du diabète de type 2, est associée à une augmentation du risque de dépression majeure. Dans cette étude, nous démontrons que des souris mâles nourries avec un régime riche en gras (HFD) présentent des perturbations métaboliques au niveau périphérique rappelant une IR associées à des taux d'acides aminés ramifiés (BCAA) élevés. Cependant ces modifications sont normalisées par un traitement chronique par la metformine (Met). Étant donné le rôle des BCAA dans la régulation de transport du tryptophane vers le cerveau, nous avons ensuite exploré l'activité du système sérotoninergique chez ces souris nourries avec un régime HFD. Il apparaît que les souris HFD présentent une altération de l'activité électrique des neurones 5-

HT du noyau du raphé dorsal (DRN) ainsi qu'une atténuation des concentrations extracellulaires de sérotonine dans l'hippocampe et une anxiété exacerbée, un symptôme précoce de la dépression. Au contraire, la Met stimule l'excitabilité et la neurotransmission sérotoninergique et atténue l'anxiété induite par le HFD. La Met promeut également des effets antidépresseurs similaires à ceux de la fluoxétine. A la lumière de ces résultats, nous avons préparé un régime HFD carencé en BCAA. Ce déficit en BCAA n'a pas permis de contrecarrer les perturbations métaboliques induites par le HFD mais a entraîné des effets antidépresseurs caractérisés par une potentialisation des effets neurocomportementaux de la fluoxétine. Nos résultats suggèrent que la Met pourrait diminuer les concentrations circulantes de BCAA, ce qui favoriserait le passage du tryptophane à travers la BHE et ainsi la synthèse et la neurotransmission sérotoninergique dans l'hippocampe pour promouvoir des effets de type antidépresseurs chez la souris exposées à un régime HFD. Ceci nous amène à penser qu'un régime pauvre en BCAA, seul ou en association avec un traitement antidépresseur conventionnel, pourrait aider à l'amélioration l'efficacité de ce dernier notamment chez des patients dépressifs avec des comorbidités métaboliques.

Contribution personnelle :

Au cours de ce travail :

- J'ai participé au phénotypage comportemental des souris traitées à la Metformine,
- J'ai participé à l'écriture et à la révision du manuscrit

Behavioral/Cognitive

Metformin Promotes Anxiolytic and Antidepressant-Like Responses in Insulin-Resistant Mice by Decreasing Circulating Branched-Chain Amino Acids

Juliane Zemdegs,^{1*} Hugo Martin,^{2*} Hiranya Pintana,^{1,3*} Sebastien Bullich,¹ Stella Manta,¹ Marie A. Marqués,⁴ Cédric Moro,⁴ Sophie Layé,² Fabien Ducrocq,² Nipon Chattipakorn,³ Siriporn C. Chattipakorn,³ Claire Rampon,¹ Luc Pénicaud,⁵ Xavier Fioramonti,^{2#} and Bruno P. Guiard^{1,6#}

¹Centre de Recherches sur la Cognition Animale, Centre de Biologie Intégrative, Université de Toulouse, CNRS, 31000 Toulouse, France, ²Université de Bordeaux, Institut National de la Recherche Agronomique, Bordeaux INP, NutriNeuro, UMR 1286, F-33000 Bordeaux, France, ³Neurophysiology Unit, Cardiac Electrophysiology Research and Training Center, Faculty of Medicine, Chiang Mai University, Chiang Mai 50200, Thailand, ⁴INSERM, Paul Sabatier University, UMR 1048, Institute of Metabolic and Cardiovascular Diseases, Obesity Research Laboratory, 31000 Toulouse, France, ⁵UMR STROMALab, Université de Toulouse, CNRS ERL5311, École Française du Sang, Institut National Polytechnique-École Nationale Vétérinaire de Toulouse, INSERM U1031, BP 84225, F-31432, 31000 Toulouse Cedex 4, France, and ⁶Faculté de Pharmacie, Université Paris Sud, Université Paris-Saclay, 92290 Chatenay-Malabry, France

Epidemiological studies indicate that insulin resistance (IR), a hallmark of type 2 diabetes, is associated with an increased risk of major depression. Here, we demonstrated that male mice fed a high-fat diet (HFD) exhibited peripheral metabolic impairments reminiscent of IR accompanied by elevated circulating levels of branched-chain amino acids (BCAAs), whereas both parameters were normalized by chronic treatment with metformin (Met). Given the role of BCAAs in the regulation of tryptophan influx into the brain, we then explored the activity of the serotonin (5-HT) system. Our results indicated that HFD-fed mice displayed impairment in the electrical activity of dorsal raphe 5-HT neurons, attenuated hippocampal extracellular 5-HT concentrations and anxiety, one of the most visible and early symptoms of depression. On the contrary, Met stimulated 5-HT neurons excitability and 5-HT neurotransmission while hindering HFD-induced anxiety. Met also promoted antidepressant-like activities as observed with fluoxetine. In light of these data, we designed a modified HFD in which BCAA dietary supply was reduced by half. Deficiency in BCAAs failed to reverse HFD-induced metabolic impairments while producing antidepressant-like activity and enhancing the behavioral response to fluoxetine. Our results suggest that Met may act by decreasing circulating BCAAs levels to favor serotonergic neurotransmission in the hippocampus and promote antidepressant-like effects in mice fed an HFD. These findings also lead us to envision that a diet poor in BCAAs, provided either alone or as add-on therapy to conventional antidepressant drugs, could help to relieve depressive symptoms in patients with metabolic comorbidities.

Key words: branched-chain amino acids; depression; hippocampus; insulin resistance; metformin; serotonin

Significance Statement

Insulin resistance in humans is associated with increased risk of anxiodepressive disorders. Such a relationship has been also found in rodents fed a high-fat diet (HFD). To determine whether insulin-sensitizing strategies induce anxiolytic- and/or antidepressant-like activities and to investigate the underlying mechanisms, we tested the effects of metformin, an oral antidiabetic drug, in mice fed an HFD. Metformin reduced levels of circulating branched-chain amino acids, which regulate tryptophan uptake within the brain. Moreover, metformin increased hippocampal serotonergic neurotransmission while promoting anxiolytic- and antidepressant-like effects. Moreover, a diet poor in these amino acids produced similar beneficial behavioral property. Collectively, these results suggest that metformin could be used as add-on therapy to a conventional antidepressant for the comorbidity between metabolic and mental disorders.

Introduction

Insulin resistance (IR), defined as declined sensitivity of tissues to the action of insulin, is associated with the development of serious health concerns such as overweight, hypertension, hyperlipidemia, cardiovascular disease, and type 2 diabetes (T2D). Evidence also suggests the existence of a positive correlation between IR and major depression (Rasgon and Kenna, 2005). Indeed, the induction of IR in rats or mice, using prolonged exposure to high-fat diet (HFD), causes some hallmark symptoms of depression including anxiety, anhedonia, and despair (Miyata et al., 2004; Ho et al., 2012; André et al., 2014; Gupta et al., 2014; Duthiel et al., 2016; Yang et al., 2016; Zemdeg et al., 2016; Hassan et al., 2018) and exacerbates behavioral abnormalities observed in animal models of depression (Abildgaard et al., 2011; Liu et al., 2014).

Although the neurobiological mechanisms underlying the relationship between IR and depression have yet to be identified, impairments of brain plasticity have been incriminated. In humans, associations between the severity of IR and the reduction of brain volume have been unveiled (Last et al., 2007; Phillips et al., 2018). In keeping with these results, mice or rats developing IR display deficits in adult hippocampal neurogenesis (Lindqvist et al., 2006; Stranahan et al., 2008; Lang et al., 2009; Park et al., 2010) in a manner similar to that observed in animal models of depression (Surget et al., 2008; David et al., 2009). In marked contrast, insulin-sensitizing strategies exert neuroprotective/neurotrophic effects in rodents (Zhong et al., 2018). This has been reported with the antidiabetic agents liraglutide, glyburide, and metformin (Wang et al., 2012; Su et al., 2017; Weina et al., 2018). Given the beneficial role of the serotonin (5-HT) system in the enhancement of brain plasticity (Quesseveur et al., 2013), the possibility that deficits in 5-HT neurotransmission underlie the comorbidity between T2D/IR and depression, has been raised. Consistent with this hypothesis, decreased levels of tryptophan were detected in the CNS of patients with T2D (Kloiber et al., 2010; Herrera-Marquez et al., 2011) or in rodents fed an HFD (Kim et al., 2013; Derkach et al., 2015). Using intracerebral microdialysis, we showed that mice fed an HFD displayed lower basal hippocampal extracellular 5-HT concentrations (Zemdegs et al., 2016). Exaggerated stimulation of the monoamine oxidase activity—the enzyme responsible for 5-HT degradation—or the indoleamine 2,3-dioxygenase—the enzyme that metabolizes tryptophan along the kynurenine pathway—are putative explanations for such neurochemical changes (André et al., 2014; Dinel et al., 2014; Gupta et al., 2014). We recently proposed that an increased sensitivity of inhibitory somatodendritic 5-HT_{1A} autoreceptors in the dorsal raphe (DR) could be an alternative mechanism by

Table 1. Composition of the standard and high-fat diets

Diet composition	STD	HFD	HFD-BCAA ^{+/+}	HFD-BCAA ^{+/-}
Proteins (kcal%)	26	20	20	19
Carbohydrates (kcal%)	60	35	34	35
Lipids (kcal%)	3	45	46	46
Amino acids (g/kg)				
BCAAs				
Leucine	18.7	18.7	18.7	9.35
Isoleucine	11.7	11.7	11.7	5.85
Valine	14	14	14	7
Tryptophan	1.9	2.1	2.3	2.3
Energy content (kcal/kg dry diet)	2790	4720	4570	4590

which IR might hinder hippocampal serotonergic transmission (Zemdegs et al., 2016). Despite these possibilities, the role of branched-chain amino acids [BCAAs; leucine (Leu), isoleucine (Ile), and valine (Val)] in the relationship between IR and brain extracellular 5-HT concentrations is gaining interest. Indeed, elevated circulating BCAA levels predict the severity of IR (Newgard et al., 2009; Gannon et al., 2018) while limiting the uptake of tryptophan into the brain through the blood–brain barrier (BBB) by the large neutral amino acid transporter 1 (LAT1; Pardridge, 1998). Thus, the rate of 5-HT production may be affected by BCAAs, thereby leading to anxiodepressive symptoms, as shown in clinical (Fellendorf et al., 2018) and preclinical studies (Coppola et al., 2013; Scaini et al., 2014; Asor et al., 2015).

On this backdrop, the present study determined whether metformin (an insulin-sensitizing drug belonging to the class of biguanides) exerts beneficial effects on glucose metabolism, on the electrical activity of DR 5-HT neurons, on the 5-HT release at the nerve terminals, and on emotional behavior in a mouse model of comorbid T2D/IR and depression. Moreover, given the association among BCAAs, IR, and depression, and in light of their negative impact on 5-HT neurotransmission, we also tested the possibility that the antidepressant-like effects of metformin rely on an attenuation of circulating BCAA levels.

Materials and Methods

Animals, diets, and drugs. The 5- to 7-week-old C57BL/6J male mice (Elevages Janvier Farms) were housed four to five mice per cage under standard conditions with a 12 h light/dark cycle. After 1 week of acclimatization, mice were randomly assigned to receive free access to a standard diet (STD; STD A04, SAFE), an HFD (D12451, Research Diets) or a half-BCAA-HFD (HFD-BCAA^{+/-}; MD.1610 version, ENVIGO) up to 16 weeks (Table 1). We ensured that tryptophan quantity, the precursor for 5-HT synthesis, was equivalent between STDs and HFDs. In a specific experiment, STD and HFD mice were chronically administered with the insulin-sensitizing agent metformin at the active dose of 300 mg/kg/d (Sigma-Aldrich) or the selective serotonin reuptake inhibitor (SSRI) fluoxetine (Flx) at a dose of 18 mg/kg/d (Biotrend Chemikalien). Both drugs were dissolved and given in the drinking water. The water consumption per mouse per day (24 h) was monitored during the course of treatments. Because daily water consumption might have differed between STD and HFD mice, metformin and fluoxetine concentrations in drinking water were adjusted accordingly to achieve comparable dosing. The purpose of giving the metformin and fluoxetine in drinking water was to maintain a constant level of these pharmacological compounds. For example, metformin is typically given to patients in an extended-release form so that its effects can be sustained over long durations. All experimental procedures were conducted in accordance with the European directive 2010/63/UE and were approved by the French Ministry of Research and local ethic committees (C2EA Grand Campus de Dijon N°105, APAFIS #12342-2017082111489451 v6, and CE2A Université de Bordeaux N°50, Apafis #8928).

Received Nov. 12, 2018; revised May 7, 2019; accepted May 15, 2019.

Author contributions: X.F. and B.P.G. designed research; J.Z., H.M., H.P., S.B., S.M., M.A.M., C.M., F.D., X.F., and B.P.G. performed research; J.Z., H.P., S.M., S.L., N.C., S.C.C., C.R., L.P., X.F., and B.P.G. analyzed data; X.F. and B.P.G. wrote the paper.

B.P.G. received a fellowship from the "Société Francophone du Diabète (SFD). The salary for J.Z. was supported by the program Ciência sem Fronteiras funded by the National Council for Scientific and Technological Development (CNPq) and H.P. by the Royal Golden Jubilee PhD Program (PHD/0025/2555:HP&SCC). H.M. is supported by a fellowship from INRA-Région Nouvelle Aquitaine. S.C.C. is supported by TRF:RTA6080003. N.C. is supported by a NSTDA Research Chair Grant from the National Science and Technology Development Agency, Thailand. We thank the Mouse Behavioural Phenotyping Core (Center of Integrative Biology, Toulouse, France) and more particularly Sébastien Lopez for expertise and assistance in setting up the behavioral apparatus and procedures

*J.Z., H.M., and H.P. contributed equally to the study.

#X.F. and B.P.G. codirected this study.

The authors declare no competing financial interests.

Correspondence should be addressed to Bruno P. Guiard at bruno.guiard@univ-tlse3.fr.

https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.2904-18.2019

Copyright © 2019 the authors

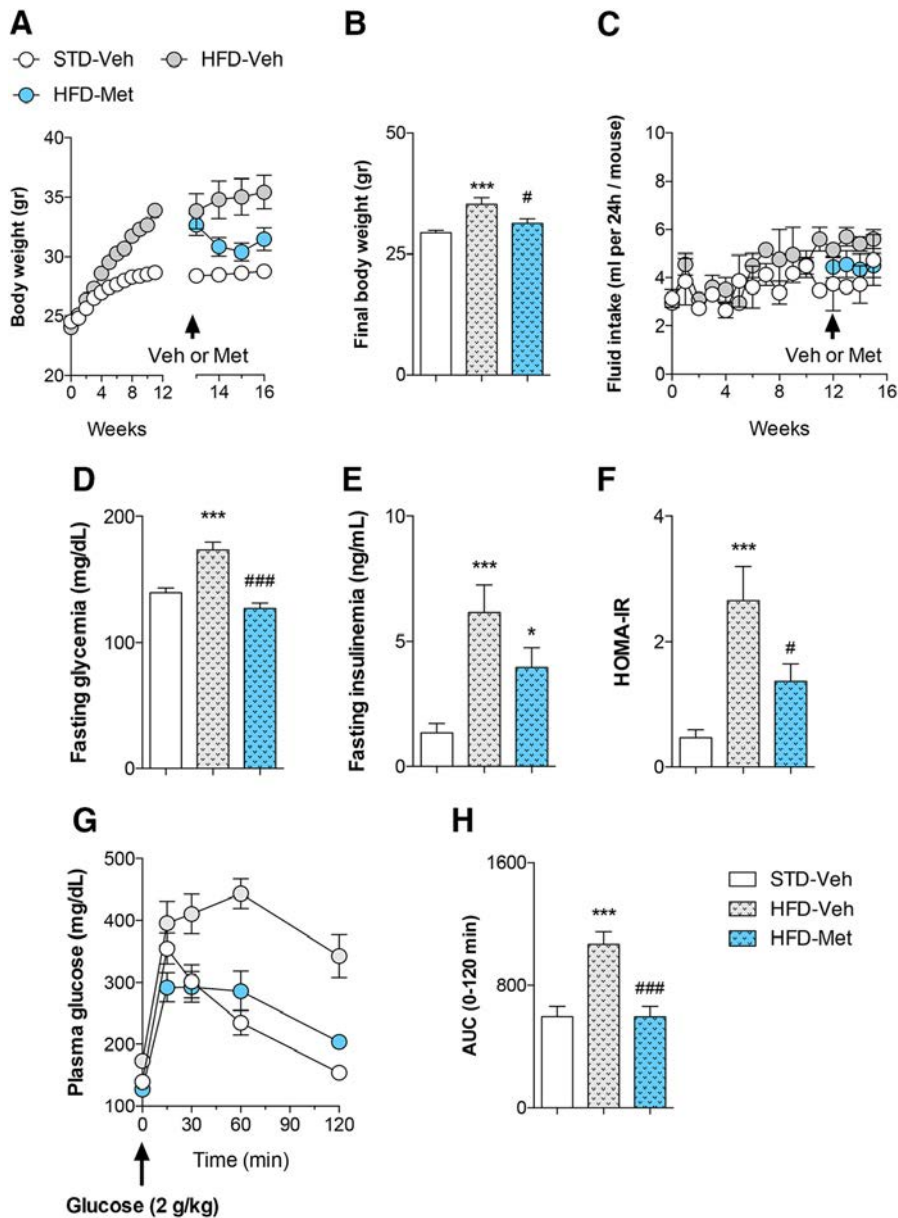


Figure 1. Chronic administration of metformin reverses HFD-induced glucose metabolism impairment. Two groups of mice were fed an HFD for 16 weeks and chronically treated with Met (300 mg/kg) or its Veh in the drinking water for the last 4 weeks. The control group of mice was fed an STD and administered the Veh. **A–H**, Data are the mean \pm SEM of body weight from week 0 to week 16 (**A**), final body weight ($F_{(2,27)} = 10.4; p = 0.0004$; **B**), fluid intake (**C**), basal fasting glycemia ($F_{(2,27)} = 23.9; p = 0.0001$; **D**), basal fasting insulinemia ($F_{(2,27)} = 10.1; p = 0.0008$; **E**), HOMA-IR ($F_{(2,27)} = 11.2; p = 0.0005$; **F**), and glucose tolerance in response to the intraperitoneal administration of glucose (for $AUC_{0-120}; F_{(2,27)} = 24.9; p = 0.0001$; 2 g/kg; **G, H**). $n = 10$ mice/group. * $p < 0.05$ and *** $p < 0.001$: significantly different from the STD-Veh group. # $p < 0.05$ and ### $p < 0.001$: significantly different from the HFD-Veh group.

Metabolic parameters: glucose tolerance test. Animals were individually housed, weighed, and fasted for 5 h with free access to water. Blood glucose level was measured from tail prick (Accu-Chek Performa Glucometer, Roche) at 0 min (basal), 15, 30, 45, 60, 90, and 120 min after the administration of glucose (2 g/kg) in an intraperitoneal glucose tolerance test (ipGTT). During ipGTT, the area under the curve (AUC) was calculated using the coordinate axis set at 100. For plasma insulin levels, blood samples were collected through tail prick in heparinized capillary tubes (Microvette CB 300 K2E, Sarstedt). Blood was centrifuged (10,000 rpm; 10 min), and plasma was collected and stored at -80°C before analysis. Insulin was measured using the AlphaLISA method, according to manufacturer instructions (human insulin kit; catalog #AL204C, PerkinElmer). The homeostasis model assessment (HOMA) of IR (HOMA-IR) scores were calculated from glucose and insulin concentrations obtained

from mice after 5 h of fasting. The following equation was used: fasting blood glucose (in milligrams per deciliter) \times fasting insulin (in nanograms per milliliter)/405. HOMA-IR ≥ 2.8 represents an insulin resistance state (Matthews et al., 1985).

Plasma amino acids analysis. The BCAA concentration from plasma samples was measured using a BCAA (leucine, isoleucine, and valine) assay kit (catalog #MAK003, Sigma-Aldrich) according to manufacturer instructions using a coupled enzyme reaction, which results in a colorimetric (450 nm) product, proportional to the BCAA present.

In vivo single-unit recordings of 5-HT neurons in the dorsal raphe nucleus. Mice were anesthetized with chloral hydrate (400 mg/kg, i.p.) and placed in a stereotaxic frame with the skull positioned horizontally. To maintain a full anesthesia, chloral hydrate supplements of 100 mg/kg, i.p., were given as needed. Extracellular recordings in the DR were performed using single glass micropipettes (Stoelting Europe) pulled on a pipette puller (Narishige) and preloaded with a 2 M NaCl solution (impedances from 2.5 to 5 M Ω). Micropipettes were positioned 0.2–0.5 mm posterior to the interaural line on the midline and lowered into the DR, attained at a depth between 2.5 and 3.5 mm from the brain surface. 5-HT neurons were identified using the following criteria: a slow (0.5–2.5 Hz) and regular firing rate and a long-duration positive action potential. In each mouse, several tracts were performed to measure the spontaneous firing rate of DR 5-HT neurons. Firing rates were determined by monitoring the average discharge frequency of DR 5-HT neurons under each experimental condition. The number of neurons recorded per track was also determined.

Brain slice patch-clamp recordings of DR 5-HT neurons. Patch-clamp recordings were performed on brain slices from Pet1-cre-mCherry mice obtained by crossing Pet1-cre mice (a gift from Dr. P. Gaspar, Institut du Fer à Moulin, Inserm, UMR-S 839, Paris, France; Kiyasova et al., 2011) with B6.Cg-Gt(ROSA)26Sor^{tm9(CAG-tdTomato)Hze/J} mice (The Jackson Laboratory). Briefly, 4-month-old mice fed an STD or HFD for 16 weeks were intracardially perfused during the killing of the mice (exagon/lidocaine, 300/30 mg/kg, i.p.) with ice-cold NMDG solution [containing the following (in mM): 1.25 NaH₂PO₄, 2.5 KCl, 7 MgCl₂, 20 HEPES, 0.5 CaCl₂, 28 NaHCO₃, 8 D-glucose, 5 L(+)-ascorbate, 3 Na-pyruvate, 2 thiourea, 93 NMDG, and 93 HCl 37%; pH 7.3–7.4, osmolarity, 305–310 mOsm]. Brains were quickly removed, and 250 μm slices containing the DR were prepared with a vibratome (catalog #VT1000S, Leica) in ice-cold oxygenated NMDG solution before recovery for 12–15 min into at 34 $^{\circ}\text{C}$ in the oxygenated NMDG solution. Slices were then transferred at room temperature into an aCSF solution [containing the following (in mM): 124 NaCl, 2.5 KCl, 1.25 NaH₂PO₄, 2 MgCl₂, 2.5 CaCl₂, 2.5 D-glucose, and 25 NaHCO₃; pH 7.3–7.4, osmolarity, 305–310 mOsm] for at least 1 h.

Slices were transferred in the recording chamber placed under a microscope (Nikon) outfitted for fluorescence and IR-differential interference contrast video microscopy and perfused with oxygenated aCSF at 2–3 ml/min in the recording chamber. Viable DR 5-HT neurons were

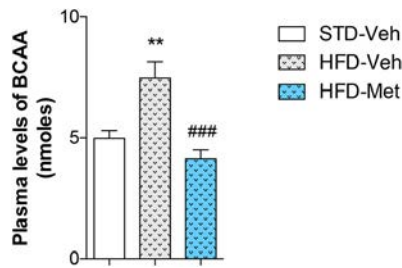


Figure 2. Chronic administration of metformin reverses HFD-induced increase in plasma BCAA levels. Two groups of mice were fed an HFD for 16 weeks and chronically treated with Met (300 mg/kg) or its Veh in the drinking water for the last 4 weeks. The control group of mice was fed an STD and administered the Veh. Data are the mean \pm SEM of plasma levels of BCAAs (Leu, Val, Iso-Leu; $F_{(2,18)} = 13.7$; $p = 0.0003$). $n = 7$ mice/group. ** $p < 0.01$: significantly different from STD-Veh group. ### $p < 0.001$: significantly different from the HFD-Veh group.

visualized with a fluorescence video camera (Nikon). Borosilicate pipettes (4–6 M Ω ; outer diameter, 1.5 mm; Sutter Instrument) were filled with an intracellular solution [containing the following (in mM): Kgluconate solution: 128 Kgluconate, 20 NaCl, 1 MgCl₂, 1 EGTA, 0.3 CaCl₂, 2 Na₂-ATP, 0.3 Na-GTP, 0.2 cAMP, and 10 HEPES; CsCl solution: 150 CsCl, 2 MgCl₂, 1 EGTA, 3 Na₂-ATP, 0.3 Na-GTP, 0.2 cAMP, and 10 HEPES; pH 7.3–7.4, osmolality, 280–290 mOsm]. Recordings were made using a Multiclamp 700B amplifier, digitized using the Digidata 1440A interface and acquired at 2 kHz using pClamp 10.5 software (Molecular Devices). Pipettes and cell capacitances were fully compensated, but the junction potential was not corrected. Intrinsic properties of DR 5-HT neurons were recorded in whole-cell clamp mode by injecting a 10 pA current step from -80 to 110 pA on a cell held at -60 mV by constant current injection. sEPSCs or sIPSCs were recording in Vclamp mode on cells hold at -60 mV. Picrotoxin (100 μ M) was added to the baths for IPSC recordings. Both sEPSCs and sIPSCs were recorded for 10 min and analyzed during the last minute of the recording.

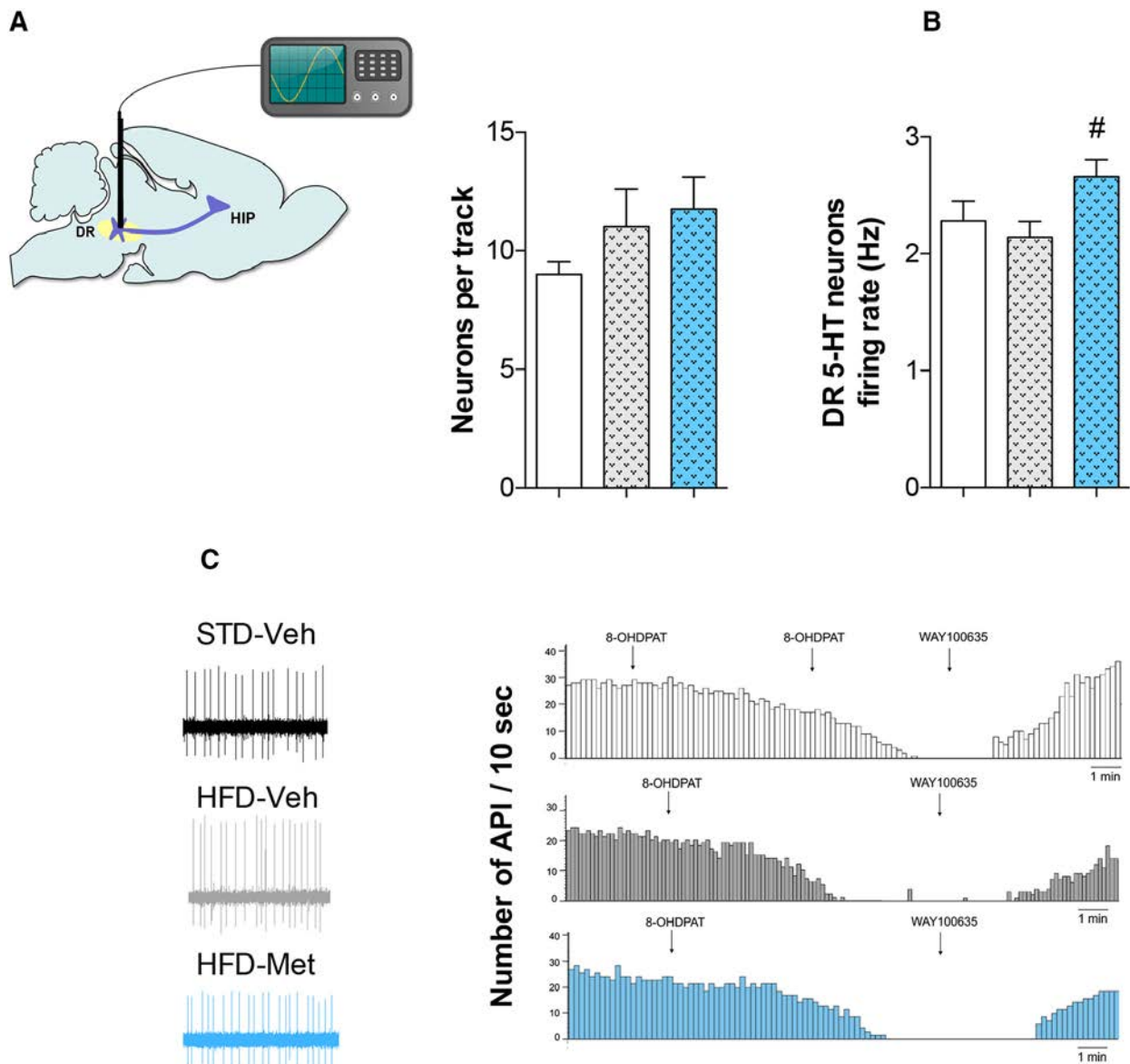


Figure 3. Chronic administration of metformin increases the activity of 5-HT neurons in the DR nucleus of mice fed an HFD. Two groups of mice were fed an HFD for 16 weeks and were chronically treated with Met (300 mg/kg) or its Veh in the drinking water for the last 4 weeks. The control group of mice was fed an STD and administered the Veh. **A, B**, Data are the mean \pm SEM of the number of presumed DR 5-HT neurons recorded per track ($F_{(2,19)} = 1.2$; $p = 0.31$; **A**) and of DR 5-HT firing rate (in Hz; $F_{(2,269)} = 3.5$; $p = 0.031$; **B**). **C**, As a validation of the serotonergic nature of the recorded neurons in the DR, typical traces of a mouse from each experimental group are presented showing their responses to an acute subcutaneous administration of the 5-HT_{1A} receptor agonist 8-OHDPAT (0.1 mg/kg per injection) and the 5-HT_{1A} receptor antagonist WAY100635 (1 mg/kg). $n = 5$ –9 mice/group. # $p < 0.05$: significantly different from the HFD-Veh group.

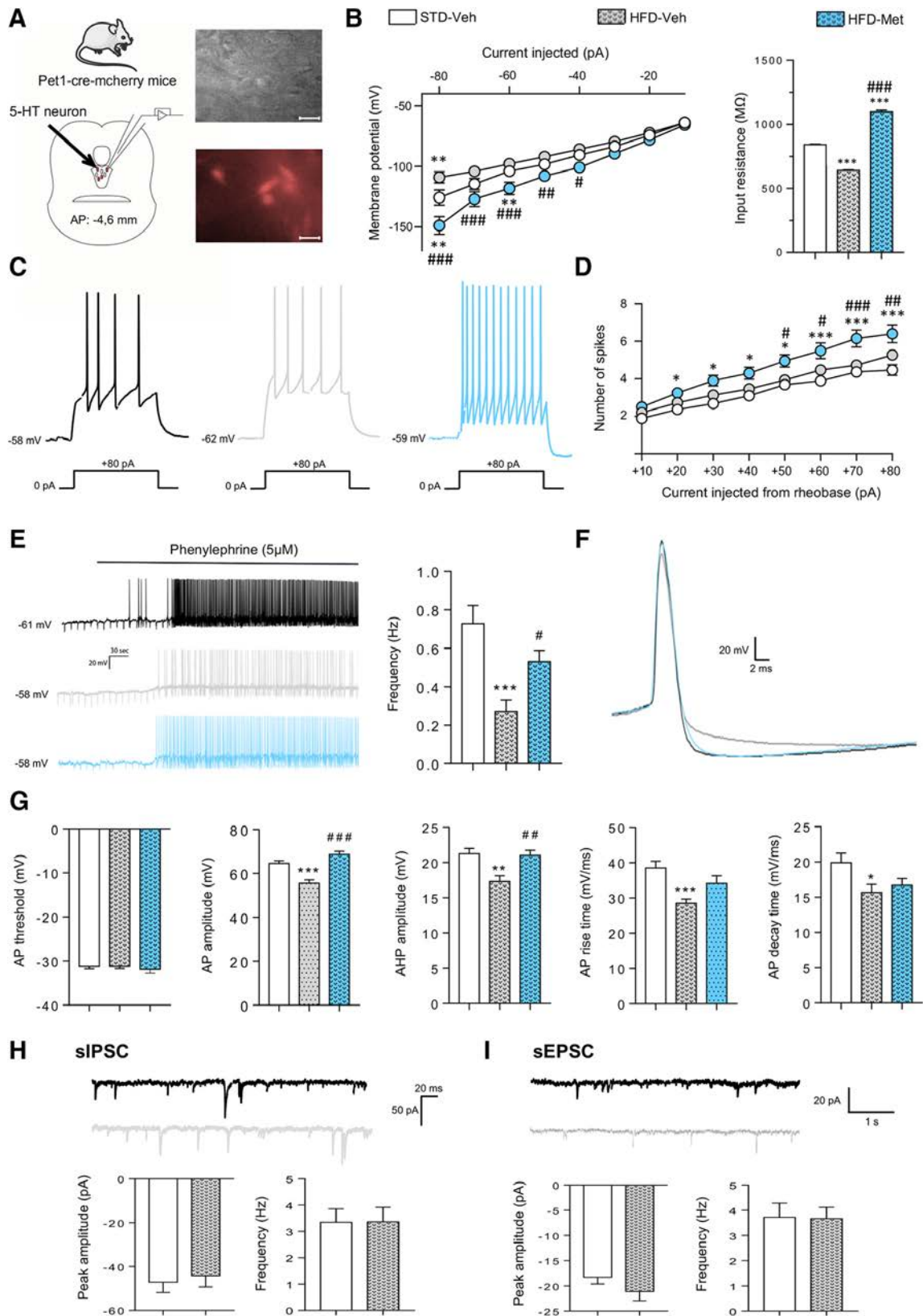


Figure 4. Metformin reverses HFD-induced impairment of the electrical properties of DR 5-HT neurons. **A**, Two groups of Pet1-cre-mCherry mice were fed an HFD for 16 weeks and chronically treated with Met (300 mg/kg) or its Veh in the drinking water for the last 4 weeks. The control group of mice was fed an STD and administered the Veh. **A**, *right*, Images in bright field (*upper panel*) or fluorescence (*lower panel*) of 5-HT neurons expressing the red fluorescent protein mCherry in the DR of Pet1-cre-mCherry mice. The scale bar on each image represents 10 μm. **B**, Mean membrane potential (**B**, *left*) and quantification of the input resistance (**B**, *right*) in response to hyperpolarizing currents. **B**, *left*, Data are the mean ± SEM of membrane potentials in response to hyperpolarizing current step injections (ANOVA: $F_{(14,399)} = 7.463$; $p < 0.0001$). **B**, *right*, Input resistance was calculated using linear regression from an I–V curve according to Ohm’s law. Comparison between groups was performed using ANOVA ($F_{(2,57)} = 754.1$; $p < 0.0001$). **C–D**, Representative traces of 5-HT neurons from WT (black), HFD (gray), or HFD-Met (blue) mice in response to depolarizing currents (**C**). **D**, Quantification of the number of spikes in response to depolarizing currents from rheobase. Data are the mean ± SEM of the number of spikes in response to relative current injected (ANOVA: $F_{(16,408)} = 3.795$; $p < 0.0001$). **E**, Representative traces of 5-HT neurons from STD (black), HFD (gray), and HFD-Met (blue) mice in response to phenylephrine (*Figure legend continues*).

Intracerebral microdialysis in the ventral hippocampus of awake freely moving mice. Mice were implanted with a home-made microdialysis probe in the ventral hippocampus (vHP). Stereotaxic coordinates from bregma were as follows (in mm): antero-posterior (AP), -2.5 ; lateral (L), ± 2.7 ; and dorso-ventral (DV), -3.0 . Twenty-four hours later, probes were connected to a microinjection pump for a continuous perfusion of aCSF (147 mM NaCl, 2.7 mM KCl, 1 mM MgCl₂, and 1.2 mM CaCl₂, adjusted to pH 7.4 with 2 mM sodium phosphate buffer) containing the serotonin reuptake inhibitor escitalopram (1 μ M) at a flow rate of 1.5 μ l/min. Samples (15 μ l) were collected every 15 min and analyzed with a high-performance liquid chromatography system equipped with a 2.6 μ m C18 reverse-phase analytical column (50 \times 3.0 mm; Accucore, Thermo Fisher Scientific) coupled with electrochemical detection (Dionex Ultimate 3000, Thermo Fisher Scientific). The mobile phase containing 150 mM NaH₂PO₄, 4.76 mM citric acid, 50 mM EDTA, 1.5 mM SDS, 10% methanol, and 15% acetonitrile, adjusted to pH 5.6 with NaOH, was delivered at a flow rate of 0.3 ml/min. The amount of 5-HT in dialysate samples was calculated by measuring the peak heights relative to external standards and was expressed as a percentage of the basal value measured in the four initial fractions. At the end of the experiments, the localization of the microdialysis probes was verified histologically.

Behavioral tests. Animals were tested in different behavioral paradigms starting with the less stressful paradigm and finished with the most stressful one. A 2 d recovery period between each test was respected.

An open field (OF) test was performed in Plexiglas boxes (40 \times 40 cm; Mouse Open Field Arena ENV-510, Med Associates) during a 10 min session. The total ambulatory distance was monitored using the Activity Monitor software (SOF-811, Med Associates) to eliminate any putative bias link to a psychostimulant or a sedative effect.

Elevated plus maze (EPM) was performed in an apparatus manufactured by Ugo Basile, with four 5-cm-wide and 35-cm-long arms, two of which are open: the wall in the closed arms is 15 cm high. Each mouse was allowed to explore the apparatus for 5 min. Global activity was assessed by measuring the time and number of entries into the open arms for which animals display innate aversion.

Novelty suppressed feeding (NSF) was performed in a white plastic box (30 \times 60 cm). Mice were food deprived for 24 h while maintaining water *ad libitum*. On the day of testing, mice were removed from their home cage and transferred to a new clean cage for 1 h. They were then individually placed in the corner of a box with a food pellet on a white square filter paper at the center of the arena under a bright light (\sim 60 W). The latency for the animal to approach and take its first bite of the food was recorded (cutoff, 10 min). Immediately after the test, the feeding drive of each mouse was assessed by returning it individually to the familiar environment of the home cage and measuring the latency to eat and the amount of food consumed over a period of 5 min. Since each mouse was tested with their respective food pellet, the latter parameter was calculated based on caloric value consumed using the following formula [(pellet weight before (in grams) – pellet weight after (in grams)) \times number of calories/gram diet (STD, 2.79 calories/g; HFD, 4.73 calories/

gram)/mouse body weight]. These parameters were determined to ensure the absence of differences in hunger/motivation.

A tail suspension test (TST) was performed using the Tail Suspension Test System (BIOSEB) during a 6 min session. Immobility time was scored as an index of resignation. Mice movements in terms of energy and power in motion were measured to ensure the absence of any locomotor bias.

A splash test (ST) was performed for a 5 min period as previously described (David et al., 2009). After squirting 200 μ l of a 10% sucrose solution on the snout of the mouse, grooming time was scored by a single experimenter as an index of self-care.

Statistical analysis. Unpaired Student's *t* test was used to evaluate the metabolic and behavioral effects of metformin compared with vehicle (Veh) in mice fed an STD. For all other experiments, mice were fed an STD or HFD, and one- or two-way ANOVAs were applied, when appropriate, by *post hoc* tests (protected least significant difference) using GraphPad Prism (GraphPad Software). In the NSF, we used the Kaplan–Meier survival representation to indicate the fraction of animals not eating during the test. The accepted level of significance was set at $p \leq 0.05$.

Results

Metformin does not modify glucose metabolism and emotionally related behaviors in mice fed an STD

In the first part of this study, the effects of 4 weeks of administration of Met, an oral antidiabetic drug displaying insulin-sensitizing properties, were evaluated on metabolism and behavior in mice fed an STD. Comparing STD-Veh ($n = 9$) and STD-Met ($n = 8$) mice using an unpaired *t* test, we found no statistical differences between groups on final body weight (31.5 ± 0.5 vs 30.2 ± 0.6 g; $p = 0.4$), fasting glycemia (122 ± 6 vs 110 ± 4 mg/dl; $p = 0.1$), fasting plasma insulin (1.3 ± 0.3 vs 0.7 ± 0.1 ng/ml; $p = 0.3$), HOMA-IR (0.39 ± 0.09 vs 0.19 ± 0.03 ; $p = 0.1$), and glucose tolerance (AUC_{0-120} : 565 ± 57 vs 597 ± 105 ; $p = 0.4$). Similarly, at the behavioral level, no significant differences were detected between STD-Veh and STD-Met mice regarding their performances in the EPM (time: 69 ± 6 vs 67 ± 11 s, $p = 0.8$; entries in open arms: 7.4 ± 1 vs 7.8 ± 1 s, $p = 0.8$), the NSF (latency to feed: 163 ± 19 vs 202 ± 46 s, $p = 0.5$), and the TST (88 ± 6 vs 78 ± 8 s, $p = 0.4$).

Metformin improves glucose metabolism in mice fed an HFD

We then tested the effects of Met in mice fed an HFD for 16 weeks. Exposure to HFD induced a significantly higher increase in body weight from the 1st to the 12th week than that observed in control mice fed an STD. Before the initiation of the different treatments (12th week), HFD groups of mice were balanced, and the average individual weights were similar (Fig. 1A). Four weeks later (16th week), higher body weight was observed in HFD-Veh relative to control mice fed an STD ($p = 0.0003$; Fig. 1A,B), whereas HFD-Met mice had lower body weight than HFD-Veh mice ($p = 0.02$; Fig. 1A,B). During this period, fluid intake was similar among STD-Veh, HFD-Veh, and HFD-Met mice (Fig. 1C). With respect to the other metabolic measures, an HFD increased fasting glycemia ($p = 0.0001$), insulinemia ($p = 0.0006$), and the HOMA-IR ($p = 0.0004$) relative to controls (Fig. 1D–F). All of these parameters were decreased in HFD-Met mice compared with HFD-Veh mice, albeit not statistically significant for insulinemia ($p = 0.0001$; $p = 0.13$; $p = 0.04$; Fig. 1D–F). In keeping with the latter observations, HFD-Veh mice displayed glucose intolerance ($p = 0.0002$), and this effect was reversed by Met ($p = 0.0002$; Fig. 1G,H). Together, these data show that HFD-fed mice displayed obvious metabolic disturbances, whereas chronic treatment with Met reversed these metabolic impairments through insulin-sensitizing properties.

←

(Figure legend continued.) application (5 μ M; left) and quantification of action potential frequency during the last minute of the recordings (right). Data are the mean \pm SEM of firing rate frequency in response to phenylephrine (5 μ M; ANOVA: $F(2,21) \& 10,24$; $p = 0.0008$). **F, G**, Representative action potential (AP) of 5-HT neurons from STD (black), HFD (gray), and HFD-Met (blue) mice (**F**); and quantification of AP threshold, amplitude, afterhyperpolarization, rise time, and decay time (**G**). Data are the mean \pm SEM of neuron AP intrinsic properties. ANOVA: AP threshold ($F_{(2,60)} = 0.3278$; $p = 0.7218$); AP amplitude ($F_{(2,60)} = 24.33$; $p < 0.0001$); AHP amplitude ($F_{(2,60)} = 8.657$; $p = 0.0005$); AP rise time ($F_{(2,60)} = 8.314$; $p = 0.0007$); AP decay time Kruskal–Wallis test ($K = 7.149$; $p = 0.0280$). **H, I**, Representative traces and quantification of the frequency and amplitude of IPSCs (**H**) or EPSCs (**I**) onto 5-HT neurons from STD (black) and HFD (gray) mice. Data are the mean \pm SEM of sIPSC frequency (Mann–Whitney test: $U = 399.5$; $p = 0.9588$) and peak amplitude ($U = 359$; $p = 0.4888$). **I**, Data are the mean \pm SEM of sEPSC frequency ($U = 155.5$; $p = 0.7106$) and peak amplitude (unpaired *t* test, $p = 0.2220$). * $p < 0.05$; ** $p < 0.01$; *** $p < 0.001$: significantly different from STD-Veh group. # $p < 0.05$; ## $p < 0.01$; ### $p < 0.001$: significantly different from HFD-Veh group.

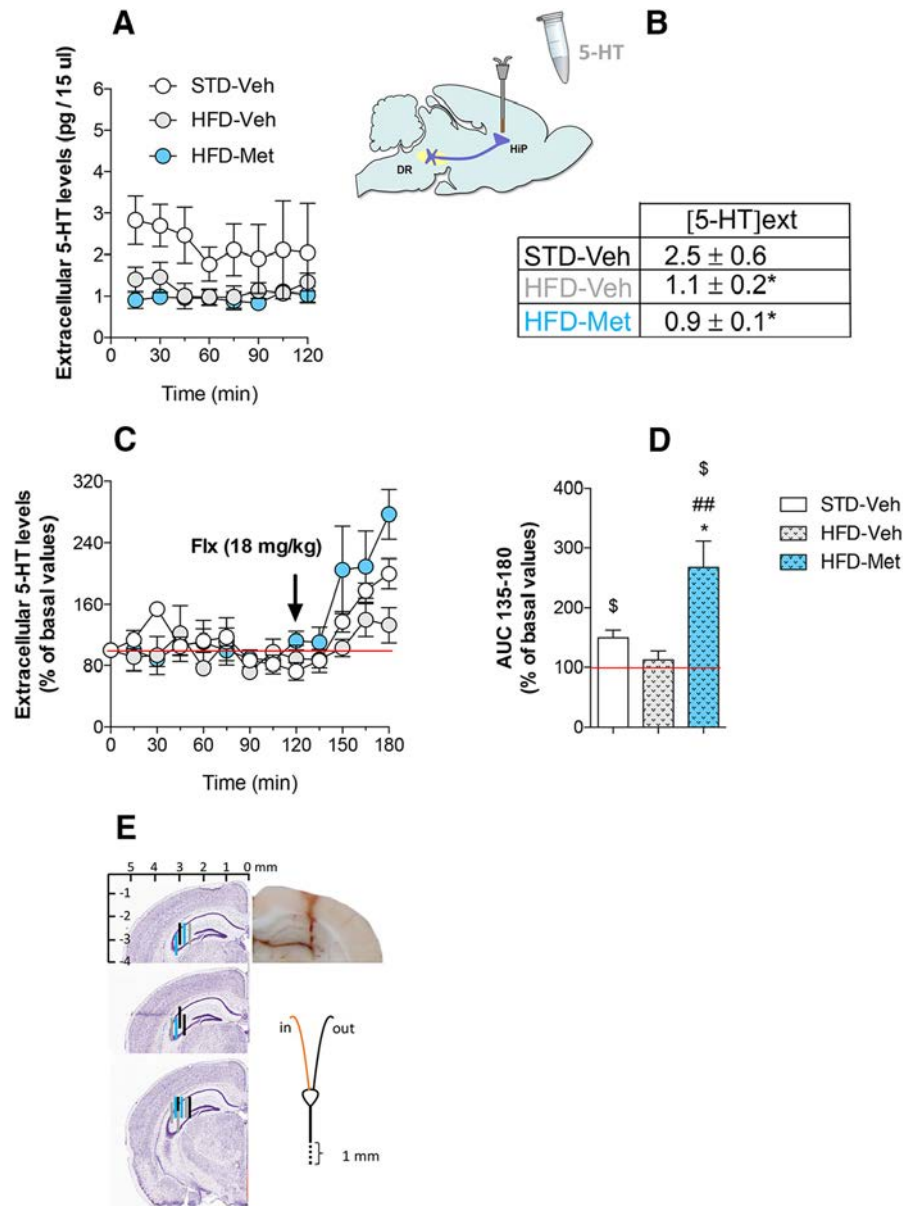


Figure 5. Chronic administration of metformin modulates 5-HT release in the ventral hippocampus of mice fed an HFD. Two groups of mice were fed an HFD for 16 weeks and were chronically treated with Met (300 mg/kg) or its Veh in the drinking water for the last 4 weeks. The control group of mice was fed an STD and administered the Veh. **A, B**, Data are the mean \pm SEM of basal extracellular 5-HT levels in the vHP (pg/15 μ l) on a 0–120 min period ($F_{(2,13)} = 4.5; p = 0.03$). **C**, Data are the mean \pm SEM of [5-HT]ext levels in vHP, expressed as percentages of the respective basal values following exposure to an intraperitoneal administration of fluoxetine (18 mg/kg). **D**, AUC (mean \pm SEM) values calculated for the amount of 5-HT in the vHP outflow measured during the 135–180 min after Flx administration and expressed as percentages of baseline ($F_{(2,13)} = 7.4; p = 0.007$). **E**, Coronal sections of a C57BL/6 mouse brain showing the location of the concentric microdialysis probes tips in the hippocampus. The black, gray, and blue lines indicate the brain zone of the membrane from STD-Veh, HFD-Veh, and HFD-Met mice, respectively. * $p < 0.05$: significantly different from the STD-Veh group. ## $p < 0.01$: significantly different from the HFD-Veh group. \$ $p < 0.05$: significantly different from the 100% value.

Metformin decreases plasma levels of BCAAs in mice fed an HFD

Because elevated circulating BCAAs levels have been correlated with the severity of insulin resistance (Gannon et al., 2018) and neurobehavioral abnormalities (Coppola et al., 2013), we measured the plasma levels of these amino acids. As expected, HFD-Veh mice displayed a marked increase in plasma BCAAs ($p = 0.0038$) compared with STD-Veh mice, and this rise in plasma BCAA content was significantly attenuated in HFD-Met mice ($p = 0.0003$; Fig. 2).

Metformin positively influences the serotonergic system in mice fed an HFD

Because BCAAs share the same transport protein into the brain with aromatic amino acids such as tryptophan, the sole precursor of centrally produced 5-HT, we then questioned the impact of these changes in plasma levels of amino acids on the serotonergic system. We first studied the activity of presumed DR 5-HT neurons using *in vivo* electrophysiology. Results indicated that the average number of cells recorded per track was not different among the experimental groups (Fig. 3A). However, although the firing rate of DR 5-HT neurons was not modified in HFD-Veh mice compared with STD-Veh mice, the statistical analysis revealed a significant increase in the firing rate of these neuronal populations in HFD-Met mice compared with HFD-Veh mice ($p = 0.032$; Fig. 3B, C).

Using patch-clamp electrophysiology on brain slices from Pet1-cre-mCherry mice to selectively visualize DR 5-HT neurons (Fig. 4A), we found decreased input resistance in these neurons in HFD-Veh mice compared with STD-Veh mice without modification of the number of spikes evoked by depolarizing currents ($p < 0.0001$; Fig. 4B–D). Met treatment increased the input resistance ($p < 0.0001$; Fig. 4B) and the number of spikes in response to depolarizing currents of 5-HT neurons compared with STD- or HFD-fed mice ($p < 0.0001$; Fig. 4C, D). In HFD-Veh mice, an attenuated response to phenylephrine application was also observed ($p = 0.0006$; Fig. 4E) whereas Met treatment reversed this parameter ($p = 0.0339$). Of particular note are the impairments of some of the intrinsic properties of 5-HT neuron action potentials in HFD-Veh mice, which were partially reversed in HFD-Met mice (Fig. 4F, G). Interestingly, the frequency and amplitude of sEPSCs or sIPSCs in 5-HT neurons was not affected by HFD feeding ($p = 0.7106$ and $p = 0.2220$ for sEPSCs, respectively; $p = 0.9588$ and $p = 0.4888$ for sIPSCs, respectively; Fig. 4H, I). These data suggest that the effects of the diet on the electrical properties of 5-HT neurons were not

due to changes in glutamate or GABA presynaptic inputs.

To determine whether changes in electrical properties of DR 5-HT neurons have *in vivo* consequences on basal extracellular 5-HT levels ([5-HT]ext) in the vHP, we conducted intracerebral microdialysis experiments (Fig. 5). This brain region is endowed with a dense serotonergic innervation from the DR and is particularly important in anxiolytic-like/antidepressant-like responses. Basal [5-HT]ext levels were significantly decreased in the HFD-Veh mice ($p = 0.04$) and HFD-Met mice ($p = 0.03$; Fig. 5A, B) compared with STD-Veh mice. Testing the effect of a challenge

dose of Flx to produce an acute inactivation of the serotonin transporter (SERT), we observed that this pharmacological compound significantly increased the percentage of [5-HT]ext over baseline in STD-Veh and HFD-Met mice ($p = 0.013$ and $p = 0.0011$, respectively), but such a response was not apparent in HFD-Veh mice ($p = 0.46$; Fig. 5C,D). Interestingly the neurochemical effect of Flx was higher in HFD-Met than that observed in the other groups (Fig. 5C,D).

Metformin promotes anxiolytic/antidepressant-like activities in mice fed an HFD

Finally, we sought to determine how these properties reverberated at the behavioral level. The SSRI Flx was used as positive control. We first control the locomotor activity of mice using the OF, and we showed that this parameter was not significantly different between groups (Fig. 6A). In the EPM, HFD-Veh mice displayed decreased time ($p = 0.0045$) and entries in open arms ($p = 0.0002$) compared with STD-Veh mice. These anxiogenic-like responses were partially reversed in HFD-Met-treated mice ($p = 0.04$ and $p = 0.09$) but not in HFD-Flx-treated mice ($p = 0.99$ and $p = 0.99$; Fig. 6B,C). In the NSF, an increased latency to feed, which can be also used as a readout for anxiety, was detected in HFD-Veh mice ($p = 0.0001$). This behavior was significantly attenuated in HFD-Met mice ($p = 0.015$) and HFD-Flx mice ($p = 0.0001$) compared with HFD-Veh mice (Fig. 6D). In an attempt to verify that the latter results could not be attributable to changes in hunger, we verified that the latency to eat in the home cage was the same in all experimental groups (Fig. 6E). Interestingly, food home cage consumption based on caloric value consumed was significantly higher in HFD-Veh mice ($p = 0.0001$), HFD-Met mice ($p = 0.0001$), and HFD-Flx mice ($p = 0.0001$) compared with STD-Veh mice (Fig. 6F), thereby reinforcing the idea that the increased latency to eat during the test was not related to the fact that HFD mice were less starved. We also evaluated other symptoms of depression such as despair in the TST. No changes in the time of immobility was detected in HFD-Veh mice ($p = 0.69$) compared with controls. However, we found a decrease of this parameter in HFD-Met mice ($p = 0.04$) and HFD-Flx mice ($p = 0.04$) relative to HFD-Veh mice (Fig. 6G). Overall, these results indicated that mice fed an HFD harbored a robust anxious phenotype. In this model, Met elicited both anxiolytic- and antidepressant-like responses.

