



**HAL**  
open science

# Surexpression de la MAO-A : caractérisation biologique, neurochimique et comportementale

Rodolphe Lebeau

► **To cite this version:**

Rodolphe Lebeau. Surexpression de la MAO-A : caractérisation biologique, neurochimique et comportementale. Pharmacologie. Université Paris-Saclay, 2024. Français. ⟨NNT : 2024UPASQ027⟩. ⟨tel-05580057⟩

**HAL Id: tel-05580057**

**<https://theses.hal.science/tel-05580057v1>**

Submitted on 3 Apr 2026

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.



HAL Authorization

# Surexpression de la MAO-A : Caractérisation biologique, neurochimique et comportementale

*Biological, neurochemical and behavioral effects of increase  
expression of MAO-A*

## Thèse de doctorat de l'université Paris-Saclay

École doctorale n°569, Innovation Thérapeutique : du Fondamental à l'Appliqué  
(ITFA)

Spécialité de doctorat : Sciences pharmacologiques  
Graduate School : Santé et médicaments. Référent : Faculté de Pharmacie

Thèse préparée dans l'unité de recherche **CESP (Université Paris-Saclay,  
UVSQ, Inserm)**, sous la direction du **Dr Jean-Philippe GUILLOUX**,  
le co-encadrement de **Denis DAVID**

Thèse soutenue à Paris-Saclay, le 10 Juillet 2024, par

**Rodolphe LEBEAU**

## Composition du Jury

Membres du jury avec voix délibérative

**Pr Bruno GUIARD**

CNRS UMR 5169, Université Paul  
Sabatier, Toulouse

Président

**Dr Florence NOBLE**

INSEMR UMR-S 1124, Université  
Paris Cité

Rapporteur & Examinatrice

**Pr Olivier LAPREVOTE**

CNRS UMR 8038, Université Paris  
Cité

Rapporteur & Examineur

**Dr Kévin HARDONNIERE**

INSERM UMR 996, Université Paris  
Saclay

Examineur



# Remerciements

---

- **Aux membres du Jury,**

Je remercie les Professeurs Bruno GUIARD, Professeur à l'Université de Toulouse et de l'unité CNRS 5169, d'avoir accepté de présider le jury évaluant mon travail lors de ma soutenance de thèse. Je tiens également à remercier Madame le Docteur Florence NOBLE, enseignant-chercheur à l'Université Paris Cité et directrice de l'équipe Pharmacologie de l'Addiction et Thérapie de l'unité INSERM 1124 et Monsieur le Professeur Olivier LAPRÉVOTE, professeur à l'Université Paris Cité et directeur de l'équipe CTAC de l'unité CNRS 8038, d'avoir accepté d'évaluer et de juger mon travail de thèse en tant que rapporteurs. Enfin, je remercie le Docteur Kévin HARDONNIÈRE, enseignant-chercheur de l'Université Paris-Saclay et de l'unité INSERM 996, d'avoir accepté d'évaluer ce travail en tant qu'examineur et membre du Jury.

- **Aux membres du Comité de Suivi de Thèse,**

Je remercie les Docteurs Morgane BESSON et Kévin HARDONNIÈRE d'avoir évalué l'avancement de mon travail de thèse au cours des Comités de Suivi et de m'avoir apporté les conseils et jugements permettant d'améliorer ce travail pour l'amener au niveau actuel.

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

Je vous remercie de m'avoir accueilli au sein de votre laboratoire pour ces quatre années qui m'ont permis de me former et d'appréhender au mieux la recherche, domaine dans lequel je souhaite poursuivre. Un grand merci également pour les échanges sur différents domaines tels que les arts et l'Histoire et les petits conseils que vous m'avez apporté.

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

Je tiens particulièrement à te remercier Jean-Philippe de m'avoir fait confiance et de m'avoir accepté en tant que doctorant pour mener ce projet. Travailler sous ta direction m'a beaucoup apporté, tu m'as permis d'acquérir de nombreuses compétences techniques, sur la façon de gérer un projet (et ce sur tous les aspects), de le construire et de le réaliser. Tu m'as également permis de développer mon esprit critiques, de m'initier à la rédaction d'articles, ou encore sur la manière d'évaluer le travail réalisé par d'autres chercheurs, entre autre en m'initiant à la revue d'articles en soumission. Je te remercie aussi de m'avoir aidé pour participer aux congrès

auxquels j'ai pu participer, me permettant de découvrir autrement ce fabuleux métier de chercheur. Je te remercie également de m'avoir transmis l'intérêt et la passion de l'enseignement dans le supérieur, ce qui m'a donné l'envie de poursuivre si cela m'est permis dans le futur. Enfin, un grand merci pour le travail de relecture et de correction de ce mémoire.