BCAA deficiency in diet exerts anxiolytic-/antidepressant-like effects without improvement of glucose metabolism in mice fed an HFD

As Met improves glucose metabolism, decreases plasma BCAA levels, and elicits anxiolytic-/antidepressant-like activities in mice

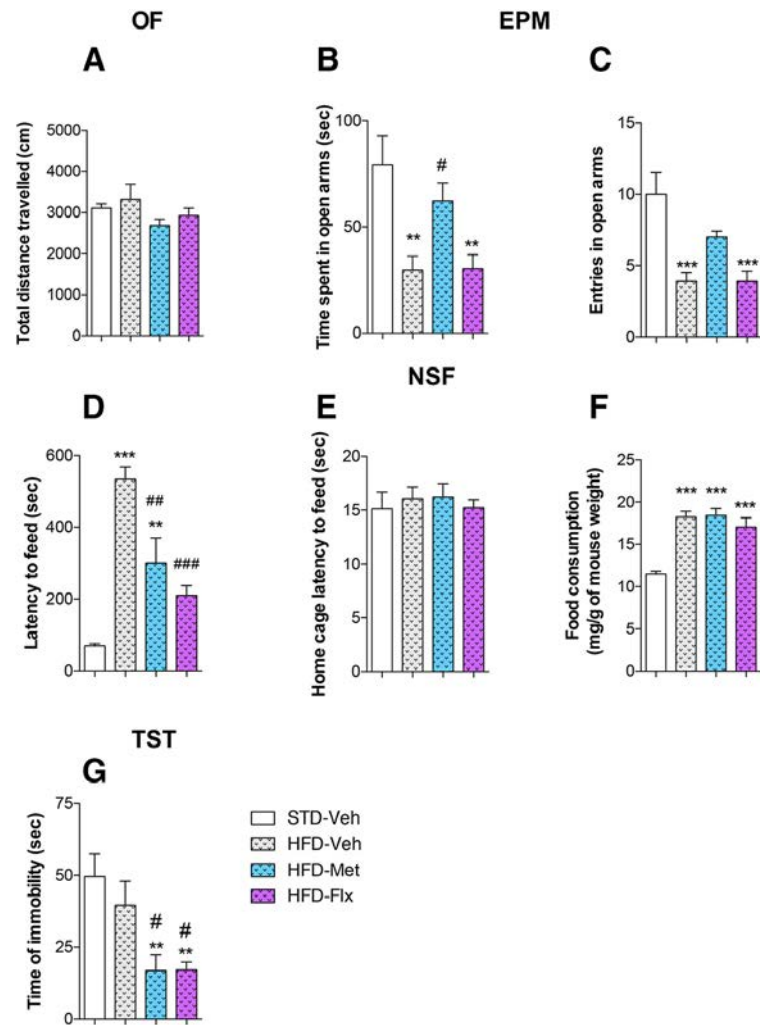


Figure 6. Chronic administration of metformin reverses HFD-induced anxiety-/depressive-like effects. Three groups of mice were fed an HFD and administered Met (300 mg/kg), or Flx (20 mg/kg) or its Veh in the drinking water for 4 weeks. The control group of mice was fed an STD and administered the Veh. **A–G**, Data are the mean \pm SEM of the total distance traveled in the open field for 10 min [$F_{(3,36)} = 2.8$; $p = 0.06$]; **A**, time spent, and number of entries in open arms in the EPM ($F_{(3,36)} = 6.7$; $p = 0.0011$; and $F_{(3,36)} = 10.2$; $p = 0.0001$; **B, C**), latency to feed in the NSF ($F_{(3,36)} = 22.8$; $p = 0.0001$; **D**), latency to feed in the home cage ($F_{(3,36)} = 0.22$; $p = 0.88$; **E**), food home cage consumption based on caloric value consumed ($F_{(3,36)} = 17.6$; $p = 0.0001$; **F**), and time of immobility in the TST ($F_{(3,36)} = 6.4$; $p = 0.0013$; **G**). $n = 10$ mice/group. $**p < 0.01$ and $***p < 0.001$: significantly different from STD-Veh group. $\#p < 0.05$, $\#\#p < 0.01$ and $\#\#\#p < 0.001$: significantly different from HFD-Veh group.

fed an HFD, we tested the possibility that deficiency in these specific amino acids could exert beneficial effects both on peripheral parameters and neurobehavioral responses. With this prospect, we designed a modified HFD in which the BCAA dietary supply was reduced by half. The plasma levels of BCAAs was reduced by $\sim 40\%$ in HFD-BCAA^{+/-} mice compared with HFD-BCAA^{+/+} mice ($p = 0.0001$; Fig. 7A).

Exposure to HFD-BCAA^{+/+} for 16 weeks induced a significant increase in body weight, fasting glycemia, and insulinemia ($p = 0.0001$; $p = 0.04$; $p = 0.04$); and resulted in a significant glucose intolerance ($p = 0.0001$) compared with control mice fed an STD (Fig. 7B–G). The same phenotype was observed in HFD-BCAA^{+/-} mice ($p = 0.0001$, $p = 0.008$, $p = 0.04$, and $p = 0.0001$), and no differences between HFD-BCAA^{+/+} and HFD-BCAA^{+/-} mice ($p = 0.73$; $p = 0.63$; $p = 0.99$ and $p = 0.91$; Fig. 7B–G) were detected, showing that the partial deficiency in BCAA is not sufficient to reverse glucose metabolism impairments.

As regards behavioral consequences, we reported that the locomotor activity was similar in the different experimental groups

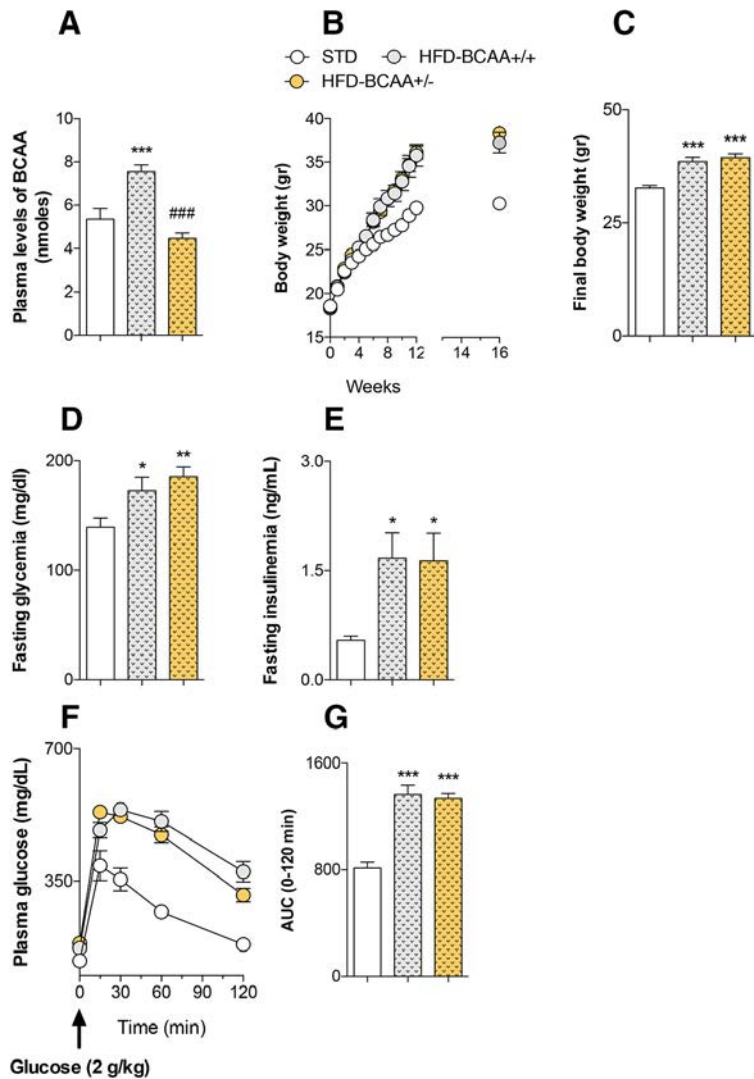


Figure 7. Partial deficiency in BCAAs does not improve glucose metabolism in mice fed an HFD. Two groups of mice were fed an HFD with a normal or reduced content of branched-chain amino acids (HFD-BCAA^{+/+} and HFD-BCAA^{+/-}; respectively). The control group of mice was fed an STD. **A–G**, Data are the mean \pm SEM of plasma levels of BCAAs (Leu, Val, Iso-Leu; $F_{(2,27)} = 26.1$; $p = 0.0001$; **A**), body weight from week 0 to week 16 (**B**), final body weight ($F_{(2,27)} = 18.8$; $p = 0.0001$; **C**), basal fasting glycemia ($F_{(2,27)} = 5.6$; $p = 0.008$; **D**), basal fasting insulinemia ($F_{(2,27)} = 4.6$; $p = 0.02$; **E**), glucose tolerance in response to the intraperitoneal administration of glucose (2 g/kg; for AUC_{0-120} ; $F_{(2,27)} = 14.7$; $p = 0.0001$; **F, G**). $n = 10$ mice/group. * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$ and *** $p < 0.001$: significantly different from STD-Veh group. ### $p < 0.001$: significantly different from HFD-BCAA^{+/+} mice.

(Fig. 8A). In the EPM, HFD-BCAA^{+/+} and HFD-BCAA^{+/-} mice displayed a decrease in time ($p = 0.04$ and $p = 0.03$) and/or entries in open arms ($p = 0.53$ and $p = 0.013$; Fig. 8B,C) compared with STD mice. No differences between HFD-BCAA^{+/+} and HFD-BCAA^{+/-} mice were detected ($p = 0.82$ and $p = 0.12$). In the NSF, although a significant increase in latency to feed was detected in HFD-BCAA^{+/+} and HFD-BCAA^{+/-} mice compared with STD mice ($p = 0.0002$ and $p = 0.0065$; Fig. 8D), both groups displayed similar responses in this paradigm ($p = 0.35$). The latency to eat in the home cage was the same in all experimental groups (Fig. 8E), whereas food home cage consumption based on caloric value consumed was higher in HFD-BCAA^{+/+} and HFD-BCAA^{+/-} mice compared with STD mice, but did not reach statistical significance (Fig. 8F). In the TST, a significant decrease in the time of immobility was detected in HFD-BCAA^{+/-} mice compared with HFD-BCAA^{+/+} mice ($p = 0.021$; Fig. 8G). Finally, we showed a higher latency of first grooming in HFD-

BCAA^{+/+} mice ($p = 0.04$) but not in HFD-BCAA^{+/-} mice ($p = 0.61$) compared with STD mice in the ST, and a significant difference was observed between the latter groups ($p = 0.019$; Fig. 8H). Together, these results led us to envision that deficiency in BCAA might exert antidepressant-like properties while maintaining a high level of anxiety.

In a last series of experiments, we asked how such deficiency in amino acids impacts the response to an acute administration of Flx in the TST. A few days after the first session of TST, we resubmitted the same animals to this procedure and found that a single administration of Flx significantly decreased the percentage of time of immobility in controls ($p = 0.03$) but not in HFD-BCAA^{+/+} mice ($p = 0.37$; Fig. 9). The antidepressant-like effect of Flx was fully restored in HFD-BCAA^{+/-} mice ($p = 0.009$; Fig. 9).

Discussion

This study was designed to determine the neurobehavioral effects of Met in mice fed an HFD and to decipher its putative mechanism of action focusing on the serotonergic system and its projections to the hippocampus, a brain region morphologically and functionally affected in major depression (MacQueen and Frodl, 2011). One of the most remarkable results reported herein is the fact that HFD-induced peripheral IR was accompanied by elevated levels of circulating BCAAs. In the CNS, HFD impaired both the electrical properties of DR 5-HT neurons and 5-HT release, resulting in altered emotionally related behaviors, whereas Met improved all these peripheral and central parameters. Because changes in plasma BCAAs are known to limit tryptophan availability into the brain, we also provided evidence that partial deficiency of BCAAs in diet is sufficient to exert antidepressant-like activity.

It is now well accepted that in homogenous C57BL/6J mice, HFD feeding leads to IR (Burcelin et al., 2002). In agreement with this finding, we reported that exposure to an HFD for 16 weeks elicits glucose metabolic impairments. Met, which belongs to a class of insulin-sensitizing drugs, significantly decreased body weight and improved peripheral IR in mice fed an HFD. Its beneficial effects on peripheral metabolism have been attributed to several peripheral processes including the activation of AMP-activated protein kinase (AMPK) pathway, reduction in hepatic gluconeogenesis, and stimulation of glucose uptake in skeletal muscle (Graham et al., 2011). Interestingly, increased IR drives higher circulating fasting BCAA levels (Mahendran et al., 2017), while rats fed a diet high in BCAAs displayed increased rates of IR (Newgard et al., 2009; Zhao et al., 2016). Here, we demonstrated that HFD mice displayed elevated plasma levels of BCAAs, whereas Met reversed this parameter. Interestingly, 5-HT synthe-

sis in neurons can be influenced by tryptophan uptake into the brain, which occurs through the LAT1 on the BBB that it shares with the BCAAs (Yamamoto and Newsholme, 2000; Fernstrom, 1983, 2013). Thus, we hypothesized that chronic exposure to an HFD could raise plasma BCAA concentrations sufficiently to limit the uptake of tryptophan into the brain as a result of the competition between amino acids, and thereby reduce neuronal 5-HT synthesis and release from nerve terminals. This is consistent with findings reporting that supplementation in BCAAs reduced brain 5-HT content in rats (Choi et al., 2013) and induced depressive-like symptoms in rodents such as anxiety (Coppola et al., 2013) or anhedonia (Scaini et al., 2014). By attenuating circulating BCAA levels, Met could favor tryptophan availability in the brain and thereby positively reverberate on central 5-HT tone. In an attempt to confirm this assumption and to provide a more valuable insight into the impact of the modulation of circulating BCAAs on the activity of the serotonergic system, electrophysiological and microdialysis experiments were conducted.

In vivo electrophysiological experiments indicated that an HFD did not modify the basal firing rate of DR 5-HT neurons, whereas patch-clamp recordings pointed out that the intrinsic properties of these neurons were significantly impaired. It is plausible that the altered excitability observed in patch-clamp recordings would not affect the basal firing rate but would rather limit DR neuron activation in response to diverse stimuli that notably increased norepinephrine release, which is known to accelerate the pacemaker activity of 5-HT neurons in an $\alpha 1$ adrenoceptor-dependent manner (Aghajanian, 1985). Accordingly, we found that the phenylephrine-induced increased firing rate is blunted after HFD feeding. Met increased the firing rate of DR 5-HT neurons and reversed the impairments of electrical parameters detected in HFD mice. These electrophysiological data parallel the altered extracellular 5-HT levels ($[5\text{-HT}]_{\text{ext}}$) in the vHP of mice fed an HFD. Indeed, using *in vivo* microdialysis, we reported a twofold decrease in basal extracellular $[5\text{-HT}]_{\text{ext}}$ in HFD mice. However, Met failed to reverse this neurochemical response. Because 5-HT outflow measured by microdialysis reflects a balance between 5-HT uptake and release (Guiard et al., 2006), we assumed that any increase in 5-HT release at the nerve terminals may be counterbalanced by an active 5-HT reuptake process. If this assumption is correct, the stimulating effects of Met on basal extracellular 5-HT levels would be revealed in the presence of a SERT inhibitor. Accordingly, we showed that the acute administration of Flx elicited a greater increase in hippocampal $[5\text{-HT}]_{\text{ext}}$ in HFD-Met mice than in HFD-Veh.

We next questioned the effects of Met on anxiety- and depressive-like phenotypes, which are finely regulated by 5-HT

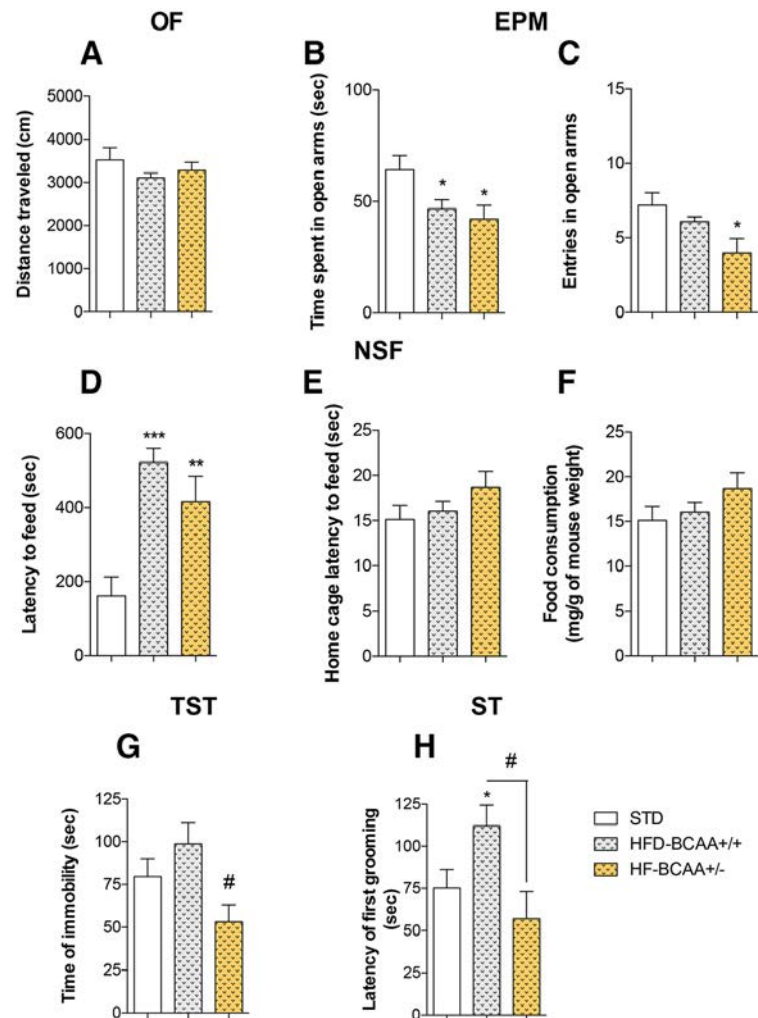


Figure 8. Partial deficiency in BCAAs promotes antidepressant-like effects in mice fed an HFD. Two groups of mice were fed an HFD with a normal or reduced content of branched-chain amino acids (HFD-BCAA^{+/+} and HFD-BCAA^{+/-}; respectively). **A–H**, The control group of mice was fed an STD. Data are the mean \pm SEM of total distance traveled in the open field for 10 min ($F_{(2,27)} = 0.3$; $p = 0.74$; **A**), time spent and the number of entries in open arms ($F_{(2,27)} = 4.4$, $p = 0.02$; and $F_{(2,27)} = 4.7$, $p = 0.016$; **B**, **C**), latency to feed in the novelty suppressed feeding ($F_{(2,27)} = 11.9$, $p = 0.0002$; **D**), latency to feed in the home cage ($F_{(2,27)} = 1.4$, $p = 0.25$; **E**), food home cage consumption based on caloric value consumed ($F_{(2,27)} = 1.2$, $p = 0.3$; **F**), time of immobility in the tail suspension test ($F_{(2,27)} = 4.2$, $p = 0.025$; **G**), and latency of first grooming in the splash test ($F_{(2,27)} = 4.5$, $p = 0.02$; **H**). $n = 10$ mice/group. * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$ and *** $p < 0.001$: significantly different from STD-Veh group. # $p < 0.05$: significantly different from HFD-BCAA^{+/+} mice.

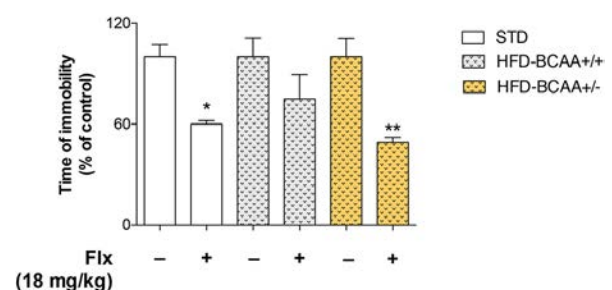


Figure 9. Partial deficiency in BCAAs restores normal response to the antidepressant fluoxetine in mice fed an HFD. Two groups of mice were fed an HFD with a normal or reduced content of branched-chain amino acids (HFD-BCAA^{+/+} and HFD-BCAA^{+/-}; respectively). The control group of mice was fed an STD. Data are the mean \pm SEM of the percentage time of immobility relative to the corresponding control group of mice injected with NaCl 0.9% in the tail suspension test. Mice were tested 30 min after the intraperitoneal administration of NaCl 0.9% (–) or Flx (18 mg/kg; two-way ANOVA: $F_{(2,54)} = 2.3$, $p = 0.65$; and $F_{(1,54)} = 30.2$, $p = 0.0005$ for diet and treatment factors, respectively). $n = 10$ mice/group. * $p < 0.05$ and ** $p < 0.01$: significantly different from the corresponding group of mice injected with NaCl 0.9%.

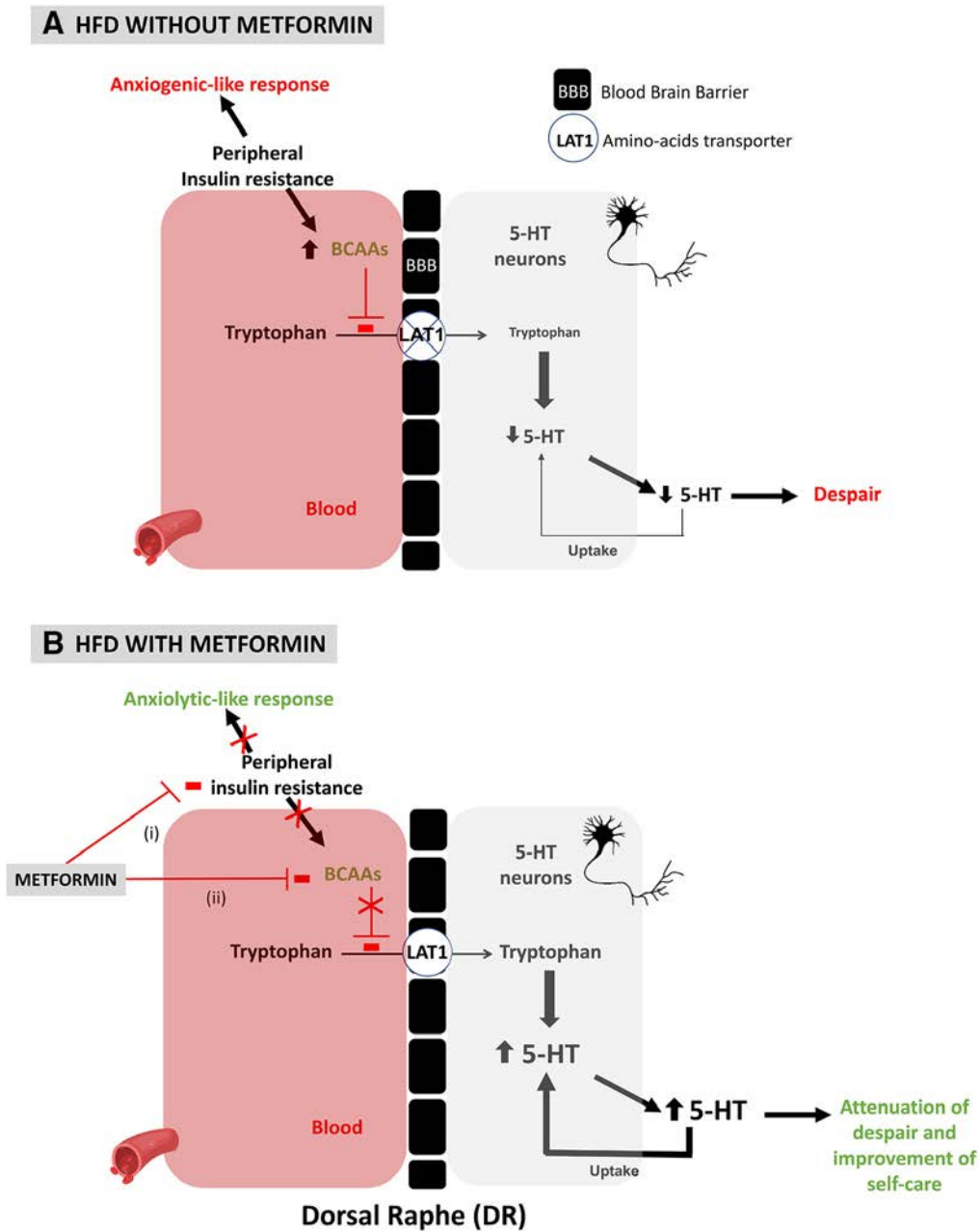


Figure 10. Model underpinning the effects of metformin on depressive symptoms in mice fed an HFD. Peripheral insulin resistance has been associated with anxiogenic-like response, one of the most visible and early symptoms of depression. This metabolic impairment is also responsible for an increase in plasma BCAA (Val, Leu, Isoleu) levels, which limit tryptophan availability in DR 5-HT neurons due to a lower brain penetration across LAT1 expressed on the BBB. **A**, Such effects are believed to impair DR 5-HT neuronal activity and 5-HT release at the nerve terminals, thereby leading to despair, another symptom of depression. The ability of Met to ameliorate insulin sensitivity represents an important process to promote anxiolytic effects whereas its antidepressant-like effects could rely on both direct (i) and indirect (ii) mechanisms converging toward lower levels of circulating BCAAs. **B**, The latter mechanism would favor 5-HT neuronal activity and 5-HT release at the nerve terminals, which are key for the antidepressant response. Owing to an active 5-HT reuptake process in the hippocampus of HFD mice treated with Met, the association of this antidiabetic drug with an SSRI could be a new potentiation strategy exerting a wide spectrum of action. Alternatively, the combination of SSRI with a diet poor in BCAAs might be used to relieve depressive symptoms in depressed patients with or without comorbid metabolic disorders.

projections. Our results indicate that mice fed an HFD are prone to develop anxiety, as shown in the EPM and NSF. This result is particularly interesting since anxiety manifests as a predominant feature of depression and can also precede the onset of the pathology (Malhi and Mann, 2018). In a marked contrast, HFD did not influence the time of immobility in the TST, but this result does not rule out the possibility that such a diet caused depressive symptoms beyond anxiety. Indeed, the TST and the forced swim stress have been developed to screen antidepressant-like activity rather than to ascertain depressive-like behavior (Nestler and

Hyman, 2010). The observation that HFD leads to anhedonia and decreased self-care (Dutheil et al., 2016; Zemdegs et al., 2016) reinforces the idea that core symptoms of depression can be also affected by HFD-induced IR (Miyata et al., 2004; Abildgaard et al., 2011; Ho et al., 2012; André et al., 2014; Gupta et al., 2014; Liu et al., 2014; Dutheil et al., 2016; Yang et al., 2016; Zemdegs et al., 2016; Hassan et al., 2018). These data mirror the clinical observations that people experiencing type 2 diabetes and IR are twice as likely to develop depression compared to people without diabetes (Anderson et al., 2001; de Groot et al., 2001). Interestingly,

the improvement of metabolic parameters induced by prolonged administration of Met in mice fed an HFD were accompanied by a reduction of both anxiety and despair, whereas fluoxetine, the conventional antidepressant drug used herein as a positive control, failed to exert beneficial effects in the EPM. These results concur with previous preclinical studies pointing out that different classes of antidiabetic agents or adiponectin, a hormone exerting insulin-sensitizing action, produces antidepressant-like activities (Ho et al., 2012; Liu et al., 2012; Gupta et al., 2014; Su et al., 2017). In humans, a recent study also reported that Met favors depression recovery in patients with comorbid diabetes unveiling a strong correlation between improvement in plasma glycated hemoglobin levels and depression score (Guo and Lu, 2014).

In light of the latter results, we generated an HFD with a partial deficiency in BCAAs (i.e., HFD-BCAA^{+/-}) for which a significant reduction of these plasma amino acids content by 40% was detected. As previously reported, we found that an HFD deficient in BCAAs did not display an improvement of peripheral IR (White et al., 2016), but reduced despair, and improvement of self-care was detected in HFD-BCAA^{+/-} mice. Finally, we investigated to what extent HFD-BCAA^{+/-} influences the response of a single administration of Flx in the TST. Although acute administration of Flx failed to exert an antidepressant-like effect in HFD-BCAA^{+/+} mice, a normal response was observed in HFD-BCAA^{+/-} mice. The efficacy of antidepressant drugs in a context of T2D and IR both in humans and rodents has been subjected to only few investigations, and no consistent conclusions have been provided (Anderson et al., 2010; Bryan et al., 2010; Isingrini et al., 2010; Gois et al., 2014; Zemdegs et al., 2016).

The present study proposes a new antidepressant strategy based on chronic treatment with Met, which acts, at least in part, by reducing circulating levels of BCAAs and by stimulating 5-HT release in the vHP (Fig. 10). It is important to emphasize that an improvement of brain IR could represent another mechanism underlying the beneficial action of Met. Indeed, the brain is endowed with a high density of insulin receptors (Kleinriders et al., 2014), and growing evidence emphasizes their role in the regulation of brain monoaminergic transmission (Kleinriders et al., 2015) and signaling (Papazoglou et al., 2015). It should also be borne in mind that Met crosses the BBB and has several beneficial effects in the brain such as anti-inflammatory and neuroprotective effects (Łabuzek et al., 2010). A possible mechanism underpinning the anxiolytic- and antidepressant-like effects of Met could thus also recruit such properties. Overall, this study supports the fact that the association of Met or a diet poor in BCAAs with an SSRI could be a relevant “add-on” strategy for the comorbidity of metabolic and mental disorders. This hypothesis has been recently tested showing that the association of Flx and Met produced greater improvement of depressive symptoms in rats exposed to chronic stress and an HFD (Khedr et al., 2018). In light of these data, clinical and preclinical studies are also warranted to further evaluate the efficacy of such a potentiation strategy in depressed patients or in relevant animal models without metabolic comorbidities. In this prospect, a recent study shows that Met produces antidepressant-like activities given either alone (Liu et al., 2019) or in combination with Flx (Poggini et al., 2019) in chronically stressed animals.

References

- Abildgaard A, Solskov L, Volke V, Harvey BH, Lund S, 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.
- Aghajanian GK (1985) Modulation of a transient outward current in serotonergic neurons by alpha 1-adrenoceptors. *Nature* 315:501–503.
- Anderson RJ, Freedland KE, Clouse RE, Lustman PJ (2001) The prevalence of comorbid depression in adults with diabetes: a meta-analysis. *Diabetes Care* 24:1069–1078.
- Anderson RJ, Gott BM, Sayuk GS, Freedland KE, Lustman PJ (2010) Antidepressant pharmacotherapy in adults with type 2 diabetes: rates and predictors of initial response. *Diabetes Care* 33:485–489.
- André C, Dinel AL, Ferreira G, Layé S, 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.
- Asor E, Stempler S, Avital A, Klein E, Ruppin E, Ben-Shachar D (2015) The role of branched chain amino acid and tryptophan metabolism in rat's behavioral diversity: intertwined peripheral and brain effects. *Eur Neuropharmacol* 25:1695–1705.
- Bryan C, Songer T, Brooks MM, Rush AJ, Thase ME, Gaynes B, Balasubramani GK, Trivedi MH, Fava M, Wisniewski SR (2010) The impact of diabetes on depression treatment outcomes. *Gen Hosp Psychiatry* 32:33–41.
- Burcelin R, Crivelli V, Dacosta A, Roy-Tirelli A, Thorens B (2002) Heterogeneous metabolic adaptation of C57BL/6J mice to high-fat diet. *AM J Physiol Endocrinol Metab* 282:E834–E842.
- Choi S, Disilvio B, Fernstrom MH, Fernstrom JD (2013) Oral branched-chain amino acid supplements that reduce brain serotonin during exercise in rats also lower brain catecholamines. *Amino Acids* 45:1133–1142.
- Coppola A, Wenner BR, Ilkayeva O, Stevens RD, Maggioni M, Slotkin TA, Levin ED, Newgard CB (2013) Branched-chain amino acids alter neurobehavioral function in rats. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 304:E405–E413.
- David DJ, Samuels BA, Rainer Q, Wang JW, Marsteller D, Mendez I, Drew M, Craig DA, Guiard BP, Guilloux JP, Artymyshyn RP, Gardier AM, Gerald C, Antonijevic IA, Leonardo ED, Hen R (2009) Neurogenesis-dependent and -independent effects of fluoxetine in an animal model of anxiety/depression. *Neuron* 62:479–493.
- de Groot M, Anderson R, Freedland KE, Clouse RE, Lustman PJ (2001) Association of depression and diabetes complications: a meta-analysis. *Psychosom Med* 63:619–630.
- Derkach KV, Bondareva VM, Chistyakova OV, Berstein LM, Shpakov AO (2015) The effect of long-term intranasal serotonin treatment on metabolic parameters and hormonal signaling in rats with high-fat diet/low-dose streptozotocin-induced type 2 diabetes. *Int J Endocrinol* 2015:245459.
- Dinel AL, André C, Aubert A, Ferreira G, Layé S, Castanon N (2014) Lipopolysaccharide-induced brain activation of the indoleamine 2,3-dioxygenase and depressive-like behavior are impaired in a mouse model of metabolic syndrome. *Psychoneuroendocrinology* 40:48–59.
- Dutheil S, Ota KT, Wohleb ES, Rasmussen K, Duman RS (2016) High-fat diet induced anxiety and anhedonia: impact on brain homeostasis and inflammation. *Neuropsychopharmacology* 41:1874–1887.
- Fellendorf FT, Platzer M, Pilz R, Rieger A, Kapfhammer HP, Mangge H, Dalkner N, Zelzer S, Meintzer A, Birner A, Bengesser SA, Queissner R, Hamm C, Hartleb R, Reininghaus EZ (2018) Branched-chain amino acids are associated with metabolic parameters in bipolar disorder. *World J Biol Psychiatry*. Advance online publication. Retrieved May 23, 2019. doi:10.1080/15622975.2018.1487077.
- Fernstrom JD (1983) Role of precursor availability in control of monoamine biosynthesis in brain. *Physiol Rev* 63:484–546.
- Fernstrom JD (2013) Large neutral amino acids: dietary effects on brain neurochemistry and function. *Amino Acids* 45:419–430.
- Gannon NP, Schnuck JK, Vaughan RA (2018) BCAA Metabolism and Insulin Sensitivity—dysregulated by metabolic status? *Mol Nutr Food Res* 62:e1700756.
- Gois C, Dias VV, Carmo I, Duarte R, Ferro A, Santos AL, Sousa F, Barbosa A (2014) Treatment response in type 2 diabetes patients with major depression. *Clin Psychol Psychother* 21:39–48.
- Graham GG, Punt J, Arora M, Day RO, Doogue MP, Duong JK, Furlong TJ, Greenfield JR, Greenup LC, Kirkpatrick CM, Ray JE, Timmins P, Williams KM (2011) Clinical pharmacokinetics of metformin. *Clin Pharmacokinet* 50:81–98.
- Guiard BP, Lanfumey L, Gardier AM (2006) Microdialysis approach to study serotonin outflow in mice following selective serotonin reuptake

- inhibitors and substance P (neurokinin 1) receptor antagonist administration: a review. *Curr Drug Targets* 7:187–201.
- Guo M, Lu XY (2014) Leptin receptor deficiency confers resistance to behavioral effects of fluoxetine and desipramine via separable substrates. *Transl Psychiatry* 4:e486.
- Gupta D, Radhakrishnan M, Kurhe Y (2014) Insulin reverses anxiety-like behavior evoked by streptozotocin-induced diabetes in mice. *Metab Brain Dis* 29:737–746.
- Hassan AM, Mancano G, Kashofer K, Fröhlich EE, Matak A, Mayerhofer R, Reichmann F, Olivares M, Neyrinck AM, Delzenne NM, Claus SP, Holzer P (2018) High-fat diet induces depression-like behaviour in mice associated with changes in microbiome, neuropeptide Y, and brain metabolome. *Nutr Neurosci*. Advance online publication. Retrieved May 23, 2019. doi:10.1080/1028415X.2018.1465713.
- Herrera-Marquez R, Hernandez-Rodriguez J, Medina-Serrano J, Boyzo-Montes de Oca A, Manjarrez-Gutierrez G (2011) Association of metabolic syndrome with reduced central serotonergic activity. *Metab Brain Dis* 26:29–35.
- Ho N, Balu DT, Hilario MR, Blendy JA, Lucki I (2012) Depressive phenotypes evoked by experimental diabetes are reversed by insulin. *Physiol Behav* 105:702–708.
- Isingrini E, Camus V, Le Guisquet AM, Pingaud M, Devers S, Belzung C (2010) Association between repeated unpredictable chronic mild stress (UCMS) procedures with a high fat diet: a model of fluoxetine resistance in mice. *PLoS One* 5:e10404.
- Khedr SA, Elmegly AA, El-Kharashi OA, Abd-Alkhalik HA, Louka ML, Salam HA, Aboul-Fotouh S (2018) Metformin potentiates cognitive and antidepressant effects of fluoxetine in rats exposed to chronic restraint stress and high fat diet: potential involvement of hippocampal c-jun repression. *Naunyn Schmiedeberg's Arch Pharmacol* 391:407–422.
- Kim M, Bae S, Lim KM (2013) Impact of high fat diet-induced obesity on the plasma levels of monoamine neurotransmitters in C57BL/6 mice. *Biomol Ther (Seoul)* 21:476–480.
- Kiyasova V, Fernandez SP, Laine J, Stankovski L, Muzerelle A, Doly S, Gaspar P (2011) A genetically defined morphologically and functionally unique subset of 5-HT neurons in the mouse raphe nuclei. *J Neurosci* 31:2756–2768.
- Kleinridders A, Ferris HA, Cai W, Kahn CR (2014) Insulin action in brain regulates systemic metabolism and brain function. *Diabetes* 63:2232–2243.
- Kleinridders A, Cai W, Cappellucci L, Ghazarian A, Collins WR, Vienberg SG, Pothos EN, Kahn CR (2015) Insulin resistance in brain alters dopamine turnover and causes behavioral disorders. *Proc Natl Acad Sci U S A* 112:3463–3468.
- Kloiber S, Kohli MA, Brueckl T, Ripke S, Ising M, Uhr M, Menke A, Unschuld PG, Horstmann S, Salyakina D, Muller-Myhsok B, Binder EB, Holsboer F, Lucae S (2010) Variations in tryptophan hydroxylase 2 linked to decreased serotonergic activity are associated with elevated risk for metabolic syndrome in depression. *Mol Psychiatry* 15:736–747.
- Labuzek K, Liber S, Gabryel B, Okopień B (2010) Metformin has adenosine monophosphate activated protein kinase (AMPK)-independent effects on LPS-stimulated rat primary microglial cultures. *Pharmacol Rep* 62:827–848.
- Lang UE, Günther L, Scheuch K, Klein J, Eckhart S, Hellweg R, Danker-Hopfe H, Oehler J (2009) Higher BDNF concentrations in the hippocampus and cortex of an aggressive mouse strain. *Behav Brain Res* 197:246–249.
- Last D, Alsop DC, Abduljalil AM, Marquis RP, de Bazelaire C, Hu K, Cavallero J, Novak V (2007) Global and regional effects of type 2 diabetes on brain tissue volumes and cerebral vasoreactivity. *Diabetes Care* 30:1193–1199.
- Lindqvist A, Mohapel P, Bouter B, Frielingsdorf H, Pizzo D, Brundin P, Erlanson-Albertsson C (2006) High-fat diet impairs hippocampal neurogenesis in male rats. *Eur J Neurol* 13:1385–1388.
- Liu R, Dang W, Jianting M, Su C, Wang H, Chen Y, Tan Q (2012) Citalopram alleviates chronic stress induced depression-like behaviors in rats by activating GSK3beta signaling in dorsal hippocampus. *Brain Res* 1467:10–17.
- Liu W, Zhai X, Li H, Ji L (2014) Depression-like behaviors in mice subjected to co-treatment of high-fat diet and corticosterone are ameliorated by AICAR and exercise. *J Affect Disord* 156:171–177.
- Liu W, Liu J, Huang Z, Cui Z, Li L, Liu W, Qi Z (2019) Possible role of GLP-1 in antidepressant effects of metformin and exercise in CUMS mice. *J Affect Disord* 246:486–497.
- MacQueen G, Frodl T (2011) The hippocampus in major depression: evidence for the convergence of the bench and bedside in psychiatric research? *Mol Psychiatry* 16:252–264.
- Mahendran Y, Jonsson A, Have CT, Allin KH, Witte DR, Jørgensen ME, Grarup N, Pedersen O, Kilpeläinen TO, Hansen T (2017) Genetic evidence of a causal effect of insulin resistance on branched-chain amino acid levels. *Diabetologia* 60:873–878.
- Malhi GS, Mann JJ (2018) Depression. *Lancet* 392:2299–2312.
- Matthews DR, Hosker JP, Rudenski AS, Naylor BA, Treacher DF, Turner RC (1985) Homeostasis model assessment: insulin resistance and beta-cell function from fasting plasma glucose and insulin concentrations in man. *Diabetologia* 28:412–419.
- Miyata S, Hirano S, Kamei J (2004) Diabetes attenuates the antidepressant-like effect mediated by the activation of 5-HT1A receptor in the mouse tail suspension test. *Neuropsychopharmacology* 29:461–469.
- Nestler EJ, Hyman SE (2010) Animal models of neuropsychiatric disorders. *Nat Neurosci* 13:1161–1169.
- Newgard CB, An J, Bain JR, Muehlbauer MJ, Stevens RD, Lien LF, Haqq AM, Shah SH, Arlotto M, Slentz CA, Rochon J, Gallup D, Ilkayeva O, Wenner BR, Yancy WS Jr, Eisenstein H, Musante G, Surwit RS, Millington DS, Butler MD, et al. (2009) A branched-chain amino acid-related metabolic signature that differentiates obese and lean humans and contributes to insulin resistance. *Cell Metab* 9:311–326.
- Papazoglou IK, Jean A, Gertler A, Taouis M, and Vacher CM (2015) Hippocampal GSK3β as a molecular link between obesity and depression. *Mol Neurobiol* 52:363–374.
- Pardridge WM (1998) Blood-brain barrier carrier-mediated transport and brain metabolism of amino acids. *Neurochem Res* 23:635–644.
- Park HR, Park M, Choi J, Park KY, Chung HY, Lee J (2010) A high-fat diet impairs neurogenesis: involvement of lipid peroxidation and brain-derived neurotrophic factor. *Neurosci Lett* 482:235–239.
- Phillips OR, Onopa AK, Zaiko YV, Singh MK (2018) Insulin resistance is associated with smaller brain volumes in a preliminary study of depressed and obese children. *Pediatr Diabetes* 19:892–897.
- Poggini S, Golia MT, Alboni S, Milior G, Sciarria LP, Viglione A, Matte Bon G, Brunello N, Puglisi-Allegra S, Limatola C, Maggi L, Branchi I (2019) Combined fluoxetine and metformin treatment potentiates antidepressant efficacy increasing IGF2 expression in the dorsal hippocampus. *Neural Plast* 2019:4651031.
- Quesseveur G, Gardier AM, Guiard BP (2013) The monoaminergic tripartite synapse: a putative target for currently available antidepressant drugs. *Curr Drug Targets* 14:1277–1294.
- Rasgon NL, Kenna HA (2005) Insulin resistance in depressive disorders and Alzheimer's disease: revisiting the missing link hypothesis. *Neurobiol Aging* 26 [Suppl 1]:103–107.
- Scaini G, Jeremias GC, Furlanetto CB, Domingui D, Comim CM, Quevedo J, Schuck PF, Ferreira GC, Streck EL (2014) Behavioral responses in rats submitted to chronic administration of branched-chain amino acids. *JIMD Rep* 13:159–167.
- Stranahan AM, Norman ED, Lee K, Cutler RG, Telljohann RS, Egan JM, Mattson MP (2008) Diet-induced insulin resistance impairs hippocampal synaptic plasticity and cognition in middle-aged rats. *Hippocampus* 18:1085–1088.
- Su WJ, Peng W, Gong H, Liu YZ, Zhang Y, Lian YJ, Cao ZY, Wu R, Liu LL, Wang B, Wang YX, Jiang CL (2017) Antidiabetic drug glyburide modulates depressive-like behavior comorbid with insulin resistance. *J Neuroinflammation* 14:210.
- Surget A, Saxe M, Leman S, Iburguen-Vargas Y, Chalons S, Griebel G, Hen R, Belzung C (2008) Drug-dependent requirement of hippocampal neurogenesis in a model of depression and of antidepressant reversal. *Biol Psychiatry* 64:293–301.
- Wang J, Gallagher D, DeVito LM, Cancino GI, Tsui D, He L, Keller GM, Frankland PW, Kaplan DR, Miller FD (2012) Metformin activates an atypical PKC-CBP pathway to promote neurogenesis and enhance spatial memory formation. *Cell Stem Cell* 11:23–35.
- Weina H, Yuhu N, Christian H, Birong L, Feiyu S, Le W (2018) Liraglutide attenuates the depressive- and anxiety-like behaviour in the corticoste-

- rone induced depression model via improving hippocampal neural plasticity. *Brain Res* 1694:55–62.
- White PJ, Lapworth AL, An J, Wang L, McGarrah RW, Stevens RD, Ilkayeva O, George T, Muehlbauer MJ, Bain JR, Trimmer JK, Brosnan MJ, Rolph TP, Newgard CB (2016) Branched-chain amino acid restriction in Zucker-fatty rats improves muscle insulin sensitivity by enhancing efficiency of fatty acid oxidation and acyl-glycine export. *Mol Metab* 5:538–551.
- Yamamoto T, Newsholme EA (2000) Diminished central fatigue by inhibition of the L-system transporter for the uptake of tryptophan. *Brain Res Bull* 52:35–38.
- Yang JL, Liu X, Jiang H, Pan F, Ho CS, Ho RC (2016) The effects of high-fat-diet combined with chronic unpredictable mild stress on depression-like behavior and Leptin/LepRb in male rats. *Sci Rep* 6:35239.
- Zemdegs J, Quesseveur G, Jarriault D, Pénicaud L, Fioramonti X, Guiard BP (2016) High-fat diet-induced metabolic disorders impairs 5-HT function and anxiety-like behavior in mice. *Br J Pharmacol* 173:2095–2110.
- Zhao X, Han Q, Liu Y, Sun C, Gang X, Wang G (2016) The relationship between branched-chain amino acid related metabolomic signature and insulin resistance: a systematic review. *J Diabetes Res* 2016:2794591.
- Zhong KL, Chen F, Hong H, Ke X, Lv YG, Tang SS, Zhu YB (2018) New views and possibilities of antidiabetic drugs in treating and/or preventing mild cognitive impairment and Alzheimer's disease. *Metab Brain Dis* 33:1009–1018.

À travers ces travaux, nous démontrons l'effet anxiolytique de la metformine dans le modèle de comorbidité diabète-dépression induit par un régime HFD. Cette amélioration comportementale s'accompagne d'effets bénéfiques sur l'activité électrique et biochimique des neurones sérotoninergiques du DRN. L'ensemble de ces résultats soutient notre hypothèse concernant l'implication de l'insulino-résistance dans la physiopathologie de la dépression mais nous ne pouvons pas exclure un potentiel effet direct de la metformine indépendant de l'insuline.

Grâce à une collaboration avec le docteur Eduardo Luiz Gasnhar MOREIRA (Université Fédérale de Santa Catarina, Brésil), nous avons pu appréhender l'effet de la metformine dans le modèle STZ chez la souris Swiss. Cette étude permet d'élargir le champ d'action de la metformine au DT1. En effet, puisque dans le cas du modèle STZ, l'insulino-sensibilité ne peut être que marginalement améliorée, cela permet de déterminer si les effets bénéfiques potentiels de la metformine sont dépendants (ou pas) de l'amélioration de troubles métaboliques périphériques et s'ils passent par une action directe sur le cerveau (dont la cible reste à être identifiée).

2) Les effets de la metformine dans le **modèle STZ**

ARTICLE 5 :

L'amélioration de l'insulino-résistance périphérique n'est pas nécessaire aux effets neurocomportementaux de la Metformine.

Eslen DELANOGARE, Sébastien BULLICH, Lucas Antônio dos Santos BARBOSA, Wellington de Medeiros BARROS, Sara Pereira BRAGA, Scheila Iria KRAUS, Júlia Nahir KASPROWICZ, Gustavo Jorge dos SANTOS, Bruno Pierre GUIARD, Eduardo Luiz Gasnhar MOREIRA.

¹*Departamento de Ciências Fisiológicas, 2Programa de Pós-Graduação em Neurociências, Programa de Pós-Graduação Multicêntrico em Ciências Fisiológicas, Universidade Federal de Santa Catarina, 88040-900, Florianópolis, SC, Brasil.*

²*Centre de Recherches sur La Cognition Animale, Centre de Biologie Intégrative, Université de Toulouse, CNRS, 31000 Toulouse, France.*

Under review, Behavioral Brain Research

Résumé :

La résistance centrale à l'insuline a été évoquée comme un lien potentiel entre le diabète et les troubles neuropsychiatriques. Par conséquent, des approches thérapeutiques utilisant des médicaments antidiabétiques pour améliorer les taux d'insuline ou sa signalisation pourrait prévenir les dysfonctions neurologiques induites par un diabète de type 1 (DT1) ou un diabète de type 2 (DT2). Cette étude vise à déterminer si la metformine exerce des effets métaboliques et neurocomportementaux bénéfiques dans un modèle de DT1 induit par de la streptozotocine (STZ) ou dans un modèle d'obésité induit par un régime Wester Diet (WD) chez des souris Swiss males. Le DT1 a été induit par des injections intrapéritonéales de STZ (50mg/kg, une fois par jours pendant 5 jours). Ces animaux ont ensuite été traités avec une solution vehicule ou de la metformine à partir du 15ème jour (200mg/kg/day, par gavage). Une batterie de test comportementaux permettant l'analyse des symptômes de la dépression ainsi que la douleur a été réalisée après 18jours. Le WD a été modélisé par l'exposition à un régime riche en gras et en fructose (High-fat high-fructose diet, HFFD) durant 30 jours. Les résultats expérimentaux montrent que le traitement par la STZ ainsi que l'exposition à un WD induisent des

perturbations métaboliques et neurocomportementales chez la souris. De manière remarquable, la metformine améliore l'ensemble de ces altérations chez les souris obèses exposées au WD. Cependant, chez les souris ayant reçu la STZ, la metformine améliore les déficits neurocomportementaux mais pas les marqueurs de dysfonctions métaboliques associés. Sur la base de ces observations, nous proposons que les effets neurocomportementaux bénéfiques de la metformine ne passent pas par l'amélioration de la signalisation de l'insuline périphérique mais mobiliseraient des mécanismes centraux. Ces résultats suggèrent que les antidiabétiques oraux pourraient être utilisés pour leur action centrale dans le traitement des troubles neurocomportementaux.

Contribution personnelle :

Au cours de ce travail :

- J'ai calculé l'ensemble des z-scores métaboliques et comportementaux,
- J'ai participé à l'écriture et à révision du manuscrit

31 **Abstract**

32
33
34 Brain insulin resistance has been pointed to as a possible link between diabetes and
35 neuropsychiatric disorders; therefore, therapeutic approaches using anti-diabetic drugs to
36 improve insulin levels or signaling could prevent type 1 (T1D) and type 2 diabetes mellitus
37 (T2D)-induced brain dysfunction. The present study aimed to determine whether metformin
38 exerts beneficial effects on metabolic and neurobehavioral outcomes in the streptozotocin
39 (STZ)-induced T1D model and Western Diet (WD)-induced obesity model in male Swiss
40 mice. T1D was induced by intraperitoneal injection of STZ (50 mg/kg, for five consecutive
41 days). The animals were then treated daily with saline or metformin (200 mg/kg/day, oral
42 gavage), and a battery of tests recapitulating different neurobehavioral anomalies related to
43 anxiogenic/depressive-like phenotype was conducted after 18 days. WD-induced obesity
44 was modeled in mice by high-fat and high-fructose diet (HFFD) feeding for 15 days. In the
45 sequence, control and diet-induced obesity mice were treated daily with saline or metformin
46 (200 mg/kg/day), and a battery of behavioral tests was performed after 17 days. STZ
47 injection and WD feeding induced metabolic and neurobehavioral impairments in mice.
48 Remarkably, metformin improved the metabolic and neurobehavioral parameters in WD-
49 induced obesity mice. Moreover, metformin ameliorated STZ-induced neurobehavioral
50 deficits while it failed to improve the associated metabolic impairments. Based on such
51 observation, the beneficial effects of metformin in STZ-induced neurobehavioral
52 impairments were not mediated by improving peripheral insulin signaling. Our results
53 suggest that conventional diabetes treatment could be repurposed to improve
54 neurobehavioral symptoms and diabetes concurrently.

55
56 **Key Words:** Metformin; Diabetes; Obesity; Behavioral; Mice.

1
2
3
4
5
6
7
8
9
10
11
12
13
14
15
16
17
18
19
20
21
22
23
24
25
26
27
28
29
30
31
32
33
34
35
36
37
38
39
40
41
42
43
44
45
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60
61
62
63
64
65
66
67
68
69
70
71
72
73
74
75
76
77
78
79
80
81
82
83

1. Introduction

Diabetes Mellitus is a metabolic disease characterized by severe hyperglycemia due to impaired insulin secretion or action [1]. The main types of this disease include type 1 (T1D) and type 2 diabetes mellitus (T2D), and gestational diabetes mellitus [2]. According to the International Diabetes Federation [3], the estimated worldwide prevalence of diabetes (T1D and T2D combined, both diagnosed and undiagnosed) in people aged 20-79 years has risen from 151 million people, in 2000, to 463 million in 2019. T1D results from a combination of a genetic predisposition associated with environmental factors that promote specific autoimmune destruction of insulin-producing pancreatic beta cells [4]. On the other hand, T2D, which accounts for approximately 90% of the cases [2], arises from an imbalance between insulin action in insulin-sensitive tissues (insulin resistance), insulin secretion (beta-cell dysfunction in T2D), and insulin clearance [5]. The main drivers of the global epidemic of T2D include the population aging, sedentary lifestyle, and the availability of ultra-processed foods, characterized by high energy density, fatty and sugary, with high obesogenic and diabetogenic capacity [1,6].

Despite the well-acknowledged complications related to diabetes, converging evidence indicates that both T1D and T2D have a tremendous impact on brain plasticity and neurotransmission, leading to comorbidities [7-8]. In particular, the depression rates among individuals with T1D or T2D across the life span are twice as high as in the general population [9]. Diabetic neuropathy is also a common complication of T1D and T2D [10]. The pain can be constant and accompanied by cutaneous allodynia, substantially affecting patients' quality of life [11]. In keeping with this clinical evidence, preclinical studies have shown that rodents fed a western diet (WD), rich in fat and sugar, present metabolic and behavioral impairments, e.g., obesity, dyslipidemia, insulin resistance, and depressive and anxiety like-behaviors [12-14]. Moreover, preclinical evidence suggests that streptozotocin

1
2
3
4
5
6
7
8
9
10
11
12
13
14
15
16
17
18
19
20
21
22
23
24
25
26
27
28
29
30
31
32
33
34
35
36
37
38
39
40
41
42
43
44
45
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60
61
62
63
64
65

84 (STZ)-induced T1D is associated with behavioral impairments in mice, e.g., anxiety-like
85 and depressive-like behaviors [15]. Diet-induced obesity mouse models and STZ-induced
86 T1D in mice are also associated with neuropathy phenotype [16-17].

87 It is noteworthy that several lines of evidence point to the development of brain
88 insulin resistance as a possible link between diabetes and neuropsychiatric disorders [18].
89 On this backdrop, therapeutic approaches using anti-diabetic drugs to improve insulin
90 signaling could prevent T1D and T2D-induced brain dysfunction. Metformin is a widely
91 prescribed drug for T2D. Its primary mechanism of action involves the activation of
92 adenosine monophosphate-activated protein kinase (AMPK), an enzyme involved in cellular
93 and whole organism energy balance. This activation decreases blood glucose, predominantly
94 by down-regulating its liver production, increasing insulin-independent glucose uptake in
95 peripheral tissues, lowering the insulin circulating levels [19], and promoting fatty acid
96 metabolism [20]. Therefore, based on the fact that (i) both DM forms alter mice behavior and
97 metabolism, (ii) that anti-diabetic drugs may prevent DM-induced brain injury, and (iii) that
98 metformin is a widely prescribed drug for T2D, the present study aimed to determine whether
99 metformin exerts beneficial effects on metabolic and behavioral outcomes in STZ-induced
100 T1D model and WD-induced obesity model in mice and its relation to peripheral glucose
101 metabolism.

102 103 **2. Experimental Procedures**

104 105 **2.1. Animals**

106 Male Swiss mice, 3-months old, weighing 30 – 35 g, were obtained from the Federal
107 University of Santa Catarina (UFSC, Florianópolis, Brazil). They were kept in groups of six
108 to nine mice per cage in a room under controlled temperature (23 ± 1 °C) and subjected to a
109 12-h light cycle (lights on 6:00 a.m.) with free access to food and water. All animal

110 procedures were performed following the Brazilian Federal Law on Animal Experimentation
111 and were approved by the Committee on Animal Use in Research (CEUA) of UFSC
112 (Protocols 3143051019 and 5875220419).

114 **2.2. Experimental Design**

115 **2.2.1. Streptozotocin (STZ)-induced T1D model**

116 T1D was induced by intraperitoneally (i.p.) injection of STZ (50 mg/kg, Sigma-
117 Aldrich, USA), dissolved in 1 M citrate buffer, pH 4.5, for five consecutive days. Random
118 blood glucose was monitored within two days after the last STZ injection, and the animals
119 with blood glucose ≥ 250 mg/dL for two consecutive tests were considered diabetic. In the
120 sequence, control and diabetic mice were treated, for 21 days, with vehicle or metformin, at a
121 dose of 200 mg/kg/day, via oral gavage (o.g) every day. After eighteen days of treatments, a
122 battery of tests recapitulating different neurobehavioral anomalies related to
123 anxiogenic/depressive-like and pain phenotype was conducted as follows, the open field test
124 (day 18), the tail suspension test (day 19), and the von Frey test (day 20). A day after, mice
125 were again food-deprived for six hours, and the blood was collected from the heart to
126 determine plasma cholesterol and insulin levels (Fig 1A). In another experimental cohort,
127 maintaining the above-mentioned experimental procedures, a splash test was conducted
128 after nineteen days of metformin treatment to evaluate self-care behavior in mice.

130 **2.2.2. Western Diet (WD)-induced obesity model**

131 Two experimental groups of mice were randomly created ($n = 18$ per group) and fed
132 daily for 15 days with different chows: (SD) standard rodent chow (Nuvilab CR1, Nuvital;
133 Quimtia Nutrientes SA, Brazil) or (HFFD) high-fat and high-fructose diet, i.e., 61 kJ%
134 saturated fat (Rhoster Indústria e Comércio, Brazil) plus filtered potable water containing
135 10% fructose (w/v; LabSynth, Brazil). The water containing fructose was renewed every two

136 days. In the sequence, control and HFFD-fed mice were treated, for 21 days, with vehicle or
137 metformin, at a dose of 200 mg/kg/day, o.g., every day. After seventeen days of treatments, a
138 battery of behavioral tests started, composed of the open field test (day 33), the tail suspension
139 test (day 35), and the von Frey test (day 36). One day after the last test, mice were food-
140 deprived for six hours, and the glucose tolerance test was performed (day 37). A day after,
141 mice were again food-deprived for six hours, and the blood was collected from the heart to
142 determine plasma cholesterol and insulin levels. Afterward, the prefrontal cortex and
143 hippocampus were dissected to determine the pGSK-3 β levels (Fig 1B).

2.3. Neurobehavioral tests

146 Experiments were performed during the light phase, in a controlled-temperature room
147 (23°C, humidity around ~40-60%), with low-light intensity (~15 lx).

2.3.1. Open Field Test (OFT)

150 The open field was used to evaluate the locomotor and exploratory activities induced
151 by a new environment. The apparatus, made of wood and covered with impermeable
152 Formica, had 50 cm wide \times 50 cm deep \times 40 cm high. Each mouse was placed in the center
153 of the open field and allowed to explore the apparatus for 5 min freely. The following
154 behavioral parameters were evaluated: % of crosses in the center of the apparatus, the total
155 number of crosses, and time in the center.

2.3.2. Tail Suspension Test (TST)

158 This test developed by Steru et al. [21] and interrogates one core symptom of
159 depression such as resignation. It is based on the premise that an animal subjected to a
160 stressful and inescapable situation presents two types of alternating behaviors, the agitation
161 characteristic of the attempt to escape from the stressful situation and immobility. This

162 behavior pattern can also be called resignation, characterized by the alternation of intense
163 motor activity and energy expenditure with immobility. Mice, both acoustically and visually
164 isolated, were suspended 30 cm above the floor by adhesive tape placed approximately 1 cm
165 from the tail's tip. Immobility time was manually recorded during a 6-min period by an
166 experienced observer.

2.3.3. Splash Test (ST)

169 This test consists of squirting a 10% sucrose solution on the animal's dorsal coat in
170 its home cage. Due to its viscosity, the sucrose solution dirties the coat and induces
171 grooming behavior [22]. After applying the sucrose solution, the frequency (duration) and
172 the latency to the beginning of the grooming behavior were recorded for 5 minutes.
173 Indications of lack of self-care and motivational behavior are considered as depressive-type
174 behaviors.

2.3.4. Mechanical allodynia: von Frey Test

177 Mechanical allodynia was evaluated following the method described by Chaplan et
178 al. [23]. Mice were acclimated for one h in individual clear Plexiglas boxes (9 x 7 x 11 cm)
179 on an elevated wire mesh platform to allow access to the hind paws' ventral surface. Von
180 Frey filaments (0.02; 0.07; 0.16; 0.4; 1.4; 4.0; 8.0 grams; VFH) were applied vertically over
181 the right hind paw's plantar surface until observed the subtle curving of it. The first filament
182 used was 0.4 g, and the next filament was increased or decreased according to the paw
183 withdrawal response. The response frequency is considered after up to 6 applications of the
184 von Frey filaments, and the median paw withdrawal threshold was determined using an
185 adaptation of the Dixon's up-and-down method.

2.4. Metabolic Analysis

188 Glucose tolerance was assessed following six h of fasting (from 08:00 to 14:00) and an
189 i.p. injection of 2 g/kg glucose (Sigma Aldrich). Blood glucose was measured from the tail tip
190 at baseline, 15, 30, 60, and 120 min using a glucometer (Accu-check, Roche Diagnostic). The
191 incremental area-under-the-curve for blood glucose (AUC) was calculated after normalization
192 by the baseline values (time 0). Total cholesterol was measured in plasma using the enzymatic
193 kit according to the manufacturer's instructions (Gold Analisa Diagnóstica Ltda, Brazil). The
194 results were expressed as mg/dL. Fasting plasma insulin levels were quantified by the
195 AlphaLisa® system (PerkinElmer, Waltham, MA, USA, cat. no. AL204) according to the
196 manufacturer's instructions.

197

198 **2.5. Neurochemical analysis**

199 Brains were removed, and the hippocampus and prefrontal cortex were immediately
200 dissected and homogenized with PBS buffer containing 0.05% Tween 20, 0.1 mM
201 phenylmethylsulfonyl fluoride, 0.1 mM benzethonium chloride, 10 mM EDTA, and 20 IU
202 aprotinin A. The homogenates were centrifuged at 3000×g for 10 min, and the supernatants
203 were stored at – 80 °C until assays for the determination of pGSK3-β levels were carried
204 out. The levels of pGSK3-β were evaluated using enzyme-linked immunosorbent assay
205 (ELISA) kits according to the manufacturer's recommendations (R&D Systems, USA), and
206 the results are expressed in picograms per milligram of protein in each sample. Protein
207 content was evaluated by the method of Bradford.

208

209 **2.6. Metabolic and neurobehavioral z-scores**

210 Z- normalization across complementary measures of metabolism and
211 emotionality- related behaviors assessed from different paradigms was applied after each
212 experimental protocol. Simple mathematical tools were used to normalize data from each
213 individual raw metabolic and behavioral data to the control groups' mean within each

1
2
3
4
5
6
7
8
9
10
11
12
13
14
15
16
17
18
19
20
21
22
23
24
25
26
27
28
29
30
31
32
33
34
35
36
37
38
39
40
41
42
43
44
45
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60
61
62
63
64
65

214 experimental cohort. Data were then integrated into a single value named metabolic and
215 neurobehavioral z - scores, respectively. Their values were obtained by subtracting the
216 average of observations in a population from an individual raw value and dividing this
217 difference by the population standard deviation as described previously [14]. This type of
218 normalization allows data on different scales to be compared. The metabolic z - score for the
219 STZ-induced T1D model and the WD-induced obesity model included glycemia, body mass
220 variation, and plasma cholesterol and insulin levels. The neurobehavioral z - score for the
221 STZ-induced T1D model and the WD-induced obesity model included the parameters
222 measured in the open field (percentage of center crossings and center time in seconds), tail
223 suspension test (latency to immobility and immobility time), and von Frey test (50%
224 mechanical threshold). It is noteworthy that, to avoid any weighted effect of the tests with
225 more than one parameter measured, we averaged these normalized behavioral parameters in
226 these tests to obtain a single value per mouse and behavioral test.

227 228 **2.7. Statistical analysis**

229 Data are expressed as mean + SEM. The statistical analyses were carried out using a
230 two-way analysis of variance (ANOVA; factors: model, treatment), with repeated measures
231 when appropriate. Following significant interaction effects, post-hoc tests were performed
232 (Newman Keul's test). The linear relationship between metabolic and
233 neurobehavioral z - scores was analyzed by the Pearson's r after a Shapiro–Wilk normality
234 test. The accepted level of significance for all tests was $p \leq 0.05$. All tests were performed
235 using the STATISTICA[®] software package (StatSoft Inc, Tulsa, OK, USA).

236 237 **3. Results**

238 239 *3.1. STZ-induced T1D model*

240 In the first part of this study, T1D was induced by multiple STZ injections in mice.
241 Thus, it was evaluated the effects of chronic metformin administration on metabolic and
242 behavioral outcomes. The two-way ANOVA indicated that STZ-treated mice exhibited
243 decreased body-weight gain [significant main effect of STZ, $F_{(1,21)} = 24.97$, $p \leq 0.0001$; Fig
244 2A]. As expected, STZ-treated mice presented higher blood glucose levels [significant main
245 effect of STZ, $F_{(1,21)} = 236.47$, $p \leq 0.00001$; Fig 2C] and lower plasma insulin levels
246 [significant main effect of STZ, $F_{(1,21)} = 6.11$, $p \leq 0.05$; Fig 2D] while metformin did not affect
247 both parameters. Moreover, the two-way ANOVA indicated no significant effects on the
248 plasma cholesterol levels (Fig 2B).

249 Regarding the behavioral outcomes, the two-way ANOVA indicated that STZ-treated
250 mice presented an overall decrease in the percentage of center crossings in the open field test
251 [significant main effect of STZ, $F_{(1,21)} = 13.86$, $p \leq 0.005$; Fig 3A], although it indicated no
252 significant effects on the center time (s) (Fig 3B), and the total crossings (Fig 3C). Moreover,
253 the two-way ANOVA indicated no significant effects on the latency to immobility (Fig 3E)
254 and on the total immobility time in the tail suspension test (Fig 3F). Finally, the two-way
255 ANOVA indicated a main effect for STZ by metformin interaction [$F_{(1,21)} = 11.20$, $p \leq 0.005$]
256 on the mechanical allodynia, characterized by the reduced paw withdrawal threshold.
257 Subsequent *post-hoc* comparisons revealed increased mechanical allodynia of vehicle-treated
258 STZ-treated mice compared with the vehicle-related control group ($p \leq 0.05$) and with
259 metformin-treated STZ-treated mice ($p \leq 0.05$; Fig 3D).

260 In a separated experimental cohort, the splash test was conducted to evaluate self-care
261 behavior in mice. The two-way ANOVA indicated no significant effects on latency to
262 grooming behavior (Fig 3G) in the splash test. On the other hand, the two-way ANOVA
263 indicated a main effect for STZ by metformin interaction [$F_{(1,20)} = 13.26$, $p \leq 0.005$] on the
264 grooming time (s) in the splash test. Subsequent *post-hoc* comparisons revealed lower
265 grooming time (s), indicative of depressive-like behavior, in vehicle-treated STZ-treated mice

1
2
3
4
5
6
7
8
9
10
11
12
13
14
15
16
17
18
19
20
21
22
23
24
25
26
27
28
29
30
31
32
33
34
35
36
37
38
39
40
41
42
43
44
45
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60
61
62
63
64
65

266 when compared with its vehicle-related control group ($p \leq 0.05$) and with the metformin-
267 treated STZ-treated mice ($p \leq 0.05$; Fig 3H).

268

269 3.2. *WD-induced obesity model*

270 In a new set of experiments, obesity was induced by WD diet feeding in mice for
271 fifteen days. Then, we sought to determine the effects of chronic metformin administration on
272 metabolism, behavior, and neurochemical outcomes in mice fed a WD diet for another 21
273 days. Firstly, the two-way ANOVA indicated a main effect for diet by metformin interaction
274 [$F_{(1,32)} = 6.55, p \leq 0.05$] on the body-weight gain. Subsequent *post-hoc* comparisons revealed
275 higher body weight gain of vehicle-treated WD-fed mice than its vehicle-related control group
276 ($p \leq 0.05$) and metformin-treated WD-fed mice ($p \leq 0.05$; Fig 4A). Metformin-treated WD-fed
277 mice presented higher body weight gain than its metformin-related control group ($p \leq 0.05$; Fig
278 4A). Moreover, the two-way ANOVA indicated a main effect for diet by metformin
279 interaction [$F_{(1,32)} = 4.49, p \leq 0.05$] on the plasma cholesterol levels. Subsequent *post-hoc*
280 comparisons revealed higher plasma cholesterol levels of vehicle-treated WD-fed mice than
281 its vehicle-related control group ($p \leq 0.05$; Fig 4B). Metformin-treated WD-fed mice also
282 presented higher plasma cholesterol levels than its metformin-related control group ($p \leq 0.05$;
283 Fig 4B).

284 WD feeding resulted in higher blood glucose levels [significant main effect of diet,
285 $F_{(1,32)} = 4.98, p \leq 0.05$; Fig 4C] and higher plasma insulin levels [significant main effect of diet,
286 $F_{(1,32)} = 8.14, p \leq 0.01$; Fig 4D] in mice. On the other hand, the two-way ANOVA indicated a
287 main effect for diet [$F_{(1,32)} = 9.42, p \leq 0.005$], for diet by metformin interaction [$F_{(1,32)} = 7.56,$
288 $p \leq 0.01$], for repetition [$F_{(4,128)} = 133.33, p \leq 0.00005$], as well as for repetition by diet
289 interaction [$F_{(4,128)} = 6.04, p \leq 0.0005$], and for repetition by diet by metformin interaction
290 [$F_{(4,128)} = 3.69, p \leq 0.01$] on blood glucose levels during the i.p. glucose tolerance test.
291 Subsequent *post-hoc* comparisons revealed higher blood glucose levels in the WD-fed mice

1
2
3
4
5
6
7
8
9
10
11
12
13
14
15
16
17
18
19
20
21
22
23
24
25
26
27
28
29
30
31
32
33
34
35
36
37
38
39
40
41
42
43
44
45
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60
61
62
63
64
65

292 than its vehicle-related control group ($p \leq 0.05$) and metformin-treated WD-fed mice at 30 and
293 60 minutes after glucose administration ($p \leq 0.05$; Fig 4E). The two-way ANOVA also
294 indicated a main effect for diet by metformin interaction [$F_{(1,32)} = 5.80, p \leq 0.05$] on the AUC
295 values of blood glucose levels in mice. Subsequent *post-hoc* comparisons revealed higher
296 AUC values in WD-fed mice than the vehicle-related control group ($p \leq 0.05$) and metformin-
297 treated WD-fed mice ($p \leq 0.05$; Fig 4F).

298 Furthermore, the two-way ANOVA indicated no significant effects on the percentage
299 of center crossings (Fig 5A), on the center time (s) (Fig 5B), and the total crossings (Fig 5C)
300 in the open field test. On the other hand, the two-way ANOVA indicated a main effect for diet
301 by metformin interaction [$F_{(1,32)} = 4.98, p \leq 0.05$] on the latency to immobility in the tail
302 suspension test. Subsequent *post-hoc* comparisons revealed lower latency to immobility of
303 vehicle-treated WD-fed mice than its vehicle-related control group ($p \leq 0.05$) and with
304 metformin-treated WD-fed mice ($p = 0.06$; Fig 5D). Moreover, the two-way ANOVA also
305 indicated a main effect for diet by metformin interaction [$F_{(1,32)} = 3.81, p \leq 0.05$] on the total
306 immobility time. Subsequent *post-hoc* comparisons revealed higher immobility time,
307 indicative of passive stress-coping behavior, of vehicle-treated WD-fed mice compared with
308 its vehicle-related control group ($p \leq 0.05$) and with metformin-treated WD-fed mice ($p \leq 0.05$;
309 Fig 5E). Finally, the two-way ANOVA also indicated a main effect for diet by metformin
310 interaction [$F_{(1,32)} = 4.37, p \leq 0.005$] on the mechanical allodynia. Subsequent *post-hoc*
311 comparisons revealed increased mechanical allodynia of vehicle-treated WD-fed mice
312 compared with its vehicle-related control group ($p \leq 0.05$) and a tendency compared with
313 metformin-treated WD-fed mice ($p = 0.057$; Fig 5F).

314 We next determined whether the behavioral effects of the WD were accompanied with
315 modifications in the phosphorylation status of the GSK-3 β in the prefrontal cortex and the
316 hippocampus. The two-way ANOVA indicated a main effect for diet by metformin interaction
317 [$F_{(1,32)} = 4.66, p \leq 0.005$] on the pGSK-3 β levels in the prefrontal cortex. Subsequent *post-hoc*

1
2
3
4
5
6
7
8
9
10
11
12
13
14
15
16
17
18
19
20
21
22
23
24
25
26
27
28
29
30
31
32
33
34
35
36
37
38
39
40
41
42
43
44
45
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60
61
62
63
64
65

318 comparisons revealed only a tendency of lower pGSK-3 β levels in vehicle-treated WD-fed
319 mice than its vehicle-related control group ($p = 0.07$). Moreover, it revealed a tendency of
320 lower pGSK-3 β levels in metformin-treated control group mice compared with its vehicle-
321 related control group ($p = 0.06$) (Fig 6A). The two-way ANOVA also indicated a main effect
322 for diet by metformin interaction [$F_{(1,32)} = 11.36, p \leq 0.005$] on the pGSK-3 β levels in the
323 hippocampus. Subsequent *post-hoc* comparisons revealed lower pGSK-3 β levels in vehicle-
324 treated WD-fed mice than its vehicle-related control group ($p \leq 0.0005$). Moreover, it revealed
325 lower pGSK-3 β levels in metformin-treated control group mice than its vehicle-related
326 control group ($p \leq 0.0005$) (Fig 6B).

327

328 3.3. Metabolic and neurobehavioral z-scores

329 Metabolic and neurobehavioral z- scores that normalize each raw data to the control
330 group's mean and integrate all parameters into a single value were also established for both
331 experimental protocols. The two-way ANOVA indicated that the STZ injection resulted in an
332 overall increase in the metabolic z-score [significant main effect of STZ, $F_{(1,21)} = 294.06,$
333 $p \leq 0.00001$; Fig 7A]. Moreover, the two-way ANOVA indicated that the STZ injection also
334 resulted in an overall increase in the neurobehavioral z-score [significant main effect of STZ,
335 $F_{(1,21)} = 5.40, p \leq 0.05$; Fig 7B]. The STZ by metformin interaction failed to reach significance
336 [$F_{(1,21)} = 2.98, p = 0.09$]. Subsequent *post-hoc* comparisons were performed and revealed a
337 higher neurobehavioral z-score of vehicle-treated STZ-treated mice compared with its
338 vehicle-related control group ($p \leq 0.05$) and with metformin-treated STZ-treated mice ($p \leq 0.05$;
339 Fig 7B).

340 Furthermore, the two-way ANOVA indicated a main effect for diet by metformin
341 interaction [$F_{(1,32)} = 9.06, p \leq 0.01$] on the metabolic z-score. Subsequent *post-hoc* comparisons
342 revealed a higher metabolic z-score of vehicle-treated WD-fed mice compared with its

1
2
3
4
5
6
7
8
9
10
11
12
13
14
15
16
17
18
19
20
21
22
23
24
25
26
27
28
29
30
31
32
33
34
35
36
37
38
39
40
41
42
43
44
45
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60
61
62
63
64
65

343 vehicle-related control group ($p \leq 0.05$) and with metformin-treated WD-fed mice ($p \leq 0.05$; Fig
344 7C). Metformin-treated WD-fed mice presented a higher metabolic z-score than its
345 metformin-related control group ($p \leq 0.05$; Fig 7C). The two-way ANOVA also indicated a
346 main effect for diet by metformin interaction [$F_{(1,32)} = 8.58, p \leq 0.01$] on the neurobehavioral z-
347 score. Subsequent *post-hoc* comparisons revealed a higher neurobehavioral z-score of vehicle-
348 treated WD-fed mice compared with its vehicle-related control group ($p \leq 0.01$) and with
349 metformin-treated WD-fed mice ($p \leq 0.005$; Fig 7D). Moreover, a significant positive
350 correlation between metabolic and neurobehavioral z- scores was unveiled after both STZ-
351 induced T1D model (Pearson $r = 0.5155; p \leq 0.01$; Figure 7C) and WD-induced obesity model
352 (Pearson $r = 0.4649; p \leq 0.005$; Figure 7F).

353 354 **4. Discussion**

355
356 The present study was designed to determine metformin's metabolic and
357 neurobehavioral effects, an oral insulin-sensitizing drug used for T2D, in STZ-induced T1D
358 and WD-induced obesity in mice. On the one hand, STZ injection-induced fasting
359 hypoinsulinemia and hyperglycemia (over 400 mg/dL), body weight loss, mechanical
360 allodynia, anxiety-like behavior, and loss of self-care behavior in control mice. On the other
361 hand, WD-fed control mice presented increased bodyweight, hypercholesterolemia, fasting
362 hyperinsulinemia and hyperglycemia, glucose intolerance, mechanical allodynia, and passive
363 stress-coping behavior. In the STZ model, metformin ameliorated neurobehavioral deficits
364 without beneficial effects on metabolic parameters. On the other hand, it improved the WD-
365 induced body weight gain, hypercholesterolemia, glucose intolerance, and neurobehavioral
366 impairments.

367 It is well accepted that T1D and T2D have a high co-morbid frequency with
368 psychiatric disorders, such as mood disorders [24-25]. Interestingly, a meta-analysis study

1
2
3
4
5
6
7
8
9
10
11
12
13
14
15
16
17
18
19
20
21
22
23
24
25
26
27
28
29
30
31
32
33
34
35
36
37
38
39
40
41
42
43
44
45
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60
61
62
63
64
65

369 conducted by Lustman et al. [26] showed that depression is associated with hyperglycemia in
370 patients with T1D or T2D. Furthermore, Philips and Perry [27] showed that, compared to
371 metabolically healthy obese counterparts, metabolically unhealthy obese subjects are at
372 increased risk of anxiety and depressive symptoms. In keeping with clinical data, STZ-
373 induced T1D and WD-induced T2D are known to alter emotionality in rodents, i.e., induce
374 anxiogenic-like and depressive-like behavior [28-30]. Interestingly, although chronic
375 metformin administration did not modify WD-induced fasting hyperinsulinemia and
376 hyperglycemia, it reversed WD-induced passive stress-coping behavior in the tail
377 suspension test. Considering the inflammatory hypothesis of depression and Mudgal et al.
378 [31] observations that metformin reduced lipopolysaccharide-induced neuroinflammation in
379 mice, one might suggest that this pharmacological agent ameliorated WD-induced depressive-
380 like behavior through an anti-inflammatory property. Interestingly, Zemdegs et al. [32]
381 showed that C57BL/6j male mice on an HFD (45% fat) for 16 weeks presented a significant
382 reduction in the grooming time in the splash test and that such phenotype was reversed by
383 metformin. Although the anti-inflammatory property of metformin could also explain such
384 beneficial effects, alternative hypotheses have been proposed. In particular, it was shown that
385 HFD-fed mice exhibited insulin resistance and elevated circulating levels of branched-chain
386 amino acids (BCAAs). Since BCAAs regulate tryptophan influx into the brain, the authors
387 also indicated that HFD-fed mice displayed impairment in dorsal raphe serotonin neurons'
388 electrical activity and attenuated hippocampal extracellular serotonin concentrations.
389 Remarkably, chronic metformin treatment reduced circulating levels of BCAAs and
390 stimulated serotonin release in the ventral hippocampus, thereby promoting antidepressant-
391 like effects in HFD-fed mice [32]. These beneficial effects echo recent findings showing that
392 acute metformin administration (50, 100, and 200 mg/kg; i.p.) induced antidepressant-like
393 effects in naïve and stressed mice [33]. The authors reported that metformin's effects were

1
2
3
4
5
6
7
8
9
10
11
12
13
14
15
16
17
18
19
20
21
22
23
24
25
26
27
28
29
30
31
32
33
34
35
36
37
38
39
40
41
42
43
44
45
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60
61
62
63
64
65

394 fast-acting and lasted for at least five days after a single injection. Mechanistically, they
395 reported that the antidepressant-like effects were dependent on AMPK [33].

396 Regarding the T1D model, our results indicated that our STZ protocol did not
397 influence the total immobility time in the tail suspension test. It is noteworthy that previous
398 studies showed that STZ-induced T1D mice presented a depressive-like phenotype in the tail
399 suspension test [28-29]. Thus, considering that our result should not rule out the possibility
400 that STZ causes depressive symptoms in mice, we strengthened our approach by assessing, in
401 a separated cohort, a distinct but complementary behavior, i.e., self-care behavior in the
402 splash test. Our results indicated that STZ-induced loss of self-care behavior in mice, whereas
403 this impairment was rescued by metformin. In this regard, Ho et al. [28] showed that the STZ-
404 induced depressive-like phenotype was normalized by chronic subcutaneous insulin
405 administration, which also reversed the STZ-induced hyperglycemia and body weight loss. On
406 the other hand, Huang et al. [29] showed that rosiglitazone, an antihyperglycemic and insulin-
407 sensitizing drug, failed to reverse the STZ-induced hyperglycemia and depressive-like
408 phenotype. Considering that herein metformin also failed to reverse STZ-induced
409 hyperglycemia, which was expected since STZ does not induce significant insulin sensitivity
410 impairment [34], one might suppose that its antidepressant-like effects were independent of
411 the action on peripheral glucose metabolism. However, although our findings reinforce the
412 therapeutic potential of metformin for type 1 or type 2 diabetes-associated depression, further
413 studies are necessary to characterize the underlying mechanisms. Remarkably, there is also
414 clinical evidence supporting an adjunctive role of metformin in managing major depressive
415 disorder in adult patients without other comorbidities, such as diabetes [35].

416 Regarding anxiety, tested in the open field test, which uses the animals' natural
417 aversion for unfamiliar open space to induce anxiety, we did not observe any effects in WD-
418 fed mice. On the other hand, we observed that STZ-induced a decrease in the percentage of
419 center crossings, indicative of anxiogenic-like behavior, although metformin failed to reverse

1
2
3
4
5
6
7
8
9
10
11
12
13
14
15
16
17
18
19
20
21
22
23
24
25
26
27
28
29
30
31
32
33
34
35
36
37
38
39
40
41
42
43
44
45
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60
61
62
63
64
65

420 such impairment. Published studies in both models have yielded mixed results. Gupta et al.
421 [36] showed that STZ-induced T1D mice elicited anxiety-like phenotypes in the elevated
422 plus-maze test. Zemdegs et al. [14] showed that C57BL6/J mice on an HFD presented an
423 anxiety-like behavior in the open field test. On the other hand, Ho et al. [28] showed that
424 STZ-induced T1D mice did not present anxiety-like phenotypes in the elevated zero maze
425 test. In the open field test, O'Flaherty et al. [37] also showed that high fructose-fed rats did not
426 show increased anxiety-like behavior. Although such differences are difficult to reconcile
427 with our findings and themselves, they may be linked to differences in species, strains, or
428 different experimental procedures (e.g., diet exposure duration). However, it is noteworthy
429 that Zemdegs et al. [32] showed that the anxiogenic-like responses induced by HFD feeding
430 in mice were partially reversed by metformin.

431 We also observed that STZ-induced T1D and WD-fed mice exhibited mechanical
432 allodynia, whereas metformin's administration produced analgesic effects in both conditions.
433 Of note, a considerable proportion of diabetic patients suffer from severe allodynia and
434 hyperalgesia [38]. In agreement with our observations, Dias et al. [39] showed that STZ-
435 injected mice presented both mechanical and cold allodynia at 6 weeks after diabetes
436 induction. Similarly, Cooper et al. [40] demonstrated that HFD-fed C57BL/6 mice also
437 developed mechanical allodynia and the authors associated this hypersensitivity with elevated
438 expression of Transient Receptor Potential Ankyrin 1 channel (TRPA1) mRNA in the dorsal
439 root ganglion. It is noteworthy that Wang et al. [41] shed light on a functional link between
440 AMPK and TRPA1 in the dorsal root ganglion neurons, in which AMPK activation results in
441 the downregulation of membrane-associated TRPA1 and its channel activity. Moreover,
442 Chowdhury et al. [42] showed that hyperglycemia alters the dorsal root ganglion neurons'
443 energetic profile, leading to the downregulation of AMPK expression, phosphorylation, and
444 activity. Remarkably, treatment with metformin, an AMPK activator, inhibited high-glucose-
445 induced TRPA1 activation in cultured dorsal root ganglion neurons [41]. Based on such

1
2
3
4
5
6
7
8
9
10
11
12
13
14
15
16
17
18
19
20
21
22
23
24
25
26
27
28
29
30
31
32
33
34
35
36
37
38
39
40
41
42
43
44
45
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60
61
62
63
64
65

446 evidence, and considering that metformin failed to reverse STZ- and WD-induced
447 hyperglycemia, one may assume that metformin-induced AMPK activation would support the
448 analgesic effects of metformin in both models as observed herein. In agreement with these
449 results, pre-clinical studies have demonstrated the antinociceptive effects of metformin in
450 rodents (for a review, see [43]), which appears to be independent of glycemic control [44].

451 Metformin's beneficial effects on peripheral metabolism have been attributed to
452 several peripheral processes, including the activation of the AMPK pathway, reduction in
453 hepatic gluconeogenesis, and stimulation of glucose uptake in skeletal muscle [19]. Moreover,
454 Patanè et al. [45] presented evidence that metformin also has a direct beneficial effect on the
455 metabolism and function of β -cells exposed to elevated lipid or glucose concentrations.
456 Nevertheless, contrary to other studies [32], metformin failed to rescue fasting
457 hyperinsulinemia and hyperglycemia in WD-fed mice, although it improved glucose
458 tolerance. Based on such observation, one might assume that metformin, an insulin-
459 sensitizing agent with actions attributed to AMPK signaling activation [46], probably acted by
460 enhancing glucose uptake in peripheral tissues, in an insulin-independent manner, in the face
461 of a glucose challenge. However, further studies are necessary to analyze the blood insulin
462 levels during the glucose tolerance test and perform an insulin tolerance test. We also showed
463 that metformin attenuated WD-induced body weight gain and hypercholesterolemia. In this
464 regard, Zang et al. [20] showed that AMPK negatively regulates acetyl-CoA carboxylase
465 activity and hepatic lipid content.

466 Based on the z - score method, we normalized each parameter from the average of the
467 corresponding values observed in the control group (vehicle-treated or SD-fed) and integrated
468 them into a single score. Therefore, we obtained metabolic and neurobehavioral z - scores,
469 which were significantly increased in STZ-treated mice and WD-fed mice, compared with
470 their respective control groups. It should be noted that we did not include the splash test data
471 in the calculation of this score, as this behavioral experiment was not performed in the same

1
2
3
4
5
6
7
8
9
10
11
12
13
14
15
16
17
18
19
20
21
22
23
24
25
26
27
28
29
30
31
32
33
34
35
36
37
38
39
40
41
42
43
44
45
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60
61
62
63
64
65

472 cohort of animals, nor was it performed in the WD-induced obesity mice. In keeping with our
473 observations, STZ-induced T1D mice and WD-induced obesity mice displayed
474 neurobehavioral impairments, whereas chronic treatment with metformin reversed these
475 impairments. Considering the metabolic disturbances, metformin could only reverse the WD-
476 induced metabolic impairments, whereas it did not influence the STZ-induced metabolic
477 impairments. Based on such observation, the beneficial effects of metformin in STZ-induced
478 neurobehavioral impairments were not mediated by improving peripheral insulin signaling. In
479 this regard, the use of metformin in T1D is less frequent and less studied, and there is limited
480 evidence that metformin can decrease the need for insulin use [47].

481 To gain insight into the mechanisms underlying STZ- and WD-induced
482 neurobehavioral anomalies and the beneficial effects of metformin, we focused our attention
483 on GSK3 β , a protein kinase that would play a role in neuropsychiatric disorders and related
484 treatments [48]. In the present study, WD-fed mice presented a significant reduction in the
485 phosphorylated levels of GSK3 β in the hippocampus and prefrontal cortex. In most tissues,
486 the GSK3 β is constitutively active and mainly regulated by inhibitory phosphorylation on Ser
487 9 [49]. Llorens-Marín et al. [50] argue that a status where GSK3 β remains abnormally active
488 due to a failure to repress its activity adequately, thereby contributing to several pathologies,
489 including diabetes and mood disorders. Following our observations, Yoon et al. [51] found a
490 reduction of the phosphorylated form of GSK3 β in the brain cortex of HFD-fed C57Bl/6
491 mice. Moreover, Leng et al. [52] showed that high-glucose-induced insulin resistance in cells
492 is associated with the activation of GSK3 β and subsequent phosphorylation of insulin receptor
493 substrate (IRS1), triggering the ubiquitination and degradation of IRS1.

494 The antidiabetic agent metformin reportedly activates AMPK. Of note, Horike et al.
495 [53] pointed out a critical role of GSK3 β phosphorylation in the AMPK-induced suppression
496 of hepatic gluconeogenesis. Based on such observations, it was expected that metformin
497 treatment would increase the levels of pGSK3 β (as antidepressants do), contrary to what we

1
2
3
4
5
6
7
8
9
10
11
12
13
14
15
16
17
18
19
20
21
22
23
24
25
26
27
28
29
30
31
32
33
34
35
36
37
38
39
40
41
42
43
44
45
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60
61
62
63
64
65

498 observed. In this line of evidence, Farr et al. [54] showed that SAMP8 mice, a sporadic
499 Alzheimer's disease model that received 200 mg/kg of metformin daily for eight weeks, had
500 significantly higher brain levels of pGSK3 β ser9/total than control mice. In their study,
501 metformin improved the mice's memory performance in several behavioral tests. On the other
502 hand, Ramamurthy et al. [55] presented data suggesting that AMPK suppresses the Akt-
503 GSK3 β pathway during dendritic growth. These data suggest that AMPK signaling regulates
504 dendritic structure by inhibiting multiple positive mediators of dendritic growth [55].
505 Therefore, further studies are necessary better to understand the metformin's action on brain
506 GSK3 β activity.

507

508 **5. Conclusions**

509

510 Overall, our results reinforce the observation that a conventional diabetes treatment,
511 metformin, could be repurposed to improve neurobehavioral symptoms and diabetes
512 concurrently. Further studies are necessary to evaluate if central AMPK activation is a key
513 mechanism underlying the beneficial effects of metformin.

514

515 **Role of the funding source**

516 This research was supported by grants from the Brazilian funding agencies: CNPq (Universal
517 424799/2018-9), CAPES and FAPESC. These funding agencies had no further role in the
518 study design, in the collection, analysis and interpretation of data; in the writing of the report;
519 and in the decision to submit the paper for publication.

520

521 **Data Availability Statement**

522 All data generated or used during the study are available from the corresponding author by
523 request.

524

1
2 **525 Contributors**
3

4
5 526 Conception and design of the project: ED, ELGM. Methodology: ED, LASB, WMB, SPB,
6
7 527 JNK, SIK. Analysis and interpretation of research data: ED, SB, BPG, ELGM. Writing –
8
9 528 original draft preparation: BPG, ELGM. Writing – review and editing: ED, GJS. Project
10
11 529 administration: ELGM. All authors approved this manuscript.
12
13

14
15 530

16
17 **531 Acknowledgements**
18

19 532 This paper is dedicated to the memory of Professor Adair Roberto Soares dos Santos, who
20
21 533 passed away on July 06, 2021, in Florianopolis, Santa Catarina, Brazil. Dr. Santos was a
22
23 534 renowned Professor of Physiology and Pharmacology, a leading authority with an
24
25 535 international reputation in the pain research community. A great friend and mentor to many,
26
27 536 including the corresponding author of this manuscript, who is immensely grateful for the
28
29 537 friendship, learning, and inspiration during the entire period of professional interaction.
30
31
32

33
34 538

35
36 **539 References**
37

38
39 540

- 40 541 [1]. American Diabetes Association, 2015. Standards of medical care in diabetes-2015
41 542 abridged for primary care providers. *Clinical diabetes: a publication of the American*
42 543 *Diabetes Association*. 33(2), 97–111.
43 544 [2]. Saeedi, P., Petersohn, I., Salpea, P., Malanda, B., Karuranga, S., Unwin, N., Colagiuri,
44 545 S., Guariguata, L., Motala, A. A., Ogurtsova, K., Shaw, J. E., Bright, D., Williams, R.,
45 546 Committee, I. D. A., 2019. Global and regional diabetes prevalence estimates for 2019
46 547 and projections for 2030 and 2045: Results from the International Diabetes Federation
47 548 *Diabetes Atlas, 9*. *Diabetes Res Clin Pract*. 157, 107843.
48 549 [3]. International Diabetes Federation, 2019. *IDF Diabetes Atlas, 9th edn*. Brussels,
49 550 Belgium.
50 551 [4]. Atkinson, M. A., Eisenbarth, G. S., 2001. Type 1 diabetes: new perspectives on
51 552 disease pathogenesis and treatment. *Lancet*. 358(9277), 221-229.
52 553 [5]. Zheng, Y., Ley, S. H., Hu, F. B., 2018. Global aetiology and epidemiology of type 2
53 554 diabetes mellitus and its complications. *Nat Rev Endocrinol*. 14(2), 88-98.
54 555 [6]. Monteiro, C. A., Moubarac, J. C., Cannon, G., Ng, S. W., Popkin, B., 2013. Ultra-
55 556 processed products are becoming dominant in the global food system. *Obes Rev*. 14
56 557 Suppl 2, 21-28.
57 558 [7]. Pruzin, J. J., Nelson, P. T., Abner, E. L., Arvanitakis, Z., 2018. Review: Relationship

- 559 of type 2 diabetes to human brain pathology. *Neuropathol Appl Neurobiol.* 44(4), 347-
1 560 362.
- 2 561 [8]. Wrihten, S. A., Piroli, G. G., Grillo, C. A., Reagan, L. P., 2009. A look inside the
3 562 diabetic brain: Contributors to diabetes-induced brain aging. *Biochim Biophys Acta.*
4 563 1792(5), 444-453.
- 5 564 [9]. Ducat, L., Philipson, L. H., Anderson, B. J., 2014. The mental health comorbidities of
6 565 diabetes. *JAMA.* 312(7), 691-692.
- 7 566 [10]. Feldman, E. L., Callaghan, B. C., Pop-Busui, R., Zochodne, D. W., Wright, D. E.,
8 567 Bennett, D. L., Bril, V., Russell, J. W., Viswanathan, V., 2019. Diabetic neuropathy.
9 568 *Nat Rev Dis Primers.* 5(1), 41.
- 10 569 [11]. Schreiber, A. K., Nones, C. F., Reis, R. C., Chichorro, J. G., Cunha, J. M., 2015.
11 570 Diabetic neuropathic pain: Physiopathology and treatment. *World J Diabetes.* 6(3),
12 571 432-444.
- 13 572 [12]. De Souza, L., Barros, W. M., De Souza, R. M., Delanogare, E., Machado, A. E.,
14 573 Braga, S. P., Rosa, G. K., Nardi, G. M., Rafacho, A., Speretta, G. F. F., Moreira, E. L.
15 574 G., 2021. Impact of different fructose concentrations on metabolic and behavioral
16 575 parameters of male and female mice. *Physiol Behav.* 228, 113187.
- 17 576 [13]. Hassan, A. M., Mancano, G., Kashofer, K., Fröhlich, E. E., Matak, A., Mayerhofer,
18 577 R., Reichmann, F., Olivares, M., Neyrinck, A. M., Delzenne, N. M., Claus, S. P.,
19 578 Holzer, P., 2019. High-fat diet induces depression-like behaviour in mice associated
20 579 with changes in microbiome, neuropeptide Y, and brain metabolome. *Nutr Neurosci.*
21 580 22(12), 877-893.
- 22 581 [14]. Zemdegs, J., Quesseveur, G., Jarriault, D., Pénicaud, L., Fioramonti, X., Guiard, B. P.,
23 582 2016. High-fat diet-induced metabolic disorders impairs 5-HT function and anxiety-
24 583 like behavior in mice. *Br J Pharmacol.* 173(13), 2095-2110.
- 25 584 [15]. Yuan, P., Zhang, J., Li, L., Song, Z., 2019. Fluoxetine Attenuated Anxiety-Like
26 585 Behaviors in Streptozotocin-Induced Diabetic Mice by Mitigating the Inflammation.
27 586 *Mediators Inflamm.* 2019, 4315038.
- 28 587 [16]. O'Brien, P. D., Hur, J., Hayes, J. M., Backus, C., Sakowski, S. A., Feldman, E. L.,
29 588 2015. BTBR ob/ob mice as a novel diabetic neuropathy model: Neurological
30 589 characterization and gene expression analyses. *Neurobiol Dis.* 73, 348-355.
- 31 590 [17]. Tian, D., Tian, M., Zhang, L., Zhao, P., Cui, Y., Li, J., 2018. High fat diet sensitizes
32 591 fibromyalgia-like pain behaviors in mice via tumor necrosis factor alpha. *PLoS One.*
33 592 13(2), e0190861.
- 34 593 [18]. Rasgon, N. L., Kenna, H. A., 2005. Insulin resistance in depressive disorders and
35 594 Alzheimer's disease: revisiting the missing link hypothesis. *Neurobiol Aging.* 26 Suppl
36 595 1, 103-107.
- 37 596 [19]. Rena, G., Hardie, D. G., Pearson, E. R., 2017. The mechanisms of action of
38 597 metformin. *Diabetologia.* 60(9), 1577-1585.
- 39 598 [20]. Zang, M., Zuccollo, A., Hou, X., Nagata, D., Walsh, K., Herscovitz, H., Brecher, P.,
40 599 Ruderman, N. B., Cohen, R. A., 2004. AMP-activated protein kinase is required for
41 600 the lipid-lowering effect of metformin in insulin-resistant human HepG2 cells. *J Biol*
42 601 *Chem.* 279(46), 47898-47905.
- 43 602 [21]. Steru, L., Chermat, R., Thierry, B., Simon, P., 1985. The tail suspension test: a new
44 603 method for screening antidepressants in mice. *Psychopharmacology (Berl).* 85(3), 367-
45 604 370.
- 46 605 [22]. Isingrini, E., Camus, V., Le Guisquet, A. M., Pingaud, M., Devers, S., Belzung, C.,
47 606 2010. Association between repeated unpredictable chronic mild stress (UCMS)
48 607 procedures with a high fat diet: a model of fluoxetine resistance in mice. *PLoS One.*
49 608 5(4), e10404.
- 50 609 [23]. Chaplan, S. R., Bach, F. W., Pogrel, J. W., Chung, J. M., Yaksh, T. L., 1994.

- 610 Quantitative assessment of tactile allodynia in the rat paw. *J Neurosci Methods*. 53(1),
611 55-63.
- 1 611
- 2 612 [24]. Anderson, R. J., Freedland, K. E., Clouse, R. E., Lustman, P. J., 2001. The prevalence
3 613 of comorbid depression in adults with diabetes: a meta-analysis. *Diabetes Care*. 24(6),
4 614 1069-1078.
- 5 615 [25]. Khaledi, M., Haghghatdoost, F., Feizi, A., Aminorroaya, A., 2019. The prevalence of
6 616 comorbid depression in patients with type 2 diabetes: an updated systematic review
7 617 and meta-analysis on huge number of observational studies. *Acta Diabetol*. 56(6), 631-
8 618 650.
- 9 618
- 10 619 [26]. Lustman, P. J., Anderson, R. J., Freedland, K. E., de Groot, M., Carney, R. M.,
11 620 Clouse, R. E., 2000. Depression and poor glycemic control: a meta-analytic review of
12 621 the literature. *Diabetes Care*. 23(7), 934-942.
- 13 622 [27]. Phillips, C. M., Perry, I. J., 2015. Depressive symptoms, anxiety and well-being
14 623 among metabolic health obese subtypes. *Psychoneuroendocrinology*. 62, 47-53.
- 15 624 [28]. Ho, N., Balu, D. T., Hilario, M. R., Blendy, J. A., Lucki, I., 2012. Depressive
16 625 phenotypes evoked by experimental diabetes are reversed by insulin. *Physiol Behav*.
17 626 105(3), 702-708.
- 18 627 [29]. Huang, C. W., Hong, T. W., Wang, Y. J., Chen, K. C., Pei, J. C., Chuang, T. Y., Lai,
19 628 W. S., Tsai, S. H., Chu, R., Chen, W. C., Sheen, L. Y., Takahashi, S., Ding, S. T.,
20 629 Shen, T. L., 2016. *Ophiocordyceps formosana* improves hyperglycemia and
21 630 depression-like behavior in an STZ-induced diabetic mouse model. *BMC Complement*
22 631 *Altern Med*. 16(1), 310.
- 23 632 [30]. Vagena, E., Ryy, J. K., Baeza-Raja, B., Walsh, N. M., Syme, C., Day, J. P., Houslay,
24 633 M. D., Baillie, G. S., 2019. A high-fat diet promotes depression-like behavior in mice
25 634 by suppressing hypothalamic PKA signaling. *Transl Psychiatry*. 9(1), 141.
- 26 635 [31]. Mudgal, J., Nampoothiri, M., Basu Mallik, S., Kinra, M., Hall, S., Grant, G.,
27 636 Anoopkumar-Dukie, S., Rao, C. M., Arora, D., 2019. Possible involvement of
28 637 metformin in downregulation of neuroinflammation and associated behavioural
29 638 changes in mice. *Inflammopharmacology*. 27(5), 941-948.
- 30 639 [32]. Zemdegs, J., Martin, H., Pintana, H., Bullich, S., Manta, S., Marqués, M. A., Moro, C.,
31 640 Layé, S., Ducrocq, F., Chattapakorn, N., Chattapakorn, S. C., Rampon, C., Pénicaud,
32 641 L., Fioramonti, X., Guiard, B. P., 2019. Metformin Promotes Anxiolytic and
33 642 Antidepressant-Like Responses in Insulin-Resistant Mice by Decreasing Circulating
34 643 Branched-Chain Amino Acids. *J Neurosci*, 39(30), 5935-5948.
- 35 644 [33]. Ai, H., Fang, W., Hu, H., Hu, X., Lu, W., 2020. Antidiabetic Drug Metformin
36 645 Ameliorates Depressive-Like Behavior in Mice with Chronic Restraint Stress via
37 646 Activation of AMP-Activated Protein Kinase. *Aging Dis*. 11, 31-43.
- 38 647 [34]. Bagaméry, F., Varga, K., Kecsmár, K., Vincze, I., Szökő, É., Tábi, T., 2020. Lack of
39 648 insulin resistance in response to streptozotocin treatment in neuronal SH-SY5Y cell
40 649 line. *J Neural Transm (Vienna)*. 127(1), 71-80.
- 41 650 [35]. Abdallah, M. S., Mosalam, E. M., Zidan, A. A., Elattar, K. S., Zaki, S. A., Ramadan,
42 651 A. N., Ebeid, A. M., 2000. The Antidiabetic Metformin as an Adjunct to
43 652 Antidepressants in Patients with Major Depressive Disorder: A Proof-of-Concept,
44 653 Randomized, Double-Blind, Placebo-Controlled Trial. *Neurotherapeutics*. 17, 1897-
45 654 1906.
- 46 655 [36]. Gupta, D., Radhakrishnan, M., Kurhe, Y., 2014. Insulin reverses anxiety-like behavior
47 656 evoked by streptozotocin-induced diabetes in mice. *Metab Brain Dis*. 29(3), 737-746.
- 48 657 [37]. O'Flaherty, B., Neigh, G. N., Rainnie, D., 2019. High-fructose diet initiated during
49 658 adolescence does not affect basolateral amygdala excitability or affective-like behavior
50 659 in Sprague Dawley rats. *Behav Brain Res*. 365, 17-25.
- 51 660 [38]. Didangelos, T., Doupis, J., Veves, A., 2014. Painful diabetic neuropathy: clinical

661 aspects. *Handb Clin Neurol.* 126, 53-61.

1 662 [39]. Dias, F. C., Alves, V. S., Matias, D. O., Figueiredo, C. P., Miranda, A. L. P., Passos,
2 663 G. F., Costa, R., 2019. The selective TRPV4 channel antagonist HC-067047 attenuates
3 664 mechanical allodynia in diabetic mice. *Eur J Pharmacol.* 856, 172408.

4 665 [40]. Cooper, M. A., Ryals, J. M., Wu, P. Y., Wright, K. D., Walter, K. R., Wright, D. E.,
5 666 2017. Modulation of diet-induced mechanical allodynia by metabolic parameters and
6 667 inflammation. *J Peripher Nerv Syst.* 22(1), 39-46.

7 668 [41]. Wang, S., Kobayashi, K., Kogure, Y., Yamanaka, H., Yamamoto, S., Yagi, H.,
8 669 Noguchi, K., Dai, Y., 2018. Negative Regulation of TRPA1 by AMPK in Primary
9 670 Sensory Neurons as a Potential Mechanism of Painful Diabetic Neuropathy. *Diabetes.*
10 671 67(1), 98-109.

11 672 [42]. Chowdhury, S. K., Smith, D. R., Fernyhough, P., 2013. The role of aberrant
12 673 mitochondrial bioenergetics in diabetic neuropathy. *Neurobiol Dis.* 51, 56-65.

13 674 [43]. Baeza-Flores, G. D. C., Guzmán-Priego, C. G., Parra-Flores, L. I., Murbartián, J.,
14 675 Torres-López, J. E., Granados-Soto, V., 2000. Metformin: A Prospective Alternative
15 676 for the Treatment of Chronic Pain. *Front Pharmacol.* 11, 558474.

16 677 [44]. Price, T. J., Das, V., Dussor, G., 2016. Adenosine Monophosphate-activated Protein
17 678 Kinase (AMPK) Activators For the Prevention, Treatment and Potential Reversal of
18 679 Pathological Pain. *Curr Drug Targets.* 17(8), 908-920.

19 680 [45]. Patanè, G., Piro, S., Rabuazzo, A. M., Anello, M., Vigneri, R., Purrello, F., 2000.
20 681 Metformin restores insulin secretion altered by chronic exposure to free fatty acids or
21 682 high glucose: a direct metformin effect on pancreatic beta-cells. *Diabetes.* 49(5), 735-
22 683 740.

23 684 [46]. Zhou, G., Myers, R., Li, Y., Chen, Y., Shen, X., Fenyk-Melody, J., Wu, M., Ventre, J.,
24 685 Doebber, T., Fujii, N., Musi, N., Hirshman, M. F., Goodyear, L. J., Moller, D. E.,
25 686 2001. Role of AMP-activated protein kinase in mechanism of metformin action. *J Clin*
26 687 *Invest.* 108(8), 1167-1174.

27 688 [47]. Livingstone, R., Boyle, J. G., Petrie, J. R., Team, R. S., 2017. A new perspective on
28 689 metformin therapy in type 1 diabetes. *Diabetologia.* 60(9), 1594-1600.

29 690 [48]. Li, X., Jope, R. S., 2010. Is glycogen synthase kinase-3 a central modulator in mood
30 691 regulation?. *Neuropsychopharmacology.* 35(11), 2143-2154.

31 692 [49]. ter Haar, E., Coll, J. T., Austen, D. A., Hsiao, H. M., Swenson, L., Jain, J., 2001.
32 693 Structure of GSK3beta reveals a primed phosphorylation mechanism. *Nat Struct Biol.*
33 694 8(7), 593-596.

34 695 [50]. Llorens-Martín, M., Jurado, J., Hernández, F., Avila, J., 2014. GSK-3β, a pivotal
35 696 kinase in Alzheimer disease. *Front Mol Neurosci.* 7, 46.

36 697 [51]. Yoon, G., Cho, K. A., Song, J., Kim, Y. K., 2019. Transcriptomic Analysis of High
37 698 Fat Diet Fed Mouse Brain Cortex. *Front Genet.* 10, 83.

38 699 [52]. Leng, S., Zhang, W., Zheng, Y., Liberman, Z., Rhodes, C. J., Eldar-Finkelman, H.,
39 700 Sun, X. J., 2010. Glycogen synthase kinase 3 beta mediates high glucose-induced
40 701 ubiquitination and proteasome degradation of insulin receptor substrate 1. *J*
41 702 *Endocrinol.* 206(2), 171-181.

42 703 [53]. Horike, N., Sakoda, H., Kushiya, A., Ono, H., Fujishiro, M., Kamata, H.,
43 704 Nishiyama, K., Uchijima, Y., Kurihara, Y., Kurihara, H., Asano, T., 2008. AMP-
44 705 activated protein kinase activation increases phosphorylation of glycogen synthase
45 706 kinase 3beta and thereby reduces cAMP-responsive element transcriptional activity
46 707 and phosphoenolpyruvate carboxykinase C gene expression in the liver. *J Biol Chem.*
47 708 283(49), 33902-339010.

48 709 [54]. Farr, S. A., Roesler, E., Niehoff, M. L., Roby, D. A., McKee, A., Morley, J. E., 2019.
49 710 Metformin Improves Learning and Memory in the SAMP8 Mouse Model of
50 711 Alzheimer's Disease. *J Alzheimers Dis.* 68(4), 1699-1710.