- **À Monsieur le professeur Denis David**

Je te remercie pour ta disponibilité durant ces années, les discussions et échanges que nous avons eu et qui m'ont permis d'améliorer ma rigueur et mon organisation pour réaliser mes expériences, notamment celles de comportement. Tu m'as permis aussi de découvrir beaucoup sur la science et la recherche, notamment la manière dont cela se passe ailleurs dans le monde. Un grand merci aussi pour ta gentillesse.

- **Aux docteur Laurent Tritschler et Céline Defaix**

Je tiens à vous remercier tous les deux pour tous vos conseils techniques sur la microdialyse, la stéréotaxie et l'utilisation et la compréhension du dosage par HPLC. Vous m'avez beaucoup aidé lors des expérimentations de microdialyse, qui m'ont permis de m'améliorer.

Il fut notamment agréable d'enseigner (et d'apprendre à enseigner) avec toi Laurent, entre autre grâce à tes plaisanteries lors des EDs, plaisanteries dont tu es également prodigue au laboratoire apportant une excellente ambiance. J'ai également beaucoup apprécié discuter avec toi Céline, tant sur la science que sur d'autres sujets.

- **Aux autres membres du laboratoire,**

Indira, Sofia, Yann, Ingrid et Louise, il fut très agréable de travailler à vos côtés au sein du laboratoire et de discuter avec vous. Ce fut également, Sofia et Yann, très enrichissant lors de cette dernière année de pouvoir donner des enseignements à vos côtés.

Un grand merci Loan avec qui j'ai partagé le bureau des doctorants pendant mes trois premières années de thèse. J'ai beaucoup apprécié de discuter avec toi, de t'apprendre beaucoup de chose sur la France et d'échanger sur ta culture.

Un grand merci aux actuels stagiaires du laboratoire, Lauren, Bienvenue, Ons et Sayed-Ali, pour votre sympathie et votre gentillesse, et plus particulièrement toi Lauren avec qui j'ai partagé le bureau des doctorants durant cette dernière année et qui a toujours un petit mot pour rire. Une pensée aussi à tous les stagiaires de courte ou plus longue durée venus au laboratoire pendant ces quatre dernières années.

- **Aux membres des plateformes,**

Un grand merci aux animaliers de la plateforme Animex, et notamment à Ayma Galland et Manon Clerc, pour leur travail au quotidien, pour le bien-être et l'entretien des animaux, mais aussi tous leurs conseils au regard de l'utilisation des animaux. Un grand merci aussi à Claudine Deloménie responsable de la plateforme ACTAGen, pour son aide et ses conseils pour les expériences de RT-qPCR.

- **À nos collaborateurs de Toronto et de Pittsburgh,**

Professeur Etienne Sibille, je vous remercie grandement de m'avoir accordé votre confiance pour mener avec Jean-Philippe ce projet qui unit nos deux laboratoires. Les conseils que vous nous avez apportés lors des labmeetings mensuels nous ont permis de mieux orienter le projet et de l'avoir amené au stade avancé où je le laisse.

Au professeur Toshifumi Tomoda et son doctorant Runhao Zhou, je tiens à les remercier pour leur travail sur le projet qui, sans eux, n'aurait pas pu exister. Un grand merci aussi à nos autres collaborateurs, Monsieur le professeur Jeffrey Meyer et les Docteurs Mounira Banasr et Marianne Seney pour leur participation aux labmeetings mensuels, ayant apportés leurs propres expertises pour aiguiller et parfaire ce projet.

- **A ma famille**

Je tiens à remercier ma famille, et plus particulièrement ma maman, pour leur soutien tout au long de ces années, les encouragements qu'ils m'ont apportés. Je sais qu'étant le premier scientifique de la famille cela n'a pas toujours été facile de comprendre ce que je faisais et ce que je disais, ce en quoi consistait mon travail et son intérêt, et s'est pour cela que je vous remercie énormément pour la patience que vous avez eu pour moi.

Enfin, je tiens à vous remercier tous pour les encouragements et le soutien que vous m'avez apporté tout au long de ces quatre années.