1 [55]. Ramamurthy, S., Chang, E., Cao, Y., Zhu, J., Ronnett, G. V., 2014. AMPK activation
2 regulates neuronal structure in developing hippocampal neurons. *Neuroscience*. 259,
3 13-24.
4

5 6 **Figure Legends**

7
8 717

9
10 **Figure 1.** Experimental design.
11

12
13 719

14
15 **Figure 2.** Effects of metformin treatment on STZ-induced metabolic alterations in male Swiss
16 mice. (A) Body mass variation (g), (B) Total plasma cholesterol levels, (C) Basal fasting
17 glucose levels, and (D) Fasting plasma insulin levels. Data are expressed as mean + SEM ($n =$
18 6 – 7 animals per group). & denotes the main effect of STZ by two-way ANOVA ($p \leq 0.05$).
19
20
21
22
23
24

25 724

26
27 **Figure 3.** Effects of metformin treatment on STZ-induced neurobehavioral alterations in the
28 open field test (A-C), in the von Frey test (D), in the tail suspension test (E-F), and in the
29 splash test (G-H) in male Swiss mice. (A) Center crossings (%), (B) Center time (%), (C)
30 Total crossings, (D) 50% mechanical threshold (g), (E) Latency to immobility (s), (F)
31 Immobility time (s), (G) Latency to grooming (s), (H) Grooming time (s). Data are expressed
32 as mean + SEM ($n = 6 - 7$ animals per group). X indicates significant STZ-by-metformin
33 interaction by two-way ANOVA ($p \leq 0.05$); “*” $p \leq 0.05$ vs. vehicle-related control group, “#”
34 $p \leq 0.05$ vs. vehicle-related STZ group (Newman–Keuls post hoc test).
35
36
37
38
39
40
41
42
43
44
45
46
47

48 733

49
50 **Figure 4.** Effects of metformin treatment on WD-induced metabolic alterations in male Swiss
51 mice. (A) Body mass variation (g), (B) Plasma cholesterol levels, (C) Basal fasting glucose
52 levels, (D) Fasting plasma insulin levels, (E) Glucose tolerance test, and (F) Area under the
53 curve of glucose tolerance test. Data are expressed as mean + SEM ($n = 9$ animals per group).
54
55
56
57
58
59
60 & denotes the main effect of HFFD by two-way ANOVA ($p \leq 0.05$). X indicates significant
61
62
63
64
65

1
2
3
4
5
6
7
8
9
10
11
12
13
14
15
16
17
18
19
20
21
22
23
24
25
26
27
28
29
30
31
32
33
34
35
36
37
38
39
40
41
42
43
44
45
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60
61
62
63
64
65

739 HFFD-by-metformin interaction by two-way ANOVA (or significant repetition by HFFD by
740 metformin interaction) ($p \leq 0.05$); “*” $p \leq 0.05$ vs. vehicle-related control group, “#” $p \leq 0.05$ vs.
741 vehicle-related HFFD group, “£” $p \leq 0.05$ vs. metformin-related control group (Newman–
742 Keuls post hoc test).

743

744 **Figure 5.** Effects of metformin treatment on WD-induced neurobehavioral alterations in the
745 open field test (A-C), in the tail suspension test (D-E), and in the von Frey test (F). (A) Center
746 crossings (%), (B) Center time (%), (C) Total crossings, (D) Latency to immobility (s), (E)
747 Immobility time (s), (F) 50% Mechanical threshold (g). Data are expressed as mean + SEM
748 ($n = 9$ animals per group). X indicates significant HFFD-by-metformin interaction by two-
749 way ANOVA ($p \leq 0.05$); “*” $p \leq 0.05$ vs. vehicle-related control group, “#” $p \leq 0.05$ vs. vehicle-
750 related HFFD group (Newman–Keuls post hoc test).

751

752 **Figure 6.** Effects of metformin treatment on WD-induced brain pGSK3- β levels alterations in
753 male Swiss mice. (A) pGSK3- β levels (% of control) in the prefrontal cortex, (B) pGSK3- β
754 levels (% of control) in the hippocampus. Data are expressed as mean + SEM ($n = 9$ animals
755 per group). X indicates significant HFFD-by-metformin interaction by two-way ANOVA
756 ($p \leq 0.05$); “*” $p \leq 0.05$ vs. vehicle-related control group (Newman–Keuls post hoc test).

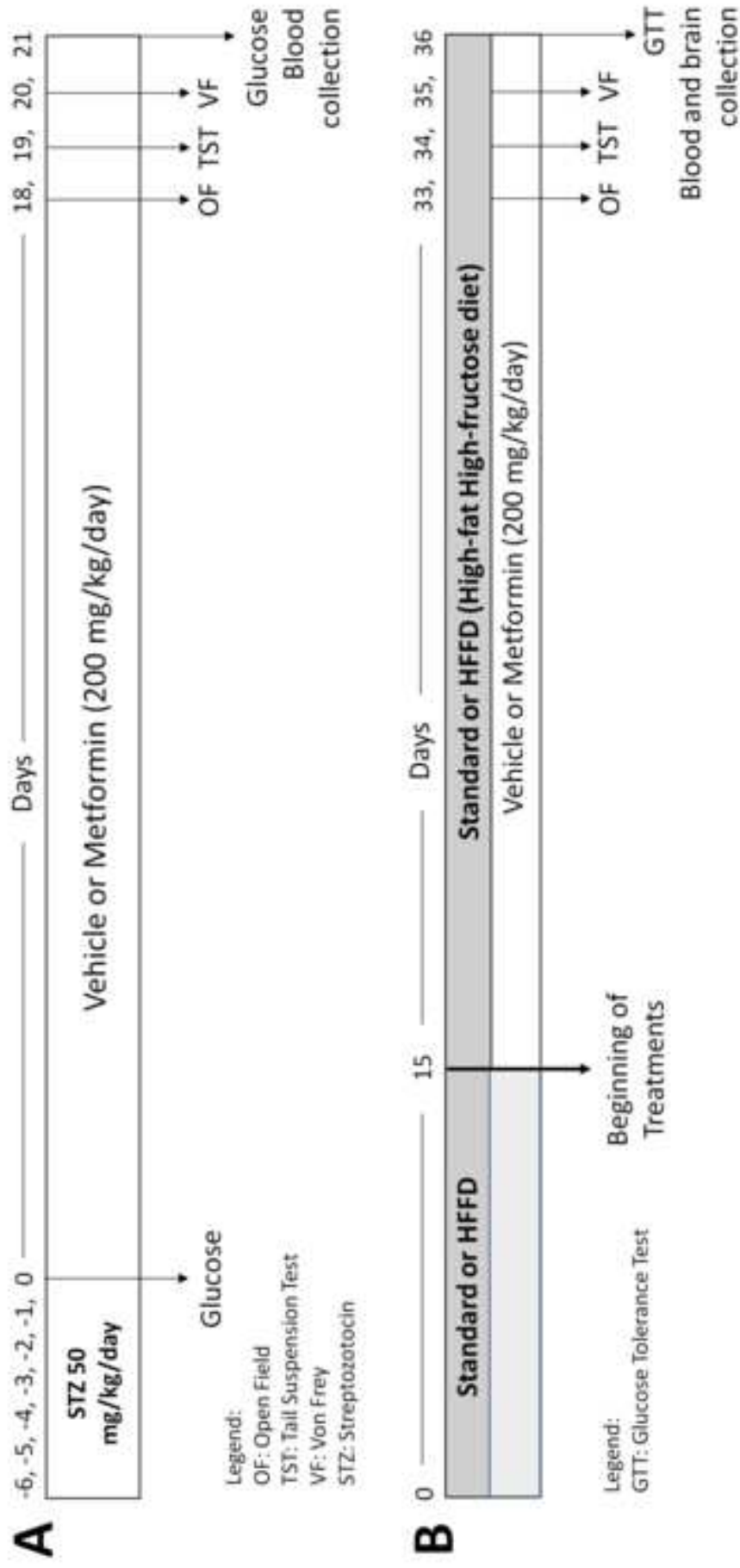
757

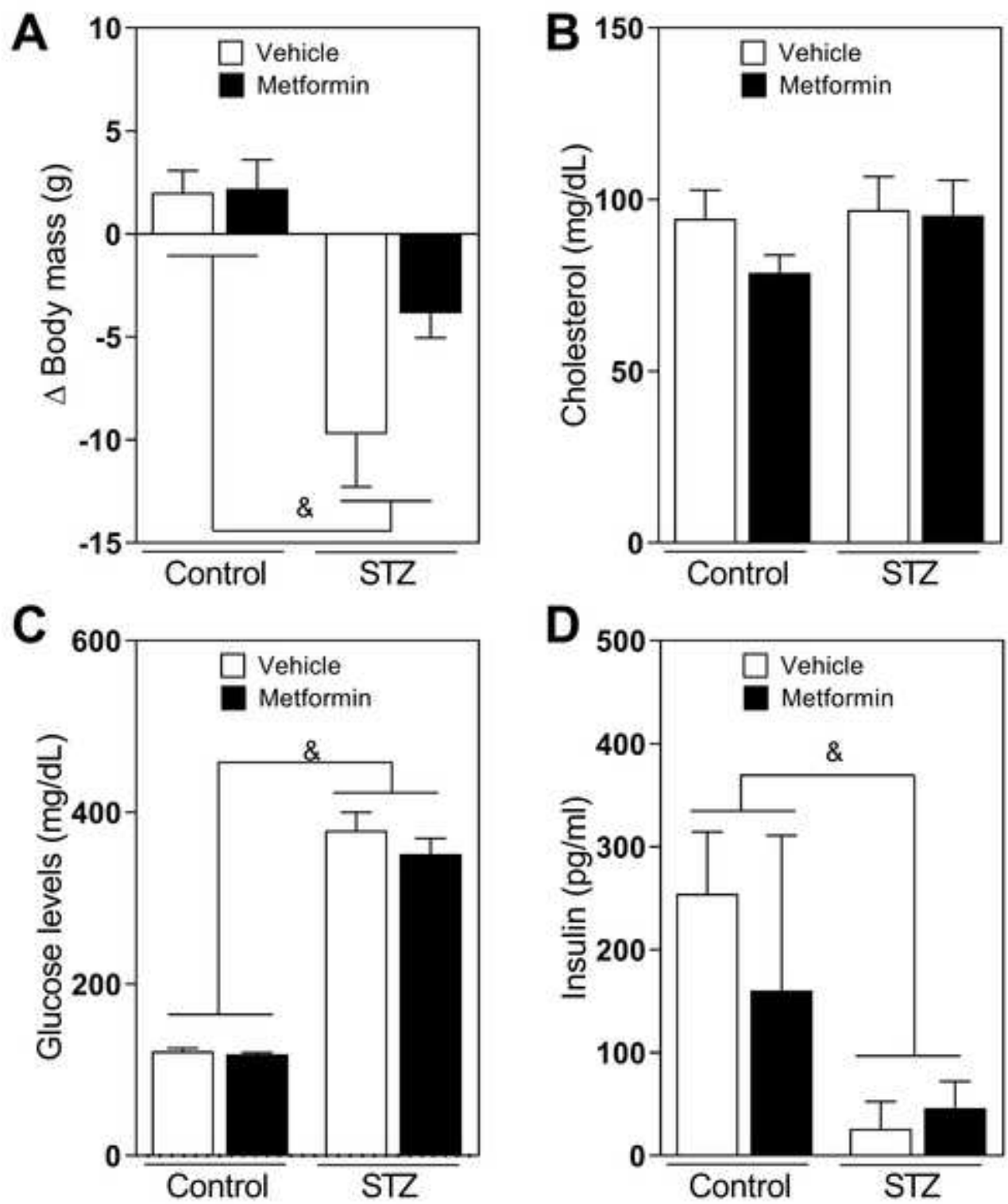
758 **Figure 7.** Metabolic and neurobehavioral z-scores of STZ-injected mice (A-B) and WD-fed
759 mice (D-E). Correlation between metabolic and emotionality z-scores in STZ-injected mice
760 (C) and WD-fed mice (F). Data are expressed as mean + SEM ($n = 6$ to 9 animals per group).
761 & denotes the main effect of HFFD by two-way ANOVA ($p \leq 0.05$). X indicates significant
762 HFFD-by-metformin interaction by two-way ANOVA (or significant repetition by HFFD by
763 metformin interaction) ($p \leq 0.05$); “*” $p \leq 0.05$ vs. vehicle-related control group, “#” $p \leq 0.05$ vs.

1
2
3
4
5
6
7
8
9
10
11
12
13
14
15
16
17
18
19
20
21
22
23
24
25
26
27
28
29
30
31
32
33
34
35
36
37
38
39
40
41
42
43
44
45
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60
61
62
63
64
65

764 vehicle-related HFFD group, “£” $p \leq 0.05$ vs. metformin-related control group (Newman–
765 Keuls post hoc test). (C, F) Black dots correspond to vehicle/control mice and the grey dots to
766 the STZ/control or HFHF/control mice.

Experimental design





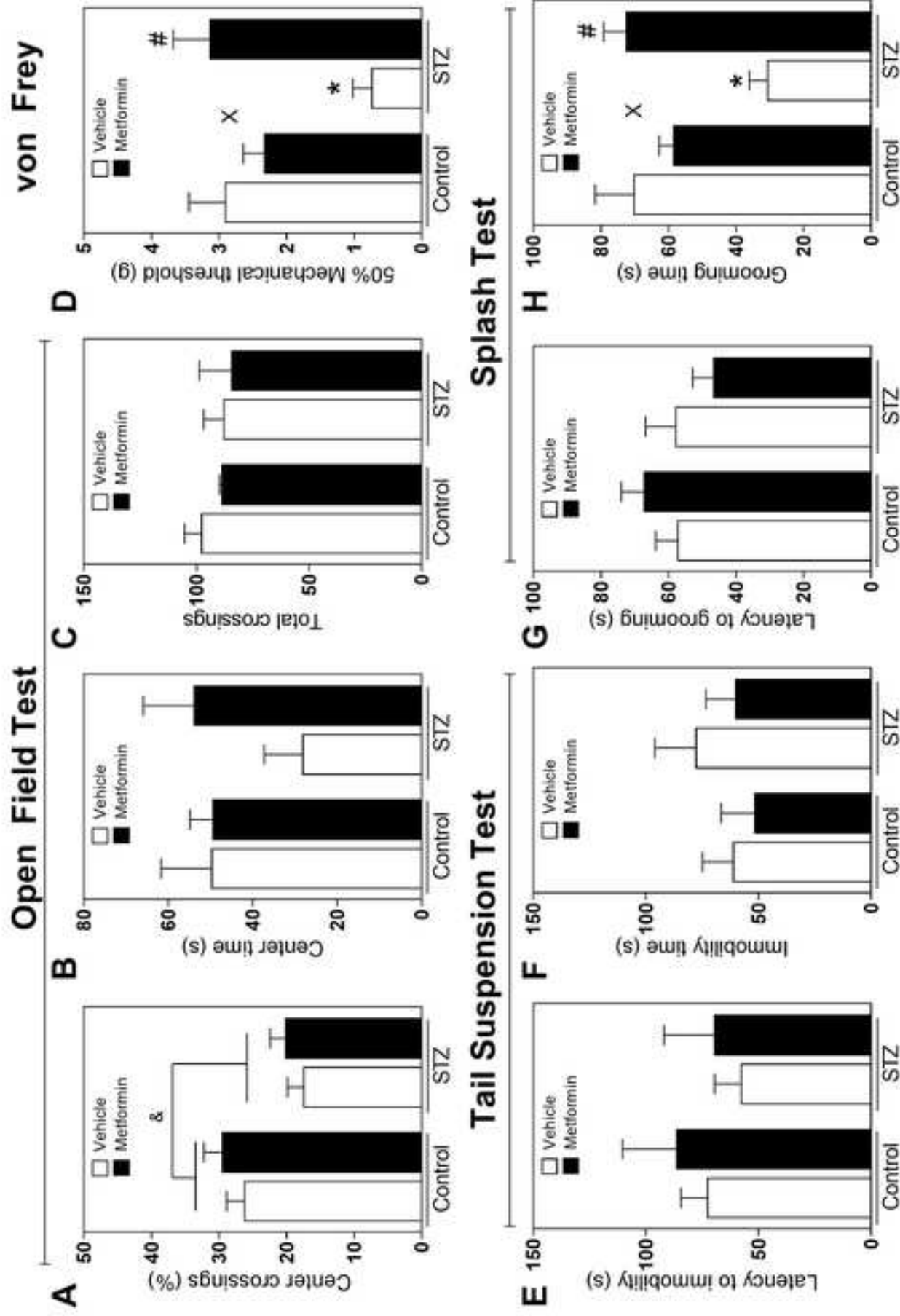
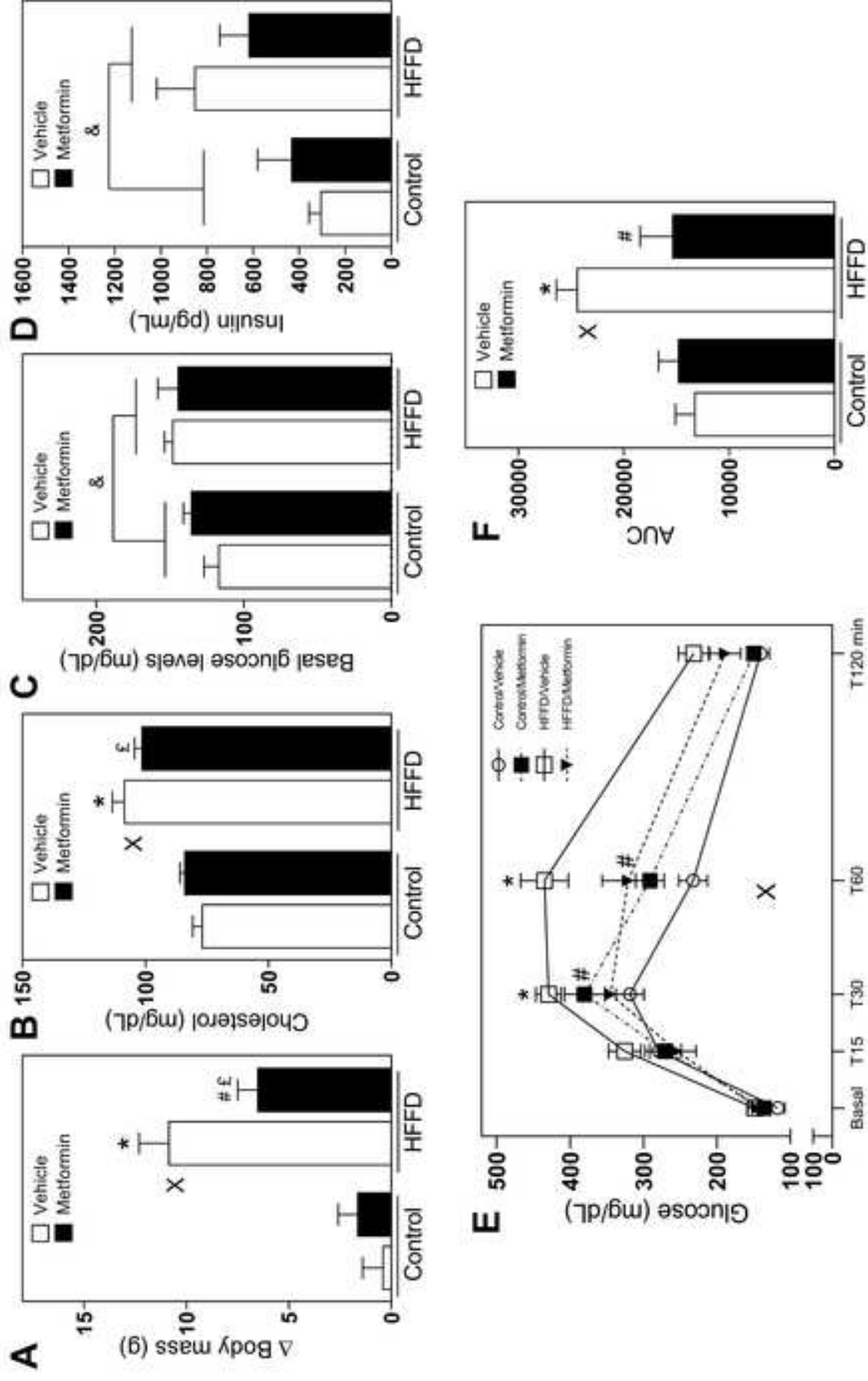
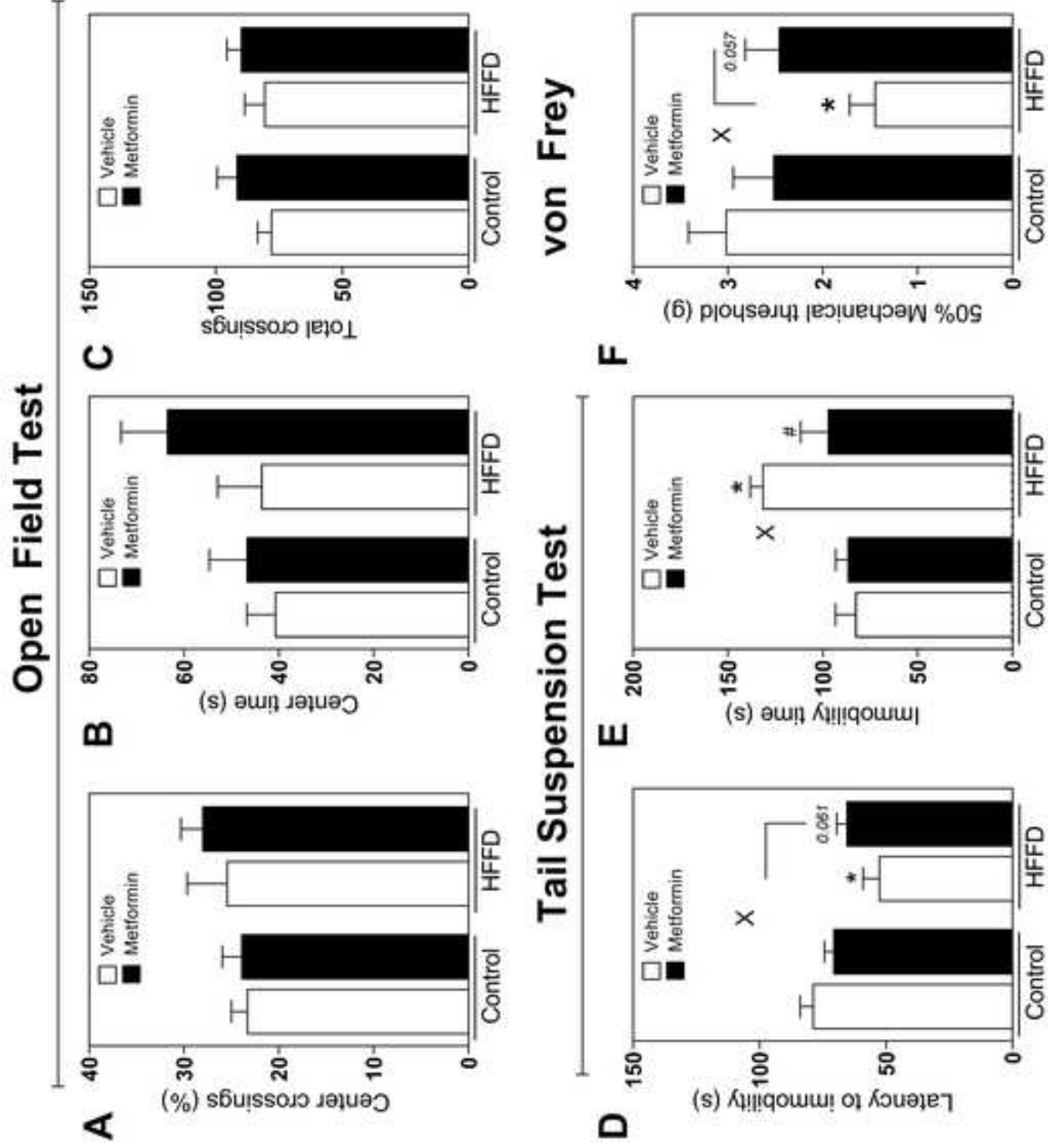
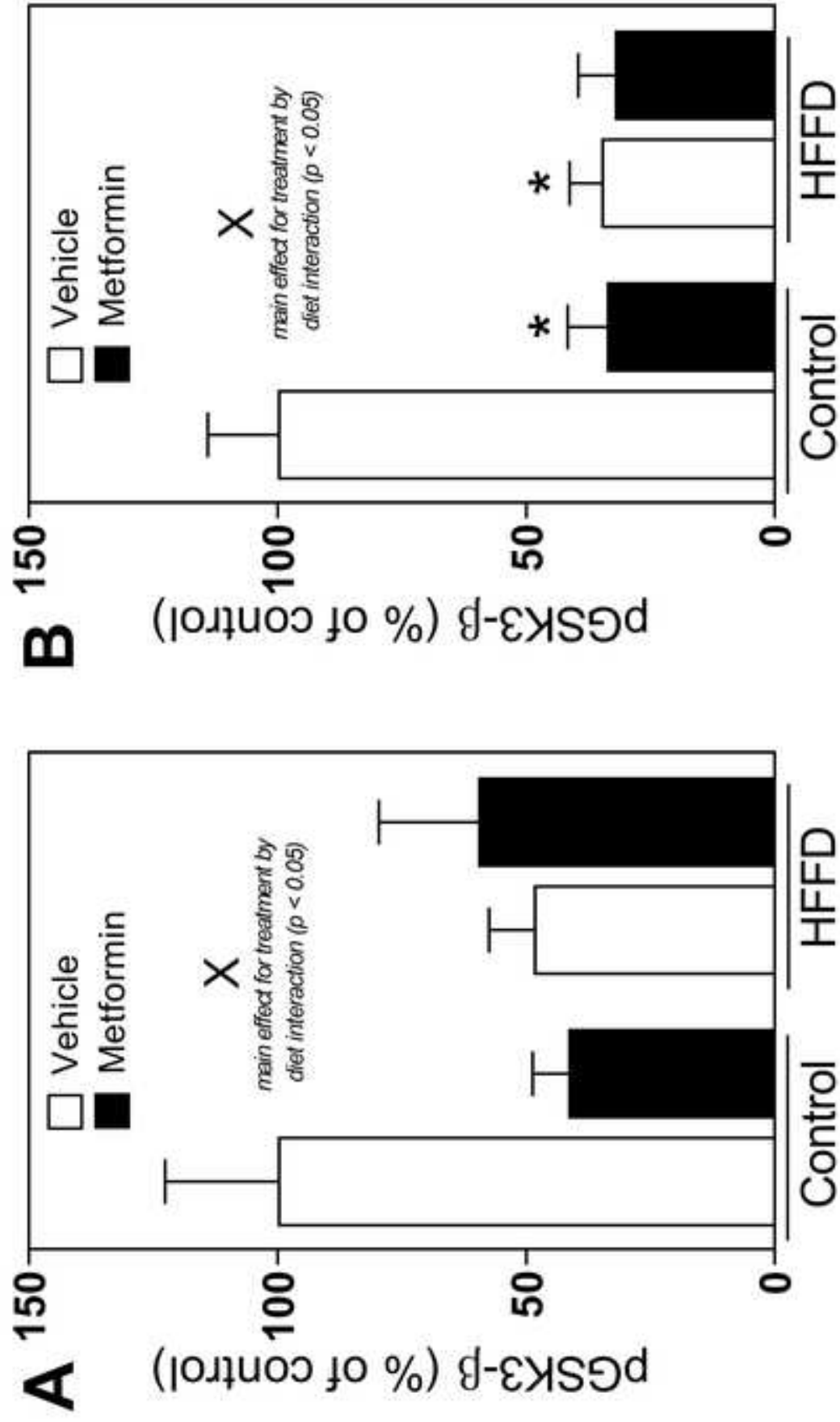
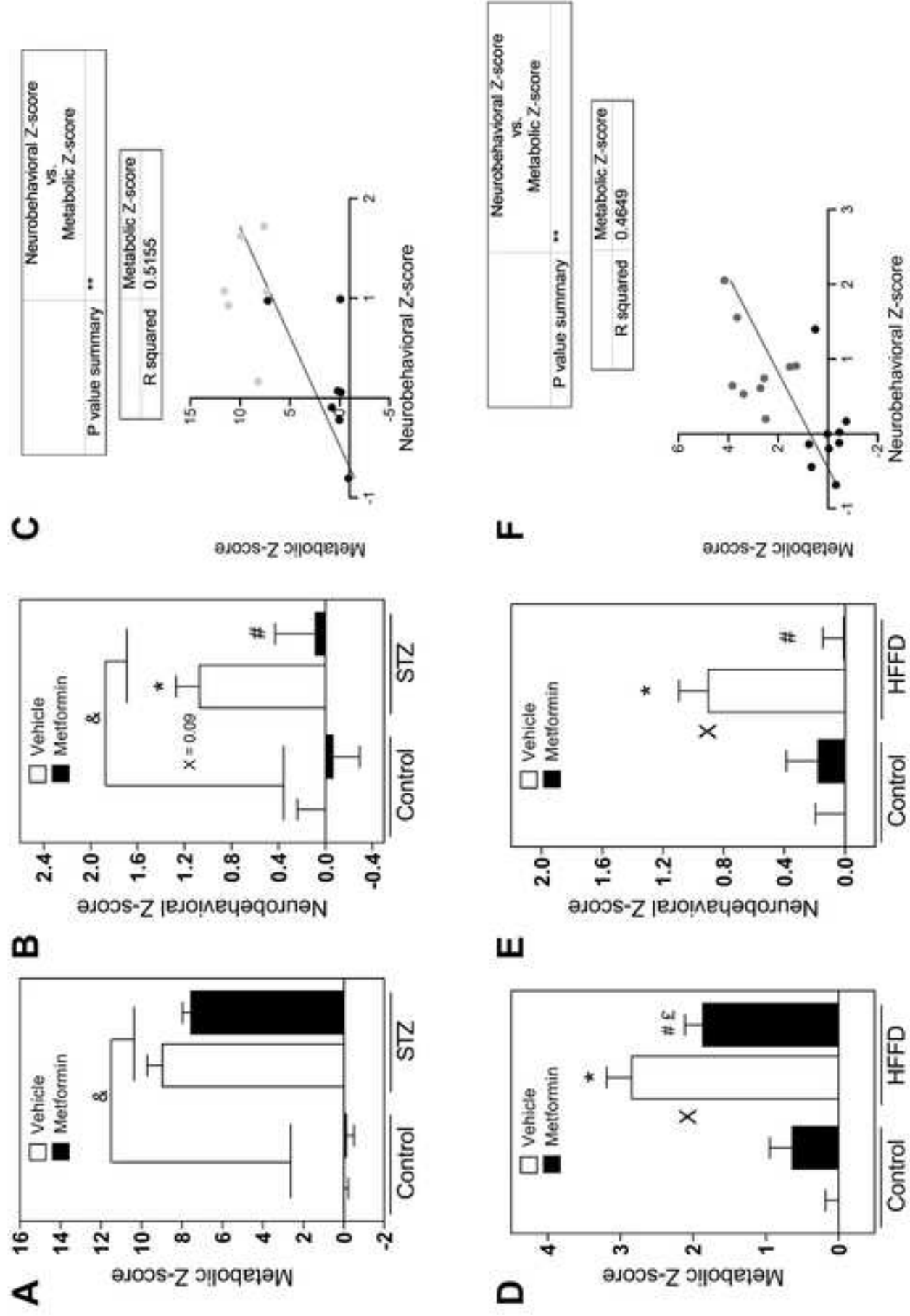


Figure 3









Le message principal qui découle de cet article est que la metformine n'aurait pas besoin d'améliorer le métabolisme glucidique périphérique pour exercer ses effets bénéfiques neurocomportementaux dans le modèle STZ. C'est également les conclusions auxquelles nous arrivons lorsque nous avons adressé cette question dans le modèle de souris knock-out pour l'apeline exposées à 6 semaines de régime HFD. Ces résultats sont inclus dans l'article « Maladaptive emotional response to metabolic stress : role of apelin signaling » présenté dans la Partie 2 des résultats. Il me semble toutefois important de les re-contextualiser dans cette dernière partie qui se consacre à l'effet de la metformine.

3) Dans le modèle de **souris $Ap^{-/-}$** nourries avec un régime HFD

Des souris contrôles ($Ap^{+/+}$) et knock-out pour l'apeline ($Ap^{-/-}$) ont été soumises à un régime HFD (45%) pendant 6 semaines. La moitié d'entre elles ont été traitées par la metformine (300mg/kg, eau de boisson) à partir de la deuxième semaine de régime (Figure 35A). Leur statut métabolique (Figure 35) ainsi que leurs comportements liés à l'anxiété (Figure 36) ont été analysés. On a pu constater que les souris $Ap^{-/-}$ /Metformine régulent moins bien leur glycémie que le groupe $Ap^{+/+}$ /Metformine (Figure 35B, C) lors de l'IPGTT. Concernant le poids, la glycémie et l'insulinémie à jeun (et par conséquent l'HOMA-IR), tous ces paramètres se sont avérés significativement plus élevés chez les souris $Ap^{-/-}$ mais la metformine n'a montré aucun effet bénéfique (Figure 35D-G).

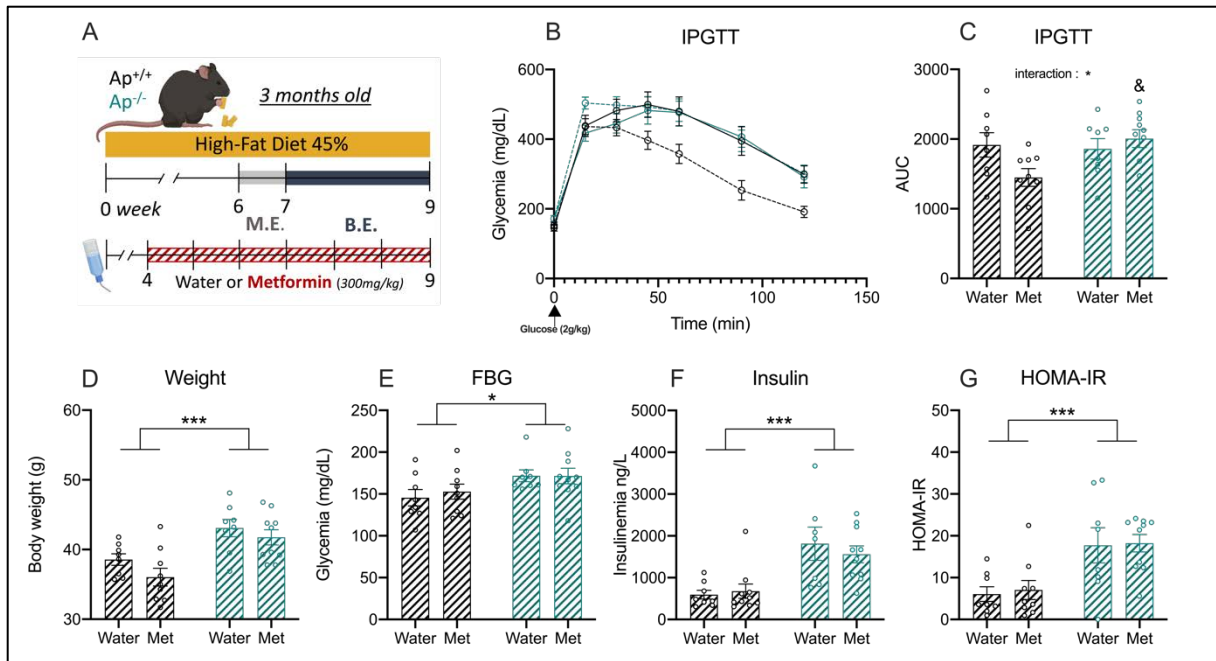


Figure 35. Absence d'effets insulino-sensibilisateurs de la metformine chez les souris $Ap^{-/-}$. (A) Schéma du protocole expérimental. M.E = metabolic experiments, B.E= behavioral experiments. (B) Suivi de la glycémie au cours d'un test de tolérance au glucose (mg/dL). (C) Aire sous la courbe des courbes de glycémie. ANOVA : Interaction $F(1,31)=4,572$ $p=0,0405$; Treatment $F(1,31)=1,248$ $p=0,2725$ & Genotype $F(1,31)=3,032$ $p=0,0916$. (D) Poids corporel (g). ANOVA : Interaction $F(1,31)=0,2810$ $p=0,5998$; Treatment $F(1,31)=2,2878$ $p=0,0998$ & Genotype $F(1,31)=20,27$ $p<0,001$. (E-F) Glycémie (mg/dL) et Insulinémie (ng/L) à jeun. ANOVA : Interaction $F(1,31)=0,1771$ $p=0,6767$; Treatment $F(1,31)=0,1544$ $p=0,6971$ & Genotype $F(1,31)=6,323$ $p=0,0173$ and ANOVA : Interaction $F(1,31)=0,5577$ $p=0,4608$; Treatment $F(1,31)=0,1397$ $p=0,7111$ & Genotype $F(1,31)=21,84$ $p<0,001$. (G) 'Homeostasis model assessment of insulin resistance' (HOMA-IR). ANOVA : Interaction $F(1,31)=0,0078$ $p=0,9294$; Treatment $F(1,31)=0,0765$ $p=0,7839$ & Genotype $F(1,31)=18,25$ $p<0,001$. Les résultats sont représentés par la moyenne \pm SEM. $\$p<0,05$, $**p<0,01$ et $***p<0,001$ significativement différent du groupe $Ap^{+/+}$ et $\&p<0,05$ significativement différent du groupe $Ap^{+/+}$ Met.

Quant à l'analyse comportementale, nous avons constaté que les souris $Ap^{-/-}$ passent moins de temps dans les bras ouverts de l'EPM (Figure 36A) et plus de temps dans le compartiment sombre dans le DL (Figure 36B). Seul le ratio 'temps au centre/distance parcourue' est statistiquement plus élevé chez les souris $Ap^{-/-}$ /Metformine dans l'OF (Figure 36C). Si l'on analyse maintenant le z-score d'anxiété récapitulant l'ensemble des tests utilisés afin de prendre en compte les tendances perceptibles dans les différents paradigmes pris séparément, on peut constater que le groupe $Ap^{-/-}$ /Metformine possède un z-score plus faible que les souris $Ap^{-/-}$ non traitées (Figure 36D) suggérant que cet antidiabétique améliore l'anxiété détectée dans notre modèle.

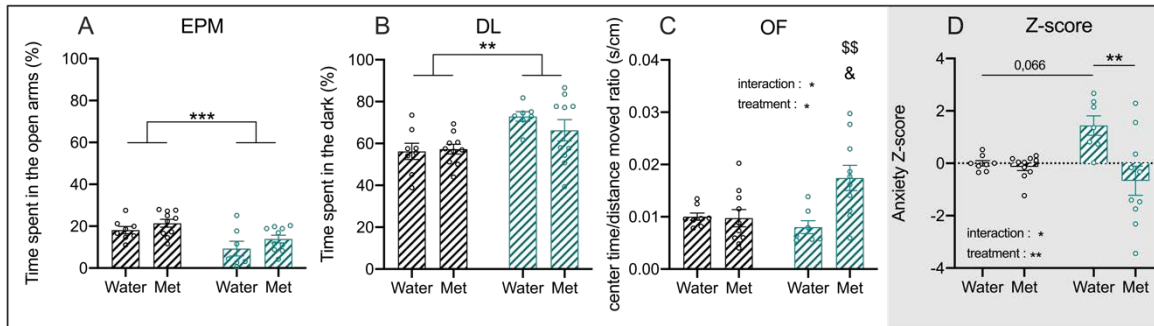


Figure 36. Effet anxiolytique de la metformine chez la souris Ap^{-/-}. (A) Temps passé dans les bras ouverts (%) pendant le labyrinthe en croix surélevé. ANOVA : Interaction $F(1,31)=0,0876$ $p=0,7692$; Treatment $F(1,31)=3,143$ $p=0,0861$ & Genotype $F(1,31)=13,60$ $p<0,001$. (B) Temps passé dans le compartiment sombre du test de la boîte claire/sombre. ANOVA : Interaction $F(1,31)=0,9987$ $p=0,3254$; Treatment $F(1,31)=0,5213$ $p=0,4757$ & Genotype $F(1,31)=11,36$ $p=0,002$. (C) Ratio du temps passé au centre (s)/distance parcourue (cm) dans le champ ouvert. ANOVA : Interaction $F(1,31)=7,237$ $p=0,0114$; Treatment $F(1,31)=6,377$ $p=0,0169$ & Genotype $F(1,31)=2,475$ $p=0,1258$. (D) Z-score d'anxiété (paramètres inclus : temps passé dans les bras ouverts (EPM), temps passé dans le compartiment sombre (D/L) et le ratio temps/distance parcourue (OF)). ANOVA : Interaction $F(1,31)=7,167$ $p=0,0118$; Treatment $F(1,31)=9,268$ $p=0,0047$ & Genotype $F(1,31)=1,527$ $p=0,2258$. Les résultats sont représentés par les moyennes \pm SEM. ** $p<0,01$ et *** $p<0,001$ significativement différent du groupe Ap^{+/+}, \$\$ $p<0,01$ significativement différent du groupe Ap^{-/-}Water, & $p<0,05$ significativement différent du groupe Ap^{+/+}Met et # $p<0,05$ significativement différent du niveau de chance (50%).

Ces résultats, comme ceux décrits précédemment, mettent donc aussi en évidence le fait que la metformine n'aurait pas besoin d'améliorer le métabolisme périphérique pour exercer des effets anxiolytiques.

Discussion et Perspectives

L'introduction bibliographique de ce travail récapitule l'ensemble des preuves expérimentales (épidémiologiques, cliniques et précliniques) supportant l'existence d'un lien entre le diabète et la dépression majeure (DM) ainsi que les hypothèses mécanistiques qui pourraient sous-tendre leur comorbidité. En effet, il a été rapporté que la prévalence de la DM est au moins doublée chez les patients diabétiques et que certains paramètres métaboliques sont corrélés avec la sévérité des symptômes psychiatriques. Parmi eux se dégage la résistance à l'insuline, un des marqueurs caractéristiques du diabète de type 2 (DT2). Il est ainsi légitime de s'interroger sur l'implication de la modulation de la signalisation périphérique et/ou centrale de l'insuline dans la physiopathologie de la DM et éventuellement dans l'efficacité des antidépresseurs. L'insuline et son récepteur modulant l'inflammation, l'activité de l'axe HPA et les systèmes monoaminergiques, autant de paramètres modifiés dans la DM, représente donc une cible intéressante pour développer des stratégies thérapeutiques innovantes. Dans ce contexte, le rôle de l'insuline dans la modulation du système dopaminergique et ses répercussions comportementales ont été récemment étudiées (Könner et al., 2011) mais très peu d'informations sont disponibles concernant l'impact de cette hormone pancréatique sur le système sérotoninergique du cerveau.

À travers ces travaux de thèse, nous avons donc voulu amener des éléments de réponses quant au rôle de l'insuline dans la modulation du système sérotoninergique en s'appuyant sur 3 questions fondamentales qui seront discutées dans cette dernière partie du manuscrit.

IV. Quels sont les effets centraux de l'insuline sur le système sérotoninergique et les comportements anxio-dépressifs associés dans un contexte physiologique ?

Un des résultats le plus remarquables obtenu au cours de cette thèse est l'identification du récepteur à l'insuline sur les neurones sérotoninergiques et sa capacité à réguler l'activité de ces cellules. En effet, nos résultats d'électrophysiologie *in-vitro* (menés en collaboration avec les Drs Fioramonti et Martin ; Nutrineuro, Bordeaux) montrent que l'insuline exerce un effet excitateur sur le système sérotoninergique. Mais cette régulation est plus complexe qu'il n'y paraît car les études des effets de l'insuline *in-vivo* montrent, au contraire, que cette hormone exerce un effet inhibiteur sur les neurones sérotoninergiques du DRN. Par exemple, nous avons montré au cours de mes travaux que le taux de décharge des neurones 5-HT est diminué par l'injection systémique d'insuline. En accord avec cette observation, nos études de microdialyse

intracérébrale montrent que l'insuline diminue la libération de 5-HT dans l'hippocampe ventral de souris éveillée (Article 1). Ces derniers résultats font écho à une ancienne étude menée chez le chat démontrant que l'injection d'insuline 4UI/kg par voie intraveineuse diminue l'activité électrique des neurones sérotoninergiques du raphé magnus (Martin-Cora et al., 2002). L'hypothèse du rôle de l'hypoglycémie dans cet effet inhibiteur a été testée par les auteurs qui montrent dans ce travail que l'inhibition de la décharge électrique des neurones 5-HT induite par l'insuline est atténuée par l'injection de glucose (Martin-Cora et al., 2002). Ainsi une diminution de l'apport des neurones en glucose pourrait avoir pour conséquence d'inhiber l'activité électrique des neurones. Or dans nos conditions expérimentales, nous n'avons pas observé de tels effets du glucose sur les neurones 5-HT du DRN (*données non présentées*) suggérant la mise en place d'autres mécanismes physiologiques.

Ces travaux ont ensuite été complétés par des analyses comportementales visant à évaluer l'effet de l'insuline, injectée directement dans le DRN ou par voie systémique (intranasale), sur le comportement anxio-dépressif des souris. D'un point de vue comportemental, alors que l'insuline n'exerce aucun effet bénéfique sur des tests de résignation, nous avons montré qu'elle induit des effets anxiolytiques dans le test du labyrinthe en croix surélevé (EPM) en utilisant ces deux voies d'administration. Ces données suggèrent que la diminution de la neurotransmission sérotoninergique induite par l'insuline est favorable à un effet anxiolytique. Elles sont en accord avec les travaux récents d'opto- et chemo-génétique montrant que la stimulation des neurones 5-HT du DRN entraîne, au contraire, des effets anxiogéniques (Teissier et al., 2015 ; Urban et al., 2016 ; Ohmura et al., 2020). Ils sont également cohérents avec le fait que les antidépresseurs sérotoninergiques (dont les ISRS) augmentent l'anxiété chez des patients dépressifs ou dans différents modèles animaux de laboratoire (Hamon, 1994). Ainsi, l'augmentation de la neurotransmission sérotoninergique semble nuisible puisqu'elle favorise l'anxiété alors que sa diminution serait favorable à une réponse thérapeutique. Il est aussi intéressant de noter que les travaux du Dr Hugo Martin ont permis de mettre en évidence la contribution du système sérotoninergique dans l'effet anxiolytique de l'insuline puisque l'administration concomitante de pCPA, un inhibiteur de la synthèse de 5-HT, prévient les effets anxiolytiques de cette hormone dans l'EPM suite à son injection intranasale.

Afin de mieux comprendre la dichotomie entre les effets excitateur *in vitro* et inhibiteur *in vivo* de l'insuline, nous avons testé l'hypothèse du rôle du récepteur 5-HT_{1A} situés sur les corps cellulaires des neurones sérotoninergiques. En effet, il est connu que ce récepteur somatodendritique, exprimé par les neurones 5-HT du DRN, exerce un rétrocontrôle inhibiteur sur le système sérotoninergique (Richardson-Jones et al., 2010). Nous avons émis l'hypothèse

selon laquelle l'insuline exciterait à travers son action sur l'IR les neurones sérotoninergiques conduisant à une accumulation de 5-HT endogène autour des corps cellulaires. Cette 5-HT conduirait, dans un second temps, à la mise en jeu de ce frein biologique exercé par les autorécepteurs 5-HT_{1A} et donc à l'inhibition de la décharge des neurones sérotoninergiques et la diminution de sa libération dans les aires de projection. Pour tester cette hypothèse, nous avons évalué les effets *in vivo* de l'insuline en présence de l'antagoniste du récepteur 5-HT_{1A}, le WAY100635. De manière intéressante, nos résultats *in vivo* montrent que l'insuline exerce des effets excitateurs sur le système sérotoninergique en présence de WAY100635 à l'aide des approches électrophysiologique et neurochimique (microdialyse) (Article 1).

Une autre hypothèse peut être soulevée puisque nous avons remarqué que l'IR n'était pas exclusivement exprimé par les neurones sérotoninergiques. En particulier, nous pensons que ce récepteur est également présent sur les interneurones GABAergiques du DRN et que son activation par l'insuline pourrait favoriser la libération de GABA autour des corps cellulaires sérotoninergiques et donc participer à son effet inhibiteur *in-vivo*. Ainsi, il serait intéressant de doser les taux de GABA extracellulaires dans le DRN en réponse à l'administration locale ou systémique d'insuline. L'hypothèse d'une diminution du tonus excitateur glutamatergique est également une piste à explorer par ce type d'approche (Figure 37).

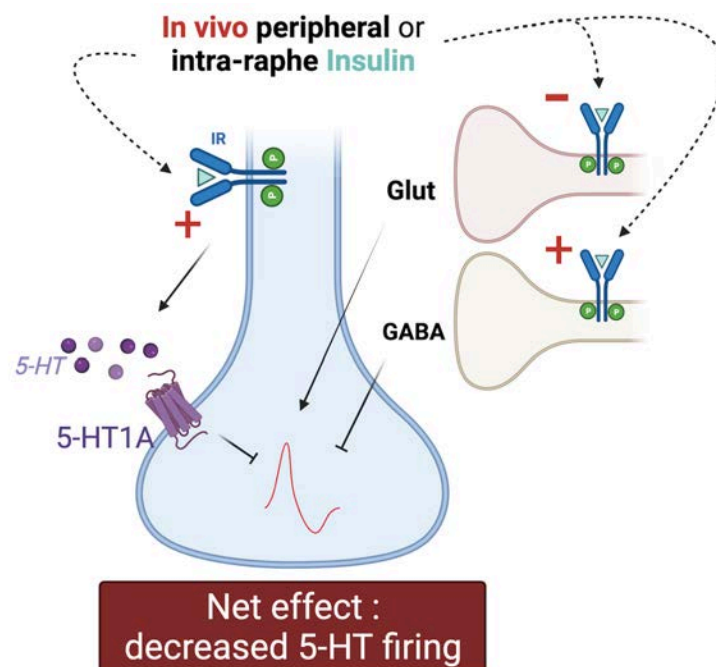


Figure 37. Hypothèse du modèle d'action de l'insuline sur le système sérotoninergique dans le noyau du raphé dorsal. En agissant sur son récepteur (IR) l'insuline stimulerait la libération de 5-HT endogène autour des corps cellulaires des neurones sérotoninergiques du DRN. Cette 5-HT contribuerait à stimuler le contrôle inhibiteur via les autorécepteurs 5-HT_{1A}

conduisant à une réduction du taux de décharge. Cette inhibition pourrait également passer par la stimulation des interneurons à GABA directement connectés aux neurones sérotoninergiques dans le DRN ou au contraire par une inhibition des neurones glutamatergiques.

Pour améliorer nos connaissances concernant les interactions fonctionnelles entre l'insuline et le système sérotoninergique, il serait également intéressant de tester les effets chroniques de cette hormone sur le comportement anxieux. D'un point de vue électrophysiologique, on pourrait s'attendre à ce que l'accumulation de 5-HT autour des corps cellulaires contribue à désensibiliser l'autorécepteur 5-HT_{1A} comme le font les antidépresseurs de type ISRS. Ainsi il faudrait dissocier les effets de l'administration unique et répétée de l'insuline.

Il est également important de souligner que nos résultats expérimentaux montrent des effets sur le comportement anxieux mais aucune modification des comportements de résignation évalués dans le FST. Cette observation nous conduit à envisager que l'insuline pourrait agir sur des sous-populations de neurones sérotoninergiques spécifiquement impliquée dans l'anxiété. Les travaux du Dr S. Fernandez mettent en évidence l'existence d'une sous population de neurones sérotoninergiques (Pet1 négatif) innervant l'amygdale (Kiyasova et al., 2011) et dont la diminution de l'activité coïnciderait avec un effet anxiolytique (Ren et al., 2018). En effet, il est largement accepté que dans l'amygdale, la 5-HT active des récepteurs postsynaptiques de type 5-HT₂ responsables d'effets anxiogènes (Martin et al., 2014). Bien que nos études de microdialyse intracérébrale aient été réalisées dans l'hippocampe, il est possible qu'une diminution concomitante du tonus 5-HT prenne place dans l'amygdale pour expliquer les effets anxiolytiques de l'insuline. Afin de mieux comprendre ce lien, nous avons initié une collaboration avec Christelle Peyron (INSERM 1028, Lyon) visant à caractériser les effets de l'insuline sur l'état du réseau sérotoninergique, notamment sur la morphologie et la densité des fibres 5-HT innervant différentes structures cérébrales car on sait aujourd'hui qu'il existe des voies sérotoninergiques distinctes contrôlant des comportements spécifiques (Ohmura et al., 2020).

Enfin, il est important de noter que l'implication d'IGF1 dans la modulation du système sérotoninergique n'est pas à exclure. Cette hypothèse est d'autant plus crédible que différentes études montrent que l'injection ICV d'IGF1 induit des effets anxiolytiques (Zegarra-Valdivia, 2017) et antidépresseurs via la modulation du système sérotoninergique (Hoshaw et al., 2008). Il a également été montré que des souris double mutantes privées à la fois des récepteurs à l'insuline et à IGF1 dans l'hippocampe ou l'amygdale présentent un phénotype anxieux (Soto

et al., 2019). Au cours de sa thèse, le Dr H. Martin (Nutrineuro, Bordeaux) a constaté qu'un antagoniste IGF1R réduit partiellement l'effet de l'insuline renforçant l'idée d'un rôle éventuel ce facteur sur la régulation du système sérotoninergique et des comportements émotionnels associés.

V. Quel est l'impact d'une modulation négative de la signalisation de l'insuline sur le système sérotoninergique et les comportements associés :

i. Dans un modèle de souris de DT1 recevant la streptozotocine (STZ) ?

La seconde façon d'appréhender le lien entre la signalisation de l'insuline et l'activité du système sérotoninergique consiste à s'intéresser aux effets d'un défaut de signalisation de cette hormone. Pour cela, nous nous sommes appuyés un premier temps sur le modèle de souris injectées à la STZ. En accord avec la littérature, nos résultats expérimentaux montrent que ces souris présentent des troubles métaboliques très marqués caractérisés par une insulino-pénie, une hyperglycémie à jeun et une perte de poids.

D'un point de vue comportemental, ces souris présentent plusieurs symptômes pseudo-dépressifs. Par exemple, comme attendu au regard des études déjà publiées dans ce domaine (Gupta et al., 2014), leurs niveaux de résignation et d'anxiété sont beaucoup plus marqués que les souris contrôles. Ces perturbations comportementales s'accompagnent d'une diminution de l'activité électrique des neurones 5-HT du DRN. Il est intéressant de noter que cette baisse du tonus sérotoninergique rappelle celle observée suite à l'injection systémique d'insuline alors que l'analyse comportementale révèle des effets opposés. On peut alors se demander comment des effets électrophysiologiques comparables peuvent aboutir à des effets comportementaux opposés, si on s'intéresse notamment à l'anxiété ? Un premier élément de réponse repose sur le fait que dans le modèle STZ, le circuit sérotoninergique préférentiellement impacté serait différent de celui mis en jeu lors de l'injection d'insuline (c-a-d l'amygdale). On sait par exemple que la 5-HT joue un rôle anxiolytique dans l'hippocampe (Karayol et al., 2021) laissant entrevoir la possibilité que la STZ diminuerait l'action de la 5-HT spécifiquement dans cette région cérébrale. Il serait donc intéressant d'analyser en détail l'activité des circuits DRN ↔ amygdale et DRN ↔ hippocampe suite à l'injection d'insuline ou de STZ et de préciser s'il existe des effets préférentiels sur l'un de ces deux circuits dans chaque condition expérimentale. L'hypothèse du recrutement du circuit DRN ↔ hippocampe est d'autant plus plausible que dans le modèle STZ, les anomalies comportementales ne se limitent pas à l'anxiété mais aussi

à d'autres comportements (résignation/incurie) dépendant, du moins en partie, de l'hippocampe (Eliwa et al., 2021). Il est aussi important de noter que le modèle STZ présente des limites, notamment lorsqu'on s'intéresse aux liens fonctionnels entre l'insuline et le système 5-HT central car il n'existe pas d'évidences selon laquelle la STZ induit un déficit de transmission insulinerigique dans le cerveau. De plus, il se pourrait que la diminution de production d'insuline endogène au niveau périphérique soit compensée par une production locale au niveau du cerveau ou que le transport de l'insuline à travers la barrière hémato-encéphalique soit augmenté pour pallier à la potentielle carence centrale. Afin de mieux comprendre le lien entre l'insulinopénie et l'activité du système sérotoninergique, il serait intéressant d'étudier les concentrations extracellulaires de 5-HT au niveau des aires de projection sérotoninergiques mais aussi de quantifier la quantité d'insuline au niveau central et ses voies de signalisation.

En attendant la réalisation de ces études, il est légitime d'envisager que le modèle STZ provoque des effets sur le système 5-HT qui s'étendent au-delà de l'insulinopénie. En effet, ce modèle, il a été montré que les taux de leptine plasmatiques sont diminués pouvant expliquer non seulement la perte de poids chez ces animaux (Havel et al., 1998) mais aussi ces effets électrophysiologiques et neurocomportementaux. En accord avec cette hypothèse, il a été montré que la leptine module les comportements anxio-dépressifs puisque les souris ob/ob privées de leptine présentent un comportement anxieux (Finger et al., 2010). De plus, comme décrit dans la partie bibliographique de ce manuscrit, la STZ est connue pour ses propriétés pro-inflammatoires favorisant l'augmentation des concentrations plasmatiques de cytokines dont la CRP, TNF- α et IL1 β (Guo et al., 2019). Compte tenu des effets anxiogéniques de ces médiateurs (Felger and Lotrich, 2013), il est possible que les effets de la STZ passent par cette voie. On peut également envisager que les effets de la STZ soient liés à la capacité de cette toxine à provoquer une hyper-activation de l'axe HPA, processus également associé à une réponse exagérée au stress pouvant être atténuée par l'administration chronique d'insuline (Chan et al., 2002). Toutes ces hypothèses, non exclusives, pourraient expliquer les effets de la STZ sur la diminution de la neurotransmission sérotoninergique et le phénotype anxio-dépressif des souris.

Enfin, une autre piste séduisante est apportée par nos travaux réalisés en collaboration avec le Dr. Moreira. En effet dans ce travail, le même type d'altération comportementale à savoir une anxiété exacerbée a été mise en évidence mais celle-ci s'accompagne d'une hyperalgésie. Cette association entre anxiété et douleur a déjà été rapporté dans la littérature et on peut émettre l'hypothèse que cette douleur exacerbée soit responsable des troubles émotionnels observés chez les souris STZ. En effet des travaux chez l'humain ou l'animal montrent que l'induction

de douleurs neuropathiques (constriction nerf sciatique, injection d'agent intercalent de l'ADN : oxaliplatine) augmente l'état anxieux et provoque des symptômes de type dépressifs chez le rongeur (Hache et al., 2012).

ii. Dans un modèle de souris de DT2 combinant des facteurs de risque génétiques (système apelinergique) et environnementaux (alimentation hyper-lipidique) ?

Ce travail de thèse nous a permis d'étudier l'influence de la signalisation de l'insuline sur le système sérotoninergique et les comportements émotionnels à l'aide d'un autre modèle caractérisé par une insulino-résistance périphérique. Ce phénotype métabolique est d'autant plus marqué qu'il propose de combiner deux facteurs de risque de l'insulino-résistance : la diminution des taux circulants d'apeline et un régime alimentaire obésogène de type « *high fat diet* » ($Ap^{-/-}/HFD$). En accord avec les résultats précédents, nous retrouvons dans ce modèle une diminution du taux de décharge des neurones 5-HT et un comportement anxieux chez les souris $Ap^{-/-}$ nourries avec un régime HFD pendant 6 semaines. Concernant l'aspect électrophysiologique, ce résultat est cohérent avec nos données précédentes montrant qu'un régime HFD diminue l'activité du système sérotoninergique (Zemdegs et al., 2019). Nous avons d'ailleurs décrit un mécanisme sous-jacent qui reposerait sur une diminution de la synthèse de sérotonine du DRN liée à une diminution de l'apport en tryptophane dans le cerveau (Article 4). Bien que le rôle de l'apeline sur le système sérotoninergique ne soit pas décrit à ce jour, il est envisageable que cette adipokine interfère directement avec ce système en raison de la présence du récepteur APJ dans le raphé. Ainsi, compte tenu du couplage négatif d'APJ, on pourrait également envisager un effet inhibiteur de l'apeline sur les neurones sérotoninergiques venant s'ajouter voire potentialiser les effets négatifs du régime HFD mis en évidence dans ce modèle.

Compte tenu de l'importance de la signalisation de l'insuline centrale dans la régulation du système sérotoninergique (Article 1), on est en droit de se demander s'il s'agit de la résistance centrale et/ou périphérique à l'insuline qui est responsable des effets observés dans ce modèle. Nos résultats montrent clairement que ce modèle présente une insulino-résistance périphérique mais à ce stade nous ne disposons d'aucune preuve expérimentale concernant l'insulino-résistance centrale. On peut toutefois envisager qu'elle se mette en place dans le cerveau pour plusieurs raisons et notamment parce que sous régime HFD, l'insuline n'induit plus la phosphorylation des acteurs de sa voie de signalisation dans le cerveau (Arnold et al.,

2014 ; Clegg et al., 2011). Ainsi, les mécanismes qui se mettent en place en périphérie semble se dérouler également dans le système nerveux central. Concernant l'apeline, à ce jour aucune preuve n'est disponible sur la possibilité que son inactivation génétique provoque les mêmes effets sur la signalisation insulinerigique dans le cerveau mais on peut envisager que l'effet du HFD soit potentialisé chez les souris *Ap^{-/-}*. Le fait que des souris mutantes spécifiquement dans le cerveau pour le récepteur à l'insuline montrent le même phénotype comportemental que les *Ap^{-/-}/HFD* nous laisse penser que l'insulino-résistance centrale est suffisante pour induire des troubles anxieux et une diminution de l'activité du système sérotoninergique. Il serait donc intéressant de regarder l'état de phosphorylation des acteurs de la voie de signalisation de l'insuline dans le DRN par western blot ou spécifiquement dans les neurones sérotoninergiques des souris *Ap^{-/-}/HFD* à l'aide d'une approche immunohistochimique. En effet l'utilisation d'un double marquage TPH2/IRS-1 phosphorylé en réponse à un challenge à l'insuline chez des souris *Ap^{-/-}/HFD* comparés à des souris sauvages (avec ou sans HFD) permettrait de répondre à cette question. A ce jour, il est difficile d'envisager une stratégie permettant de cibler spécifiquement la sensibilité à l'insuline dans le cerveau afin d'en étudier l'impact. Différents travaux montrent qu'il est possible d'améliorer la sensibilité centrale de l'insuline à l'aide d'antidiabétiques oraux ou via l'exercice physique (Rueggsegger et al., 2019) mais ces stratégies n'excluent pas la possibilité du rôle de la sensibilité périphérique à l'insuline. Toutefois, des stratégies lentivirales visant à faire sur-exprimer le récepteur à l'insuline dans différentes régions cérébrales et même dans des sous-populations neuronales clés de la régulation des émotions permettrait d'apporter des conclusions définitives quant au lien entre l'insulino-résistance centrale, l'activité électrique d'une population neuronale et le comportement anxio-dépressif. Plus précisément, est-ce que la surexpression de l'IR dans les neurones 5-HT des souris *Ap^{-/-}/HFD* permettrait de récupérer un phénotype comportement normal et de ré-augmenter l'activité électrique des neurones sérotoninergique ?

La stratégie actuelle utilisée pour interférer négativement sur la sensibilité à l'insuline centrale sans impacter celle des tissus périphériques repose sur l'injection ICV de STZ. Ce protocole engendre une insulino-résistance et une neurodégénérescence (Moreira-Silva et al., 2019 ; Salkovic-petrisic and Hoyer, 2007). Ainsi, il n'est pas exclu que l'insulino-résistance centrale s'installe dans des régions différentes du DRN contribuant ainsi au contrôle des comportements anxio-dépressifs. Il a été montré que la signalisation de l'insuline dans l'hippocampe favorise le processus de neurogenèse ainsi que les performances mnésiques et les comportements émotionnels chez le rongeur (Lv et al., 2020). Il est possible que ces mécanismes hippocampiques soient également altérés dans le modèle *Ap^{-/-}/HFD* via un déficit de

signalisation de l'insuline et/ou en raison de l'absence d'apeline qui aurait des répercussions négatives sur la plasticité cérébrale. En accord avec cette hypothèse, différentes études soulignent les effets neuroprotecteurs de l'apeline dans le cerveau et notamment dans l'hippocampe en agissant sur la survie des neurones (O'Donnell et al., 2007). Il est alors facile d'imaginer que l'absence de ces effets neuroprotecteurs chez les souris *Ap^{-/-}/HFD* participent au phénotype observé. Il est également intéressant de noter que l'apeline exerce des effets neuroprotecteurs dans des modèles de dégénérescence des neurones dopaminergiques dans un modèle murin de la maladie de Parkinson (Haghparast et al., 2018) ou d'accidents vasculaires cérébraux (Duan et al., 2019) pouvant découler des effets anti-inflammatoires, antioxydants, anti-apoptotiques ou encore anti-excitotoxiques (pour revue Zhou et al., 2021).

Nous venons de considérer les effets indirects de l'apeline sur les comportements anxio-dépressifs via la modulation du système insulinerigique (intra-raphe et/ou intra-hippocampique) mais cette adipokine pourrait également avoir des effets sur ce type de comportement et le système sérotoninergique par des effets directs. Une étude récente a pu montrer que les effets anxiolytiques de l'apeline injectée par voie ICV seraient dépendant d'une action sur le système sérotoninergique puisqu'un antagoniste de récepteur 5-HT₂ préviendrait ses effets bénéfiques (Telegdy and Jászberényi, 2014).

A ce stade de notre réflexion, une autre question mérite d'être abordée bien qu'elle dépasse le cadre spécifique de cette étude. Cette question est de déterminer dans quelle mesure le poids joue un rôle dans les comportements observés. Une revue récente du Dr S Fulton au Canada, synthétise les différents mécanismes cellulaires et moléculaires suggérant que le poids, indépendant de l'insulino-résistance, contribue à la mise en place de symptômes anxieux chez des patients obèses ou dans différents modèles animaux (Fulton and Srinivasan., 2021). À première vue, le fait que le modèle STZ (sans prise de poids) et le modèle HFD (avec prise de poids) conduisent au même phénotype anxieux, pourrait minimiser l'influence du poids sur le phénotype observé. Or, il a été montré qu'un régime enrichi en fructose, responsable d'une insulino-résistance sans prise de poids (Do et al., 2018), n'entraîne pas de phénotype anxio-dépressif (De Souza et al., 2020 ; Zemdegs et al., 2016). Ces derniers résultats plaident donc en faveur d'un rôle majeur du poids et renvoie aux travaux menés chez l'humain qui suggèrent, en effet, que l'obésité représente un facteur de risque majeur pour le développement d'un DT2 et des symptômes dépressifs (Luppino et al., 2010).

VI. Est-ce que la Metformine, un agent insulino-sensibilisateur, permet d'améliorer les altérations comportementales dans ces différents modèles ?

Ce travail de thèse a permis de mettre en évidence l'effet bénéfique de la metformine sur les comportements anxieux dans différents modèles animaux dont la perturbation de la signalisation de l'insuline était associée à des comportements anxieux. Cependant, en raison de son administration systémique, il est, là aussi, difficile de dissocier ses effets centraux de ses effets périphériques dans cette modulation de l'anxiété. En effet, la metformine pourrait avoir exercé des effets bénéfiques via ses propriétés anti-inflammatoires et/ou sa capacité à améliorer le métabolisme énergétique : diminution néoglucogénèse/lipogénèse, augmentation de l'utilisation du glucose et amélioration de l'insulino-résistance. Tous ces mécanismes pourraient, dans un second temps contribuer à modifier l'activité de réseaux neuronaux spécifiques. C'est ce qui a pu être montré, par exemple, avec la diminution des comportements anxio-dépressifs associée à une augmentation de BDNF dans l'hippocampe et le cortex préfrontal dans le modèle de défaite sociale (Fang et al., 2020) ou encore l'amélioration de la fonction oxydative mitochondriale centrale (Rueggsegger et al., 2019) en réponse à l'administration de metformine. Cependant notre étude suggère que la metformine ne nécessite pas la mise en place de ses effets périphériques pour améliorer les comportements anxieux. En effet, le fait qu'elle n'améliore pas le métabolisme glucidique périphérique ni dans le modèle STZ (Article 5) ni dans le modèle *Ap^{-/-}/HFD* (Article 3) alors qu'elle exerce des effets comportementaux sont en faveur d'un effet central. Il reste cependant à déterminer par quels mécanismes et sur quels systèmes la metformine exerce ses effets ? Pour répondre à cette question, il serait intéressant de tester les effets de l'injection locale de metformine dans le DRN (ou une autre région cérébrale comme l'hippocampe) et déterminer ses effets sur le comportement anxieux, l'état de la voie de signalisation de l'insuline et la neurotransmission sérotoninergique. En effet, il a été montré que la metformine pouvait améliorer les déficits comportementaux en agissant sur la signalisation de l'insuline dans l'hippocampe (Tanokashira 2018). De manière plus simple, nous pourrions aussi évaluer l'effet de la metformine chez les souris NIRKO ou SEIRKO privés de l'IR dans le cerveau ou dans les neurones 5-HT du DRN afin de déterminer dans quelle mesure ses effets bénéfiques persistent dans ces lignées d'animaux mutants. Ces études pourraient également nous éclairer concernant l'implication de la résistance à l'insuline dans la modulation de l'humeur.

De manière intéressante, il semblerait que la metformine augmente les taux circulants d'apeline chez les patients atteints de diabète de type 2 (Kadoglou et al., 2010). Si les effets

métaboliques de la metformine passent par l'apeline alors ceci pourrait expliquer l'absence d'amélioration du métabolisme des souris *Ap^{-/-}/HFD* par la metformine et suggère également que la metformine et l'apeline impacte la régulation de l'anxiété par deux processus différents.

De plus, il est important de noter que notre étude s'est seulement concentrée sur les effets comportementaux de la metformine dans des modèles de comorbidité diabète-dépression. Or il serait intéressant d'élargir l'étude de ces propriétés dans des modèles de dépression sans troubles métaboliques bien que cela soulève une nouvelle question. Ces modèles de dépression basés sur le stress chronique et donc une dérégulation de l'axe HPA sont-ils réellement des modèles de dépression « purs », sans impacts sur le métabolisme périphérique ? En effet, dans le modèle de dépression induite par l'exposition à des stress modérés chroniques imprévisibles (UCMS), il a été montré que la signalisation de l'insuline est perturbée au niveau de l'hypothalamus (Pan et al., 2013). C'est aussi le cas dans le modèle CORT basé sur l'administration chronique de corticostérone qui lui induit à la fois une prise de poids, une hyperinsulinémie, hyperleptinémie et même une perturbation de la tolérance au glucose lorsque la dose utilisée est élevée (Karatsoreos et al., 2010). Il apparaît donc que les modèles de diabètes mènent, in fine, au développement de comportements anxio-dépressifs et que les modèles de dépression engendrent aussi des troubles métaboliques. D'un point de vue clinique, on peut donc se demander si des marqueurs métaboliques comme l'insulino-résistance pourraient être prédictifs d'un trouble anxio-dépressif et si les stratégies insulino-sensibilisatrices pourraient potentialiser les effets des antidépresseurs actuels. Dans l'article 1, nous montrons que l'administration aigüe d'insuline potentialise l'effet antidépresseur de l'injection aigüe de fluoxétine dans le test de suspension caudale chez des souris naïves. Ces résultats préliminaires sont très intéressants dans la perspective de développer de nouvelles stratégies de combinaison dans le but d'améliorer l'efficacité des traitements antidépresseurs actuels (réduction du délai d'action, du taux de non-répondeurs et de rechute) et méritent notre attention dans les années futures. Ils ouvrent également la voie à l'utilisation des antidiabétiques oraux comme stratégies de potentialisation. Des travaux récents soulignent les effets bénéfiques que peut apporter par exemple la metformine dans l'efficacité de la fluoxétine (Khedr et al., 2018 Poggini et al., 2019). Dans ce dernier article, les auteurs montrent l'effet potentialisateur de la metformine dès la première semaine de traitement.

Conclusion générale

Au cours de ce projet de thèse, nous avons pu mettre en évidence la modulation du système sérotoninergique par l'insuline et ses conséquences sur le comportement émotionnel dans des conditions physiologiques. Nous avons en effet démontré l'effet anxiolytique de l'insuline à des doses supra-physiologiques. Au contraire, la régulation négative du système insulinerigique dans différents modèles d'insulinopénie ou d'insulino-résistance se traduit par un état d'anxiété associé à une altération du système sérotoninergique (résumé dans le [Tableau 5](#)).

Modèles	Métabolisme périphérique	Métabolisme central	Comportements	Système 5-HT
STZ	Hyperglycémie ↓[insuline] ↓poids	↔ [insuline] ?	Anxiété, Incurie, Résignation, problème mnésique	↓ taux de décharge
HFD (16sem)	Hyperglycémie Insulino-résistance	<i>Insuline résistance ?</i>	↑ Anxiété	Modification propriétés électriques (patch clamp), ↓ 5-HT hippocampique
Ap-/- HFD (6sem)	↑ [insuline] Intolérance glucose Insulino-résistance	<i>Insuline résistance ?</i>	↑ Anxiété	↓ taux de décharge
APJ+/- HFD (6sem)	↑ [insuline] Intolérance glucose Insulino-résistance	<i>Insuline résistance ?</i>	↑ Anxiété	?

Tableau 5. Résumé des résultats obtenus dans les différents modèles étudiés au cours de ce travail de thèse.

Un autre point majeur de ce travail de thèse repose sur la mise en évidence des effets bénéfiques d'une stratégie insulino-sensibilisatrice, basée sur l'administration de metformine, dans différents modèles de comorbidité diabète-dépression (résumé dans le [Tableau 6](#)).

Modèles	Métabolisme périphérique	Métabolisme central	Comportements	Système 5-HT
STZ	Pas d'amélioration	<i>Pas d'amélioration ?</i>	↓ Incurie ↓ Douleur	?
HFD (16sem)	↓Hyperglycémie ↓ Insulino-résistance ↓ Poids ↑ Tolérance glucose	↕ <i>Insuline résistance ?</i>	↓Anxiété ↓ Résignation	↑ taux de décharge, Amélioration paramètre électrique (patch clamp)
Ap-/- HFD (6sem)	Pas d'amélioration	<i>Pas d'amélioration ?</i>	↓ Anxiété	?

Tableau 6. Effets de la Metformine dans les différents modèles étudiés au cours de ce travail de thèse.

Au cours de ces travaux, nous avons fait l'hypothèse selon laquelle l'insulino-résistance pourrait être le nexus entre le diabète et la dépression et nous proposons, d'après l'ensemble des résultats, le modèle présenté dans la **Figure 38**. Ce modèle hypothétique et simplifiée, s'appuie uniquement sur les éléments étudiés au cours de ce travail et ne rend évidemment pas compte de tous les acteurs pouvant moduler à la fois le système insulinergique et plus directement le système sérotoninergique. En effet, il ne prend pas en compte de nombreuses molécules qui peuvent impacter la résistance à l'insuline (leptine, ghreline, adipokines, hormones sexuelles, etc.) dans le contexte pathologique du diabète ni l'ensemble des hypothèses associées à l'éthiologie de la dépression.

Intégrés à la littérature, ces résultats pourraient participer à la meilleure compréhension de la dépression en elle-même mais aussi du lien entre la dépression et le diabète dans l'optique de développer de nouveaux traitements contre les troubles anxio-dépressifs aussi bien chez les patients présentant la comorbidité, que chez ceux simplement atteints de dépression majeure.

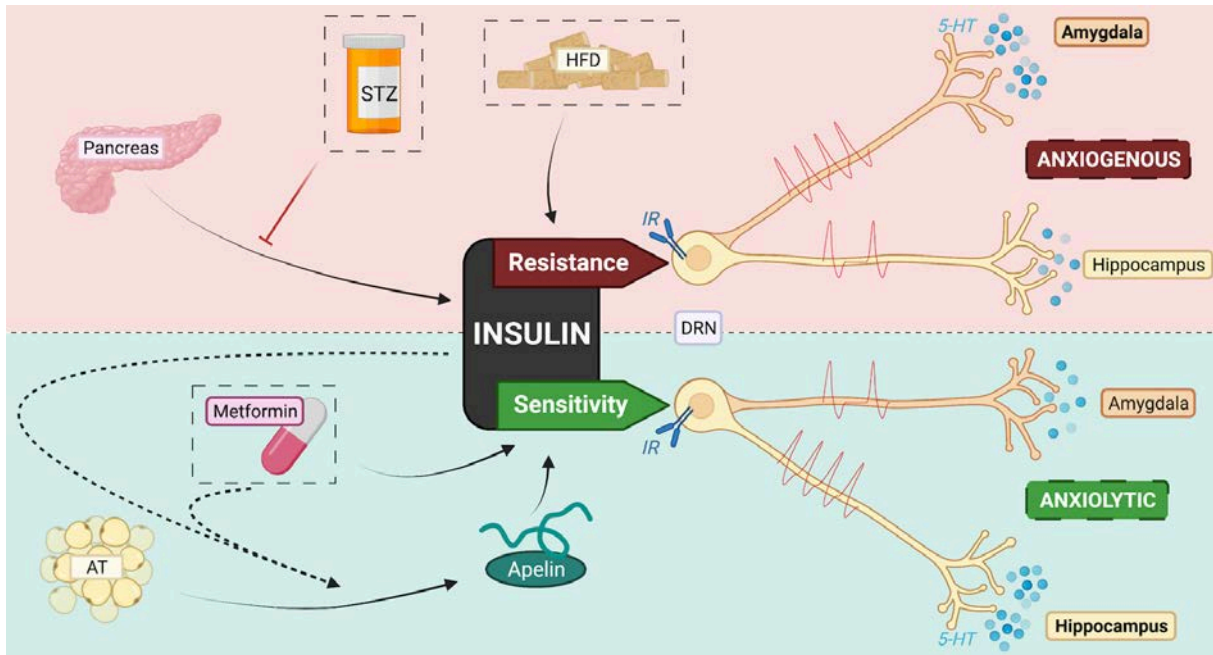


Figure 38. Modèle schématique de la modulation du système sérotoninergique par l'insuline : impact sur le comportement anxieux. Ce schéma propose un modèle hypothétique intégrant les données obtenues et les questions soulevées par ce travail de thèse. Dans le cas d'une insulino-résistance, la signalisation de l'insuline est réduite favorisant la neurotransmission sérotoninergique vers l'amygdale induisant un comportement anxieux. L'apeline, sécrétée majoritairement par le tissu adipeux, améliore la sensibilité à l'insuline, de la même façon que la metformine, un antidiabétique oral prescrit en première intention chez les diabétiques de type 2. Dans le cadre d'une bonne sensibilité à l'insuline du système sérotoninergique, la voie hippocampique est favorisée induisant ainsi des effets de type anxiolytiques. AT = adipose tissue, DRN = dorsal raphe nucleus, HFD = high-fat diet, STZ = streptozotocin.

Références

- Abela, A.R. *et al.* (2020) 'Median raphe serotonin neurons promote anxiety-like behavior via inputs to the dorsal hippocampus', *Neuropharmacology*, 168, p. 107985. doi:[10.1016/j.neuropharm.2020.107985](https://doi.org/10.1016/j.neuropharm.2020.107985).
- Acharjee, S. *et al.* (2013) 'Understanding Type 1 Diabetes: Etiology and Models', *Canadian Journal of Diabetes*, 37(4), pp. 269–276. doi:[10.1016/j.jcjd.2013.05.001](https://doi.org/10.1016/j.jcjd.2013.05.001).
- Ackermann, R.T. *et al.* (2009) 'Changes in health state utilities with changes in body mass in the Diabetes Prevention Program', *Obesity (Silver Spring, Md.)*, 17(12), pp. 2176–2181. doi:[10.1038/oby.2009.114](https://doi.org/10.1038/oby.2009.114).
- Acosta-Montañó, P. *et al.* (2019) 'Fatty Acid and Lipopolysaccharide Effect on Beta Cells Homeostasis and its Impact on Insulin Secretion', *Cells*, 8(8), p. E884. doi:[10.3390/cells8080884](https://doi.org/10.3390/cells8080884).
- Aerts, L. and Van Assche, F.A. (2006) 'Animal evidence for the transgenerational development of diabetes mellitus', *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology*, 38(5–6), pp. 894–903. doi:[10.1016/j.biocel.2005.07.006](https://doi.org/10.1016/j.biocel.2005.07.006).
- Ahmad, A. *et al.* (2010) 'Alterations in monoamine levels and oxidative systems in frontal cortex, striatum, and hippocampus of the rat brain during chronic unpredictable stress', *Stress (Amsterdam, Netherlands)*, 13(4), pp. 355–364. doi:[10.3109/10253891003667862](https://doi.org/10.3109/10253891003667862).
- Ahmadian, G. *et al.* (2004) 'Tyrosine phosphorylation of GluR2 is required for insulin-stimulated AMPA receptor endocytosis and LTD', *The EMBO Journal*, 23(5), pp. 1040–1050. doi:[10.1038/sj.emboj.7600126](https://doi.org/10.1038/sj.emboj.7600126).
- Aleyassine, H. and Gardiner, R.J. (1975) 'Dual Action of Antidepressant Drugs (MAO Inhibitors) on Insulin Release', *Endocrinology*, 96(3), pp. 702–710. doi:[10.1210/endo-96-3-702](https://doi.org/10.1210/endo-96-3-702).
- 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(1), pp. 193–204. doi:[10.1016/s0306-4522\(03\)00518-9](https://doi.org/10.1016/s0306-4522(03)00518-9).
- Almaça, J. *et al.* (2016) 'Human Beta Cells Produce and Release Serotonin to Inhibit Glucagon Secretion from Alpha Cells', *Cell Reports*, 17(12), pp. 3281–3291. doi:[10.1016/j.celrep.2016.11.072](https://doi.org/10.1016/j.celrep.2016.11.072).
- Almind, K. *et al.* (1996) 'A common amino acid polymorphism in insulin receptor substrate-1 causes impaired insulin signaling. Evidence from transfection studies', *The Journal of Clinical Investigation*, 97(11), pp. 2569–2575. doi:[10.1172/JCI118705](https://doi.org/10.1172/JCI118705).
- 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', *The Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*, 320(1), pp. 376–385. doi:[10.1124/jpet.106.111690](https://doi.org/10.1124/jpet.106.111690).
- American Diabetes Association (2021) '2. Classification and Diagnosis of Diabetes: *Standards of Medical Care in Diabetes—2021*', *Diabetes Care*, 44(Supplement 1), pp. S15–S33. doi:[10.2337/dc21-S002](https://doi.org/10.2337/dc21-S002).
- Amigó, J. *et al.* (2016) 'The absence of 5-HT4 receptors modulates depression- and anxiety-like responses and influences the response of fluoxetine in olfactory bulbectomised mice: Adaptive changes in hippocampal neuroplasticity markers and 5-HT1A autoreceptor', *Neuropharmacology*, 111, pp. 47–58. doi:[10.1016/j.neuropharm.2016.08.037](https://doi.org/10.1016/j.neuropharm.2016.08.037).
- Amisten, S. *et al.* (2013) 'An atlas and functional analysis of G-protein coupled receptors in human islets of Langerhans', *Pharmacology & Therapeutics*, 139(3), pp. 359–391. doi:[10.1016/j.pharmthera.2013.05.004](https://doi.org/10.1016/j.pharmthera.2013.05.004).
- Anderberg, R.H. *et al.* (2016) 'GLP-1 is both anxiogenic and antidepressant; divergent effects of acute and chronic GLP-1 on emotionality', *Psychoneuroendocrinology*, 65, pp. 54–66. doi:[10.1016/j.psyneuen.2015.11.021](https://doi.org/10.1016/j.psyneuen.2015.11.021).

- Andrade, R. and Haj-Dahmane, S. (2013) 'Serotonin Neuron Diversity in the Dorsal Raphe', *ACS Chemical Neuroscience*, 4(1), pp. 22–25. doi:[10.1021/cn300224n](https://doi.org/10.1021/cn300224n).
- Antoine, M.-H. *et al.* (2004) 'Tricyclic antidepressant imipramine reduces the insulin secretory rate in islet cells of Wistar albino rats through a calcium antagonistic action', *Diabetologia*, 47(5), pp. 909–916. doi:[10.1007/s00125-004-1384-9](https://doi.org/10.1007/s00125-004-1384-9).
- Arnold, S.E. *et al.* (2014) 'High fat diet produces brain insulin resistance, synaptodendritic abnormalities and altered behavior in mice', *Neurobiology of Disease*, 67, pp. 79–87. doi:[10.1016/j.nbd.2014.03.011](https://doi.org/10.1016/j.nbd.2014.03.011).
- Atkinson, M.A., Eisenbarth, G.S. and Michels, A.W. (2014) 'Type 1 diabetes', *The Lancet*, 383(9911), pp. 69–82. doi:[10.1016/S0140-6736\(13\)60591-7](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(13)60591-7).
- Atkinson, M.A. and Leiter, E.H. (1999) 'The NOD mouse model of type 1 diabetes: as good as it gets?', *Nature Medicine*, 5(6), pp. 601–604. doi:[10.1038/9442](https://doi.org/10.1038/9442).
- Attané, C. *et al.* (2012) 'Apelin treatment increases complete Fatty Acid oxidation, mitochondrial oxidative capacity, and biogenesis in muscle of insulin-resistant mice', *Diabetes*, 61(2), pp. 310–320. doi:[10.2337/db11-0100](https://doi.org/10.2337/db11-0100).
- Austin, S.A., Santhanam, A.V. and Katusic, Z.S. (2010) 'Endothelial nitric oxide modulates expression and processing of amyloid precursor protein', *Circulation Research*, 107(12), pp. 1498–1502. doi:[10.1161/CIRCRESAHA.110.233080](https://doi.org/10.1161/CIRCRESAHA.110.233080).
- Austin, S.A., d'Uscio, L.V. and Katusic, Z.S. (2013) 'Supplementation of nitric oxide attenuates A β PP and BACE1 protein in cerebral microcirculation of eNOS-deficient mice', *Journal of Alzheimer's disease: JAD*, 33(1), pp. 29–33. doi:[10.3233/JAD-2012-121351](https://doi.org/10.3233/JAD-2012-121351).
- Avgerinos, K.I. *et al.* (2018) 'Intranasal insulin in Alzheimer's dementia or mild cognitive impairment: a systematic review', *Journal of Neurology*, 265(7), pp. 1497–1510. doi:[10.1007/s00415-018-8768-0](https://doi.org/10.1007/s00415-018-8768-0).
- Awotidebe, T.O. *et al.* (2016) 'Knowledge, attitude and practice of exercise for plasma blood glucose control among patients with type-2 diabetes', *Diabetes & Metabolic Syndrome*, 10(2 Suppl 1), pp. S1-6. doi:[10.1016/j.dsx.2016.01.006](https://doi.org/10.1016/j.dsx.2016.01.006).
- Azizi, M. *et al.* (2008) 'Reciprocal Regulation of Plasma Apelin and Vasopressin by Osmotic Stimuli', *Journal of the American Society of Nephrology*, 19(5), pp. 1015–1024. doi:[10.1681/ASN.2007070816](https://doi.org/10.1681/ASN.2007070816).
- Azua, I.R. de *et al.* (2011) 'Novel insights into the function of β -cell M3 muscarinic acetylcholine receptors: therapeutic implications', *Trends in Endocrinology & Metabolism*, 22(2), pp. 74–80. doi:[10.1016/j.tem.2010.10.004](https://doi.org/10.1016/j.tem.2010.10.004).
- Balakumar, M. *et al.* (2016) 'High-fructose diet is as detrimental as high-fat diet in the induction of insulin resistance and diabetes mediated by hepatic/pancreatic endoplasmic reticulum (ER) stress', *Molecular and Cellular Biochemistry*, 423(1–2), pp. 93–104. doi:[10.1007/s11010-016-2828-5](https://doi.org/10.1007/s11010-016-2828-5).
- Banks, W.A. and Kastin, A.J. (1998) 'Differential permeability of the blood-brain barrier to two pancreatic peptides: insulin and amylin', *Peptides*, 19(5), pp. 883–889. doi:[10.1016/s0196-9781\(98\)00018-7](https://doi.org/10.1016/s0196-9781(98)00018-7).
- Barakat, M., DiPietro, L.A. and Chen, L. (2021) 'Limited Treatment Options for Diabetic Wounds: Barriers to Clinical Translation Despite Therapeutic Success in Murine Models', *Advances in Wound Care*, 10(8), pp. 436–460. doi:[10.1089/wound.2020.1254](https://doi.org/10.1089/wound.2020.1254).
- Barnes, N.M. and Sharp, T. (1999) 'A review of central 5-HT receptors and their function', *Neuropharmacology*, 38(8), pp. 1083–1152. doi:[10.1016/s0028-3908\(99\)00010-6](https://doi.org/10.1016/s0028-3908(99)00010-6).
- Barzilay, J.I. *et al.* (2001) 'The relation of markers of inflammation to the development of glucose disorders in the elderly: the Cardiovascular Health Study', *Diabetes*, 50(10), pp. 2384–2389. doi:[10.2337/diabetes.50.10.2384](https://doi.org/10.2337/diabetes.50.10.2384).
- Baskin, D.G. *et al.* (1986) 'Quantitative Autoradiographic Evidence for Insulin Receptors in the Choroid Plexus of the Rat Brain', *Diabetes*, 35(2), pp. 246–249. doi:[10.2337/diab.35.2.246](https://doi.org/10.2337/diab.35.2.246).

- Baura, G.D. *et al.* (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', *The Journal of Clinical Investigation*, 92(4), pp. 1824–1830. doi:[10.1172/JCI116773](https://doi.org/10.1172/JCI116773).
- Beattie, E.C. *et al.* (2000) 'Regulation of AMPA receptor endocytosis by a signaling mechanism shared with LTD', *Nature Neuroscience*, 3(12), pp. 1291–1300. doi:[10.1038/81823](https://doi.org/10.1038/81823).
- Bell, G.I. *et al.* (1980) 'Sequence of the human insulin gene', *Nature*, 284(5751), pp. 26–32. doi:[10.1038/284026a0](https://doi.org/10.1038/284026a0).
- Belmaker, R.H. and Agam, G. (2008) 'Major depressive disorder', *The New England Journal of Medicine*, 358(1), pp. 55–68. doi:[10.1056/NEJMra073096](https://doi.org/10.1056/NEJMra073096).
- Belmer, A. *et al.* (2018) 'Positive regulation of raphe serotonin neurons by serotonin 2B receptors', *Neuropsychopharmacology: Official Publication of the American College of Neuropsychopharmacology*, 43(7), pp. 1623–1632. doi:[10.1038/s41386-018-0013-0](https://doi.org/10.1038/s41386-018-0013-0).
- Belmer, A. and Maroteaux, L. (2019) 'Regulation of raphe serotonin neurons by serotonin 1A and 2B receptors', *Neuropsychopharmacology: Official Publication of the American College of Neuropsychopharmacology*, 44(1), pp. 218–219. doi:[10.1038/s41386-018-0214-6](https://doi.org/10.1038/s41386-018-0214-6).
- Benedict, C. *et al.* (2004) 'Intranasal insulin improves memory in humans', *Psychoneuroendocrinology*, 29(10), pp. 1326–1334. doi:[10.1016/j.psyneuen.2004.04.003](https://doi.org/10.1016/j.psyneuen.2004.04.003).
- Bennet, H. *et al.* (2015) 'Altered serotonin (5-HT) 1D and 2A receptor expression may contribute to defective insulin and glucagon secretion in human type 2 diabetes', *Peptides*, 71, pp. 113–120. doi:[10.1016/j.peptides.2015.07.008](https://doi.org/10.1016/j.peptides.2015.07.008).
- Bennet, H. *et al.* (2016) 'Serotonin (5-HT) receptor 2b activation augments glucose-stimulated insulin secretion in human and mouse islets of Langerhans', *Diabetologia*, 59(4), pp. 744–754. doi:[10.1007/s00125-015-3847-6](https://doi.org/10.1007/s00125-015-3847-6).
- Benoit, S.C. *et al.* (2002) 'The Catabolic Action of Insulin in the Brain Is Mediated by Melanocortins', *The Journal of Neuroscience*, 22(20), pp. 9048–9052. doi:[10.1523/JNEUROSCI.22-20-09048.2002](https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.22-20-09048.2002).
- Bentley, K.R. and Barnes, N.M. (1995) 'Therapeutic Potential of Serotonin 5-HT₃ Antagonists in Neuropsychiatric Disorders', *CNS Drugs*, 3(5), pp. 363–392. doi:[10.2165/00023210-199503050-00005](https://doi.org/10.2165/00023210-199503050-00005).
- Berta, J. *et al.* (2014) 'Apelin promotes lymphangiogenesis and lymph node metastasis', *Oncotarget*, 5(12), pp. 4426–4437. doi:[10.18632/oncotarget.2032](https://doi.org/10.18632/oncotarget.2032).
- Best, C.H. and Haist, R.E. (1941) 'The effect of insulin administration on the insulin content of the pancreas', *The Journal of Physiology*, 100(2), pp. 142–146. doi:[10.1113/jphysiol.1941.sp003930](https://doi.org/10.1113/jphysiol.1941.sp003930).
- Beurel, E., Toups, M. and Nemeroff, C.B. (2020) 'The Bidirectional Relationship of Depression and Inflammation: Double Trouble', *Neuron*, 107(2), pp. 234–256. doi:[10.1016/j.neuron.2020.06.002](https://doi.org/10.1016/j.neuron.2020.06.002).
- Biessels, G.J. *et al.* (1996) 'Place learning and hippocampal synaptic plasticity in streptozotocin-induced diabetic rats', *Diabetes*, 45(9), pp. 1259–1266. doi:[10.2337/diab.45.9.1259](https://doi.org/10.2337/diab.45.9.1259).
- Biessels, G.-J. *et al.* (1998) 'Water maze learning and hippocampal synaptic plasticity in streptozotocin-diabetic rats: effects of insulin treatment', *Brain Research*, 800(1), pp. 125–135. doi:[10.1016/S0006-8993\(98\)00510-1](https://doi.org/10.1016/S0006-8993(98)00510-1).
- Björnholm, M. *et al.* (2002) 'Absence of functional insulin receptor substrate-3 (IRS-3) gene in humans', *Diabetologia*, 45(12), pp. 1697–1702. doi:[10.1007/s00125-002-0945-z](https://doi.org/10.1007/s00125-002-0945-z).
- Blier, P. (2001) 'Pharmacology of rapid-onset antidepressant treatment strategies', *The Journal of Clinical Psychiatry*, 62 Suppl 15, pp. 12–17.
- Bockaert, J. *et al.* (2004) '5-HT₄ receptors', *Current Drug Targets -CNS and Neurological Disorders-*, 3(1), pp. 39–51. doi:[10.2174/1568007043482615](https://doi.org/10.2174/1568007043482615).
- Bockaert, J. *et al.* (2011) '5-HT₄ receptors, a place in the sun: act two', *Current Opinion in Pharmacology*, 11(1), pp. 87–93. doi:[10.1016/j.coph.2011.01.012](https://doi.org/10.1016/j.coph.2011.01.012).

- Bonaventure, P. *et al.* (2007) 'Selective blockade of 5-hydroxytryptamine (5-HT)₇ receptors enhances 5-HT transmission, antidepressant-like behavior, and rapid eye movement sleep suppression induced by citalopram in rodents', *The Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*, 321(2), pp. 690–698. doi:[10.1124/jpet.107.119404](https://doi.org/10.1124/jpet.107.119404).
- Bonner-Weir, S., Trent, D.F. and Weir, G.C. (1983) 'Partial pancreatectomy in the rat and subsequent defect in glucose-induced insulin release', *The Journal of Clinical Investigation*, 71(6), pp. 1544–1553. doi:[10.1172/jci110910](https://doi.org/10.1172/jci110910).
- Boothman, L.J., Mitchell, S.N. and Sharp, T. (2006) 'Investigation of the SSRI augmentation properties of 5-HT₂ receptor antagonists using in vivo microdialysis', *Neuropharmacology*, 50(6), pp. 726–732. doi:[10.1016/j.neuropharm.2005.11.020](https://doi.org/10.1016/j.neuropharm.2005.11.020).
- Bortolotto, C.F. *et al.* (2010) 'Involvement of potassium channels in the antidepressant-like effect of venlafaxine in mice', *Life Sciences*, 86(9–10), pp. 372–376. doi:[10.1016/j.lfs.2010.01.013](https://doi.org/10.1016/j.lfs.2010.01.013).
- Bortolin, R.C. *et al.* (2018) 'A new animal diet based on human Western diet is a robust diet-induced obesity model: comparison to high-fat and cafeteria diets in term of metabolic and gut microbiota disruption', *International Journal of Obesity*, 42(3), pp. 525–534. doi:[10.1038/ijo.2017.225](https://doi.org/10.1038/ijo.2017.225).
- Boucher, J. *et al.* (2005) 'Apelin, a Newly Identified Adipokine Up-Regulated by Insulin and Obesity', *Endocrinology*, 146(4), pp. 1764–1771. doi:[10.1210/en.2004-1427](https://doi.org/10.1210/en.2004-1427).
- Boucher, J., Kleinridders, A. and Kahn, C.R. (2014) 'Insulin receptor signaling in normal and insulin-resistant states', *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology*, 6(1), p. a009191. doi:[10.1101/cshperspect.a009191](https://doi.org/10.1101/cshperspect.a009191).
- Breder, C.D. *et al.* (1994) 'Regional induction of tumor necrosis factor alpha expression in the mouse brain after systemic lipopolysaccharide administration', *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 91(24), pp. 11393–11397. doi:[10.1073/pnas.91.24.11393](https://doi.org/10.1073/pnas.91.24.11393).
- Brenchat, A. *et al.* (2012) 'Assessment of 5-HT₇ Receptor Agonists Selectivity Using Nociceptive and Thermoregulation Tests in Knockout versus Wild-Type Mice', *Advances in Pharmacological Sciences*, 2012, p. 312041. doi:[10.1155/2012/312041](https://doi.org/10.1155/2012/312041).
- Brodsky, M. *et al.* (2016) 'Striatal 5-HT₆ Receptors Regulate Cocaine Reinforcement in a Pathway-Selective Manner', *Neuropsychopharmacology: Official Publication of the American College of Neuropsychopharmacology*, 41(9), pp. 2377–2387. doi:[10.1038/npp.2016.45](https://doi.org/10.1038/npp.2016.45).
- Bromet, E. *et al.* (2011) 'Cross-national epidemiology of DSM-IV major depressive episode', *BMC Medicine*, 9(1), p. 90. doi:[10.1186/1741-7015-9-90](https://doi.org/10.1186/1741-7015-9-90).
- Brown, M.S. and Goldstein, J.L. (2008) 'Selective versus Total Insulin Resistance: A Pathogenic Paradox', *Cell Metabolism*, 7(2), pp. 95–96. doi:[10.1016/j.cmet.2007.12.009](https://doi.org/10.1016/j.cmet.2007.12.009).
- Bruijnzeel, A.W. *et al.* (2011) 'Effects of insulin and leptin in the ventral tegmental area and arcuate hypothalamic nucleus on food intake and brain reward function in female rats', *Behavioural Brain Research*, 219(2), pp. 254–264. doi:[10.1016/j.bbr.2011.01.020](https://doi.org/10.1016/j.bbr.2011.01.020).
- Burguete-Garcia, A.I. *et al.* (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: Clinical and Experimental*, 59(1), pp. 38–45. doi:[10.1016/j.metabol.2009.07.007](https://doi.org/10.1016/j.metabol.2009.07.007).
- Cai, D. *et al.* (2003) 'Two new substrates in insulin signaling, IRS5/DOK4 and IRS6/DOK5', *The Journal of Biological Chemistry*, 278(28), pp. 25323–25330. doi:[10.1074/jbc.M212430200](https://doi.org/10.1074/jbc.M212430200).
- Cai, W. *et al.* (2018) 'Insulin regulates astrocyte gliotransmission and modulates behavior', *The Journal of Clinical Investigation*, 128(7), pp. 2914–2926. doi:[10.1172/JCI99366](https://doi.org/10.1172/JCI99366).
- Campana, M. *et al.* (2018) 'Inhibition of central de novo ceramide synthesis restores insulin signaling in hypothalamus and enhances β -cell function of obese Zucker rats', *Molecular Metabolism*, 8, pp. 23–36. doi:[10.1016/j.molmet.2017.10.013](https://doi.org/10.1016/j.molmet.2017.10.013).

- Canello, R. and Clément, K. (2006) 'Is obesity an inflammatory illness? Role of low-grade inflammation and macrophage infiltration in human white adipose tissue', *BJOG: an international journal of obstetrics and gynaecology*, 113(10), pp. 1141–1147. doi:[10.1111/j.1471-0528.2006.01004.x](https://doi.org/10.1111/j.1471-0528.2006.01004.x).
- Cantley, J. (2014) 'The control of insulin secretion by adipokines: current evidence for adipocyte-beta cell endocrine signalling in metabolic homeostasis', *Mammalian Genome*, 25(9–10), pp. 442–454. doi:[10.1007/s00335-014-9538-7](https://doi.org/10.1007/s00335-014-9538-7).
- Carabelli, B. *et al.* (2020) 'Fish-oil supplementation decreases Indoleamine-2,3-Dioxygenase expression and increases hippocampal serotonin levels in the LPS depression model', *Behavioural Brain Research*, 390, p. 112675. doi:[10.1016/j.bbr.2020.112675](https://doi.org/10.1016/j.bbr.2020.112675).
- Carrington, E.R., Shuman, C.R. and Reardon, H.S. (1957) 'Evaluation of the prediabetic state during pregnancy', *Obstetrics and Gynecology*, 9(6), pp. 664–669. doi:[10.1097/00006250-195706000-00008](https://doi.org/10.1097/00006250-195706000-00008).
- Casey, B.M. *et al.* (1997) 'Pregnancy outcomes in women with gestational diabetes compared with the general obstetric population', *Obstetrics and Gynecology*, 90(6), pp. 869–873. doi:[10.1016/s0029-7844\(97\)00542-5](https://doi.org/10.1016/s0029-7844(97)00542-5).
- Catalano, P.M. *et al.* (1991) 'Longitudinal changes in insulin release and insulin resistance in nonobese pregnant women', *American Journal of Obstetrics and Gynecology*, 165(6), pp. 1667–1672. doi:[10.1016/0002-9378\(91\)90012-G](https://doi.org/10.1016/0002-9378(91)90012-G).
- Cataldo Bascuñan, L.R. *et al.* (2019) 'Serotonergic regulation of insulin secretion', *Acta Physiologica*, 225(1), p. e13101. doi:[10.1111/apha.13101](https://doi.org/10.1111/apha.13101).
- Cataldo, L.R. *et al.* (2015) 'Fluoxetine impairs insulin secretion without modifying extracellular serotonin levels in MIN6 β -cells', *Experimental and Clinical Endocrinology & Diabetes: Official Journal, German Society of Endocrinology [and] German Diabetes Association*, 123(8), pp. 473–478. doi:[10.1055/s-0035-1549964](https://doi.org/10.1055/s-0035-1549964).
- Ceretta, L.B. *et al.* (2012) 'Imipramine treatment reverses depressive-like behavior in alloxan-diabetic rats', *Diabetes/Metabolism Research and Reviews*, 28(2), pp. 139–144. doi:[10.1002/dmrr.1285](https://doi.org/10.1002/dmrr.1285).
- Cha, D.S. *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', *Journal of Affective Disorders*, 210, pp. 57–65. doi:[10.1016/j.jad.2016.12.006](https://doi.org/10.1016/j.jad.2016.12.006).
- Chan, O. *et al.* (2002) 'Hyperactivation of the Hypothalamo-Pituitary-Adrenocortical Axis in Streptozotocin-Diabetes Is Associated with Reduced Stress Responsiveness and Decreased Pituitary and Adrenal Sensitivity', *Endocrinology*, 143(5), pp. 1761–1768. doi:[10.1210/endo.143.5.8809](https://doi.org/10.1210/endo.143.5.8809).
- Chaves-Almagro, C. *et al.* (2015) 'Apelin receptors: From signaling to antidiabetic strategy', *European Journal of Pharmacology*, 763, pp. 149–159. doi:[10.1016/j.ejphar.2015.05.017](https://doi.org/10.1016/j.ejphar.2015.05.017).
- Chiodini, I. *et al.* (2005) 'Association of subclinical hypercortisolism with type 2 diabetes mellitus: a case-control study in hospitalized patients', *European Journal of Endocrinology*, 153(6), pp. 837–844. doi:[10.1530/eje.1.02045](https://doi.org/10.1530/eje.1.02045).
- Chiucciariello, L. *et al.* (2014) 'Elevated Monoamine Oxidase A Binding During Major Depressive Episodes Is Associated with Greater Severity and Reversed Neurovegetative Symptoms', *Neuropsychopharmacology*, 39(4), pp. 973–980. doi:[10.1038/npp.2013.297](https://doi.org/10.1038/npp.2013.297).
- Chng, S.C. *et al.* (2013) 'ELABELA: a hormone essential for heart development signals via the apelin receptor', *Developmental Cell*, 27(6), pp. 672–680. doi:[10.1016/j.devcel.2013.11.002](https://doi.org/10.1016/j.devcel.2013.11.002).
- Christie, J.M., Wenthold, R.J. and Monaghan, D.T. (2001) 'Insulin Causes a Transient Tyrosine Phosphorylation of NR2A and NR2B NMDA Receptor Subunits in Rat Hippocampus', *Journal of Neurochemistry*, 72(4), pp. 1523–1528. doi:[10.1046/j.1471-4159.1999.721523.x](https://doi.org/10.1046/j.1471-4159.1999.721523.x).