# Publications scientifiques

---

## Articles originaux

- **Rodolphe H. Lebau**, Indira Mendez-David, Laura Kucynski-Noyau, Céline Henry, David Attali, Marion Plaze, Romain Colle, Emmanuelle Corruble, Alain M. Gardier, Raphaël Gaillard, Jean-Philippe Guilloux, Denis J. David (2022), « *Peripheral proteomic changes after electroconvulsive seizures in a rodent model of non-response to chronic fluoxetine* ». Front Pharmacol., 13 : 993449

## Revues

- **Rodolphe H. Lebeau**, Kim Besognet, Alain M. Gardier, Denis J. David, Jean-Philippe Guilloux (en cours), « *Behavioural, neurochemical and neuronal effects of electroconvulsive seizures in animal models* »,

## Posters/Communications affichées

- **Rodolphe Lebeau**, Indira Mendez-David, Laura Kucynski-Noyau, Céline Henry, David Attali, Marion Plaze, Romain Colle, Emmanuelle Corruble, Alain M. Gardier, Raphaël Gaillard, Jean-Philippe Guilloux, Denis J. David, « *Peripheral proteomic changes after electroconvulsive seizures (ECS) in a rodent model of non-response to chronic fluoxetine* ». ULLA Summer School (par visioconférence), Uppsala, Suède, 4-7 Juillet 2021.
- **Rodolphe Lebeau**, Toshifumi Tomoda, Alain M. Gardier, Etienne Sibille, Jean-Philippe Guilloux, « *Elevated MAO-A activity in mice: Role in Emotionality response* ». Journée de l'École Doctoral ITFA (ED569), Châtenay-Malabry, France, 29 Juin 2022.
- **Rodolphe Lebeau**, Runhao Zhou, Toshifumi Tomoda, Alain M. Gardier, Etienne Sibille, Jean-Philippe Guilloux, « *MAO-REE: MAO-A increased activity, role in Response to antidepressant and Emotionality* ». NeuroFrance 2023, Lyon, France, 24-26 Mai 2023.
- **Rodolphe Lebeau**, Runhao Zhou, Toshifumi Tomoda, Alain M. Gardier, Jeffrey Meyer, Etienne Sibille, Jean-Philippe Guilloux, « *Modelling elevated MAO-A activity in mice: role in emotionality and antidepressant treatment response* ». ECNP Workshop for Early Career Scientist in Europe 2024, Nice, France, 14-17 Mars 2024.

## **Communications orales**

- **Rodolphe Lebau**, Indira Mendez-David, Laura Kucynski-Noyau, Céline Henry, David Attali, Marion Plaze, Romain Colle, Emmanuelle Corruble, Alain M. Gardier, Raphaël Gaillard, Jean-Philippe Guilloux, Denis J. David, « *Peripheral proteomic changes after electroconvulsive seizures (ECS) in a rodent model of non-response to chronic fluoxetine* ». EuGloH Summer School (par visioconférence), Université Paris Saclay, 21-25 Juin 2021.

## Participation au travail de relecture d'articles en soumission

---

- British Journal of Pharmacology (**BJP**) : IF = 9,473 [2 articles]
- Frontiers in Pharmacology (**Front Pharmacol.**) : IF = 5,988 [1 article]
- Frontiers in Neuroscience (**Front Neurosci.**) : IF = 5,152 [1 article]
- Physiology & behavior (**Physiol. Behav.**) : IF = 3,742 [1 article]
- Neuroscience Letters (**Neurosci. Lett.**) : IF = 3,197 [1 article]

# Sommaire

---

<b>Remerciements</b> .....	<b>1</b>
<b>Publications scientifiques</b> .....	<b>4</b>
<b>Participation au travail de relecture d'articles en soumission</b> .....	<b>6</b>
<b>Sommaire</b> .....	<b>7</b>
<b>Abréviations</b> .....	<b>11</b>
<b>Liste des figures</b> .....	<b>13</b>
<b>Liste des tableaux</b> .....	<b>15</b>
<b>Liste des annexes</b> .....	<b>15</b>
<b>Résumé</b> .....	<b>17</b>
<b><i>Introduction</i></b> .....	<b><i>19</i></b>
1. Les monoamines oxydases .....	21
1.1. Généralité sur les MAO .....	21
1.2. Génétique de la MAO-A.....	22
1.2.1. Localisation chromosomique du gène de la MAO-A .....	22
1.2.2. Régulation de l'expression du gène de la MAO-A .....	22
1.2.3. Régulation circadienne de l'expression du gène de la MAO-A.....	26
1.2.4. Polymorphismes du gène .....	27
1.2.5. Isoformes du transcript de la MAO-A .....	28
1.2.6. Régulation épigénétique du gène de la MAO-A.....	29
1.3. L'enzyme de la MAO-A .....	29
1.3.1. Structure protéique de la MAO-A .....	29
1.3.2. La flavine adénine dinucléotide, co-facteur de la MAO-A.....	31
1.3.3. Substrats de la MAO-A et mécanismes enzymatiques .....	32
1.3.4. Régulation de l'activité enzymatique de la MAO-A par le calcium .....	34
1.3.5. MAO-A et preseniline 1 (PS-1).....	34
1.3.6. Fonctions assurées par la MAO-A.....	34
1.3.7. Intervention de la MAO-A dans la cascade d'évènements liées à l'apoptose.....	35
1.3.8. Rôle de la MAO-A dans la respiration mitochondriale et la production d'ERO .....	35
1.4. Expression différentielle des MAOs durant le développement cérébral.....	36
2. Le Trouble Dépressif Caractérisé.....	38
2.1. Symptomatologie et épidémiologie du Trouble Dépressif Caractérisé.....	38
2.2. Physiopathologie du TDC et l'hypothèse monoaminergique .....	39
2.3. Traitement courant du TDC et ses limites .....	40
2.3.1. Les traitements antidépresseurs .....	40