- Chu, H. *et al.* (2017) 'Apelin-13 Protects against Ischemic Blood-Brain Barrier Damage through the Effects of Aquaporin-4', *Cerebrovascular Diseases (Basel, Switzerland)*, 44(1–2), pp. 10–25. doi:[10.1159/000460261](https://doi.org/10.1159/000460261).
- Clarke, K.J., Whitaker, K.W. and Reyes, T.M. (2009) 'Diminished metabolic responses to centrally-administered apelin-13 in diet-induced obese rats fed a high-fat diet', *Journal of Neuroendocrinology*, 21(2), pp. 83–89. doi:[10.1111/j.1365-2826.2008.01815.x](https://doi.org/10.1111/j.1365-2826.2008.01815.x).
- Clegg, D.J. *et al.* (2011) 'Consumption of a High-Fat Diet Induces Central Insulin Resistance Independent of Adiposity', *Physiology & behavior*, 103(1), pp. 10–16. doi:[10.1016/j.physbeh.2011.01.010](https://doi.org/10.1016/j.physbeh.2011.01.010).
- Colberg, S.R. *et al.* (2016) 'Physical Activity/Exercise and Diabetes: A Position Statement of the American Diabetes Association', *Diabetes Care*, 39(11), pp. 2065–2079. doi:[10.2337/dc16-1728](https://doi.org/10.2337/dc16-1728).
- Colditz, G.A. (1995) 'Weight Gain as a Risk Factor for Clinical Diabetes Mellitus in Women', *Annals of Internal Medicine*, 122(7), p. 481. doi:[10.7326/0003-4819-122-7-199504010-00001](https://doi.org/10.7326/0003-4819-122-7-199504010-00001).
- Compan, V. *et al.* (2004) '[Feeding disorders in 5-HT4 receptor knockout mice]', *Journal De La Societe De Biologie*, 198(1), pp. 37–49.
- Considine, R.V. *et al.* (1996) 'Serum immunoreactive-leptin concentrations in normal-weight and obese humans', *The New England Journal of Medicine*, 334(5), pp. 292–295. doi:[10.1056/NEJM199602013340503](https://doi.org/10.1056/NEJM199602013340503).
- Copps, K.D. and White, M.F. (2012) 'Regulation of insulin sensitivity by serine/threonine phosphorylation of insulin receptor substrate proteins IRS1 and IRS2', *Diabetologia*, 55(10), pp. 2565–2582. doi:[10.1007/s00125-012-2644-8](https://doi.org/10.1007/s00125-012-2644-8).
- Costall, B. and Naylor, R.J. (1992) 'Anxiolytic potential of 5-HT3 receptor antagonists', *Pharmacology & Toxicology*, 70(3), pp. 157–162. doi:[10.1111/j.1600-0773.1992.tb00448.x](https://doi.org/10.1111/j.1600-0773.1992.tb00448.x).
- Coulie, B. *et al.* (1998) '5-Hydroxytryptamine-1 receptor activation inhibits endocrine pancreatic secretion in humans', *The American Journal of Physiology*, 274(2), pp. E317-320. doi:[10.1152/ajpendo.1998.274.2.E317](https://doi.org/10.1152/ajpendo.1998.274.2.E317).
- Craft, S. *et al.* (1998) 'Cerebrospinal fluid and plasma insulin levels in Alzheimer's disease: relationship to severity of dementia and apolipoprotein E genotype', *Neurology*, 50(1), pp. 164–168. doi:[10.1212/wnl.50.1.164](https://doi.org/10.1212/wnl.50.1.164).
- Cremers, T.I.F.H. *et al.* (2004) 'Inactivation of 5-HT2C Receptors Potentiates Consequences of Serotonin Reuptake Blockade', *Neuropsychopharmacology*, 29(10), pp. 1782–1789. doi:[10.1038/sj.npp.1300474](https://doi.org/10.1038/sj.npp.1300474).
- Crescenzo, R. *et al.* (2013) 'Increased hepatic de novo lipogenesis and mitochondrial efficiency in a model of obesity induced by diets rich in fructose', *European Journal of Nutrition*, 52(2), pp. 537–545. doi:[10.1007/s00394-012-0356-y](https://doi.org/10.1007/s00394-012-0356-y).
- Cryan, J.F. and Leonard, B.E. (2000) '5-HT1A and beyond: the role of serotonin and its receptors in depression and the antidepressant response', *Human Psychopharmacology*, 15(2), pp. 113–135. doi:[10.1002/\(SICI\)1099-1077\(200003\)15:2<113::AID-HUP150>3.0.CO;2-W](https://doi.org/10.1002/(SICI)1099-1077(200003)15:2<113::AID-HUP150>3.0.CO;2-W).
- Cullinan, S.B. and Diehl, J.A. (2006) 'Coordination of ER and oxidative stress signaling: the PERK/Nrf2 signaling pathway', *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology*, 38(3), pp. 317–332. doi:[10.1016/j.biocel.2005.09.018](https://doi.org/10.1016/j.biocel.2005.09.018).
- Dai, T.-T. *et al.* (2018) 'Apelin-13 Upregulates BDNF Against Chronic Stress-induced Depression-like Phenotypes by Ameliorating HPA Axis and Hippocampal Glucocorticoid Receptor Dysfunctions', *Neuroscience*, 390, pp. 151–159. doi:[10.1016/j.neuroscience.2018.08.018](https://doi.org/10.1016/j.neuroscience.2018.08.018).
- el-Dakhakhny, M., Abdel el-Latif, H.A. and Ammon, H.P. (1996) 'Different effects of the antidepressant drugs imipramine, maprotiline and bupropion on insulin secretion from mouse pancreatic islets', *Arzneimittel-Forschung*, 46(7), pp. 667–669.
- D'Alessandris, C. *et al.* (2007) 'C-reactive protein induces phosphorylation of insulin receptor substrate-1 on Ser307 and Ser 612 in L6 myocytes, thereby impairing the insulin signalling pathway that

- promotes glucose transport', *Diabetologia*, 50(4), pp. 840–849. doi:[10.1007/s00125-006-0522-y](https://doi.org/10.1007/s00125-006-0522-y).
- Daly, B. *et al.* (2018) 'Increased risk of ischemic heart disease, hypertension, and type 2 diabetes in women with previous gestational diabetes mellitus, a target group in general practice for preventive interventions: A population-based cohort study', *PLoS medicine*, 15(1), p. e1002488. doi:[10.1371/journal.pmed.1002488](https://doi.org/10.1371/journal.pmed.1002488).
- Darcet, F. *et al.* (2016) 'Chronic 5-HT₄ receptor agonist treatment restores learning and memory deficits in a neuroendocrine mouse model of anxiety/depression', *Neuroscience Letters*, 616, pp. 197–203. doi:[10.1016/j.neulet.2016.01.055](https://doi.org/10.1016/j.neulet.2016.01.055).
- Daviaud, D. *et al.* (2006) 'TNF α up-regulates apelin expression in human and mouse adipose tissue', *FASEB journal: official publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology*, 20(9), pp. 1528–1530. doi:[10.1096/fj.05-5243fje](https://doi.org/10.1096/fj.05-5243fje).
- David, D.J. *et al.* (2016) 'Propriétés pharmacologiques de la vortioxetine et leurs conséquences pré-cliniques', *L'Encéphale*, 42(1), pp. 1S12-1S23. doi:[10.1016/S0013-7006\(16\)30015-X](https://doi.org/10.1016/S0013-7006(16)30015-X).
- David, D.J. and Gardier, A.M. (2016) 'Les bases de pharmacologie fondamentale du système sérotoninergique : application à la réponse antidépressive', *L'Encéphale*, 42(3), pp. 255–263. doi:[10.1016/j.encep.2016.03.012](https://doi.org/10.1016/j.encep.2016.03.012).
- De Luca, V. *et al.* (2007) 'Association of the HTR2C gene and antipsychotic induced weight gain: a meta-analysis', *The International Journal of Neuropsychopharmacology*, 10(5), pp. 697–704. doi:[10.1017/S1461145707007547](https://doi.org/10.1017/S1461145707007547).
- De Mota, N. *et al.* (2004) 'Apelin, a potent diuretic neuropeptide counteracting vasopressin actions through inhibition of vasopressin neuron activity and vasopressin release', *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 101(28), pp. 10464–10469. doi:[10.1073/pnas.0403518101](https://doi.org/10.1073/pnas.0403518101).
- De Mota, N., Lenkei, Z. and Llorens-Cortès, C. (2000) 'Cloning, pharmacological characterization and brain distribution of the rat apelin receptor', *Neuroendocrinology*, 72(6), pp. 400–407. doi:[10.1159/000054609](https://doi.org/10.1159/000054609).
- De Souza, L. *et al.* (2021) 'Impact of different fructose concentrations on metabolic and behavioral parameters of male and female mice', *Physiology & Behavior*, 228, p. 113187. doi:[10.1016/j.physbeh.2020.113187](https://doi.org/10.1016/j.physbeh.2020.113187).
- DeFronzo, R.A. *et al.* (2015) 'Type 2 diabetes mellitus', *Nature Reviews Disease Primers*, 1(1), p. 15019. doi:[10.1038/nrdp.2015.19](https://doi.org/10.1038/nrdp.2015.19).
- DeFronzo, R.A. and Tripathy, D. (2009) 'Skeletal muscle insulin resistance is the primary defect in type 2 diabetes', *Diabetes Care*, 32 Suppl 2, pp. S157-163. doi:[10.2337/dc09-S302](https://doi.org/10.2337/dc09-S302).
- Delanogare, E. *et al.* (2020) 'Enriched environment ameliorates dexamethasone effects on emotional reactivity and metabolic parameters in mice', *Stress (Amsterdam, Netherlands)*, 23(4), pp. 466–473. doi:[10.1080/10253890.2020.1735344](https://doi.org/10.1080/10253890.2020.1735344).
- Delgado, I. *et al.* (2018) 'Depressive symptoms in obesity: Relative contribution of low-grade inflammation and metabolic health', *Psychoneuroendocrinology*, 91, pp. 55–61. doi:[10.1016/j.psyneuen.2018.02.030](https://doi.org/10.1016/j.psyneuen.2018.02.030).
- Dencker, S.J. *et al.* (1966) 'ACID MONOAMINE METABOLITES OF CEREBROSPINAL FLUID IN MENTAL DEPRESSION AND MANIA', *Journal of Neurochemistry*, 13(12), pp. 1545–1548. doi:[10.1111/j.1471-4159.1966.tb04320.x](https://doi.org/10.1111/j.1471-4159.1966.tb04320.x).
- Descarries, L. *et al.* (1982) 'The serotonin neurons in nucleus raphe dorsalis of adult rat: a light and electron microscope radioautographic study', *The Journal of Comparative Neurology*, 207(3), pp. 239–254. doi:[10.1002/cne.902070305](https://doi.org/10.1002/cne.902070305).
- Di Giovanni, G. and De Deurwaerdère, P. (2016) 'New therapeutic opportunities for 5-HT_{2C} receptor ligands in neuropsychiatric disorders', *Pharmacology & Therapeutics*, 157, pp. 125–162. doi:[10.1016/j.pharmthera.2015.11.009](https://doi.org/10.1016/j.pharmthera.2015.11.009).

- Diaz, S.L. *et al.* (2012) ‘5-HT(2B) receptors are required for serotonin-selective antidepressant actions’, *Molecular Psychiatry*, 17(2), pp. 154–163. doi:[10.1038/mp.2011.159](https://doi.org/10.1038/mp.2011.159).
- Diaz, S.L. *et al.* (2016) ‘Mice lacking the serotonin 5-HT2B receptor as an animal model of resistance to selective serotonin reuptake inhibitors antidepressants’, *European Neuropsychopharmacology: The Journal of the European College of Neuropsychopharmacology*, 26(2), pp. 265–279. doi:[10.1016/j.euroneuro.2015.12.012](https://doi.org/10.1016/j.euroneuro.2015.12.012).
- Diaz-Valencia, P.A., Bougnères, P. and Valleron, A.-J. (2015) ‘Global epidemiology of type 1 diabetes in young adults and adults: a systematic review’, *BMC Public Health*, 15(1), p. 255. doi:[10.1186/s12889-015-1591-y](https://doi.org/10.1186/s12889-015-1591-y).
- Dinel, A.-L. *et al.* (2011) ‘Cognitive and emotional alterations are related to hippocampal inflammation in a mouse model of metabolic syndrome’, *PloS One*, 6(9), p. e24325. doi:[10.1371/journal.pone.0024325](https://doi.org/10.1371/journal.pone.0024325).
- Dinel, A.-L. *et al.* (2014) ‘Lipopolysaccharide-induced brain activation of the indoleamine 2,3-dioxygenase and depressive-like behavior are impaired in a mouse model of metabolic syndrome’, *Psychoneuroendocrinology*, 40, pp. 48–59. doi:[10.1016/j.psyneuen.2013.10.014](https://doi.org/10.1016/j.psyneuen.2013.10.014).
- Djillani, A. *et al.* (2017) ‘Shortened Spadin Analogs Display Better TREK-1 Inhibition, In Vivo Stability and Antidepressant Activity’, *Frontiers in Pharmacology*, 8, p. 643. doi:[10.3389/fphar.2017.00643](https://doi.org/10.3389/fphar.2017.00643).
- Dludla, P.V. *et al.* (2021) ‘Adipokines as a therapeutic target by metformin to improve metabolic function: A systematic review of randomized controlled trials’, *Pharmacological Research*, 163, p. 105219. doi:[10.1016/j.phrs.2020.105219](https://doi.org/10.1016/j.phrs.2020.105219).
- Do, M. *et al.* (2018) ‘High-Glucose or -Fructose Diet Cause Changes of the Gut Microbiota and Metabolic Disorders in Mice without Body Weight Change’, *Nutrients*, 10(6), p. 761. doi:[10.3390/nu10060761](https://doi.org/10.3390/nu10060761).
- Doczy, E.J. *et al.* (2009) ‘Hypothalamo-Pituitary-Adrenocortical Axis, Glucocorticoids, and Neurologic Disease’, *Immunology and Allergy Clinics of North America*, 29(2), pp. 265–284. doi:[10.1016/j.iac.2009.02.003](https://doi.org/10.1016/j.iac.2009.02.003).
- Dominguez, H. *et al.* (2005) ‘Metabolic and vascular effects of tumor necrosis factor-alpha blockade with etanercept in obese patients with type 2 diabetes’, *Journal of Vascular Research*, 42(6), pp. 517–525. doi:[10.1159/000088261](https://doi.org/10.1159/000088261).
- Dray, C. *et al.* (2008) ‘Apelin Stimulates Glucose Utilization in Normal and Obese Insulin-Resistant Mice’, *Cell Metabolism*, 8(5), pp. 437–445. doi:[10.1016/j.cmet.2008.10.003](https://doi.org/10.1016/j.cmet.2008.10.003).
- Dray, C. *et al.* (2010) ‘Apelin and APJ regulation in adipose tissue and skeletal muscle of type 2 diabetic mice and humans’, *American Journal of Physiology. Endocrinology and Metabolism*, 298(6), pp. E1161–1169. doi:[10.1152/ajpendo.00598.2009](https://doi.org/10.1152/ajpendo.00598.2009).
- Dray, C. *et al.* (2013) ‘The intestinal glucose-apelin cycle controls carbohydrate absorption in mice’, *Gastroenterology*, 144(4), pp. 771–780. doi:[10.1053/j.gastro.2013.01.004](https://doi.org/10.1053/j.gastro.2013.01.004).
- Dremencov, E., El Mansari, M. and Blier, P. (2007) ‘Distinct electrophysiological effects of paliperidone and risperidone on the firing activity of rat serotonin and norepinephrine neurons’, *Psychopharmacology*, 194(1), pp. 63–72. doi:[10.1007/s00213-007-0818-8](https://doi.org/10.1007/s00213-007-0818-8).
- Drougard, A. *et al.* (2014) ‘Hypothalamic Apelin/Reactive Oxygen Species Signaling Controls Hepatic Glucose Metabolism in the Onset of Diabetes’, *Antioxidants & Redox Signaling*, 20(4), pp. 557–573. doi:[10.1089/ars.2013.5182](https://doi.org/10.1089/ars.2013.5182).
- Du, R.-W. and Bu, W.-G. (2020) ‘Metformin improves depressive-like symptoms in mice via inhibition of peripheral and central NF-κB-NLRP3 inflammation activation’, *Experimental Brain Research*, 238(11), pp. 2549–2556. doi:[10.1007/s00221-020-05911-x](https://doi.org/10.1007/s00221-020-05911-x).
- Duan, J. *et al.* (2019) ‘Neuroprotective effect of Apelin 13 on ischemic stroke by activating AMPK/GSK-3β/Nrf2 signaling’, *Journal of Neuroinflammation*, 16(1), p. 24. doi:[10.1186/s12974-019-1406-7](https://doi.org/10.1186/s12974-019-1406-7).

- Duffy, K.R. and Pardridge, W.M. (1987) 'Blood-brain barrier transcytosis of insulin in developing rabbits', *Brain Research*, 420(1), pp. 32–38. doi:[10.1016/0006-8993\(87\)90236-8](https://doi.org/10.1016/0006-8993(87)90236-8).
- Duncan, B.B. *et al.* (2003) 'Low-grade systemic inflammation and the development of type 2 diabetes: the atherosclerosis risk in communities study', *Diabetes*, 52(7), pp. 1799–1805. doi:[10.2337/diabetes.52.7.1799](https://doi.org/10.2337/diabetes.52.7.1799).
- Duparc, T. *et al.* (2011) 'Central Apelin Controls Glucose Homeostasis via a Nitric Oxide-Dependent Pathway in Mice', *Antioxidants & Redox Signaling*, 15(6), pp. 1477–1496. doi:[10.1089/ars.2010.3454](https://doi.org/10.1089/ars.2010.3454).
- Dutheil, S. *et al.* (2016) 'High-Fat Diet Induced Anxiety and Anhedonia: Impact on Brain Homeostasis and Inflammation', *Neuropsychopharmacology*, 41(7), pp. 1874–1887. doi:[10.1038/npp.2015.357](https://doi.org/10.1038/npp.2015.357).
- Duvill  , B. *et al.* (2002) 'Increased Islet Cell Proliferation, Decreased Apoptosis, and Greater Vascularization Leading to β -Cell Hyperplasia in Mutant Mice Lacking Insulin', *Endocrinology*, 143(4), pp. 1530–1537. doi:[10.1210/endo.143.4.8753](https://doi.org/10.1210/endo.143.4.8753).
- Eck, M.J. *et al.* (1996) 'Structure of the IRS-1 PTB domain bound to the juxtamembrane region of the insulin receptor', *Cell*, 85(5), pp. 695–705. doi:[10.1016/s0092-8674\(00\)81236-2](https://doi.org/10.1016/s0092-8674(00)81236-2).
- Ekkiolm, R., Eicsox, L.E. and Lundquist, I. (1971) 'Monoamines in the pancreatic islets of the mouse', 7(5), p. 10.
- El Yacoubi, M. *et al.* (2003) 'Behavioral, neurochemical, and electrophysiological characterization of a genetic mouse model of depression', *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 100(10), pp. 6227–6232. doi:[10.1073/pnas.1034823100](https://doi.org/10.1073/pnas.1034823100).
- Elgee, N.J., Williams, R.H. and Lee, N.D. (1954) 'Distribution and Degradation Studies with Insulin-I131', *Journal of Clinical Investigation*, 33(9), pp. 1252–1260.
- Eliwa, H. *et al.* (2021) 'Adult neurogenesis augmentation attenuates anhedonia and HPA axis dysregulation in a mouse model of chronic stress and depression', *Psychoneuroendocrinology*, 124, p. 105097. doi:[10.1016/j.psyneuen.2020.105097](https://doi.org/10.1016/j.psyneuen.2020.105097).
- Elsner, M. *et al.* (2000) 'Relative importance of transport and alkylation for pancreatic beta-cell toxicity of streptozotocin', *Diabetologia*, 43(12), pp. 1528–1533. doi:[10.1007/s001250051564](https://doi.org/10.1007/s001250051564).
- Emilsson, V. *et al.* (1997) 'Expression of the Functional Leptin Receptor mRNA in Pancreatic Islets and Direct Inhibitory Action of Leptin on Insulin Secretion', *Diabetes*, 46(2), pp. 313–316. doi:[10.2337/diab.46.2.313](https://doi.org/10.2337/diab.46.2.313).
- Erlander, M.G. *et al.* (1993) 'Two members of a distinct subfamily of 5-hydroxytryptamine receptors differentially expressed in rat brain', *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 90(8), pp. 3452–3456. doi:[10.1073/pnas.90.8.3452](https://doi.org/10.1073/pnas.90.8.3452).
- Escribano, O. *et al.* (2017) 'The Role of Insulin Receptor Isoforms in Diabetes and Its Metabolic and Vascular Complications', *Journal of Diabetes Research*, 2017, pp. 1–12. doi:[10.1155/2017/1403206](https://doi.org/10.1155/2017/1403206).
- 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 Research Bulletin*, 137, pp. 265–276. doi:[10.1016/j.brainresbull.2018.01.001](https://doi.org/10.1016/j.brainresbull.2018.01.001).
- Evans, J.L., Maddux, B.A. and Goldfine, I.D. (2005) 'The molecular basis for oxidative stress-induced insulin resistance', *Antioxidants & Redox Signaling*, 7(7–8), pp. 1040–1052. doi:[10.1089/ars.2005.7.1040](https://doi.org/10.1089/ars.2005.7.1040).
- Falck, B. and Hellman, B. (1963) 'Evidence for the presence of biogenic amines in pancreatic islets', *Experientia*, 19(3), pp. 139–140. doi:[10.1007/BF02171596](https://doi.org/10.1007/BF02171596).
- Fan, J. *et al.* (2018) 'SIRT1 Mediates Apelin-13 in Ameliorating Chronic Normobaric Hypoxia-induced Anxiety-like Behavior by Suppressing NF- κ B Pathway in Mice Hippocampus', *Neuroscience*, 381, pp. 22–34. doi:[10.1016/j.neuroscience.2018.04.013](https://doi.org/10.1016/j.neuroscience.2018.04.013).

- Fan, Y. *et al.* (2010) 'Lysine 63-linked polyubiquitination of TAK1 at lysine 158 is required for tumor necrosis factor alpha- and interleukin-1beta-induced IKK/NF-kappaB and JNK/AP-1 activation', *The Journal of Biological Chemistry*, 285(8), pp. 5347–5360. doi:[10.1074/jbc.M109.076976](https://doi.org/10.1074/jbc.M109.076976).
- Fang, W. *et al.* (2020) 'Metformin ameliorates stress-induced depression-like behaviors via enhancing the expression of BDNF by activating AMPK/CREB-mediated histone acetylation', *Journal of Affective Disorders*, 260, pp. 302–313. doi:[10.1016/j.jad.2019.09.013](https://doi.org/10.1016/j.jad.2019.09.013).
- Faye, C. *et al.* (2020) 'Rapid Anxiolytic Effects of RS67333, a Serotonin Type 4 Receptor Agonist, and Diazepam, a Benzodiazepine, Are Mediated by Projections From the Prefrontal Cortex to the Dorsal Raphe Nucleus', *Biological Psychiatry*, 87(6), pp. 514–525. doi:[10.1016/j.biopsych.2019.08.009](https://doi.org/10.1016/j.biopsych.2019.08.009).
- Felger, J.C. and Lotrich, F.E. (2013) 'Inflammatory cytokines in depression: neurobiological mechanisms and therapeutic implications', *Neuroscience*, 246, pp. 199–229. doi:[10.1016/j.neuroscience.2013.04.060](https://doi.org/10.1016/j.neuroscience.2013.04.060).
- Fernandez, S.P. *et al.* (2016) 'Multiscale single-cell analysis reveals unique phenotypes of raphe 5-HT neurons projecting to the forebrain', *Brain Structure and Function*, 221(8), pp. 4007–4025. doi:[10.1007/s00429-015-1142-4](https://doi.org/10.1007/s00429-015-1142-4).
- Fernandez, S.P. and Gaspar, P. (2012) 'Investigating anxiety and depressive-like phenotypes in genetic mouse models of serotonin depletion', *Neuropharmacology*, 62(1), pp. 144–154. doi:[10.1016/j.neuropharm.2011.08.049](https://doi.org/10.1016/j.neuropharm.2011.08.049).
- Fierros-Campuzano, J. *et al.* (2020) 'Irreversible hippocampal changes induced by high fructose diet in rats', *Nutritional Neuroscience*, pp. 1–13. doi:[10.1080/1028415X.2020.1853418](https://doi.org/10.1080/1028415X.2020.1853418).
- Figlewicz, D.P. *et al.* (2003) 'Expression of receptors for insulin and leptin in the ventral tegmental area/substantia nigra (VTA/SN) of the rat', *Brain Research*, 964(1), pp. 107–115. doi:[10.1016/S0006-8993\(02\)04087-8](https://doi.org/10.1016/S0006-8993(02)04087-8).
- Filatova, E.V., Shadrina, M.I. and Slominsky, P.A. (2021) 'Major Depression: One Brain, One Disease, One Set of Intertwined Processes', *Cells*, 10(6), p. 1283. doi:[10.3390/cells10061283](https://doi.org/10.3390/cells10061283).
- Finger, B.C., Dinan, T.G. and Cryan, J.F. (2010) 'Leptin-deficient mice retain normal appetitive spatial learning yet exhibit marked increases in anxiety-related behaviours', *Psychopharmacology*, 210(4), pp. 559–568. doi:[10.1007/s00213-010-1858-z](https://doi.org/10.1007/s00213-010-1858-z).
- Fiorentino, T.V. *et al.* (2013) 'Hyperglycemia-induced oxidative stress and its role in diabetes mellitus related cardiovascular diseases', *Current Pharmaceutical Design*, 19(32), pp. 5695–5703. doi:[10.2174/1381612811319320005](https://doi.org/10.2174/1381612811319320005).
- Fordahl, S.C. and Jones, S.R. (2017) 'High-Fat-Diet-Induced Deficits in Dopamine Terminal Function Are Reversed by Restoring Insulin Signaling', *ACS Chemical Neuroscience*, 8(2), pp. 290–299. doi:[10.1021/acschemneuro.6b00308](https://doi.org/10.1021/acschemneuro.6b00308).
- Foretz, M. *et al.* (2014) 'Metformin: from mechanisms of action to therapies', *Cell Metabolism*, 20(6), pp. 953–966. doi:[10.1016/j.cmet.2014.09.018](https://doi.org/10.1016/j.cmet.2014.09.018).
- Frampton, J.E. (2016) 'Vortioxetine: A Review in Cognitive Dysfunction in Depression', *Drugs*, 76(17), pp. 1675–1682. doi:[10.1007/s40265-016-0655-3](https://doi.org/10.1007/s40265-016-0655-3).
- Frölich, L. *et al.* (1998) 'Brain insulin and insulin receptors in aging and sporadic Alzheimer's disease', *Journal of Neural Transmission*, 105(4), p. 423. doi:[10.1007/s007020050068](https://doi.org/10.1007/s007020050068).
- Fulton, M. and Srinivasan, V.N. (2021) 'Obesity, Stigma And Discrimination', in *StatPearls*. Treasure Island (FL): StatPearls Publishing. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK554571/> (Accessed: 1 November 2021).
- Ganic, E. *et al.* (2015) 'Islet-specific monoamine oxidase A and B expression depends on MafA transcriptional activity and is compromised in type 2 diabetes', *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 468(4), pp. 629–635. doi:[10.1016/j.bbrc.2015.11.002](https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2015.11.002).

- Garwood, C.J. *et al.* (2015) ‘Insulin and IGF1 signalling pathways in human astrocytes in vitro and in vivo; characterisation, subcellular localisation and modulation of the receptors’, *Molecular Brain*, 8(1), p. 51. doi:[10.1186/s13041-015-0138-6](https://doi.org/10.1186/s13041-015-0138-6).
- Gassaway, B.M. *et al.* (2018) ‘PKC ϵ contributes to lipid-induced insulin resistance through cross talk with p70S6K and through previously unknown regulators of insulin signaling’, *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 115(38), pp. E8996–E9005. doi:[10.1073/pnas.1804379115](https://doi.org/10.1073/pnas.1804379115).
- Gelling, R.W. *et al.* (2006) ‘Insulin action in the brain contributes to glucose lowering during insulin treatment of diabetes’, *Cell Metabolism*, 3(1), pp. 67–73. doi:[10.1016/j.cmet.2005.11.013](https://doi.org/10.1016/j.cmet.2005.11.013).
- Gervasoni, D. *et al.* (2000) ‘Role and origin of the GABAergic innervation of dorsal raphe serotonergic neurons’, *The Journal of Neuroscience: The Official Journal of the Society for Neuroscience*, 20(11), pp. 4217–4225.
- Glassford, A.J. *et al.* (2007) ‘HIF-1 regulates hypoxia- and insulin-induced expression of apelin in adipocytes’, *American Journal of Physiology. Endocrinology and Metabolism*, 293(6), pp. E1590–1596. doi:[10.1152/ajpendo.00490.2007](https://doi.org/10.1152/ajpendo.00490.2007).
- Gok Oguz, E. *et al.* (2016) ‘Serum apelin is associated with affective disorders in peritoneal dialysis patients’, *Renal Failure*, 38(7), pp. 1059–1066. doi:[10.1080/0886022X.2016.1193873](https://doi.org/10.1080/0886022X.2016.1193873).
- Gomes, J.M.G., Costa, J. de A. and Alfenas, R. de C.G. (2017) ‘Metabolic endotoxemia and diabetes mellitus: A systematic review’, *Metabolism: Clinical and Experimental*, 68, pp. 133–144. doi:[10.1016/j.metabol.2016.12.009](https://doi.org/10.1016/j.metabol.2016.12.009).
- González-Maeso, J. *et al.* (2007) ‘Hallucinogens recruit specific cortical 5-HT(2A) receptor-mediated signaling pathways to affect behavior’, *Neuron*, 53(3), pp. 439–452. doi:[10.1016/j.neuron.2007.01.008](https://doi.org/10.1016/j.neuron.2007.01.008).
- Gourdy, P. *et al.* (2018) ‘Apelin administration improves insulin sensitivity in overweight men during hyperinsulinaemic-euglycaemic clamp’, *Diabetes, Obesity and Metabolism*, 20(1), pp. 157–164. doi:[10.1111/dom.13055](https://doi.org/10.1111/dom.13055).
- Grace, A.A. and Bunney, B.S. (1983) ‘Intracellular and extracellular electrophysiology of nigral dopaminergic neurons--3. Evidence for electrotonic coupling’, *Neuroscience*, 10(2), pp. 333–348. doi:[10.1016/0306-4522\(83\)90137-9](https://doi.org/10.1016/0306-4522(83)90137-9).
- Grailhe, R. *et al.* (1999) ‘Increased exploratory activity and altered response to LSD in mice lacking the 5-HT(5A) receptor’, *Neuron*, 22(3), pp. 581–591. doi:[10.1016/s0896-6273\(00\)80712-6](https://doi.org/10.1016/s0896-6273(00)80712-6).
- Grant, P., Lipscomb, D. and Quin, J. (2011) ‘Psychological and quality of life changes in patients using GLP-1 analogues’, *Journal of Diabetes and Its Complications*, 25(4), pp. 244–246. doi:[10.1016/j.jdiacomp.2011.03.002](https://doi.org/10.1016/j.jdiacomp.2011.03.002).
- Gray, S.M., Aylor, K.W. and Barrett, E.J. (2017) ‘Unravelling the regulation of insulin transport across the brain endothelial cell’, *Diabetologia*, 60(8), pp. 1512–1521. doi:[10.1007/s00125-017-4285-4](https://doi.org/10.1007/s00125-017-4285-4).
- Griffin, M.E. *et al.* (1999) ‘Free fatty acid-induced insulin resistance is associated with activation of protein kinase C theta and alterations in the insulin signaling cascade’, *Diabetes*, 48(6), pp. 1270–1274. doi:[10.2337/diabetes.48.6.1270](https://doi.org/10.2337/diabetes.48.6.1270).
- Grychowska, K. *et al.* (2019) ‘Dual 5-HT₆ and D₃ Receptor Antagonists in a Group of 1H-Pyrrolo[3,2-c]quinolines with Neuroprotective and Procognitive Activity’, *ACS chemical neuroscience*, 10(7), pp. 3183–3196. doi:[10.1021/acscchemneuro.8b00618](https://doi.org/10.1021/acscchemneuro.8b00618).
- Guest, P.C. (2019) ‘Characterization of the Goto-Kakizaki (GK) Rat Model of Type 2 Diabetes’, in Guest, P.C. (ed.) *Pre-Clinical Models*. New York, NY: Springer New York (Methods in Molecular Biology), pp. 203–211. doi:[10.1007/978-1-4939-8994-2_19](https://doi.org/10.1007/978-1-4939-8994-2_19).
- Guilloux, J.-P. *et al.* (2011) ‘Integrated behavioral z-scoring increases the sensitivity and reliability of behavioral phenotyping in mice: relevance to emotionality and sex’, *Journal of Neuroscience Methods*, 197(1), pp. 21–31. doi:[10.1016/j.jneumeth.2011.01.019](https://doi.org/10.1016/j.jneumeth.2011.01.019).

- Guo, C.-J. *et al.* (2019) 'Puerarin alleviates streptozotocin (STZ)-induced osteoporosis in rats through suppressing inflammation and apoptosis via HDAC1/HDAC3 signaling', *Biomedicine & Pharmacotherapy*, 115, p. 108570. doi:[10.1016/j.biopha.2019.01.031](https://doi.org/10.1016/j.biopha.2019.01.031).
- Guo, L. *et al.* (2009) 'Apelin inhibits insulin secretion in pancreatic beta-cells by activation of PI3-kinase-phosphodiesterase 3B', *Endocrine Research*, 34(4), pp. 142–154. doi:[10.3109/07435800903287079](https://doi.org/10.3109/07435800903287079).
- Guo, M. *et al.* (2014) 'Metformin may produce antidepressant effects through improvement of cognitive function among depressed patients with diabetes mellitus', *Clinical and Experimental Pharmacology & Physiology*, 41(9), pp. 650–656. doi:[10.1111/1440-1681.12265](https://doi.org/10.1111/1440-1681.12265).
- Guo, S. (2014) 'Insulin signaling, resistance, and the metabolic syndrome: insights from mouse models into disease mechanisms', *The Journal of Endocrinology*, 220(2), pp. T1–T23. doi:[10.1530/JOE-13-0327](https://doi.org/10.1530/JOE-13-0327).
- Gupta, D., Kurhe, Y. and Radhakrishnan, M. (2014) 'Antidepressant effects of insulin in streptozotocin induced diabetic mice: Modulation of brain serotonin system', *Physiology & Behavior*, 129, pp. 73–78. doi:[10.1016/j.physbeh.2014.02.036](https://doi.org/10.1016/j.physbeh.2014.02.036).
- Gupta, D., Prabhakar, V. and Radhakrishnan, M. (2016) '5HT3 receptors: Target for new antidepressant drugs', *Neuroscience and Biobehavioral Reviews*, 64, pp. 311–325. doi:[10.1016/j.neubiorev.2016.03.001](https://doi.org/10.1016/j.neubiorev.2016.03.001).
- Gupta, D., Radhakrishnan, M. and Kurhe, Y. (2014) 'Insulin reverses anxiety-like behavior evoked by streptozotocin-induced diabetes in mice', *Metabolic Brain Disease*, 29(3), pp. 737–746. doi:[10.1007/s11011-014-9540-5](https://doi.org/10.1007/s11011-014-9540-5).
- Guscott, M. *et al.* (2005) 'Genetic knockout and pharmacological blockade studies of the 5-HT7 receptor suggest therapeutic potential in depression', *Neuropharmacology*, 48(4), pp. 492–502. doi:[10.1016/j.neuropharm.2004.11.015](https://doi.org/10.1016/j.neuropharm.2004.11.015).
- Gylfe, E. (1978) 'ASSOCIATION BETWEEN 5-HYDROXYTRYPTAMINE RELEASE AND INSULIN SECRETION', *Journal of Endocrinology*, 78(2), pp. 239–248. doi:[10.1677/joe.0.0780239](https://doi.org/10.1677/joe.0.0780239).
- Hache, G. *et al.* (2012) 'Antinociceptive effects of fluoxetine in a mouse model of anxiety/depression', *Neuroreport*, 23(9), pp. 525–529. doi:[10.1097/WNR.0b013e328353d70a](https://doi.org/10.1097/WNR.0b013e328353d70a).
- Hadden, D.R. (2008) 'Prediabetes and the big baby', *Diabetic Medicine: A Journal of the British Diabetic Association*, 25(1), pp. 1–10. doi:[10.1111/j.1464-5491.2007.02331.x](https://doi.org/10.1111/j.1464-5491.2007.02331.x).
- Haeusler, R.A., McGraw, T.E. and Accili, D. (2018) 'Biochemical and cellular properties of insulin receptor signalling', *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, 19(1), pp. 31–44. doi:[10.1038/nrm.2017.89](https://doi.org/10.1038/nrm.2017.89).
- Hagena, H. and Manahan-Vaughan, D. (2017) 'The serotonergic 5-HT4 receptor: A unique modulator of hippocampal synaptic information processing and cognition', *Neurobiology of Learning and Memory*, 138, pp. 145–153. doi:[10.1016/j.nlm.2016.06.014](https://doi.org/10.1016/j.nlm.2016.06.014).
- Haghparast, E. *et al.* (2018) 'Apelin-13 ameliorates cognitive impairments in 6-hydroxydopamine-induced substantia nigra lesion in rats', *Neuropeptides*, 68, pp. 28–35. doi:[10.1016/j.npep.2018.01.001](https://doi.org/10.1016/j.npep.2018.01.001).
- Haj-Dahmane, S. (2001) 'D2-like dopamine receptor activation excites rat dorsal raphe 5-HT neurons in vitro', *The European Journal of Neuroscience*, 14(1), pp. 125–134. doi:[10.1046/j.0953-816x.2001.01616.x](https://doi.org/10.1046/j.0953-816x.2001.01616.x).
- Halberstadt, A.L. *et al.* (2020) 'Correlation between the potency of hallucinogens in the mouse head-twitch response assay and their behavioral and subjective effects in other species', *Neuropharmacology*, 167, p. 107933. doi:[10.1016/j.neuropharm.2019.107933](https://doi.org/10.1016/j.neuropharm.2019.107933).
- Hallschmid, M. (2021) 'Intranasal Insulin for Alzheimer's Disease', *CNS Drugs*, 35(1), pp. 21–37. doi:[10.1007/s40263-020-00781-x](https://doi.org/10.1007/s40263-020-00781-x).
- Hamon, M. (1994) 'Neuropharmacology of anxiety: perspectives and prospects', *Trends in Pharmacological Sciences*, 15(2), pp. 36–39. doi:[10.1016/0165-6147\(94\)90104-x](https://doi.org/10.1016/0165-6147(94)90104-x).

- Hamon, M. and Blier, P. (2013) 'Monoamine neurocircuitry in depression and strategies for new treatments', *Progress in Neuro-Psychopharmacology and Biological Psychiatry*, 45, pp. 54–63. doi:[10.1016/j.pnpbp.2013.04.009](https://doi.org/10.1016/j.pnpbp.2013.04.009).
- Han, S. *et al.* (2008) 'Involvement of a Stat3 binding site in inflammation-induced enteric apelin expression', *American Journal of Physiology-Gastrointestinal and Liver Physiology*, 295(5), pp. G1068–G1078. doi:[10.1152/ajpgi.90493.2008](https://doi.org/10.1152/ajpgi.90493.2008).
- Hançer, N.J. *et al.* (2014) 'Insulin and metabolic stress stimulate multisite serine/threonine phosphorylation of insulin receptor substrate 1 and inhibit tyrosine phosphorylation', *The Journal of Biological Chemistry*, 289(18), pp. 12467–12484. doi:[10.1074/jbc.M114.554162](https://doi.org/10.1074/jbc.M114.554162).
- Hancock, M.L. *et al.* (2019) 'Insulin Receptor Associates with Promoters Genome-wide and Regulates Gene Expression', *Cell*, 177(3), pp. 722–736.e22. doi:[10.1016/j.cell.2019.02.030](https://doi.org/10.1016/j.cell.2019.02.030).
- Harder, T. *et al.* (2001) 'Pancreatic islet transplantation in diabetic pregnant rats prevents acquired malformation of the ventromedial hypothalamic nucleus in their offspring', *Neuroscience Letters*, 299(1–2), pp. 85–88. doi:[10.1016/s0304-3940\(01\)01495-1](https://doi.org/10.1016/s0304-3940(01)01495-1).
- Harrell, A.V. and Allan, A.M. (2003) 'Improvements in hippocampal-dependent learning and decremental attention in 5-HT(3) receptor overexpressing mice', *Learning & Memory (Cold Spring Harbor, N.Y.)*, 10(5), pp. 410–419. doi:[10.1101/lm.56103](https://doi.org/10.1101/lm.56103).
- Hassan, A.M. *et al.* (2019) 'High-fat diet induces depression-like behaviour in mice associated with changes in microbiome, neuropeptide Y, and brain metabolome', *Nutritional Neuroscience*, 22(12), pp. 877–893. doi:[10.1080/1028415X.2018.1465713](https://doi.org/10.1080/1028415X.2018.1465713).
- Haugaard, N. *et al.* (1954) 'Studies of radioactive injected labeled insulin', *The Journal of Biological Chemistry*, 208(2), pp. 549–563.
- Havel, P.J. *et al.* (1998) 'Marked and rapid decreases of circulating leptin in streptozotocin diabetic rats: reversal by insulin', *American Journal of Physiology-Regulatory, Integrative and Comparative Physiology*, 274(5), pp. R1482–R1491. doi:[10.1152/ajpregu.1998.274.5.R1482](https://doi.org/10.1152/ajpregu.1998.274.5.R1482).
- Havrankova, J., Roth, J. and Brownstein, M. (1978) 'Insulin receptors are widely distributed in the central nervous system of the rat', *Nature*, 272(5656), pp. 827–829. doi:[10.1038/272827a0](https://doi.org/10.1038/272827a0).
- Hedlund, P.B. *et al.* (2005) '5-HT7 receptor inhibition and inactivation induce antidepressantlike behavior and sleep pattern', *Biological Psychiatry*, 58(10), pp. 831–837. doi:[10.1016/j.biopsych.2005.05.012](https://doi.org/10.1016/j.biopsych.2005.05.012).
- Heilbronn, L.K. and Campbell, L.V. (2008) 'Adipose tissue macrophages, low grade inflammation and insulin resistance in human obesity', *Current Pharmaceutical Design*, 14(12), pp. 1225–1230. doi:[10.2174/138161208784246153](https://doi.org/10.2174/138161208784246153).
- Heils, A. *et al.* (2002) 'Allelic Variation of Human Serotonin Transporter Gene Expression', *Journal of Neurochemistry*, 66(6), pp. 2621–2624. doi:[10.1046/j.1471-4159.1996.66062621.x](https://doi.org/10.1046/j.1471-4159.1996.66062621.x).
- Heinonen, I. *et al.* (2014) 'The effects of equal caloric high fat and western diet on metabolic syndrome, oxidative stress and vascular endothelial function in mice', *Acta Physiologica*, 211(3), pp. 515–527. doi:[10.1111/apha.12253](https://doi.org/10.1111/apha.12253).
- Heisler, L.K. *et al.* (2007) 'Serotonin 5-HT(2C) receptors regulate anxiety-like behavior', *Genes, Brain, and Behavior*, 6(5), pp. 491–496. doi:[10.1111/j.1601-183X.2007.00316.x](https://doi.org/10.1111/j.1601-183X.2007.00316.x).
- Hendra, T.J. and Taylor, C.D. (2004) 'A randomised trial of insulin on well-being and carer strain in elderly type 2 diabetic subjects', *Journal of Diabetes and its Complications*, 18(3), pp. 148–154. doi:[10.1016/j.jdiacomp.2003.11.001](https://doi.org/10.1016/j.jdiacomp.2003.11.001).
- Herken, H. *et al.* (2007) 'Adenosine Deaminase, Nitric Oxide, Superoxide Dismutase, and Xanthine Oxidase in Patients with Major Depression: Impact of Antidepressant Treatment', *Archives of Medical Research*, 38(2), pp. 247–252. doi:[10.1016/j.arcmed.2006.10.005](https://doi.org/10.1016/j.arcmed.2006.10.005).
- Hernández-Vázquez, F., Garduño, J. and Hernández-López, S. (2019) 'GABAergic modulation of serotonergic neurons in the dorsal raphe nucleus', *Reviews in the Neurosciences*, 30(3), pp. 289–303. doi:[10.1515/revneuro-2018-0014](https://doi.org/10.1515/revneuro-2018-0014).

- Higuchi, K. *et al.* (2007) 'Apelin, an APJ Receptor Ligand, Regulates Body Adiposity and Favors the Messenger Ribonucleic Acid Expression of Uncoupling Proteins in Mice', *Endocrinology*, 148(6), pp. 2690–2697. doi:[10.1210/en.2006-1270](https://doi.org/10.1210/en.2006-1270).
- Hirosumi, J. *et al.* (2002) 'A central role for JNK in obesity and insulin resistance', *Nature*, 420(6913), pp. 333–336. doi:[10.1038/nature01137](https://doi.org/10.1038/nature01137).
- Hirst, W.D. *et al.* (2003) 'Differences in the central nervous system distribution and pharmacology of the mouse 5-hydroxytryptamine-6 receptor compared with rat and human receptors investigated by radioligand binding, site-directed mutagenesis, and molecular modeling', *Molecular Pharmacology*, 64(6), pp. 1295–1308. doi:[10.1124/mol.64.6.1295](https://doi.org/10.1124/mol.64.6.1295).
- Hivelin, C. *et al.* (2016) 'Potentiation of Calcium Influx and Insulin Secretion in Pancreatic Beta Cell by the Specific TREK-1 Blocker Spadin', *Journal of Diabetes Research*, 2016, pp. 1–9. doi:[10.1155/2016/3142175](https://doi.org/10.1155/2016/3142175).
- Holland, W.L. *et al.* (2007) 'Inhibition of Ceramide Synthesis Ameliorates Glucocorticoid-, Saturated-Fat-, and Obesity-Induced Insulin Resistance', *Cell Metabolism*, 5(3), pp. 167–179. doi:[10.1016/j.cmet.2007.01.002](https://doi.org/10.1016/j.cmet.2007.01.002).
- Hoshaw, B.A. *et al.* (2008) 'Antidepressant-like behavioral effects of IGF-I produced by enhanced serotonin transmission', *European Journal of Pharmacology*, 594(1–3), pp. 109–116. doi:[10.1016/j.ejphar.2008.07.023](https://doi.org/10.1016/j.ejphar.2008.07.023).
- Hosoya, M. *et al.* (2000) 'Molecular and functional characteristics of APJ. Tissue distribution of mRNA and interaction with the endogenous ligand apelin', *The Journal of Biological Chemistry*, 275(28), pp. 21061–21067. doi:[10.1074/jbc.M908417199](https://doi.org/10.1074/jbc.M908417199).
- Hotamisligil, G.S., Shargill, N.S. and Spiegelman, B.M. (1993) 'Adipose expression of tumor necrosis factor- α : direct role in obesity-linked insulin resistance', *Science (New York, N.Y.)*, 259(5091), pp. 87–91. doi:[10.1126/science.7678183](https://doi.org/10.1126/science.7678183).
- Hotta, K. *et al.* (2000) 'Plasma concentrations of a novel, adipose-specific protein, adiponectin, in type 2 diabetic patients', *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology*, 20(6), pp. 1595–1599. doi:[10.1161/01.atv.20.6.1595](https://doi.org/10.1161/01.atv.20.6.1595).
- van Houten, M. *et al.* (1979) 'Insulin-binding sites in the rat brain: in vivo localization to the circumventricular organs by quantitative radioautography', *Endocrinology*, 105(3), pp. 666–673. doi:[10.1210/endo-105-3-666](https://doi.org/10.1210/endo-105-3-666).
- van Houten, M. *et al.* (1980) 'Insulin binding sites localized to nerve terminals in rat median eminence and arcuate nucleus', *Science (New York, N.Y.)*, 207(4435), pp. 1081–1083. doi:[10.1126/science.6986652](https://doi.org/10.1126/science.6986652).
- Hoyer, D., Hannon, J.P. and Martin, G.R. (2002) 'Molecular, pharmacological and functional diversity of 5-HT receptors', *Pharmacology, Biochemistry, and Behavior*, 71(4), pp. 533–554. doi:[10.1016/s0091-3057\(01\)00746-8](https://doi.org/10.1016/s0091-3057(01)00746-8).
- Hribal, M.L. *et al.* (2008) 'Transgenic mice overexpressing human G972R IRS-1 show impaired insulin action and insulin secretion', *Journal of Cellular and Molecular Medicine*, 12(5B), pp. 2096–2106. doi:[10.1111/j.1582-4934.2008.00246.x](https://doi.org/10.1111/j.1582-4934.2008.00246.x).
- Hu, P. *et al.* (2006) 'Autocrine tumor necrosis factor alpha links endoplasmic reticulum stress to the membrane death receptor pathway through IRE1 α -mediated NF- κ B activation and down-regulation of TRAF2 expression', *Molecular and Cellular Biology*, 26(8), pp. 3071–3084. doi:[10.1128/MCB.26.8.3071-3084.2006](https://doi.org/10.1128/MCB.26.8.3071-3084.2006).
- Hu, Y. *et al.* (2015) 'Pioglitazone is an effective treatment for patients with post-stroke depression combined with type 2 diabetes mellitus', *Experimental and Therapeutic Medicine*, 10(3), pp. 1109–1114. doi:[10.3892/etm.2015.2593](https://doi.org/10.3892/etm.2015.2593).
- Huang, C.-W. *et al.* (2016) 'Ophiocordyceps formosana improves hyperglycemia and depression-like behavior in an STZ-induced diabetic mouse model', *BMC complementary and alternative medicine*, 16(1), p. 310. doi:[10.1186/s12906-016-1278-7](https://doi.org/10.1186/s12906-016-1278-7).

- Hübinger, A., Franzen, A. and Gries, F.A. (1987) 'Hormonal and metabolic response to physical exercise in hyperinsulinemic and non-hyperinsulinemic type 2 diabetics', *Diabetes Research (Edinburgh, Scotland)*, 4(2), pp. 57–61.
- Hughes, J.H. *et al.* (1990) 'Interleukin 1 inhibits insulin secretion from isolated rat pancreatic islets by a process that requires gene transcription and mRNA translation', *The Journal of Clinical Investigation*, 86(3), pp. 856–863. doi:[10.1172/JCI114785](https://doi.org/10.1172/JCI114785).
- Hysing, J., Tolleshaug, H. and Kindberg, G.M. (1989) 'Renal Uptake and Degradation of Trapped-Label Insulin', *Kidney and Blood Pressure Research*, 12(4), pp. 228–237. doi:[10.1159/000173196](https://doi.org/10.1159/000173196).
- Ibrahim, M.M. (2010) 'Subcutaneous and visceral adipose tissue: structural and functional differences', *Obesity Reviews: An Official Journal of the International Association for the Study of Obesity*, 11(1), pp. 11–18. doi:[10.1111/j.1467-789X.2009.00623.x](https://doi.org/10.1111/j.1467-789X.2009.00623.x).
- Iliadis, F., Kadoglou, N. and Didangelos, T. (2011) 'Insulin and the heart', *Diabetes Research and Clinical Practice*, 93, pp. S86–S91. doi:[10.1016/S0168-8227\(11\)70019-5](https://doi.org/10.1016/S0168-8227(11)70019-5).
- Isaac, R. *et al.* (2013) 'Selective serotonin reuptake inhibitors (SSRIs) inhibit insulin secretion and action in pancreatic β cells', *The Journal of Biological Chemistry*, 288(8), pp. 5682–5693. doi:[10.1074/jbc.M112.408641](https://doi.org/10.1074/jbc.M112.408641).
- Isacson, R. *et al.* (2011) 'The glucagon-like peptide 1 receptor agonist exendin-4 improves reference memory performance and decreases immobility in the forced swim test', *European Journal of Pharmacology*, 650(1), pp. 249–255. doi:[10.1016/j.ejphar.2010.10.008](https://doi.org/10.1016/j.ejphar.2010.10.008).
- Ishihara, H. *et al.* (2003) 'Association of the polymorphisms in the 5'-untranslated region of PTEN gene with type 2 diabetes in a Japanese population', *FEBS letters*, 554(3), pp. 450–454. doi:[10.1016/s0014-5793\(03\)01225-0](https://doi.org/10.1016/s0014-5793(03)01225-0).
- Ishimura, K. *et al.* (1988) 'Quantitative analysis of the distribution of serotonin-immunoreactive cell bodies in the mouse brain', *Neuroscience Letters*, 91(3), pp. 265–270. doi:[10.1016/0304-3940\(88\)90691-x](https://doi.org/10.1016/0304-3940(88)90691-x).
- Itani, S.I. *et al.* (2001) 'Increased protein kinase C theta in skeletal muscle of diabetic patients', *Metabolism: Clinical and Experimental*, 50(5), pp. 553–557. doi:[10.1053/meta.2001.22512](https://doi.org/10.1053/meta.2001.22512).
- Jaim-Etcheverry, G. and Zieher, L.M. (1968) 'Electron Microscopic Cytochemistry of 5-Hydroxytryptamine (5-HT) in the Beta Cells of Guinea Pig Endocrine Pancreas', *Endocrinology*, 83(5), pp. 917–923. doi:[10.1210/endo-83-5-917](https://doi.org/10.1210/endo-83-5-917).
- James, S.L. *et al.* (2018) 'Global, regional, and national incidence, prevalence, and years lived with disability for 354 diseases and injuries for 195 countries and territories, 1990–2017: a systematic analysis for the Global Burden of Disease Study 2017', *The Lancet*, 392(10159), pp. 1789–1858. doi:[10.1016/S0140-6736\(18\)32279-7](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(18)32279-7).
- Jean, A. *et al.* (2007) 'Anorexia induced by activation of serotonin 5-HT₄ receptors is mediated by increases in CART in the nucleus accumbens', *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 104(41), pp. 16335–16340. doi:[10.1073/pnas.0701471104](https://doi.org/10.1073/pnas.0701471104).
- Jensen, A.A. *et al.* (2008) '3B but which 3B and that's just one of the questions: the heterogeneity of human 5-HT₃ receptors', *Trends in Pharmacological Sciences*, 29(9), pp. 437–444. doi:[10.1016/j.tips.2008.06.001](https://doi.org/10.1016/j.tips.2008.06.001).
- Jensen, N.H., Cremers, T.I. and Sotty, F. (2010) 'Therapeutic potential of 5-HT_{2C} receptor ligands', *TheScientificWorldJournal*, 10, pp. 1870–1885. doi:[10.1100/tsw.2010.180](https://doi.org/10.1100/tsw.2010.180).
- Jhala, U. and Baly, D.L. (1994) 'Effect of chronic IL-1 beta infusion on glucose homeostasis and pancreatic insulin secretion', *Life Sciences*, 54(6), pp. 413–422. doi:[10.1016/0024-3205\(94\)00699-7](https://doi.org/10.1016/0024-3205(94)00699-7).
- Johnson, M.D. (1994) 'Electrophysiological and histochemical properties of postnatal rat serotonergic neurons in dissociated cell culture', *Neuroscience*, 63(3), pp. 775–787. doi:[10.1016/0306-4522\(94\)90522-3](https://doi.org/10.1016/0306-4522(94)90522-3).

- de Jong, I.E.M. and Mørk, A. (2017) 'Antagonism of the 5-HT₆ receptor - Preclinical rationale for the treatment of Alzheimer's disease', *Neuropharmacology*, 125, pp. 50–63. doi:[10.1016/j.neuropharm.2017.07.010](https://doi.org/10.1016/j.neuropharm.2017.07.010).
- Joseph, J.J. and Golden, S.H. (2017) 'Cortisol dysregulation: the bidirectional link between stress, depression, and type 2 diabetes mellitus: Role of cortisol in stress, depression, and diabetes', *Annals of the New York Academy of Sciences*, 1391(1), pp. 20–34. doi:[10.1111/nyas.13217](https://doi.org/10.1111/nyas.13217).
- Jovicic, N. *et al.* (2015) 'Differential Immunometabolic Phenotype in Th1 and Th2 Dominant Mouse Strains in Response to High-Fat Feeding', *PloS One*, 10(7), p. e0134089. doi:[10.1371/journal.pone.0134089](https://doi.org/10.1371/journal.pone.0134089).
- Kadoglou, N.P.E. *et al.* (2010) 'Effects of rosiglitazone and metformin treatment on apelin, visfatin, and ghrelin levels in patients with type 2 diabetes mellitus', *Metabolism*, 59(3), pp. 373–379. doi:[10.1016/j.metabol.2009.08.005](https://doi.org/10.1016/j.metabol.2009.08.005).
- Kadoglou, N.P.E. *et al.* (2012) 'The impact of aerobic exercise training on novel adipokines, apelin and ghrelin, in patients with type 2 diabetes', *Medical Science Monitor*, 18(5), pp. CR290–CR295. doi:[10.12659/MSM.882734](https://doi.org/10.12659/MSM.882734).
- kalantaripour, T. *et al.* (2017) 'Apelin-13 protects rat primary cortical glia-neuron co-culture against pentylenetetrazole-induced toxicity', *Biomedicine & Pharmacotherapy*, 87, pp. 661–668. doi:[10.1016/j.biopha.2016.12.131](https://doi.org/10.1016/j.biopha.2016.12.131).
- Kalupahana, N.S., Moustaid-Moussa, N. and Claycombe, K.J. (2012) 'Immunity as a link between obesity and insulin resistance', *Molecular Aspects of Medicine*, 33(1), pp. 26–34. doi:[10.1016/j.mam.2011.10.011](https://doi.org/10.1016/j.mam.2011.10.011).
- Kamble, M. *et al.* (2016) 'Neurobehavioral effects of liraglutide and sitagliptin in experimental models', *European Journal of Pharmacology*, 774, pp. 64–70. doi:[10.1016/j.ejphar.2016.02.003](https://doi.org/10.1016/j.ejphar.2016.02.003).
- Kamei, N. *et al.* (2006) 'Overexpression of monocyte chemoattractant protein-1 in adipose tissues causes macrophage recruitment and insulin resistance', *The Journal of Biological Chemistry*, 281(36), pp. 26602–26614. doi:[10.1074/jbc.M601284200](https://doi.org/10.1074/jbc.M601284200).
- Kanda, H. *et al.* (2006) 'MCP-1 contributes to macrophage infiltration into adipose tissue, insulin resistance, and hepatic steatosis in obesity', *The Journal of Clinical Investigation*, 116(6), pp. 1494–1505. doi:[10.1172/JCI26498](https://doi.org/10.1172/JCI26498).
- Kaneko, T. *et al.* (1990) 'Immunohistochemical demonstration of glutaminase in catecholaminergic and serotonergic neurons of rat brain', *Brain Research*, 507(1), pp. 151–154. doi:[10.1016/0006-8993\(90\)90535-J](https://doi.org/10.1016/0006-8993(90)90535-J).
- Kang, Y. *et al.* (2013) 'Apelin-APJ Signaling Is a Critical Regulator of Endothelial MEF2 Activation in Cardiovascular Development', *Circulation Research*, 113(1), pp. 22–31. doi:[10.1161/CIRCRESAHA.113.301324](https://doi.org/10.1161/CIRCRESAHA.113.301324).
- Karatsoreos, I.N. *et al.* (2010) 'Endocrine and physiological changes in response to chronic corticosterone: a potential model of the metabolic syndrome in mouse', *Endocrinology*, 151(5), pp. 2117–2127. doi:[10.1210/en.2009-1436](https://doi.org/10.1210/en.2009-1436).
- Karayol, R. *et al.* (2021) 'Serotonin receptor 4 in the hippocampus modulates mood and anxiety', *Molecular Psychiatry*, 26(6), pp. 2334–2349. doi:[10.1038/s41380-020-00994-y](https://doi.org/10.1038/s41380-020-00994-y).
- Karila, D. *et al.* (2015) 'Therapeutic Potential of 5-HT₆ Receptor Agonists', *Journal of Medicinal Chemistry*, 58(20), pp. 7901–7912. doi:[10.1021/acs.jmedchem.5b00179](https://doi.org/10.1021/acs.jmedchem.5b00179).
- Kaster, M. *et al.* (2005) 'Effects of potassium channel inhibitors in the forced swimming test: Possible involvement of l-arginine-nitric oxide-soluble guanylate cyclase pathway', *Behavioural Brain Research*, 165(2), pp. 204–209. doi:[10.1016/j.bbr.2005.06.031](https://doi.org/10.1016/j.bbr.2005.06.031).
- Kawamata, Y. *et al.* (2001) 'Molecular properties of apelin: tissue distribution and receptor binding', *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Cell Research*, 1538(2–3), pp. 162–171. doi:[10.1016/S0167-4889\(00\)00143-9](https://doi.org/10.1016/S0167-4889(00)00143-9).