2.3.2.	Limitations à l'usage des AD, la résistance aux antidépresseurs et la latence avant leurs effets.	41
3.	Altérations de l'expression et de l'activité de la MAO-A	42
3.1.	Déficience d'expression de la MAO-A	42
3.1.1.	Déficience en MAO-A chez l'être humain	42
3.1.2.	Modèles précliniques de déficience, le ko du gène de la MAO-A	42
3.2.	Augmentations d'expression et d'activité de la MAO-A chez des patients souffrant de dépression	45
3.2.1.	La MAO-A est surexprimée et son activité augmentée chez les patients dépressifs	45
3.2.2.	L'activité de la MAO-A est modulée au cours de la période post-partum	49
3.2.3.	Activité de la MAO-A lors d'un stress aiguë	49
3.2.4.	Le polymorphisme uVNTR du promoteur est corrélé avec la survenue de la pathologie	50
3.2.5.	Impact d'autres polymorphismes sur les niveaux d'expression et d'activité de la MAO-A	50
3.2.6.	Hypométhylation du gène de la MAO-A chez les patients souffrant de dépression	51
3.2.7.	La MAO-A, un potentiel biomarqueur de dépression ?	51
3.3.	Surexpression et augmentation d'activité dans les modèles précliniques	52
3.3.1.	La MAO-A est surexprimée et son activité augmentée dans des modèles d'anxiété/dépression	52
3.3.2.	Effet d'un stress oxydant sur l'activité de la MAO-A	56
3.3.3.	Modélisation de la dépression post-partum et activité de la MAO-A	57
3.3.4.	D'autres formes de stress induisent un effet d'hyperactivité du gène de la MAO-A	57
3.3.5.	Effet de l'augmentation d'expression de Sirt1	58
3.1.	Arguments en faveur de l'hypothèse d'un rôle majeur de l'augmentation d'activité de la MAO-A dans l'étiologie de la dépression	59
4.	La construction d'un modèle de surexpression de la MAO-A	61
4.1.	L'absence de modèle de surexpression nécessite la mise en place de celui-ci	61
4.2.	La mise au point d'un nouveau modèle	61
4.2.1.	L'utilisation de vecteur viraux pour induire la surexpression de la MAO-A	61
4.2.2.	Le recours à la lignée CamKII-Cre	62
4.2.3.	Effets de la transfection des vecteurs viraux dans un modèle <i>in vitro</i>	62
5.	Objectifs	66
	<b>Matériels &amp; méthodes</b>	<b>69</b>
1.	Modèles animaux	71
1.1.	Lignée CamKinase II-Cre	71
1.2.	Génotypage des individus	72
2.	Vecteurs viraux de surexpression de la hMAOA	73
2.1.	Surexpression spécifique dans les neurones pyramidaux par un vecteur "Cre-dépendant"	73
2.2.	Surexpression dans les astrocytes, le vecteur GFAP <sup>+</sup>	74
3.	Chirurgie stéréotaxique	74
3.1.	Injection de vecteur viral	76
3.2.	Implantation de sonde	76