- Keeney, A. *et al.* (2006) ‘Differential Effects of Acute and Chronic Social Defeat Stress on Hypothalamic-Pituitary-Adrenal Axis Function and Hippocampal Serotonin Release in Mice’, *Journal of Neuroendocrinology*, 18(5), pp. 330–338. doi:[10.1111/j.1365-2826.2006.01422.x](https://doi.org/10.1111/j.1365-2826.2006.01422.x).
- Kelley, S.P., Bratt, A.M. and Hodge, C.W. (2003) ‘Targeted gene deletion of the 5-HT_{3A} receptor subunit produces an anxiolytic phenotype in mice’, *European Journal of Pharmacology*, 461(1), pp. 19–25. doi:[10.1016/s0014-2999\(02\)02960-6](https://doi.org/10.1016/s0014-2999(02)02960-6).
- Kemp, D.E. *et al.* (2012) ‘Use of insulin sensitizers for the treatment of major depressive disorder: a pilot study of pioglitazone for major depression accompanied by abdominal obesity’, *Journal of Affective Disorders*, 136(3), pp. 1164–1173. doi:[10.1016/j.jad.2011.06.033](https://doi.org/10.1016/j.jad.2011.06.033).
- Kemp, D.E. *et al.* (2014) ‘PPAR- γ agonism as a modulator of mood: proof-of-concept for pioglitazone in bipolar depression’, *CNS drugs*, 28(6), pp. 571–581. doi:[10.1007/s40263-014-0158-2](https://doi.org/10.1007/s40263-014-0158-2).
- Kessler, R. (2003) ‘Epidemiology of women and depression’, *Journal of Affective Disorders*, 74(1), pp. 5–13. doi:[10.1016/S0165-0327\(02\)00426-3](https://doi.org/10.1016/S0165-0327(02)00426-3).
- Khan, F.A. *et al.* (2001) ‘Insulin activates ATP-sensitive K(+) channels in pancreatic beta-cells through a phosphatidylinositol 3-kinase-dependent pathway’, *Diabetes*, 50(10), pp. 2192–2198. doi:[10.2337/diabetes.50.10.2192](https://doi.org/10.2337/diabetes.50.10.2192).
- Khedr, S.A. *et al.* (2018) ‘Metformin potentiates cognitive and antidepressant effects of fluoxetine in rats exposed to chronic restraint stress and high fat diet: potential involvement of hippocampal c-Jun repression’, *Naunyn-Schmiedeberg's Archives of Pharmacology*, 391(4), pp. 407–422. doi:[10.1007/s00210-018-1466-8](https://doi.org/10.1007/s00210-018-1466-8).
- Kim, K. *et al.* (2015) ‘Functional Role of Serotonin in Insulin Secretion in a Diet-Induced Insulin-Resistant State’, *Endocrinology*, 156(2), pp. 444–452. doi:[10.1210/en.2014-1687](https://doi.org/10.1210/en.2014-1687).
- Kiyasova, V. *et al.* (2011) ‘A genetically defined morphologically and functionally unique subset of 5-HT neurons in the mouse raphe nuclei’, *The Journal of Neuroscience: The Official Journal of the Society for Neuroscience*, 31(8), pp. 2756–2768. doi:[10.1523/JNEUROSCI.4080-10.2011](https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.4080-10.2011).
- Kleinridders, A. *et al.* (2013) ‘Leptin regulation of Hsp60 impacts hypothalamic insulin signaling’, *The Journal of Clinical Investigation*, 123(11), pp. 4667–4680. doi:[10.1172/JCI67615](https://doi.org/10.1172/JCI67615).
- Kleinridders, A. *et al.* (2014) ‘Insulin Action in Brain Regulates Systemic Metabolism and Brain Function’, *Diabetes*, 63(7), pp. 2232–2243. doi:[10.2337/db14-0568](https://doi.org/10.2337/db14-0568).
- Kleinridders, A. *et al.* (2015) ‘Insulin resistance in brain alters dopamine turnover and causes behavioral disorders’, *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 112(11), pp. 3463–3468. doi:[10.1073/pnas.1500877112](https://doi.org/10.1073/pnas.1500877112).
- Kleinz, M.J., Skepper, J.N. and Davenport, A.P. (2005) ‘Immunocytochemical localisation of the apelin receptor, APJ, to human cardiomyocytes, vascular smooth muscle and endothelial cells’, *Regulatory Peptides*, 126(3), pp. 233–240. doi:[10.1016/j.regpep.2004.10.019](https://doi.org/10.1016/j.regpep.2004.10.019).
- Koch, L. *et al.* (2008) ‘Central insulin action regulates peripheral glucose and fat metabolism in mice’, *The Journal of Clinical Investigation*, 118(6), pp. 2132–2147. doi:[10.1172/JCI31073](https://doi.org/10.1172/JCI31073).
- Köhler, S. *et al.* (2016) ‘The serotonergic system in the neurobiology of depression: Relevance for novel antidepressants’, *Journal of Psychopharmacology*, 30(1), pp. 13–22. doi:[10.1177/0269881115609072](https://doi.org/10.1177/0269881115609072).
- Kolb, H. (1987) ‘Mouse models of insulin dependent diabetes: low-dose streptozocin-induced diabetes and nonobese diabetic (NOD) mice’, *Diabetes/Metabolism Reviews*, 3(3), pp. 751–778. doi:[10.1002/dmr.5610030308](https://doi.org/10.1002/dmr.5610030308).
- Könner, A.C. *et al.* (2007) ‘Insulin Action in AgRP-Expressing Neurons Is Required for Suppression of Hepatic Glucose Production’, *Cell Metabolism*, 5(6), pp. 438–449. doi:[10.1016/j.cmet.2007.05.004](https://doi.org/10.1016/j.cmet.2007.05.004).
- Könner, A.C. *et al.* (2011) ‘Role for Insulin Signaling in Catecholaminergic Neurons in Control of Energy Homeostasis’, *Cell Metabolism*, 13(6), pp. 720–728. doi:[10.1016/j.cmet.2011.03.021](https://doi.org/10.1016/j.cmet.2011.03.021).

- Kotzke, G. *et al.* (1995) 'Binding of human, porcine and bovine insulin to insulin receptors from human brain, muscle and adipocytes and to expressed recombinant alternatively spliced insulin receptor isoforms', *Diabetologia*, 38(7), pp. 757–763. doi:[10.1007/s001250050349](https://doi.org/10.1007/s001250050349).
- Kramer, C.K., Campbell, S. and Retnakaran, R. (2019) 'Gestational diabetes and the risk of cardiovascular disease in women: a systematic review and meta-analysis', *Diabetologia*, 62(6), pp. 905–914. doi:[10.1007/s00125-019-4840-2](https://doi.org/10.1007/s00125-019-4840-2).
- Krass, M. *et al.* (2012) 'Acute administration of GLP-1 receptor agonists induces hypolocomotion but not anxiety in mice', *Acta Neuropsychiatrica*, 24(5), pp. 296–300. doi:[10.1111/j.1601-5215.2012.00648.x](https://doi.org/10.1111/j.1601-5215.2012.00648.x).
- Krysiak, R. *et al.* (2017) 'Sexual Functioning and Depressive Symptoms in Women with Diabetes and Prediabetes Receiving Metformin Therapy: A Pilot Study', *Experimental and Clinical Endocrinology & Diabetes: Official Journal, German Society of Endocrinology [and] German Diabetes Association*, 125(1), pp. 42–48. doi:[10.1055/s-0042-116594](https://doi.org/10.1055/s-0042-116594).
- Kubota, N. *et al.* (2000) 'Disruption of insulin receptor substrate 2 causes type 2 diabetes because of liver insulin resistance and lack of compensatory beta-cell hyperplasia', *Diabetes*, 49(11), pp. 1880–1889. doi:[10.2337/diabetes.49.11.1880](https://doi.org/10.2337/diabetes.49.11.1880).
- Kulkarni, R.N. *et al.* (1999) 'Tissue-Specific Knockout of the Insulin Receptor in Pancreatic β Cells Creates an Insulin Secretory Defect Similar to that in Type 2 Diabetes', *Cell*, 96(3), pp. 329–339. doi:[10.1016/S0092-8674\(00\)80546-2](https://doi.org/10.1016/S0092-8674(00)80546-2).
- Kuo, W.L., Montag, A.G. and Rosner, M.R. (1993) 'Insulin-degrading enzyme is differentially expressed and developmentally regulated in various rat tissues', *Endocrinology*, 132(2), pp. 604–611. doi:[10.1210/endo.132.2.7678795](https://doi.org/10.1210/endo.132.2.7678795).
- Kurhe, Y. (no date) 'Pioglitazone, a PPAR γ agonist rescues depression associated with obesity using chronic unpredictable mild stress model in experimental mice', p. 40.
- Lam, T.K.T. *et al.* (2005) 'Hypothalamic sensing of circulating fatty acids is required for glucose homeostasis', *Nature Medicine*, 11(3), pp. 320–327. doi:[10.1038/nm1201](https://doi.org/10.1038/nm1201).
- Lang, D.A. *et al.* (1979) 'Cyclic Oscillations of Basal Plasma Glucose and Insulin Concentrations in Human Beings', *New England Journal of Medicine*, 301(19), pp. 1023–1027. doi:[10.1056/NEJM197911083011903](https://doi.org/10.1056/NEJM197911083011903).
- de Lara, C.L. *et al.* (2007) 'Effect of Tryptophan Hydroxylase-2 Gene Variants on Suicide Risk in Major Depression', *Biological Psychiatry*, 62(1), pp. 72–80. doi:[10.1016/j.biopsych.2006.09.008](https://doi.org/10.1016/j.biopsych.2006.09.008).
- Layé, S. *et al.* (1994) 'Peripheral administration of lipopolysaccharide induces the expression of cytokine transcripts in the brain and pituitary of mice', *Brain Research. Molecular Brain Research*, 27(1), pp. 157–162. doi:[10.1016/0169-328x\(94\)90197-x](https://doi.org/10.1016/0169-328x(94)90197-x).
- Lee, D.K. *et al.* (2000) 'Characterization of apelin, the ligand for the APJ receptor', *Journal of Neurochemistry*, 74(1), pp. 34–41. doi:[10.1046/j.1471-4159.2000.0740034.x](https://doi.org/10.1046/j.1471-4159.2000.0740034.x).
- Lee, D.K. *et al.* (2015) 'Apelin-13 Enhances Arcuate POMC Neuron Activity via Inhibiting M-Current', *PLOS ONE*. Edited by M.S. Shapiro, 10(3), p. e0119457. doi:[10.1371/journal.pone.0119457](https://doi.org/10.1371/journal.pone.0119457).
- Leibiger, B. *et al.* (2001) 'Selective Insulin Signaling through A and B Insulin Receptors Regulates Transcription of Insulin and Glucokinase Genes in Pancreatic β Cells', *Molecular Cell*, 7(3), pp. 559–570. doi:[10.1016/S1097-2765\(01\)00203-9](https://doi.org/10.1016/S1097-2765(01)00203-9).
- Leibiger, I.B., Leibiger, B. and Berggren, P.-O. (2002) 'Insulin feedback action on pancreatic β -cell function', *FEBS Letters*, 532(1–2), pp. 1–6. doi:[10.1016/S0014-5793\(02\)03627-X](https://doi.org/10.1016/S0014-5793(02)03627-X).
- Leissring, M.A. *et al.* (2021) 'Targeting Insulin-Degrading Enzyme in Insulin Clearance', *International Journal of Molecular Sciences*, 22(5), p. 2235. doi:[10.3390/ijms22052235](https://doi.org/10.3390/ijms22052235).
- Lenzen, S. (2008) 'The mechanisms of alloxan- and streptozotocin-induced diabetes', *Diabetologia*, 51(2), pp. 216–226. doi:[10.1007/s00125-007-0886-7](https://doi.org/10.1007/s00125-007-0886-7).
- Lesch, K.P. *et al.* (1990) 'Pharmacology of the hypothermic response to 5-HT_{1A} receptor activation in humans', *European Journal of Clinical Pharmacology*, 39(1), pp. 17–19. doi:[10.1007/BF02657050](https://doi.org/10.1007/BF02657050).

- Lesch, K.-P. and Waider, J. (2012) ‘Serotonin in the Modulation of Neural Plasticity and Networks: Implications for Neurodevelopmental Disorders’, *Neuron*, 76(1), pp. 175–191. doi:[10.1016/j.neuron.2012.09.013](https://doi.org/10.1016/j.neuron.2012.09.013).
- Lewis-Tuffin, L.J. and Cidlowski, J.A. (2006) ‘The physiology of human glucocorticoid receptor beta (hGRbeta) and glucocorticoid resistance’, *Annals of the New York Academy of Sciences*, 1069, pp. 1–9. doi:[10.1196/annals.1351.001](https://doi.org/10.1196/annals.1351.001).
- Li, J. *et al.* (2018) ‘PI3K/AKT/JNK/p38 signalling pathway-mediated neural apoptosis in the prefrontal cortex of mice is involved in the antidepressant-like effect of pioglitazone’, *Clinical and Experimental Pharmacology and Physiology*, 45(6), pp. 525–535. doi:[10.1111/1440-1681.12918](https://doi.org/10.1111/1440-1681.12918).
- Li, J. *et al.* (2020) ‘High fat diet induced obesity model using four strains of mice: Kunming, C57BL/6, BALB/c and ICR’, *Experimental Animals*, 69(3), pp. 326–335. doi:[10.1538/expanim.19-0148](https://doi.org/10.1538/expanim.19-0148).
- Li, S. *et al.* (2014) ‘Therapeutic effect of vagus nerve stimulation on depressive-like behavior, hyperglycemia and insulin receptor expression in Zucker fatty rats’, *PloS One*, 9(11), p. e112066. doi:[10.1371/journal.pone.0112066](https://doi.org/10.1371/journal.pone.0112066).
- Li, S. *et al.* (2018) ‘[Serotonergic neurons in the median raphe nucleus mediate anxiety- and depression-like behavior]’, *Sheng Li Xue Bao: [Acta Physiologica Sinica]*, 70(3), pp. 228–236.
- Liao, L. *et al.* (2017) ‘Pioglitazone attenuates lipopolysaccharide-induced depression-like behaviors, modulates NF-κB/IL-6/STAT3, CREB/BDNF pathways and central serotonergic neurotransmission in mice’, *International Immunopharmacology*, 49, pp. 178–186. doi:[10.1016/j.intimp.2017.05.036](https://doi.org/10.1016/j.intimp.2017.05.036).
- Like, A. and Rossini, A. (1976) ‘Streptozotocin-induced pancreatic insulinitis: new model of diabetes mellitus’, *Science*, 193(4251), pp. 415–417. doi:[10.1126/science.180605](https://doi.org/10.1126/science.180605).
- Lim, J.-E. *et al.* (2007) ‘Tryptophan hydroxylase 2 (TPH2) haplotypes predict levels of TPH2 mRNA expression in human pons’, *Molecular Psychiatry*, 12(5), pp. 491–501. doi:[10.1038/sj.mp.4001923](https://doi.org/10.1038/sj.mp.4001923).
- Lin, J.W. *et al.* (2000) ‘Distinct molecular mechanisms and divergent endocytotic pathways of AMPA receptor internalization’, *Nature Neuroscience*, 3(12), pp. 1282–1290. doi:[10.1038/81814](https://doi.org/10.1038/81814).
- Lin, K.W. *et al.* (2015) ‘Adjuvant pioglitazone for unremitted depression: Clinical correlates of treatment response’, *Psychiatry Research*, 230(3), pp. 846–852. doi:[10.1016/j.psychres.2015.10.013](https://doi.org/10.1016/j.psychres.2015.10.013).
- Liu, Weina *et al.* (2017) ‘Leptin receptor knockout-induced depression-like behaviors and attenuated antidepressant effects of exercise are associated with STAT3/SOCS3 signaling’, *Brain, Behavior, and Immunity*, 61, pp. 297–305. doi:[10.1016/j.bbi.2017.01.001](https://doi.org/10.1016/j.bbi.2017.01.001).
- Liu, Wei *et al.* (2017) ‘The Role of Neural Plasticity in Depression: From Hippocampus to Prefrontal Cortex’, *Neural Plasticity*, 2017, pp. 1–11. doi:[10.1155/2017/6871089](https://doi.org/10.1155/2017/6871089).
- Lu, Q. *et al.* (2019) ‘Chronic unpredictable mild stress-induced behavioral changes are coupled with dopaminergic hyperfunction and serotonergic hypofunction in mouse models of depression’, *Behavioural Brain Research*, 372, p. 112053. doi:[10.1016/j.bbr.2019.112053](https://doi.org/10.1016/j.bbr.2019.112053).
- Lu, S. *et al.* (2020) ‘Hyperglycemia Acutely Increases Cytosolic Reactive Oxygen Species via O-linked GlcNAcylation and CaMKII Activation in Mouse Ventricular Myocytes’, *Circulation Research*, 126(10), pp. e80–e96. doi:[10.1161/CIRCRESAHA.119.316288](https://doi.org/10.1161/CIRCRESAHA.119.316288).
- Luc, K. *et al.* (2019) ‘Oxidative stress and inflammatory markers in prediabetes and diabetes’, *Journal of Physiology and Pharmacology: An Official Journal of the Polish Physiological Society*, 70(6). doi:[10.26402/jpp.2019.6.01](https://doi.org/10.26402/jpp.2019.6.01).
- Lucas, G. *et al.* (2007) ‘Serotonin(4) (5-HT(4)) receptor agonists are putative antidepressants with a rapid onset of action’, *Neuron*, 55(5), pp. 712–725. doi:[10.1016/j.neuron.2007.07.041](https://doi.org/10.1016/j.neuron.2007.07.041).
- Lucki, I. (1992) ‘5-HT1 receptors and behavior’, *Neuroscience and Biobehavioral Reviews*, 16(1), pp. 83–93. doi:[10.1016/s0149-7634\(05\)80055-7](https://doi.org/10.1016/s0149-7634(05)80055-7).

- Luddington, N.S. *et al.* (2009) ‘Clinical implications of genetic variation in the serotonin transporter promoter region: a review’, *Primary Care Companion to the Journal of Clinical Psychiatry*, 11(3), pp. 93–102. doi:[10.4088/pcc.08r00656](https://doi.org/10.4088/pcc.08r00656).
- Luo, H. *et al.* (2019) ‘Apelin-13 Suppresses Neuroinflammation Against Cognitive Deficit in a Streptozotocin-Induced Rat Model of Alzheimer’s Disease Through Activation of BDNF-TrkB Signaling Pathway’, *Frontiers in Pharmacology*, 10, p. 395. doi:[10.3389/fphar.2019.00395](https://doi.org/10.3389/fphar.2019.00395).
- Luo, M., Zhou, J. and Liu, Z. (2015) ‘Reward processing by the dorsal raphe nucleus: 5-HT and beyond’, *Learning & Memory*, 22(9), pp. 452–460. doi:[10.1101/lm.037317.114](https://doi.org/10.1101/lm.037317.114).
- Luppino, F.S. *et al.* (2010) ‘Overweight, Obesity, and Depression: A Systematic Review and Meta-analysis of Longitudinal Studies’, *Archives of General Psychiatry*, 67(3), p. 220. doi:[10.1001/archgenpsychiatry.2010.2](https://doi.org/10.1001/archgenpsychiatry.2010.2).
- Lv, H. *et al.* (2020) ‘Intranasal insulin administration may be highly effective in improving cognitive function in mice with cognitive dysfunction by reversing brain insulin resistance’, *Cognitive Neurodynamics*, 14(3), pp. 323–338. doi:[10.1007/s11571-020-09571-z](https://doi.org/10.1007/s11571-020-09571-z).
- Lv, S.-Y. *et al.* (2012) ‘Centrally administered apelin-13 induces depression-like behavior in mice’, *Brain Research Bulletin*, 88(6), pp. 574–580. doi:[10.1016/j.brainresbull.2012.06.003](https://doi.org/10.1016/j.brainresbull.2012.06.003).
- Madsen, K. *et al.* (2014) ‘Familial risk for major depression is associated with lower striatal 5-HT₄ receptor binding’, *The International Journal of Neuropsychopharmacology*, 18(1), p. pyu034. doi:[10.1093/ijnp/pyu034](https://doi.org/10.1093/ijnp/pyu034).
- Magnan, C. and Ktorza, A. (2005) ‘Production et sécrétion de l’insuline par la cellule β pancréatique’, *EMC - Endocrinologie*, 2(4), pp. 241–264. doi:[10.1016/j.emcend.2005.07.001](https://doi.org/10.1016/j.emcend.2005.07.001).
- Man, H.Y. *et al.* (2000) ‘Regulation of AMPA receptor-mediated synaptic transmission by clathrin-dependent receptor internalization’, *Neuron*, 25(3), pp. 649–662. doi:[10.1016/s0896-6273\(00\)81067-3](https://doi.org/10.1016/s0896-6273(00)81067-3).
- Mandarino, L.J. *et al.* (1995) ‘Regulation of hexokinase II and glycogen synthase mRNA, protein, and activity in human muscle’, *The American Journal of Physiology*, 269(4 Pt 1), pp. E701–708. doi:[10.1152/ajpendo.1995.269.4.E701](https://doi.org/10.1152/ajpendo.1995.269.4.E701).
- Mann, J. (1999) ‘Role of the Serotonergic System in the Pathogenesis of Major Depression and Suicidal Behavior’, *Neuropsychopharmacology*, 21(2), pp. 99S–105S. doi:[10.1016/S0893-133X\(99\)00040-8](https://doi.org/10.1016/S0893-133X(99)00040-8).
- Mansur, R.B. *et al.* (2017) ‘Liraglutide promotes improvements in objective measures of cognitive dysfunction in individuals with mood disorders: A pilot, open-label study’, *Journal of Affective Disorders*, 207, pp. 114–120. doi:[10.1016/j.jad.2016.09.056](https://doi.org/10.1016/j.jad.2016.09.056).
- Mao, Y. *et al.* (2016) ‘Intranasal insulin alleviates cognitive deficits and amyloid pathology in young adult APP swe/ PS 1dE9 mice’, *Aging Cell*, 15(5), pp. 893–902. doi:[10.1111/accel.12498](https://doi.org/10.1111/accel.12498).
- Marek, G.J. *et al.* (2005) ‘The selective 5-HT_{2A} receptor antagonist M100907 enhances antidepressant-like behavioral effects of the SSRI fluoxetine’, *Neuropsychopharmacology: Official Publication of the American College of Neuropsychopharmacology*, 30(12), pp. 2205–2215. doi:[10.1038/sj.npp.1300762](https://doi.org/10.1038/sj.npp.1300762).
- Margolis, R.U. and Altszuler, N. (1967) ‘Insulin in the cerebrospinal fluid’, *Nature*, 215(5108), pp. 1375–1376. doi:[10.1038/2151375a0](https://doi.org/10.1038/2151375a0).
- Marks, D.R. *et al.* (2009) ‘Awake Intranasal Insulin Delivery Modifies Protein Complexes and Alters Memory, Anxiety, and Olfactory Behaviors’, *Journal of Neuroscience*, 29(20), pp. 6734–6751. doi:[10.1523/JNEUROSCI.1350-09.2009](https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.1350-09.2009).
- Martin, B.C. *et al.* (1992) ‘Role of glucose and insulin resistance in development of type 2 diabetes mellitus: results of a 25-year follow-up study’, *Lancet (London, England)*, 340(8825), pp. 925–929. doi:[10.1016/0140-6736\(92\)92814-v](https://doi.org/10.1016/0140-6736(92)92814-v).
- Martin, C.B.P. *et al.* (2014) ‘Controversies on the role of 5-HT_{2C} receptors in the mechanisms of action of antidepressant drugs’, *Neuroscience and Biobehavioral Reviews*, 42, pp. 208–223. doi:[10.1016/j.neubiorev.2014.03.001](https://doi.org/10.1016/j.neubiorev.2014.03.001).

- Martín-Cora, F.J. *et al.* (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 gluoregulatory challenges’, *European Journal of Neuroscience*, 16(4), pp. 722–734. doi:[10.1046/j.1460-9568.2002.02144.x](https://doi.org/10.1046/j.1460-9568.2002.02144.x).
- Martínez-Abundis, E. *et al.* (2007) ‘Effect of etanercept on insulin secretion and insulin sensitivity in a randomized trial with psoriatic patients at risk for developing type 2 diabetes mellitus’, *Archives of Dermatological Research*, 299(9), pp. 461–465. doi:[10.1007/s00403-007-0784-3](https://doi.org/10.1007/s00403-007-0784-3).
- Martínez-Gómez, L.E. *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’, *Annals of Human Genetics*, 75(5), pp. 612–620. doi:[10.1111/j.1469-1809.2011.00668.x](https://doi.org/10.1111/j.1469-1809.2011.00668.x).
- Masri, B. *et al.* (2002) ‘Apelin (65-77) activates extracellular signal-regulated kinases via a PTX-sensitive G protein’, *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 290(1), pp. 539–545. doi:[10.1006/bbrc.2001.6230](https://doi.org/10.1006/bbrc.2001.6230).
- Masri, B. *et al.* (2006) ‘The Apelin Receptor Is Coupled to Gi1 or Gi2 Protein and Is Differentially Desensitized by Apelin Fragments*’, *Journal of Biological Chemistry*, 281(27), pp. 18317–18326. doi:[10.1074/jbc.M600606200](https://doi.org/10.1074/jbc.M600606200).
- Mathew, N.T. (1997) ‘SEROTONIN 1D (5-HT1D) AGONISTS AND OTHER AGENTS IN ACUTE MIGRAINE’, *Neurologic Clinics*, 15(1), pp. 61–83. doi:[10.1016/S0733-8619\(05\)70295-4](https://doi.org/10.1016/S0733-8619(05)70295-4).
- Matthes, H. *et al.* (1993) ‘Mouse 5-hydroxytryptamine5A and 5-hydroxytryptamine5B receptors define a new family of serotonin receptors: cloning, functional expression, and chromosomal localization’, *Molecular Pharmacology*, 43(3), pp. 313–319.
- Mazella, J. *et al.* (2010) ‘Spadin, a Sortilin-Derived Peptide, Targeting Rodent TREK-1 Channels: A New Concept in the Antidepressant Drug Design’, *PLoS Biology*. Edited by E. Nestler, 8(4), p. e1000355. doi:[10.1371/journal.pbio.1000355](https://doi.org/10.1371/journal.pbio.1000355).
- Mazucanti, C.H. *et al.* (2019) ‘Release of insulin produced by the choroid plexis is regulated by serotonergic signaling’, *JCI insight*, 4(23), p. 131682. doi:[10.1172/jci.insight.131682](https://doi.org/10.1172/jci.insight.131682).
- McIntyre, H.D. *et al.* (2019) ‘Gestational diabetes mellitus’, *Nature Reviews Disease Primers*, 5(1), p. 47. doi:[10.1038/s41572-019-0098-8](https://doi.org/10.1038/s41572-019-0098-8).
- McIntyre, R.S. *et al.* (2016) ‘The Effects of Vortioxetine on Cognitive Function in Patients with Major Depressive Disorder: A Meta-Analysis of Three Randomized Controlled Trials’, *The International Journal of Neuropsychopharmacology*, 19(10), p. pyw055. doi:[10.1093/ijnp/pyw055](https://doi.org/10.1093/ijnp/pyw055).
- McNay, E.C. *et al.* (2010) ‘Hippocampal memory processes are modulated by insulin and high-fat-induced insulin resistance’, *Neurobiology of Learning and Memory*, 93(4), pp. 546–553. doi:[10.1016/j.nlm.2010.02.002](https://doi.org/10.1016/j.nlm.2010.02.002).
- Mebel, Dmitry.M. *et al.* (2012) ‘Insulin in the ventral tegmental area reduces hedonic feeding and suppresses dopamine concentration via increased reuptake: Insulin attenuates somatodendritic dopamine’, *European Journal of Neuroscience*, 36(3), pp. 2336–2346. doi:[10.1111/j.1460-9568.2012.08168.x](https://doi.org/10.1111/j.1460-9568.2012.08168.x).
- Medhurst, A.D. *et al.* (2003) ‘Pharmacological and immunohistochemical characterization of the APJ receptor and its endogenous ligand apelin’, *Journal of Neurochemistry*, 84(5), pp. 1162–1172. doi:[10.1046/j.1471-4159.2003.01587.x](https://doi.org/10.1046/j.1471-4159.2003.01587.x).
- Mehran, A.E. *et al.* (2012) ‘Hyperinsulinemia Drives Diet-Induced Obesity Independently of Brain Insulin Production’, *Cell Metabolism*, 16(6), pp. 723–737. doi:[10.1016/j.cmet.2012.10.019](https://doi.org/10.1016/j.cmet.2012.10.019).
- Meier, J.J., Veldhuis, J.D. and Butler, P.C. (2005) ‘Pulsatile Insulin Secretion Dictates Systemic Insulin Delivery by Regulating Hepatic Insulin Extraction In Humans’, *Diabetes*, 54(6), pp. 1649–1656. doi:[10.2337/diabetes.54.6.1649](https://doi.org/10.2337/diabetes.54.6.1649).
- Mendels, J. *et al.* (1972) ‘Biogenic Amine Metabolites in Cerebrospinal Fluid of Depressed and Manic Patients’, *Science*, 175(4028), pp. 1380–1382. doi:[10.1126/science.175.4028.1380](https://doi.org/10.1126/science.175.4028.1380).

- Mendez-David, I. *et al.* (2014) ‘Rapid anxiolytic effects of a 5-HT₄ receptor agonist are mediated by a neurogenesis-independent mechanism’, *Neuropsychopharmacology: Official Publication of the American College of Neuropsychopharmacology*, 39(6), pp. 1366–1378. doi:[10.1038/npp.2013.332](https://doi.org/10.1038/npp.2013.332).
- Meneses, A. (2004) ‘Effects of the 5-HT₇ receptor antagonists SB-269970 and DR 4004 in autoshaping Pavlovian/instrumental learning task’, *Behavioural Brain Research*, 155(2), pp. 275–282. doi:[10.1016/j.bbr.2004.04.026](https://doi.org/10.1016/j.bbr.2004.04.026).
- Mengod, G. *et al.* (1990) ‘Localization of the mRNA for the 5-HT₂ receptor by in situ hybridization histochemistry. Correlation with the distribution of receptor sites’, *Brain Research*, 524(1), pp. 139–143. doi:[10.1016/0006-8993\(90\)90502-3](https://doi.org/10.1016/0006-8993(90)90502-3).
- Meyer, J.H. *et al.* (2006) ‘Elevated Monoamine Oxidase A Levels in the Brain: An Explanation for the Monoamine Imbalance of Major Depression’, *Archives of General Psychiatry*, 63(11), p. 1209. doi:[10.1001/archpsyc.63.11.1209](https://doi.org/10.1001/archpsyc.63.11.1209).
- Minuk, H.L. *et al.* (1981) ‘Glucoregulatory and metabolic response to exercise in obese noninsulin-dependent diabetes’, *The American Journal of Physiology*, 240(5), pp. E458–464. doi:[10.1152/ajpendo.1981.240.5.E458](https://doi.org/10.1152/ajpendo.1981.240.5.E458).
- Mishra, A. *et al.* (2015) ‘Genetic differences and aberrant methylation in the apelin system predict the risk of high-altitude pulmonary edema’, *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 112(19), pp. 6134–6139. doi:[10.1073/pnas.1422759112](https://doi.org/10.1073/pnas.1422759112).
- Mitchell, E.S. and Neumaier, J.F. (2005) ‘5-HT₆ receptors: a novel target for cognitive enhancement’, *Pharmacology & Therapeutics*, 108(3), pp. 320–333. doi:[10.1016/j.pharmthera.2005.05.001](https://doi.org/10.1016/j.pharmthera.2005.05.001).
- Miyata, S., Hirano, S. and Kamei, J. (2004) ‘[Diabetes attenuates the antidepressant-like effect mediated by the activation of 5-HT_{1A} receptors in the mouse tail suspension test]’, *Nihon Shinkei Seishin Yakurigaku Zasshi = Japanese Journal of Psychopharmacology*, 24(3), pp. 159–163.
- Mnie-Filali, O. *et al.* (2011) ‘Pharmacological blockade of 5-HT₇ receptors as a putative fast acting antidepressant strategy’, *Neuropsychopharmacology: Official Publication of the American College of Neuropsychopharmacology*, 36(6), pp. 1275–1288. doi:[10.1038/npp.2011.13](https://doi.org/10.1038/npp.2011.13).
- Moha Ou Maati, H. *et al.* (2012) ‘Spadin as a new antidepressant: absence of TREK-1-related side effects’, *Neuropharmacology*, 62(1), pp. 278–288. doi:[10.1016/j.neuropharm.2011.07.019](https://doi.org/10.1016/j.neuropharm.2011.07.019).
- Moller, D.E. *et al.* (1989) ‘Tissue-specific expression of two alternatively spliced insulin receptor mRNAs in man’, *Molecular Endocrinology (Baltimore, Md.)*, 3(8), pp. 1263–1269. doi:[10.1210/mend-3-8-1263](https://doi.org/10.1210/mend-3-8-1263).
- Montagnani, M. *et al.* (2001) ‘Insulin-stimulated Activation of eNOS Is Independent of Ca²⁺ but Requires Phosphorylation by Akt at Ser1179’, *Journal of Biological Chemistry*, 276(32), pp. 30392–30398. doi:[10.1074/jbc.M103702200](https://doi.org/10.1074/jbc.M103702200).
- Moretti, M. *et al.* (2012) ‘Involvement of different types of potassium channels in the antidepressant-like effect of ascorbic acid in the mouse tail suspension test’, *European Journal of Pharmacology*, 687(1–3), pp. 21–27. doi:[10.1016/j.ejphar.2012.04.041](https://doi.org/10.1016/j.ejphar.2012.04.041).
- Morselli, E. *et al.* (2014) ‘Chronic High Fat Diet Consumption Impairs Metabolic Health of Male Mice’, *Inflammation and Cell Signaling*, 1(6), p. e561. doi:[10.14800/ics.561](https://doi.org/10.14800/ics.561).
- Moulton, C.D. *et al.* (2021) ‘SITAgliptin for Depressive Symptoms in Type 2 Diabetes: A Feasibility Randomized Controlled Trial’, *Psychosomatic Medicine*, 83(8), pp. 913–923. doi:[10.1097/PSY.0000000000000985](https://doi.org/10.1097/PSY.0000000000000985).
- Naef, L. *et al.* (2019) ‘Insulin in the ventral tegmental area reduces cocaine-evoked dopamine in the nucleus accumbens *in vivo*’, *European Journal of Neuroscience*, 50(3), pp. 2146–2155. doi:[10.1111/ejn.14291](https://doi.org/10.1111/ejn.14291).
- Nasseri, B., Zareian, P. and Alizade, H. (2020) ‘Apelin attenuates streptozotocin-induced learning and memory impairment by modulating necroptosis signaling pathway’, *International Immunopharmacology*, 84, p. 106546. doi:[10.1016/j.intimp.2020.106546](https://doi.org/10.1016/j.intimp.2020.106546).

- Nath, S., Ghosh, S.K. and Choudhury, Y. (2017) 'A murine model of type 2 diabetes mellitus developed using a combination of high fat diet and multiple low doses of streptozotocin treatment mimics the metabolic characteristics of type 2 diabetes mellitus in humans', *Journal of Pharmacological and Toxicological Methods*, 84, pp. 20–30. doi:[10.1016/j.vascn.2016.10.007](https://doi.org/10.1016/j.vascn.2016.10.007).
- Nautiyal, K.M. *et al.* (2015) 'Distinct Circuits Underlie the Effects of 5-HT1B Receptors on Aggression and Impulsivity', *Neuron*, 86(3), pp. 813–826. doi:[10.1016/j.neuron.2015.03.041](https://doi.org/10.1016/j.neuron.2015.03.041).
- Nelson, D.L. (2004) '5-HT5 receptors', *Current drug targets. CNS and neurological disorders*, 3(1), pp. 53–58. doi:[10.2174/1568007043482606](https://doi.org/10.2174/1568007043482606).
- Newsholme, P. *et al.* (2007) 'Amino acid metabolism, insulin secretion and diabetes', *Biochemical Society Transactions*, 35(5), pp. 1180–1186. doi:[10.1042/BST0351180](https://doi.org/10.1042/BST0351180).
- Nguyen, T.T. *et al.* (2020) 'Type 3 Diabetes and Its Role Implications in Alzheimer's Disease', *International Journal of Molecular Sciences*, 21(9), p. E3165. doi:[10.3390/ijms21093165](https://doi.org/10.3390/ijms21093165).
- Nigi, L. *et al.* (2018) 'MicroRNAs as Regulators of Insulin Signaling: Research Updates and Potential Therapeutic Perspectives in Type 2 Diabetes', *International Journal of Molecular Sciences*, 19(12), p. E3705. doi:[10.3390/ijms19123705](https://doi.org/10.3390/ijms19123705).
- Nisoli, E. *et al.* (2004) 'Mitochondrial biogenesis by NO yields functionally active mitochondria in mammals', *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 101(47), pp. 16507–16512. doi:[10.1073/pnas.0405432101](https://doi.org/10.1073/pnas.0405432101).
- Nitz, D. and Siegel, J. (1997) 'GABA release in the dorsal raphe nucleus: role in the control of REM sleep', *The American Journal of Physiology*, 273(1 Pt 2), pp. R451-455. doi:[10.1152/ajpregu.1997.273.1.R451](https://doi.org/10.1152/ajpregu.1997.273.1.R451).
- Noordam, R. *et al.* (2016) 'Selective Serotonin Reuptake Inhibitors Decrease Pancreatic Insulin Secretion in Older Adults and Increase the Risk of Insulin Dependence in Type 2 Diabetes Patients', *The Journal of Clinical Psychiatry*, 77(9), pp. e1124–e1129. doi:[10.4088/JCP.15m10048](https://doi.org/10.4088/JCP.15m10048).
- Nordström*, A. *et al.* (2016) 'Higher Prevalence of Type 2 Diabetes in Men Than in Women Is Associated With Differences in Visceral Fat Mass', *The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism*, 101(10), pp. 3740–3746. doi:[10.1210/jc.2016-1915](https://doi.org/10.1210/jc.2016-1915).
- Norris, J.M., Johnson, R.K. and Stene, L.C. (2020) 'Type 1 diabetes—early life origins and changing epidemiology', *The Lancet Diabetes & Endocrinology*, 8(3), pp. 226–238. doi:[10.1016/S2213-8587\(19\)30412-7](https://doi.org/10.1016/S2213-8587(19)30412-7).
- O'Carroll, A.M. *et al.* (2000) 'Distribution of mRNA encoding B78/apj, the rat homologue of the human APJ receptor, and its endogenous ligand apelin in brain and peripheral tissues', *Biochimica Et Biophysica Acta*, 1492(1), pp. 72–80. doi:[10.1016/s0167-4781\(00\)00072-5](https://doi.org/10.1016/s0167-4781(00)00072-5).
- O'Donnell, L.A. *et al.* (2007) 'Apelin, an endogenous neuronal peptide, protects hippocampal neurons against excitotoxic injury', *Journal of Neurochemistry*, 102(6), pp. 1905–1917. doi:[10.1111/j.1471-4159.2007.04645.x](https://doi.org/10.1111/j.1471-4159.2007.04645.x).
- O'Dowd, B.F. *et al.* (1993) 'A human gene that shows identity with the gene encoding the angiotensin receptor is located on chromosome 11', *Gene*, 136(1–2), pp. 355–360. doi:[10.1016/0378-1119\(93\)90495-o](https://doi.org/10.1016/0378-1119(93)90495-o).
- Ogawa, S. *et al.* (2014) 'Plasma L-tryptophan concentration in major depressive disorder: new data and meta-analysis', *The Journal of Clinical Psychiatry*, 75(9), pp. e906-915. doi:[10.4088/JCP.13r08908](https://doi.org/10.4088/JCP.13r08908).
- Ohara-Imaizumi, M. *et al.* (2013) 'Serotonin regulates glucose-stimulated insulin secretion from pancreatic β cells during pregnancy', *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 110(48), pp. 19420–19425. doi:[10.1073/pnas.1310953110](https://doi.org/10.1073/pnas.1310953110).
- Ohmura, Y. *et al.* (2014) 'Optogenetic activation of serotonergic neurons enhances anxiety-like behaviour in mice', *International Journal of Neuropsychopharmacology*, 17(11), pp. 1777–1783. doi:[10.1017/S1461145714000637](https://doi.org/10.1017/S1461145714000637).

- Ohmura, Y. *et al.* (2020) ‘Different roles of distinct serotonergic pathways in anxiety-like behavior, antidepressant-like, and anti-impulsive effects’, *Neuropharmacology*, 167, p. 107703. doi:[10.1016/j.neuropharm.2019.107703](https://doi.org/10.1016/j.neuropharm.2019.107703).
- Ohta, K.-I. *et al.* (2014) ‘Prolonged maternal separation disturbs the serotonergic system during early brain development’, *International Journal of Developmental Neuroscience: The Official Journal of the International Society for Developmental Neuroscience*, 33, pp. 15–21. doi:[10.1016/j.ijdevneu.2013.10.007](https://doi.org/10.1016/j.ijdevneu.2013.10.007).
- Ohta, Y. *et al.* (2011) ‘Convergence of the Insulin and Serotonin Programs in the Pancreatic β -Cell’, *Diabetes*, 60(12), pp. 3208–3216. doi:[10.2337/db10-1192](https://doi.org/10.2337/db10-1192).
- Ohtsuki, T. *et al.* (2002) ‘Association between serotonin 4 receptor gene polymorphisms and bipolar disorder in Japanese case-control samples and the NIMH Genetics Initiative Bipolar Pedigrees’, *Molecular Psychiatry*, 7(9), pp. 954–961. doi:[10.1038/sj.mp.4001133](https://doi.org/10.1038/sj.mp.4001133).
- Okamoto, M. *et al.* (2008) ‘Adiponectin induces insulin secretion in vitro and in vivo at a low glucose concentration’, *Diabetologia*, 51(5), pp. 827–835. doi:[10.1007/s00125-008-0944-9](https://doi.org/10.1007/s00125-008-0944-9).
- O’Leary, O.F., Codagnone, M.G. and Cryan, J.F. (2020) ‘Revisiting the behavioral genetics of serotonin: relevance to anxiety and depression’, in *Handbook of Behavioral Neuroscience*. Elsevier, pp. 665–709. doi:[10.1016/B978-0-444-64125-0.00038-4](https://doi.org/10.1016/B978-0-444-64125-0.00038-4).
- Olsson, S.E. *et al.* (1976) ‘Effects of somatostatin on the biosynthesis and release of insulin from isolated pancreatic islets’, *Diabetes & Metabolism*, 2(4), pp. 199–202.
- Osborn, O. and Olefsky, J.M. (2012) ‘The cellular and signaling networks linking the immune system and metabolism in disease’, *Nature Medicine*, 18(3), pp. 363–374. doi:[10.1038/nm.2627](https://doi.org/10.1038/nm.2627).
- O’Sullivan, J.B. (1961) ‘Gestational diabetes. Unsuspected, asymptomatic diabetes in pregnancy’, *The New England Journal of Medicine*, 264, pp. 1082–1085. doi:[10.1056/NEJM196105252642104](https://doi.org/10.1056/NEJM196105252642104).
- Otte, C. *et al.* (2016) ‘Major depressive disorder’, *Nature Reviews Disease Primers*, 2(1), p. 16065. doi:[10.1038/nrdp.2016.65](https://doi.org/10.1038/nrdp.2016.65).
- P, S. and Dj, L. (2003) ‘Monocyte chemoattractant protein 1 in obesity and insulin resistance’, *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 100(12). doi:[10.1073/pnas.1133870100](https://doi.org/10.1073/pnas.1133870100).
- Pace, T.W.W., Hu, F. and Miller, A.H. (2007) ‘Cytokine-effects on glucocorticoid receptor function: relevance to glucocorticoid resistance and the pathophysiology and treatment of major depression’, *Brain, Behavior, and Immunity*, 21(1), pp. 9–19. doi:[10.1016/j.bbi.2006.08.009](https://doi.org/10.1016/j.bbi.2006.08.009).
- Palleria, C. *et al.* (2017) ‘Liraglutide prevents cognitive decline in a rat model of streptozotocin-induced diabetes independently from its peripheral metabolic effects’, *Behavioural Brain Research*, 321, pp. 157–169. doi:[10.1016/j.bbr.2017.01.004](https://doi.org/10.1016/j.bbr.2017.01.004).
- Palovcik, R.A. *et al.* (1984) ‘Insulin inhibits pyramidal neurons in hippocampal slices’, *Brain Research*, 309(1), pp. 187–191. doi:[10.1016/0006-8993\(84\)91028-x](https://doi.org/10.1016/0006-8993(84)91028-x).
- Pan, Y. *et al.* (2013) ‘Impaired hypothalamic insulin signaling in CUMS rats: restored by icariin and fluoxetine through inhibiting CRF system’, *Psychoneuroendocrinology*, 38(1), pp. 122–134. doi:[10.1016/j.psyneuen.2012.05.007](https://doi.org/10.1016/j.psyneuen.2012.05.007).
- Panchal, S.K. *et al.* (2011) ‘High-carbohydrate High-fat Diet-induced Metabolic Syndrome and Cardiovascular Remodeling in Rats’, *Journal of Cardiovascular Pharmacology*, 57(1), pp. 51–64. doi:[10.1097/FJC.0b013e3181feb90a](https://doi.org/10.1097/FJC.0b013e3181feb90a).
- Papazoglou, I. *et al.* (2012) ‘Hypothalamic serotonin–insulin signaling cross-talk and alterations in a type 2 diabetic model’, *Molecular and Cellular Endocrinology*, 350(1), pp. 136–144. doi:[10.1016/j.mce.2011.12.007](https://doi.org/10.1016/j.mce.2011.12.007).
- Papazoglou, I.K. *et al.* (2015) ‘Hippocampal GSK3 β as a Molecular Link Between Obesity and Depression’, *Molecular Neurobiology*, 52(1), pp. 363–374. doi:[10.1007/s12035-014-8863-x](https://doi.org/10.1007/s12035-014-8863-x).
- Pariante, C.M. and Lightman, S.L. (2008) ‘The HPA axis in major depression: classical theories and new developments’, *Trends in Neurosciences*, 31(9), pp. 464–468. doi:[10.1016/j.tins.2008.06.006](https://doi.org/10.1016/j.tins.2008.06.006).

- Parsons, R. (2004) 'Human cancer, PTEN and the PI-3 kinase pathway', *Seminars in Cell & Developmental Biology*, 15(2), pp. 171–176. doi:[10.1016/j.semcdb.2003.12.021](https://doi.org/10.1016/j.semcdb.2003.12.021).
- Pasqualetti, M. *et al.* (1998) 'Distribution of 5-HT_{2c} and 5-HT_{5a} receptor mRNA in human brain', *Annals of the New York Academy of Sciences*, 861, p. 245. doi:[10.1111/j.1749-6632.1998.tb10202.x](https://doi.org/10.1111/j.1749-6632.1998.tb10202.x).
- Patel, S.S. *et al.* (2018) 'Antidepressant and anxiolytic like effects of *Urtica dioica* leaves in streptozotocin induced diabetic mice', *Metabolic Brain Disease*, 33(4), pp. 1281–1292. doi:[10.1007/s11011-018-0243-1](https://doi.org/10.1007/s11011-018-0243-1).
- Patterson, C.C. *et al.* (2019) 'Trends and cyclical variation in the incidence of childhood type 1 diabetes in 26 European centres in the 25 year period 1989–2013: a multicentre prospective registration study', *Diabetologia*, 62(3), pp. 408–417. doi:[10.1007/s00125-018-4763-3](https://doi.org/10.1007/s00125-018-4763-3).
- Pauli, A. *et al.* (2014) 'Toddler: An Embryonic Signal That Promotes Cell Movement via Apelin Receptors', *Science*, 343(6172), pp. 1248636–1248636. doi:[10.1126/science.1248636](https://doi.org/10.1126/science.1248636).
- Paulmann, N. *et al.* (2009) 'Intracellular Serotonin Modulates Insulin Secretion from Pancreatic β -Cells by Protein Serotonylation', *PLoS Biology*. Edited by S. O'Rahilly, 7(10), p. e1000229. doi:[10.1371/journal.pbio.1000229](https://doi.org/10.1371/journal.pbio.1000229).
- Paxinos and Franklin (2000) *Paxinos and Franklin's the Mouse Brain in Stereotaxic Coordinates, Compact - 5th Edition*. Available at: <https://www.elsevier.com/books/paxinos-and-franklins-the-mouse-brain-in-stereotaxic-coordinates-compact/franklin/978-0-12-816159-3> (Accessed: 19 October 2021).
- Peraldi, P. and Spiegelman, B. (1998) 'TNF-alpha and insulin resistance: summary and future prospects', *Molecular and Cellular Biochemistry*, 182(1–2), pp. 169–175.
- Persson, B. and Hanson, U. (1998) 'Neonatal morbidities in gestational diabetes mellitus', *Diabetes Care*, 21 Suppl 2, pp. B79–84.
- Petersen, M.C. and Shulman, G.I. (2018) 'Mechanisms of Insulin Action and Insulin Resistance', *Physiological Reviews*, 98(4), pp. 2133–2223. doi:[10.1152/physrev.00063.2017](https://doi.org/10.1152/physrev.00063.2017).
- Phiel, C.J. *et al.* (2003) 'GSK-3 α regulates production of Alzheimer's disease amyloid- β peptides', *Nature*, 423(6938), pp. 435–439. doi:[10.1038/nature01640](https://doi.org/10.1038/nature01640).
- Philippu, A. and Prast, H. (2001) 'Role of histaminergic and cholinergic transmission in cognitive processes', *Drug News & Perspectives*, 14(9), pp. 523–529. doi:[10.1358/dnp.2001.14.9.858409](https://doi.org/10.1358/dnp.2001.14.9.858409).
- Phillips, C.M. and Perry, I.J. (2015) 'Depressive symptoms, anxiety and well-being among metabolic health obese subtypes', *Psychoneuroendocrinology*, 62, pp. 47–53. doi:[10.1016/j.psyneuen.2015.07.168](https://doi.org/10.1016/j.psyneuen.2015.07.168).
- Pisarenko, O.I. *et al.* (2014) 'Apelin-12 and its structural analog enhance antioxidant defense in experimental myocardial ischemia and reperfusion', *Molecular and Cellular Biochemistry*, 391(1–2), pp. 241–250. doi:[10.1007/s11010-014-2008-4](https://doi.org/10.1007/s11010-014-2008-4).
- Pitychoutis, P.M. *et al.* (2015) 'Mice Lacking the Serotonin Htr2B Receptor Gene Present an Antipsychotic-Sensitive Schizophrenic-Like Phenotype', *Neuropsychopharmacology: Official Publication of the American College of Neuropsychopharmacology*, 40(12), pp. 2764–2773. doi:[10.1038/npp.2015.126](https://doi.org/10.1038/npp.2015.126).
- Plum, L. *et al.* (2006) 'Enhanced PIP3 signaling in POMC neurons causes KATP channel activation and leads to diet-sensitive obesity', *The Journal of Clinical Investigation*, 116(7), pp. 1886–1901. doi:[10.1172/JCI27123](https://doi.org/10.1172/JCI27123).
- Poggini, S. *et al.* (2019) 'Combined Fluoxetine and Metformin Treatment Potentiates Antidepressant Efficacy Increasing IGF2 Expression in the Dorsal Hippocampus', *Neural Plasticity*, 2019, p. 4651031. doi:[10.1155/2019/4651031](https://doi.org/10.1155/2019/4651031).
- Polonsky, K.S., Given, B.D. and Van Cauter, E. (1988) 'Twenty-four-hour profiles and pulsatile patterns of insulin secretion in normal and obese subjects.', *Journal of Clinical Investigation*, 81(2), pp. 442–448. doi:[10.1172/JCI113339](https://doi.org/10.1172/JCI113339).

- Power, M.L. and Schulkin, J. (2008) ‘Sex differences in fat storage, fat metabolism, and the health risks from obesity: possible evolutionary origins’, *British Journal of Nutrition*, 99(5), pp. 931–940. doi:[10.1017/S0007114507853347](https://doi.org/10.1017/S0007114507853347).
- van Praag, H.M. and de Haan, S. (1979) ‘Central serotonin metabolism and frequency of depression’, *Psychiatry Research*, 1(3), pp. 219–224. doi:[10.1016/0165-1781\(79\)90002-7](https://doi.org/10.1016/0165-1781(79)90002-7).
- Proud, C.G. (2006) ‘Regulation of protein synthesis by insulin’, *Biochemical Society Transactions*, 34(2), p. 213. doi:[10.1042/BST20060213](https://doi.org/10.1042/BST20060213).
- Prouty, E.W. *et al.* (2019) ‘Selective vulnerability of dorsal raphe-medial prefrontal cortex projection neurons to corticosterone-induced hypofunction’, *The European Journal of Neuroscience*, 50(1), pp. 1712–1726. doi:[10.1111/ejn.14355](https://doi.org/10.1111/ejn.14355).
- Qi, X. *et al.* (2018) ‘Comparison of Therapeutic Effects of TREK1 Blockers and Fluoxetine on Chronic Unpredicted Mild Stress Sensitive Rats’, *ACS Chemical Neuroscience*, 9(11), pp. 2824–2831. doi:[10.1021/acschemneuro.8b00225](https://doi.org/10.1021/acschemneuro.8b00225).
- Qiu, J. *et al.* (2014) ‘Insulin Excites Anorexigenic Proopiomelanocortin Neurons via Activation of Canonical Transient Receptor Potential Channels’, *Cell Metabolism*, 19(4), pp. 682–693. doi:[10.1016/j.cmet.2014.03.004](https://doi.org/10.1016/j.cmet.2014.03.004).
- Quesseveur, G., Gardier, A.M. and Guiard, B.P. (2013) ‘The monoaminergic tripartite synapse: a putative target for currently available antidepressant drugs’, *Current Drug Targets*, 14(11), pp. 1277–1294. doi:[10.2174/13894501113149990209](https://doi.org/10.2174/13894501113149990209).
- Rahmani, G. *et al.* (2020) ‘Garlic (*Allium sativum*) improves anxiety- and depressive-related behaviors and brain oxidative stress in diabetic rats’, *Archives of Physiology and Biochemistry*, 126(2), pp. 95–100. doi:[10.1080/13813455.2018.1494746](https://doi.org/10.1080/13813455.2018.1494746).
- Rai, R.C., Bagul, P.K. and Banerjee, S.K. (2020) ‘NLRP3 inflammasome drives inflammation in high fructose fed diabetic rat liver: Effect of resveratrol and metformin’, *Life Sciences*, 253, p. 117727. doi:[10.1016/j.lfs.2020.117727](https://doi.org/10.1016/j.lfs.2020.117727).
- Raison, C.L. and Miller, A.H. (2003) ‘When not enough is too much: the role of insufficient glucocorticoid signaling in the pathophysiology of stress-related disorders’, *The American Journal of Psychiatry*, 160(9), pp. 1554–1565. doi:[10.1176/appi.ajp.160.9.1554](https://doi.org/10.1176/appi.ajp.160.9.1554).
- Rasgon, N.L. *et al.* (2010) ‘Rosiglitazone add-on in treatment of depressed patients with insulin resistance: a pilot study’, *TheScientificWorldJournal*, 10, pp. 321–328. doi:[10.1100/tsw.2010.32](https://doi.org/10.1100/tsw.2010.32).
- Reaux, A. *et al.* (2001) ‘Physiological role of a novel neuropeptide, apelin, and its receptor in the rat brain: Physiological role of apelin’, *Journal of Neurochemistry*, 77(4), pp. 1085–1096. doi:[10.1046/j.1471-4159.2001.00320.x](https://doi.org/10.1046/j.1471-4159.2001.00320.x).
- Reaux-Le Goazigo, A. *et al.* (2011) ‘Apelin and the proopiomelanocortin system: a new regulatory pathway of hypothalamic α -MSH release’, *American Journal of Physiology-Endocrinology and Metabolism*, 301(5), pp. E955–E966. doi:[10.1152/ajpendo.00090.2011](https://doi.org/10.1152/ajpendo.00090.2011).
- Reaven, G.M. (2005) ‘The insulin resistance syndrome: definition and dietary approaches to treatment’, *Annual Review of Nutrition*, 25, pp. 391–406. doi:[10.1146/annurev.nutr.24.012003.132155](https://doi.org/10.1146/annurev.nutr.24.012003.132155).
- Reed, M.J. *et al.* (2000) ‘A new rat model of type 2 diabetes: the fat-fed, streptozotocin-treated rat’, *Metabolism: Clinical and Experimental*, 49(11), pp. 1390–1394. doi:[10.1053/meta.2000.17721](https://doi.org/10.1053/meta.2000.17721).
- Reger, M.A. *et al.* (2008) ‘Intranasal insulin improves cognition and modulates β -amyloid in early AD’, *Neurology*, 70(6), pp. 440–448. doi:[10.1212/01.WNL.0000265401.62434.36](https://doi.org/10.1212/01.WNL.0000265401.62434.36).
- Ren, J. *et al.* (2018) ‘Anatomically Defined and Functionally Distinct Dorsal Raphe Serotonin Subsystems’, *Cell*, 175(2), pp. 472–487.e20. doi:[10.1016/j.cell.2018.07.043](https://doi.org/10.1016/j.cell.2018.07.043).
- Ren, J. *et al.* (2019) *Single-cell transcriptomes and whole-brain projections of serotonin neurons in the mouse dorsal and median raphe nuclei* - PubMed. Available at: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/31647409/> (Accessed: 1 November 2021).

- Rena, G., Hardie, D.G. and Pearson, E.R. (2017) 'The mechanisms of action of metformin', *Diabetologia*, 60(9), pp. 1577–1585. doi:[10.1007/s00125-017-4342-z](https://doi.org/10.1007/s00125-017-4342-z).
- Réus, G.Z. *et al.* (2019) 'Relationship of Oxidative Stress as a Link between Diabetes Mellitus and Major Depressive Disorder', *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*, 2019, p. 8637970. doi:[10.1155/2019/8637970](https://doi.org/10.1155/2019/8637970).
- Reza, M. *et al.* (2002) 'Insulin improves well-being for selected elderly type 2 diabetic subjects', *Diabetes Research and Clinical Practice*, 55(3), pp. 201–207. doi:[10.1016/s0168-8227\(01\)00327-8](https://doi.org/10.1016/s0168-8227(01)00327-8).
- 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', *The Journal of Physiology*, 596(19), pp. 4753–4765. doi:[10.1113/JP276149](https://doi.org/10.1113/JP276149).
- Richardson-Jones, J.W. *et al.* (2010) '5-HT_{1A} autoreceptor levels determine vulnerability to stress and response to antidepressants', *Neuron*, 65(1), pp. 40–52. doi:[10.1016/j.neuron.2009.12.003](https://doi.org/10.1016/j.neuron.2009.12.003).
- Ringström, C. *et al.* (2010) 'Apelin is a novel islet peptide', *Regulatory Peptides*, 162(1–3), pp. 44–51. doi:[10.1016/j.regpep.2010.03.005](https://doi.org/10.1016/j.regpep.2010.03.005).
- Roberts, A.J. *et al.* (2004) 'Mice lacking 5-HT receptors show specific impairments in contextual learning', *The European Journal of Neuroscience*, 19(7), pp. 1913–1922. doi:[10.1111/j.1460-9568.2004.03288.x](https://doi.org/10.1111/j.1460-9568.2004.03288.x).
- Romeo, G.R., Lee, J. and Shoelson, S.E. (2012) 'Metabolic syndrome, insulin resistance, and roles of inflammation--mechanisms and therapeutic targets', *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology*, 32(8), pp. 1771–1776. doi:[10.1161/ATVBAHA.111.241869](https://doi.org/10.1161/ATVBAHA.111.241869).
- Ronkainen, V. *et al.* (2007) 'Hypoxia inducible factor regulates the cardiac expression and secretion of apelin', *The FASEB Journal*, 21(8), pp. 1821–1830. doi:[10.1096/fj.06-7294com](https://doi.org/10.1096/fj.06-7294com).
- Roohafza, H. *et al.* (2014) 'A Possible Role for Pioglitazone in the Management of Depressive Symptoms in Metabolic Syndrome Patients (EPICAMP Study): A Double Blind, Randomized Clinical Trial', *International Scholarly Research Notices*, 2014, p. 697617. doi:[10.1155/2014/697617](https://doi.org/10.1155/2014/697617).
- Rorsman, P. and Braun, M. (2013) 'Regulation of Insulin Secretion in Human Pancreatic Islets', *Annual Review of Physiology*, 75(1), pp. 155–179. doi:[10.1146/annurev-physiol-030212-183754](https://doi.org/10.1146/annurev-physiol-030212-183754).
- Rudich, A. *et al.* (1998) 'Prolonged oxidative stress impairs insulin-induced GLUT4 translocation in 3T3-L1 adipocytes', *Diabetes*, 47(10), pp. 1562–1569. doi:[10.2337/diabetes.47.10.1562](https://doi.org/10.2337/diabetes.47.10.1562).
- Rueggsegger, G.N. *et al.* (2019) 'Exercise and metformin counteract altered mitochondrial function in the insulin-resistant brain', *JCI insight*, 4(18), p. 130681. doi:[10.1172/jci.insight.130681](https://doi.org/10.1172/jci.insight.130681).
- Ruf, B.M. and Bhagwagar, Z. (2009) 'The 5-HT_{1B} receptor: a novel target for the pathophysiology of depression', *Current Drug Targets*, 10(11), pp. 1118–1138. doi:[10.2174/138945009789735192](https://doi.org/10.2174/138945009789735192).
- Rui, L. *et al.* (2002) 'SOCS-1 and SOCS-3 block insulin signaling by ubiquitin-mediated degradation of IRS1 and IRS2', *The Journal of Biological Chemistry*, 277(44), pp. 42394–42398. doi:[10.1074/jbc.C200444200](https://doi.org/10.1074/jbc.C200444200).
- Russo, S.J. *et al.* (2007) 'IRS2-Akt pathway in midbrain dopamine neurons regulates behavioral and cellular responses to opiates', *Nature Neuroscience*, 10(1), pp. 93–99. doi:[10.1038/nn1812](https://doi.org/10.1038/nn1812).
- Ryle, A.P. *et al.* (1955) 'The disulphide bonds of insulin', *The Biochemical Journal*, 60(4), pp. 541–556. doi:[10.1042/bj0600541](https://doi.org/10.1042/bj0600541).
- Sagi, Y. *et al.* (2020) 'Emergence of 5-HT_{5A} signaling in parvalbumin neurons mediates delayed antidepressant action', *Molecular Psychiatry*, 25(6), pp. 1191–1201. doi:[10.1038/s41380-019-0379-3](https://doi.org/10.1038/s41380-019-0379-3).
- Şahin, T.D. *et al.* (2019) 'Anxiolytic-Like and Antidepressant-Like Effects of Resveratrol in Streptozotocin-Induced Diabetic Rats', *Archives of Neuropsychiatry*, 56(2), pp. 144–149. doi:[10.29399/npa.23176](https://doi.org/10.29399/npa.23176).

- Sakoda, H. *et al.* (2000) 'Dexamethasone-induced insulin resistance in 3T3-L1 adipocytes is due to inhibition of glucose transport rather than insulin signal transduction', *Diabetes*, 49(10), pp. 1700–1708. doi:[10.2337/diabetes.49.10.1700](https://doi.org/10.2337/diabetes.49.10.1700).
- Salari, N. *et al.* (2020) 'Prevalence of stress, anxiety, depression among the general population during the COVID-19 pandemic: a systematic review and meta-analysis', *Globalization and Health*, 16(1), p. 57. doi:[10.1186/s12992-020-00589-w](https://doi.org/10.1186/s12992-020-00589-w).
- Salkovic-Petrisic, M. *et al.* (2006) 'Alzheimer-like changes in protein kinase B and glycogen synthase kinase-3 in rat frontal cortex and hippocampus after damage to the insulin signalling pathway', *Journal of Neurochemistry*, 96(4), pp. 1005–1015. doi:[10.1111/j.1471-4159.2005.03637.x](https://doi.org/10.1111/j.1471-4159.2005.03637.x).
- Samols, E., Marri, G. and Marks, V. (1965) 'PROMOTION OF INSULIN SECRETION BY GLUCAGON', *The Lancet*, 286(7409), pp. 415–416. doi:[10.1016/S0140-6736\(65\)90761-0](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(65)90761-0).
- Sassone-Corsi, P. (2012) 'The Cyclic AMP Pathway', *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology*, 4(12), pp. a011148–a011148. doi:[10.1101/cshperspect.a011148](https://doi.org/10.1101/cshperspect.a011148).
- Sawane, M. *et al.* (2013) 'Apelin Inhibits Diet-Induced Obesity by Enhancing Lymphatic and Blood Vessel Integrity', *Diabetes*, 62(6), pp. 1970–1980. doi:[10.2337/db12-0604](https://doi.org/10.2337/db12-0604).
- Schenk, S., Saberi, M. and Olefsky, J.M. (2008) 'Insulin sensitivity: modulation by nutrients and inflammation', *The Journal of Clinical Investigation*, 118(9), pp. 2992–3002. doi:[10.1172/JCI34260](https://doi.org/10.1172/JCI34260).
- Schnedl, W.J. *et al.* (1994) 'STZ transport and cytotoxicity. Specific enhancement in GLUT2-expressing cells', *Diabetes*, 43(11), pp. 1326–1333. doi:[10.2337/diab.43.11.1326](https://doi.org/10.2337/diab.43.11.1326).
- Schubert, M. *et al.* (2004) 'Role for neuronal insulin resistance in neurodegenerative diseases', *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 101(9), pp. 3100–3105. doi:[10.1073/pnas.0308724101](https://doi.org/10.1073/pnas.0308724101).
- Sciacca, L. *et al.* (2010) 'Insulin analogues differently activate insulin receptor isoforms and post-receptor signalling', *Diabetologia*, 53(8), pp. 1743–1753. doi:[10.1007/s00125-010-1760-6](https://doi.org/10.1007/s00125-010-1760-6).
- Seedat, S. *et al.* (2009) 'Cross-National Associations Between Gender and Mental Disorders in the World Health Organization World Mental Health Surveys', *Archives of General Psychiatry*, 66(7), p. 785. doi:[10.1001/archgenpsychiatry.2009.36](https://doi.org/10.1001/archgenpsychiatry.2009.36).
- Seino, S., Seino, M. and Bell, G.I. (1990) 'Human Insulin-Receptor Gene', *Diabetes*, 39(2), pp. 129–133. doi:[10.2337/diab.39.2.129](https://doi.org/10.2337/diab.39.2.129).
- Seino, S., Shibasaki, T. and Minami, K. (2011) 'Dynamics of insulin secretion and the clinical implications for obesity and diabetes', *The Journal of Clinical Investigation*, 121(6), pp. 2118–2125. doi:[10.1172/JCI45680](https://doi.org/10.1172/JCI45680).
- Sepanjnia, K. *et al.* (2012) 'Pioglitazone adjunctive therapy for moderate-to-severe major depressive disorder: randomized double-blind placebo-controlled trial', *Neuropsychopharmacology: Official Publication of the American College of Neuropsychopharmacology*, 37(9), pp. 2093–2100. doi:[10.1038/npp.2012.58](https://doi.org/10.1038/npp.2012.58).
- Serrats, J. *et al.* (2004) '5-HT_{5B} receptor mRNA in the raphe nuclei: coexpression with serotonin transporter', *Synapse (New York, N.Y.)*, 51(2), pp. 102–111. doi:[10.1002/syn.10287](https://doi.org/10.1002/syn.10287).
- Sestile, C.C. *et al.* (2016) 'Antidepressant-like Effect of Insulin in Streptozotocin-induced Type 2 Diabetes Mellitus Rats', *Basic & Clinical Pharmacology & Toxicology*, 119(3), pp. 243–248. doi:[10.1111/bcpt.12563](https://doi.org/10.1111/bcpt.12563).
- Sharma, A.N. *et al.* (2010) 'Neurobehavioral deficits in db/db diabetic mice', *Physiology & Behavior*, 101(3), pp. 381–388. doi:[10.1016/j.physbeh.2010.07.002](https://doi.org/10.1016/j.physbeh.2010.07.002).
- 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', *Journal of Psychopharmacology (Oxford, England)*, 26(5), pp. 724–732. doi:[10.1177/0269881111434620](https://doi.org/10.1177/0269881111434620).
- Shen, P. *et al.* (2019) 'Apelin-13 ameliorates chronic water-immersion restraint stress-induced memory performance deficit through upregulation of BDNF in rats', *Neuroscience Letters*, 696, pp. 151–155. doi:[10.1016/j.neulet.2018.11.051](https://doi.org/10.1016/j.neulet.2018.11.051).

- Shepherd, P.R. and Kahn, B.B. (1999) ‘Glucose transporters and insulin action--implications for insulin resistance and diabetes mellitus’, *The New England Journal of Medicine*, 341(4), pp. 248–257. doi:[10.1056/NEJM199907223410406](https://doi.org/10.1056/NEJM199907223410406).
- Siddiquee, K. *et al.* (2013) ‘The apelin receptor inhibits the angiotensin II type 1 receptor via allosteric trans-inhibition: Allosterism in APJ: AT1 heterodimers’, *British Journal of Pharmacology*, 168(5), pp. 1104–1117. doi:[10.1111/j.1476-5381.2012.02192.x](https://doi.org/10.1111/j.1476-5381.2012.02192.x).
- Sinen, O. and Bülbül, M. (2021) ‘The role of autonomic pathways in peripheral apelin-induced gastrointestinal dysmotility: involvement of the circumventricular organs’, *Experimental Physiology*, 106(2), pp. 475–485. doi:[10.1113/EP089182](https://doi.org/10.1113/EP089182).
- Sipols, A.J., Baskin, D.G. and Schwartz, M.W. (1995) ‘Effect of Intracerebroventricular Insulin Infusion on Diabetic Hyperphagia and Hypothalamic Neuropeptide Gene Expression’, *Diabetes*, 44(2), pp. 147–151. doi:[10.2337/diab.44.2.147](https://doi.org/10.2337/diab.44.2.147).
- Skeberdis, V.A. *et al.* (2001) ‘Insulin promotes rapid delivery of N-methyl-D- aspartate receptors to the cell surface by exocytosis’, *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 98(6), pp. 3561–3566. doi:[10.1073/pnas.051634698](https://doi.org/10.1073/pnas.051634698).
- Slaaby, R. (2015) ‘Specific insulin/IGF1 hybrid receptor activation assay reveals IGF1 as a more potent ligand than insulin’, *Scientific Reports*, 5(1), p. 7911. doi:[10.1038/srep07911](https://doi.org/10.1038/srep07911).
- Soliman, E. *et al.* (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-Schmiedeberg's Archives of Pharmacology*, 393(8), pp. 1391–1404. doi:[10.1007/s00210-020-01838-w](https://doi.org/10.1007/s00210-020-01838-w).
- Solleiro-Villavicencio, H. and Rivas-Arancibia, S. (2018) ‘Effect of Chronic Oxidative Stress on Neuroinflammatory Response Mediated by CD4+T Cells in Neurodegenerative Diseases’, *Frontiers in Cellular Neuroscience*, 12, p. 114. doi:[10.3389/fncel.2018.00114](https://doi.org/10.3389/fncel.2018.00114).
- Sörhede Winzell, M., Magnusson, C. and Ahrén, B. (2005) ‘The apj receptor is expressed in pancreatic islets and its ligand, apelin, inhibits insulin secretion in mice’, *Regulatory Peptides*, 131(1–3), pp. 12–17. doi:[10.1016/j.regpep.2005.05.004](https://doi.org/10.1016/j.regpep.2005.05.004).
- Soto, M. *et al.* (2019) ‘Insulin signaling in the hippocampus and amygdala regulates metabolism and neurobehavior’, *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 116(13), pp. 6379–6384. doi:[10.1073/pnas.1817391116](https://doi.org/10.1073/pnas.1817391116).
- Sowa, J. *et al.* (2019) ‘Ketamine Administration Reverses Corticosterone-Induced Alterations in Excitatory and Inhibitory Transmission in the Rat Dorsal Raphe Nucleus’, *Neural Plasticity*, 2019, p. 3219490. doi:[10.1155/2019/3219490](https://doi.org/10.1155/2019/3219490).
- Spencer, B. *et al.* (2018) ‘Identification of Insulin Receptor Splice Variant B in Neurons by in situ Detection in Human Brain Samples’, *Scientific Reports*, 8(1), p. 4070. doi:[10.1038/s41598-018-22434-2](https://doi.org/10.1038/s41598-018-22434-2).
- Stables, R. *et al.* (1987) ‘Antiemetic properties of the 5HT₃-receptor antagonist, gr38032f’, *Cancer Treatment Reviews*, 14(3–4), pp. 333–336. doi:[10.1016/0305-7372\(87\)90026-0](https://doi.org/10.1016/0305-7372(87)90026-0).
- Steen, E. *et al.* (2005) ‘Impaired insulin and insulin-like growth factor expression and signaling mechanisms in Alzheimer’s disease – is this type 3 diabetes?’, *Journal of Alzheimer’s Disease*, 7(1), pp. 63–80. doi:[10.3233/JAD-2005-7107](https://doi.org/10.3233/JAD-2005-7107).
- Stein, L.J. *et al.* (1983) ‘Immunoreactive insulin levels are elevated in the cerebrospinal fluid of genetically obese Zucker rats’, *Endocrinology*, 113(6), pp. 2299–2301. doi:[10.1210/endo-113-6-2299](https://doi.org/10.1210/endo-113-6-2299).
- Stentz, F.B. *et al.* (1989) ‘Identification of insulin intermediates and sites of cleavage of native insulin by insulin protease from human fibroblasts’, *The Journal of Biological Chemistry*, 264(34), pp. 20275–20282.
- Stouffer, M.A. *et al.* (2015) ‘Insulin enhances striatal dopamine release by activating cholinergic interneurons and thereby signals reward’, *Nature Communications*, 6(1), p. 8543. doi:[10.1038/ncomms9543](https://doi.org/10.1038/ncomms9543).

- Stratford, S. *et al.* (2004) 'Regulation of Insulin Action by Ceramide', *Journal of Biological Chemistry*, 279(35), pp. 36608–36615. doi:[10.1074/jbc.M406499200](https://doi.org/10.1074/jbc.M406499200).
- Stratford, T.R. and Wirtshafter, D. (1990) 'Ascending dopaminergic projections from the dorsal raphe nucleus in the rat', *Brain Research*, 511(1), pp. 173–176. doi:[10.1016/0006-8993\(90\)90239-8](https://doi.org/10.1016/0006-8993(90)90239-8).
- Su, W.-J. *et al.* (2017) 'Antidiabetic drug glyburide modulates depressive-like behavior comorbid with insulin resistance', *Journal of Neuroinflammation*, 14(1), p. 210. doi:[10.1186/s12974-017-0985-4](https://doi.org/10.1186/s12974-017-0985-4).
- Sun, X.J. *et al.* (1991) 'Structure of the insulin receptor substrate IRS-1 defines a unique signal transduction protein', *Nature*, 352(6330), pp. 73–77. doi:[10.1038/352073a0](https://doi.org/10.1038/352073a0).
- Sun, X.J. *et al.* (1995) 'Role of IRS-2 in insulin and cytokine signalling', *Nature*, 377(6545), pp. 173–177. doi:[10.1038/377173a0](https://doi.org/10.1038/377173a0).
- Svenningsson, P. *et al.* (2007) 'Biochemical and behavioral evidence for antidepressant-like effects of 5-HT₆ receptor stimulation', *The Journal of Neuroscience: The Official Journal of the Society for Neuroscience*, 27(15), pp. 4201–4209. doi:[10.1523/JNEUROSCI.3110-06.2007](https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.3110-06.2007).
- Taheri, S. *et al.* (2002) 'The Effects of Centrally Administered Apelin-13 on Food Intake, Water Intake and Pituitary Hormone Release in Rats', *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 291(5), pp. 1208–1212. doi:[10.1006/bbrc.2002.6575](https://doi.org/10.1006/bbrc.2002.6575).
- Takano, K. *et al.* (2018) 'Insulin expression in cultured astrocytes and the decrease by amyloid β ', *Neurochemistry International*, 119, pp. 171–177. doi:[10.1016/j.neuint.2017.10.017](https://doi.org/10.1016/j.neuint.2017.10.017).
- Talbot, K. *et al.* (2012) 'Demonstrated brain insulin resistance in Alzheimer's disease patients is associated with IGF-1 resistance, IRS-1 dysregulation, and cognitive decline', *Journal of Clinical Investigation*, 122(4), pp. 1316–1338. doi:[10.1172/JCI59903](https://doi.org/10.1172/JCI59903).
- Tang, Z.-J. *et al.* (2015) 'Antidepressant-like and anxiolytic-like effects of hydrogen sulfide in streptozotocin-induced diabetic rats through inhibition of hippocampal oxidative stress', *Behavioural Pharmacology*, 26(5), pp. 427–435. doi:[10.1097/FBP.000000000000143](https://doi.org/10.1097/FBP.000000000000143).
- Taniguchi, C.M., Emanuelli, B. and Kahn, C.R. (2006) 'Critical nodes in signalling pathways: insights into insulin action', *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, 7(2), pp. 85–96. doi:[10.1038/nrm1837](https://doi.org/10.1038/nrm1837).
- Tanokashira, D. *et al.* (2018) 'Metformin treatment ameliorates diabetes-associated decline in hippocampal neurogenesis and memory via phosphorylation of insulin receptor substrate 1', *FEBS open bio*, 8(7), pp. 1104–1118. doi:[10.1002/2211-5463.12436](https://doi.org/10.1002/2211-5463.12436).
- Tatemoto, K. *et al.* (1998) 'Isolation and characterization of a novel endogenous peptide ligand for the human APJ receptor', *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 251(2), pp. 471–476. doi:[10.1006/bbrc.1998.9489](https://doi.org/10.1006/bbrc.1998.9489).
- Tatemoto, K. *et al.* (2001) 'The novel peptide apelin lowers blood pressure via a nitric oxide-dependent mechanism', *Regulatory Peptides*, 99(2), pp. 87–92. doi:[10.1016/S0167-0115\(01\)00236-1](https://doi.org/10.1016/S0167-0115(01)00236-1).
- Tecott, L.H. *et al.* (1995) 'Eating disorder and epilepsy in mice lacking 5-HT_{2c} serotonin receptors', *Nature*, 374(6522), pp. 542–546. doi:[10.1038/374542a0](https://doi.org/10.1038/374542a0).
- Tecott, L.H. *et al.* (1998) 'Perturbed dentate gyrus function in serotonin 5-HT_{2C} receptor mutant mice', *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 95(25), pp. 15026–15031. doi:[10.1073/pnas.95.25.15026](https://doi.org/10.1073/pnas.95.25.15026).
- Teissier, A. *et al.* (2015) 'Activity of Raphé Serotonergic Neurons Controls Emotional Behaviors', *Cell Reports*, 13(9), pp. 1965–1976. doi:[10.1016/j.celrep.2015.10.061](https://doi.org/10.1016/j.celrep.2015.10.061).
- Telegdy, G. and Jászberényi, M. (2014) 'Transmitter mediation of the anxiolytic action of apelin-13 in male mice', *Behavioural Brain Research*, 263, pp. 198–202. doi:[10.1016/j.bbr.2014.01.009](https://doi.org/10.1016/j.bbr.2014.01.009).
- Terjung, R. (ed.) (2011) *Comprehensive Physiology*. 1st edn. Wiley. doi:[10.1002/cphy](https://doi.org/10.1002/cphy).
- Than, A. *et al.* (2012) 'Apelin inhibits adipogenesis and lipolysis through distinct molecular pathways', *Molecular and Cellular Endocrinology*, 362(1–2), pp. 227–241. doi:[10.1016/j.mce.2012.07.002](https://doi.org/10.1016/j.mce.2012.07.002).

- Than, A. *et al.* (2015) 'Apelin Enhances Brown Adipogenesis and Browning of White Adipocytes', *The Journal of Biological Chemistry*, 290(23), pp. 14679–14691. doi:[10.1074/jbc.M115.643817](https://doi.org/10.1074/jbc.M115.643817).
- The DIAMOND Project Group (2006) 'Incidence and trends of childhood Type 1 diabetes worldwide 1990–1999', *Diabetic Medicine*, 23(8), pp. 857–866. doi:[10.1111/j.1464-5491.2006.01925.x](https://doi.org/10.1111/j.1464-5491.2006.01925.x).
- Thomas, D.R. *et al.* (2002) '[3H]-SB-269970 radiolabels 5-HT7 receptors in rodent, pig and primate brain tissues', *Neuropharmacology*, 42(1), pp. 74–81. doi:[10.1016/s0028-3908\(01\)00151-4](https://doi.org/10.1016/s0028-3908(01)00151-4).
- Thorens, B. (2015) 'GLUT2, glucose sensing and glucose homeostasis', *Diabetologia*, 58(2), pp. 221–232. doi:[10.1007/s00125-014-3451-1](https://doi.org/10.1007/s00125-014-3451-1).
- Tian, S.-W., Xu, F. and Gui, S.-J. (2018) 'Apelin-13 reverses memory impairment and depression-like behavior in chronic social defeat stressed rats', *Peptides*, 108, pp. 1–6. doi:[10.1016/j.peptides.2018.08.009](https://doi.org/10.1016/j.peptides.2018.08.009).
- Tiganis, T. (2013) 'PTP1B and TCPTP - nonredundant phosphatases in insulin signaling and glucose homeostasis: Regulation of insulin signaling by PTP1B and TCPTP', *FEBS Journal*, 280(2), pp. 445–458. doi:[10.1111/j.1742-4658.2012.08563.x](https://doi.org/10.1111/j.1742-4658.2012.08563.x).
- Todd, J.A. (2010) 'Etiology of Type 1 Diabetes', *Immunity*, 32(4), pp. 457–467. doi:[10.1016/j.immuni.2010.04.001](https://doi.org/10.1016/j.immuni.2010.04.001).
- Tsuneki, H. *et al.* (2013) 'Hypothalamic orexin prevents hepatic insulin resistance induced by social defeat stress in mice', *Neuropeptides*, 47(3), pp. 213–219. doi:[10.1016/j.npep.2013.02.002](https://doi.org/10.1016/j.npep.2013.02.002).
- Tyagi, A. and Pugazhenth, S. (2021) 'Targeting Insulin Resistance to Treat Cognitive Dysfunction', *Molecular Neurobiology*, 58(6), pp. 2672–2691. doi:[10.1007/s12035-021-02283-3](https://doi.org/10.1007/s12035-021-02283-3).
- Tye, K.M. *et al.* (2013) 'Dopamine neurons modulate neural encoding and expression of depression-related behaviour', *Nature*, 493(7433), pp. 537–541. doi:[10.1038/nature11740](https://doi.org/10.1038/nature11740).
- Unger, J. *et al.* (1989) 'Distribution of insulin receptor-like immunoreactivity in the rat forebrain', *Neuroscience*, 31(1), pp. 143–157. doi:[10.1016/0306-4522\(89\)90036-5](https://doi.org/10.1016/0306-4522(89)90036-5).
- Urakawa, H. *et al.* (2003) 'Oxidative Stress Is Associated with Adiposity and Insulin Resistance in Men', *The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism*, 88(10), pp. 4673–4676. doi:[10.1210/jc.2003-030202](https://doi.org/10.1210/jc.2003-030202).
- Urano, F. *et al.* (2000) 'Coupling of stress in the ER to activation of JNK protein kinases by transmembrane protein kinase IRE1', *Science (New York, N.Y.)*, 287(5453), pp. 664–666. doi:[10.1126/science.287.5453.664](https://doi.org/10.1126/science.287.5453.664).
- Urban, D.J. *et al.* (2016) 'Elucidation of The Behavioral Program and Neuronal Network Encoded by Dorsal Raphe Serotonergic Neurons', *Neuropsychopharmacology: Official Publication of the American College of Neuropsychopharmacology*, 41(5), pp. 1404–1415. doi:[10.1038/npp.2015.293](https://doi.org/10.1038/npp.2015.293).
- Uysal, K.T. *et al.* (1997) 'Protection from obesity-induced insulin resistance in mice lacking TNF-alpha function', *Nature*, 389(6651), pp. 610–614. doi:[10.1038/39335](https://doi.org/10.1038/39335).
- Van Der Heide, L.P. *et al.* (2005) 'Insulin modulates hippocampal activity-dependent synaptic plasticity in a N-methyl-d-aspartate receptor and phosphatidylinositol-3-kinase-dependent manner: Insulin modulates LTP and LTD', *Journal of Neurochemistry*, 94(4), pp. 1158–1166. doi:[10.1111/j.1471-4159.2005.03269.x](https://doi.org/10.1111/j.1471-4159.2005.03269.x).
- Vancassel, S., Capuron, L. and Castanon, N. (2018) 'Brain Kynurenine and BH4 Pathways: Relevance to the Pathophysiology and Treatment of Inflammation-Driven Depressive Symptoms', *Frontiers in Neuroscience*, 12, p. 499. doi:[10.3389/fnins.2018.00499](https://doi.org/10.3389/fnins.2018.00499).
- Varnäs, K. *et al.* (2004) 'Distribution of 5-HT7 receptors in the human brain: a preliminary autoradiographic study using [3H]SB-269970', *Neuroscience Letters*, 367(3), pp. 313–316. doi:[10.1016/j.neulet.2004.06.025](https://doi.org/10.1016/j.neulet.2004.06.025).
- Ventorp, F. *et al.* (2017) 'Exendin-4 Treatment Improves LPS-Induced Depressive-Like Behavior Without Affecting Pro-Inflammatory Cytokines', *Journal of Parkinson's Disease*, 7(2), pp. 263–273. doi:[10.3233/JPD-171068](https://doi.org/10.3233/JPD-171068).

- Ventre, J. *et al.* (1997) 'Targeted disruption of the tumor necrosis factor- α gene: metabolic consequences in obese and nonobese mice', *Diabetes*, 46(9), pp. 1526–1531. doi:[10.2337/diab.46.9.1526](https://doi.org/10.2337/diab.46.9.1526).
- Vinel, C. *et al.* (2018) 'The exerkine apelin reverses age-associated sarcopenia', *Nature Medicine*, 24(9), pp. 1360–1371. doi:[10.1038/s41591-018-0131-6](https://doi.org/10.1038/s41591-018-0131-6).
- Walstab, J., Rappold, G. and Niesler, B. (2010) '5-HT(3) receptors: role in disease and target of drugs', *Pharmacology & Therapeutics*, 128(1), pp. 146–169. doi:[10.1016/j.pharmthera.2010.07.001](https://doi.org/10.1016/j.pharmthera.2010.07.001).
- Wang, B., Chandrasekera, P. and Pippin, J. (2014) 'Leptin- and Leptin Receptor-Deficient Rodent Models: Relevance for Human Type 2 Diabetes', *Current Diabetes Reviews*, 10(2), pp. 131–145. doi:[10.2174/1573399810666140508121012](https://doi.org/10.2174/1573399810666140508121012).
- Wang, C. *et al.* (2021) 'A high-fructose diet in rats induces systemic iron deficiency and hepatic iron overload by an inflammation mechanism', *Journal of Food Biochemistry*, 45(1). doi:[10.1111/jfbc.13578](https://doi.org/10.1111/jfbc.13578).
- Wang, Y. *et al.* (2020) 'Association of Apelin and Apelin Receptor Polymorphisms With the Risk of Comorbid Depression and Anxiety in Coronary Heart Disease Patients', *Frontiers in Genetics*, 11, p. 893. doi:[10.3389/fgene.2020.00893](https://doi.org/10.3389/fgene.2020.00893).
- Wei, L., Hou, X. and Tatemoto, K. (2005) 'Regulation of apelin mRNA expression by insulin and glucocorticoids in mouse 3T3-L1 adipocytes', *Regulatory Peptides*, 132(1–3), pp. 27–32. doi:[10.1016/j.regpep.2005.08.003](https://doi.org/10.1016/j.regpep.2005.08.003).
- Weina, H. *et al.* (2018) 'Liraglutide attenuates the depressive- and anxiety-like behaviour in the corticosterone induced depression model via improving hippocampal neural plasticity', *Brain Research*, 1694, pp. 55–62. doi:[10.1016/j.brainres.2018.04.031](https://doi.org/10.1016/j.brainres.2018.04.031).
- Weiss, M.A. (2009) 'Proinsulin and the Genetics of Diabetes Mellitus', *Journal of Biological Chemistry*, 284(29), pp. 19159–19163. doi:[10.1074/jbc.R109.009936](https://doi.org/10.1074/jbc.R109.009936).
- Wesołowska, A. *et al.* (2006) 'Effect of the selective 5-HT7 receptor antagonist SB 269970 in animal models of anxiety and depression', *Neuropharmacology*, 51(3), pp. 578–586. doi:[10.1016/j.neuropharm.2006.04.017](https://doi.org/10.1016/j.neuropharm.2006.04.017).
- Wesołowska, A. and Nikiforuk, A. (2007) 'Effects of the brain-penetrant and selective 5-HT6 receptor antagonist SB-399885 in animal models of anxiety and depression', *Neuropharmacology*, 52(5), pp. 1274–1283. doi:[10.1016/j.neuropharm.2007.01.007](https://doi.org/10.1016/j.neuropharm.2007.01.007).
- Wesołowska, A., Nikiforuk, A. and Stachowicz, K. (2007) 'Anxiolytic-like and antidepressant-like effects produced by the selective 5-HT6 receptor antagonist SB-258585 after intrahippocampal administration to rats', *Behavioural Pharmacology*, 18(5–6), pp. 439–446. doi:[10.1097/FBP.0b013e3282d28f9c](https://doi.org/10.1097/FBP.0b013e3282d28f9c).
- White, M.F. (2002) 'IRS proteins and the common path to diabetes', *American Journal of Physiology-Endocrinology and Metabolism*, 283(3), pp. E413–E422. doi:[10.1152/ajpendo.00514.2001](https://doi.org/10.1152/ajpendo.00514.2001).
- Whitton, A.E., Treadway, M.T. and Pizzagalli, D.A. (2015) 'Reward processing dysfunction in major depression, bipolar disorder and schizophrenia', *Current Opinion in Psychiatry*, 28(1), pp. 7–12. doi:[10.1097/YCO.0000000000000122](https://doi.org/10.1097/YCO.0000000000000122).
- Willette, A.A. *et al.* (2015) 'Insulin resistance predicts brain amyloid deposition in late middle-aged adults', *Alzheimer's & Dementia*, 11(5), pp. 504–510.e1. doi:[10.1016/j.jalz.2014.03.011](https://doi.org/10.1016/j.jalz.2014.03.011).
- Willner, P., Scheel-Krüger, J. and Belzung, C. (2013) 'The neurobiology of depression and antidepressant action', *Neuroscience & Biobehavioral Reviews*, 37(10), pp. 2331–2371. doi:[10.1016/j.neubiorev.2012.12.007](https://doi.org/10.1016/j.neubiorev.2012.12.007).
- Winstanley, C.A. *et al.* (2004) '5-HT2A and 5-HT2C receptor antagonists have opposing effects on a measure of impulsivity: interactions with global 5-HT depletion', *Psychopharmacology*, 176(3–4), pp. 376–385. doi:[10.1007/s00213-004-1884-9](https://doi.org/10.1007/s00213-004-1884-9).
- de Wit, H.M. *et al.* (2014) 'Liraglutide reverses pronounced insulin-associated weight gain, improves glycaemic control and decreases insulin dose in patients with type 2 diabetes: a 26 week,

- randomised clinical trial (ELEGANT)', *Diabetologia*, 57(9), pp. 1812–1819. doi:[10.1007/s00125-014-3302-0](https://doi.org/10.1007/s00125-014-3302-0).
- Withers, D.J. *et al.* (1998) 'Disruption of IRS-2 causes type 2 diabetes in mice', *Nature*, 391(6670), pp. 900–904. doi:[10.1038/36116](https://doi.org/10.1038/36116).
- Withers, D.J. *et al.* (1999) 'Irs-2 coordinates Igf-1 receptor-mediated β -cell development and peripheral insulin signalling', *Nature Genetics*, 23(1), pp. 32–40. doi:[10.1038/12631](https://doi.org/10.1038/12631).
- Wolf, H. (2000) 'Preclinical and clinical pharmacology of the 5-HT₃ receptor antagonists', *Scandinavian Journal of Rheumatology*, 29(113), pp. 37–45. doi:[10.1080/030097400446625](https://doi.org/10.1080/030097400446625).
- Wollheim, C.B. and Sharp, G.W. (1981) 'Regulation of insulin release by calcium.', *Physiological Reviews*, 61(4), pp. 914–973. doi:[10.1152/physrev.1981.61.4.914](https://doi.org/10.1152/physrev.1981.61.4.914).
- Wong, D.T. *et al.* (1974) 'A selective inhibitor of serotonin uptake: Lilly 110140, 3-(p-Trifluoromethylphenoxy)-n-methyl-3-phenylpropylamine', *Life Sciences*, 15(3), pp. 471–479. doi:[10.1016/0024-3205\(74\)90345-2](https://doi.org/10.1016/0024-3205(74)90345-2).
- Wong, M.L. *et al.* (2000) 'Pronounced and sustained central hypernoradrenergic function in major depression with melancholic features: relation to hypercortisolism and corticotropin-releasing hormone', *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 97(1), pp. 325–330. doi:[10.1073/pnas.97.1.325](https://doi.org/10.1073/pnas.97.1.325).
- Woods, S.C. *et al.* (1979) 'Chronic intracerebroventricular infusion of insulin reduces food intake and body weight of baboons', *Nature*, 282(5738), pp. 503–505. doi:[10.1038/282503a0](https://doi.org/10.1038/282503a0).
- Woods, S.C. and Porte, D. (1977) 'Relationship between plasma and cerebrospinal fluid insulin levels of dogs', *The American Journal of Physiology*, 233(4), pp. E331–334. doi:[10.1152/ajpendo.1977.233.4.E331](https://doi.org/10.1152/ajpendo.1977.233.4.E331).
- Xiao, Z.-Y. *et al.* (2018) 'The Hippocampus is a Critical Site Mediating Antidepressant-like Activity of Apelin-13 in Rats', *Neuroscience*, 375, pp. 1–9. doi:[10.1016/j.neuroscience.2018.02.001](https://doi.org/10.1016/j.neuroscience.2018.02.001).
- Xin, Q. *et al.* (2015) 'Neuroprotective effects of apelin-13 on experimental ischemic stroke through suppression of inflammation', *Peptides*, 63, pp. 55–62. doi:[10.1016/j.peptides.2014.09.016](https://doi.org/10.1016/j.peptides.2014.09.016).
- Xu, H. *et al.* (2003) 'Chronic inflammation in fat plays a crucial role in the development of obesity-related insulin resistance', *The Journal of Clinical Investigation*, 112(12), pp. 1821–1830. doi:[10.1172/JCI19451](https://doi.org/10.1172/JCI19451).
- Xu, J. *et al.* (2018) 'Biological functions of Elabela, a novel endogenous ligand of APJ receptor', *Journal of Cellular Physiology*, 233(9), pp. 6472–6482. doi:[10.1002/jcp.26492](https://doi.org/10.1002/jcp.26492).
- Xu, X. *et al.* (2008) 'The CUL7 E3 ubiquitin ligase targets insulin receptor substrate 1 for ubiquitin-dependent degradation', *Molecular Cell*, 30(4), pp. 403–414. doi:[10.1016/j.molcel.2008.03.009](https://doi.org/10.1016/j.molcel.2008.03.009).
- Xu, X. *et al.* (2012) 'Identification of the degradation determinants of insulin receptor substrate 1 for signaling cullin-RING E3 ubiquitin ligase 7-mediated ubiquitination', *The Journal of Biological Chemistry*, 287(48), pp. 40758–40766. doi:[10.1074/jbc.M112.405209](https://doi.org/10.1074/jbc.M112.405209).
- Yamada, J. *et al.* (1989) 'Serotonin-induced hypoglycemia and increased serum insulin levels in mice', *Life Sciences*, 45(20), pp. 1931–1936. doi:[10.1016/0024-3205\(89\)90547-X](https://doi.org/10.1016/0024-3205(89)90547-X).
- Yamamoto, H., Uchigata, Y. and Okamoto, H. (1981) 'Streptozotocin and alloxan induce DNA strand breaks and poly(ADP-ribose) synthetase in pancreatic islets', *Nature*, 294(5838), pp. 284–286. doi:[10.1038/294284a0](https://doi.org/10.1038/294284a0).
- Yamamoto, N. *et al.* (2018) 'Insulin-signaling Pathway Regulates the Degradation of Amyloid β -protein via Astrocytes', *Neuroscience*, 385, pp. 227–236. doi:[10.1016/j.neuroscience.2018.06.018](https://doi.org/10.1016/j.neuroscience.2018.06.018).
- Yan, X. *et al.* (2015) 'Lateral intracerebroventricular injection of Apelin-13 inhibits apoptosis after cerebral ischemia/reperfusion injury', *Neural Regeneration Research*, 10(5), pp. 766–771. doi:[10.4103/1673-5374.157243](https://doi.org/10.4103/1673-5374.157243).
- Yang, J.L. *et al.* (2016) 'The Effects of High-fat-diet Combined with Chronic Unpredictable Mild Stress on Depression-like Behavior and Leptin/LepRb in Male Rats', *Scientific Reports*, 6, p. 35239. doi:[10.1038/srep35239](https://doi.org/10.1038/srep35239).

- Yang, S. *et al.* (2020) 'Effects of metformin on lipopolysaccharide-induced depressive-like behavior in mice and its mechanisms', *NeuroReport*, 31(4), pp. 305–310. doi:[10.1097/WNR.0000000000001401](https://doi.org/10.1097/WNR.0000000000001401).
- Yang, Y. *et al.* (2014) 'Apelin-13 protects the brain against ischemia/reperfusion injury through activating PI3K/Akt and ERK1/2 signaling pathways', *Neuroscience Letters*, 568, pp. 44–49. doi:[10.1016/j.neulet.2014.03.037](https://doi.org/10.1016/j.neulet.2014.03.037).
- Yuan, X. *et al.* (2000) 'Identification of polymorphic loci in the promoter region of the serotonin 5-HT_{2C} receptor gene and their association with obesity and type II diabetes', *Diabetologia*, 43(3), pp. 373–376. doi:[10.1007/s001250050056](https://doi.org/10.1007/s001250050056).
- Yue, P. *et al.* (2010) 'Apelin is necessary for the maintenance of insulin sensitivity', *American Journal of Physiology - Endocrinology and Metabolism*, 298(1), pp. E59–E67. doi:[10.1152/ajpendo.00385.2009](https://doi.org/10.1152/ajpendo.00385.2009).
- Yue, P. *et al.* (2011) 'Apelin Decreases Lipolysis via Gq, Gi, and AMPK-Dependent Mechanisms', *Endocrinology*, 152(1), pp. 59–68. doi:[10.1210/en.2010-0576](https://doi.org/10.1210/en.2010-0576).
- Zegarra-Valdivia, J.A. (2017) 'Insulin-like growth factor type 1 and its relation with neuropsychiatric disorders', *Medwave*, 17(7), p. e7031. doi:[10.5867/medwave.2017.07.7031](https://doi.org/10.5867/medwave.2017.07.7031).
- Zemdegs, J. *et al.* (2016) 'High-fat diet-induced metabolic disorders impairs 5-HT function and anxiety-like behavior in mice', *British Journal of Pharmacology*, 173(13), pp. 2095–2110. doi:[10.1111/bph.13343](https://doi.org/10.1111/bph.13343).
- Zemdegs, J. *et al.* (2019) 'Metformin Promotes Anxiolytic and Antidepressant-Like Responses in Insulin-Resistant Mice by Decreasing Circulating Branched-Chain Amino Acids', *The Journal of Neuroscience*, 39(30), pp. 5935–5948. doi:[10.1523/JNEUROSCI.2904-18.2019](https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.2904-18.2019).
- Zeng, G. and Quon, M.J. (1996) 'Insulin-stimulated production of nitric oxide is inhibited by wortmannin. Direct measurement in vascular endothelial cells.', *Journal of Clinical Investigation*, 98(4), pp. 894–898.
- Zeng, X.J. *et al.* (2010) 'Neuroprotective effect of the endogenous neural peptide apelin in cultured mouse cortical neurons', *Experimental Cell Research*, 316(11), pp. 1773–1783. doi:[10.1016/j.yexcr.2010.02.005](https://doi.org/10.1016/j.yexcr.2010.02.005).
- Zhang, J. *et al.* (2008) 'S6K directly phosphorylates IRS-1 on Ser-270 to promote insulin resistance in response to TNF-(alpha) signaling through IKK2', *The Journal of Biological Chemistry*, 283(51), pp. 35375–35382. doi:[10.1074/jbc.M806480200](https://doi.org/10.1074/jbc.M806480200).
- Zhang, J. *et al.* (2012) 'Chronic social defeat up-regulates expression of the serotonin transporter in rat dorsal raphe nucleus and projection regions in a glucocorticoid-dependent manner', *Journal of Neurochemistry*, 123(6), pp. 1054–1068. doi:[10.1111/jnc.12055](https://doi.org/10.1111/jnc.12055).
- Zhang, Y. *et al.* (2015) 'Methylation of the tryptophan hydroxylase-2 gene is associated with mRNA expression in patients with major depression with suicide attempts', *Molecular Medicine Reports*, 12(2), pp. 3184–3190. doi:[10.3892/mmr.2015.3748](https://doi.org/10.3892/mmr.2015.3748).
- Zhang, Z. *et al.* (2019) 'Apelin attenuates depressive-like behavior and neuroinflammation in rats co-treated with chronic stress and lipopolysaccharide', *Neuropeptides*, 77, p. 101959. doi:[10.1016/j.npep.2019.101959](https://doi.org/10.1016/j.npep.2019.101959).
- Zhao, F. *et al.* (2019) 'Insulin Modulates Excitatory Synaptic Transmission and Synaptic Plasticity in the Mouse Hippocampus', *Neuroscience*, 411, pp. 237–254. doi:[10.1016/j.neuroscience.2019.05.033](https://doi.org/10.1016/j.neuroscience.2019.05.033).
- Zhao, Q. *et al.* (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', *Journal of Neuroinflammation*, 13(1), p. 259. doi:[10.1186/s12974-016-0728-y](https://doi.org/10.1186/s12974-016-0728-y).
- Zhao, W. *et al.* (1999) 'Brain insulin receptors and spatial memory. Correlated changes in gene expression, tyrosine phosphorylation, and signaling molecules in the hippocampus of water maze trained rats', *The Journal of Biological Chemistry*, 274(49), pp. 34893–34902. doi:[10.1074/jbc.274.49.34893](https://doi.org/10.1074/jbc.274.49.34893).

- Zhen, E.Y., Higgs, R.E. and Gutierrez, J.A. (2013) 'Pyroglutamyl apelin-13 identified as the major apelin isoform in human plasma', *Analytical Biochemistry*, 442(1), pp. 1–9. doi:[10.1016/j.ab.2013.07.006](https://doi.org/10.1016/j.ab.2013.07.006).
- Zhong, J.-C. *et al.* (2007) 'Apelin modulates aortic vascular tone via endothelial nitric oxide synthase phosphorylation pathway in diabetic mice', *Cardiovascular Research*, 74(3), pp. 388–395. doi:[10.1016/j.cardiores.2007.02.002](https://doi.org/10.1016/j.cardiores.2007.02.002).
- Zhou, J.-X. *et al.* (2021) 'Neuroprotective gain of Apelin/APJ system', *Neuropeptides*, 87, p. 102131. doi:[10.1016/j.npep.2021.102131](https://doi.org/10.1016/j.npep.2021.102131).
- Zhu, H. *et al.* (2011) 'The Lin28/let-7 axis regulates glucose metabolism', *Cell*, 147(1), pp. 81–94. doi:[10.1016/j.cell.2011.08.033](https://doi.org/10.1016/j.cell.2011.08.033).
- Zhu, L. *et al.* (2020) 'Beta-cell M3 muscarinic acetylcholine receptors as potential targets for novel antidiabetic drugs', *International Immunopharmacology*, 81, p. 106267. doi:[10.1016/j.intimp.2020.106267](https://doi.org/10.1016/j.intimp.2020.106267).
- Zhu, S. *et al.* (2011) 'Apelin stimulates glucose uptake through the PI3K/Akt pathway and improves insulin resistance in 3T3-L1 adipocytes', *Molecular and Cellular Biochemistry*, 353(1–2), pp. 305–313. doi:[10.1007/s11010-011-0799-0](https://doi.org/10.1007/s11010-011-0799-0).
- Zoicas, I. *et al.* (2020) 'Ceramide affect alcohol consumption and depressive-like and anxiety-like behavior in a brain region- and ceramide species-specific way in male mice', *Addiction Biology*, 25(6), p. e12847. doi:[10.1111/adb.12847](https://doi.org/10.1111/adb.12847).
- Zou, Y. *et al.* (2016) 'Apelin-13 Protects PC12 Cells from Corticosterone-Induced Apoptosis Through PI3K and ERKs Activation', *Neurochemical Research*, 41(7), pp. 1635–1644. doi:[10.1007/s11064-016-1878-0](https://doi.org/10.1007/s11064-016-1878-0).

Signalisation de l'insuline au sein du système sérotoninergique central : nexus de la comorbidité diabète-dépression

Sébastien BULLICH

Au cours de ce travail de thèse, nous avons pu montrer que le récepteur à l'insuline est présent sur les neurones 5-HT du DRN. Nous avons caractérisé l'effet excitateur de l'insuline sur l'activité électrique de ces neurones par patch clamp. Toutefois, in-vivo l'insuline induit un effet net inhibiteur sur le tonus sérotoninergique. Ces résultats nous ont conduit à tester les effets comportementaux de l'insuline et à montrer ses effets anxiolytiques suite à son injection intra-raphé ou intra-nasale chez la souris saine. Dans un second temps, nous nous sommes placés dans un contexte pathologique afin de mieux comprendre l'impact de la perturbation de la signalisation de l'insuline sur les comportements émotionnels. Pour cela, nous avons étudié l'activité du système 5-HT et les comportements anxio-dépressifs dans des modèles murins de diabète de type 1 et 2 (DT1/DT2). Dans ces deux modèles, que ce soit dans un contexte d'insulinopénie (DT1) ou d'insulino-résistance (DT2), les souris présentent un phénotype anxieux et certains symptômes de la DM associés à une diminution de l'activité du système 5-HT du DRN. Enfin, nous avons tenté d'identifier l'implication de l'apeline, une adipokine connue pour ses propriétés insulino-sensibilisatrice sur les anomalies comportementales induites par un DT2. Nos résultats montrent que les souris présentant une invalidation génétique de l'apeline, sont plus susceptibles de développer une insulino-résistance en réponse à un régime alimentaire diabéto-gène. Une diminution de l'activité du système 5-HT et une anxiété exacerbée ont également été observés dans ces conditions. De manière intéressante le traitement par la metformine, un antidiabétique aux propriétés insulino-sensibilisatrice, ne permet pas l'amélioration des paramètres métaboliques de ces souris mais améliore leur phénotype anxieux.

Ainsi ce travail de thèse souligne l'existence d'interactions anatomiques et fonctionnelles entre le système insuliner-gique et 5-HT central ainsi que leur importance dans l'anxiété, un trouble psychiatrique souvent annonciateur d'un épisode dépressif. Par ailleurs, nous avons identifié l'apeline comme un acteur potentiel impliqué dans la comorbidité diabète-dépression laissant entrevoir de nouvelles pistes thérapeutiques ciblant cette adipokine ou l'insuline directement. Finalement, ces travaux de thèse appuient l'hypothèse selon laquelle des stratégies insulino-sensibilisatrices pourraient améliorer les symptômes anxio-dépressifs avec ou sans comorbidité métabolique. Ils ouvrent également la voie au développement de stratégies de potentialisation basées sur l'utilisation de l'insuline ou autres antidiabétiques oraux pour renforcer l'efficacité des antidépresseurs. En revanche, les mécanismes qui sous-tendent ces effets méritent d'être encore mieux caractérisés.

Mots-clés : Insuline, Dépression, Diabète, Sérotonine, Noyau du raphé, Anxiété