4.	Microdialyse.....	76
4.1.	Fabrication de sondes pour microdialyse.....	76
4.2.	Procédure de microdialyse – recueil des échantillons de dialysat .....	77
4.2.1.	Principe de base de la microdialyse.....	77
4.2.2.	Déroulement de la microdialyse .....	78
4.2.3.	Détermination des niveaux basaux de libération de sérotonine : la microdialyse en Zero-Net Flux	79
4.2.4.	Détermination des effets de molécules antidépresseur par microdialyse standard .....	80
4.3.	Dosage des neurotransmetteurs par HPLC .....	81
4.4.	Extraction des cerveaux et contrôle de l’implantation de la sonde par coloration au Crésyl Violet	82
5.	Immunohistochimie.....	83
5.1.	Perfusion des animaux et extraction des cerveaux.....	83
5.2.	Préparation des coupes cérébrales .....	84
5.3.	Immunomarquage et observation microscopique .....	84
6.	Biochimie .....	85
6.1.	Extraction des régions cérébrales.....	85
6.2.	Détermination de l’effet de la surexpression de la MAO-A sur la transcription des gènes associés à la voie des monoamines .....	86
6.2.1.	Extraction et purification des ARNm .....	86
6.2.2.	Dosage et contrôle qualité des ARNm.....	87
6.2.3.	Transcription inverse – synthèse des ADNc.....	88
6.2.4.	Quantification des ARNm cibles par amplification PCR .....	88
6.3.	Détermination des niveaux protéiques de la MAO-A par Western Blot.....	90
6.3.1.	Extraction des protéines et dosage.....	90
6.3.2.	De la migration des protéines à leur détection par un marquage anticorps, technique du Western Blot .....	90
6.4.	Détermination de l’activité enzymatique MAO-A.....	91
6.4.1.	Extraction de la fraction membranaire et dosage des protéines .....	91
6.4.2.	Mesure de l’activité enzymatique MAO-A.....	92
7.	Comportement.....	92
7.1.	Le test en champ ouvert.....	92
7.2.	Labyrinthe de la croix surélevée .....	93
7.3.	Test d’alimentation supprimé par la nouveauté .....	94
7.4.	Test d’aspersion (Splash Test).....	94
7.5.	Le test de préférence d’eau sucré.....	95
7.6.	Calcul du score d’émotivité (Z-score).....	95
8.	Vérification des étapes du cycle menstruel chez la femelle .....	97
9.	Analyses statistiques .....	97
	<b>Résultats.....</b>	<b>99</b>
1.	Mise au point d’un modèle murin de surexpression et d’augmentation de l’activité de la MAO-A	101
1.1.	Localisation de la surexpression de la MAO-A .....	101

1.2.	Détermination des niveaux d'expression suite à la transfection virale .....	103
1.3.	Détermination de l'activité enzymatique suite à la transfection virale .....	103
2.	Effets biochimiques et comportementaux de l'augmentation d'expression et d'activité de la MAO-A	105
2.1.	Surexpression de la hMAO-A dans les cellules pyramidales glutamatergiques du cortex préfrontal médian.....	105
2.1.1.	L'augmentation d'activité de la MAO-A réduit l'homéostasie de la sérotonine dans le mPFC	105
2.1.2.	Effets de la surexpression de la hMAO-A sur le comportement émotionnel.....	106
2.1.3.	Modulation de l'expression d'autres gènes associés aux voies monoaminergiques en réponse à la surexpression de la MAO-A.....	111
2.2.	Surexpression de la hMAO-A dans les astrocytes du cortex préfrontal médian : effets sur le comportement émotionnel .....	115
3.	Effets de l'augmentation d'expression et d'activité de la MAO-A sur la réponse à des antidépresseurs .....	120
3.1.	Réponse à un ISRS .....	120
3.2.	Réponse à un antidépresseur non-monoaminergique, la kétamine .....	123
	<b>Discussion .....</b>	<b>127</b>
1.	La surexpression de la MAO-A augmente l'activité de l'enzyme.....	129
2.	La surexpression neuronale de la MAO-A affecte l'homéostasie de la 5-HT .....	130
3.	Réponse cellulaire à une augmentation d'activité de la MAO-A .....	131
4.	Surexpression de la MAO-A et rôle dans l'émergence du comportement anxieux-dépressif .....	132
5.	Intervention de l'activité de la MAO-A dans la résistance aux ISRS .....	134
6.	Limites et perspectives .....	137
7.	Conclusion générale .....	139
	<b>Projet annexe .....</b>	<b>141</b>
1.	Introduction .....	142
2.	Matériel et méthodes .....	198
2.1.	Modèle animal expérimental .....	198
2.1.1.	Souche de souris et condition d'élevage .....	198
2.1.2.	Modèle animal d'anxiété-“dépression”.....	198
2.1.3.	Traitement par ECS .....	199
2.2.	Détermination de l'activité transcriptomique des gènes cibles après traitement par ECS .	199
2.2.1.	Extraction des ARNm à partir du sang total .....	199
2.2.2.	Quantification des ARNm cibles par amplification PCR .....	201
2.3.	Statistiques.....	201
3.	Résultats et discussion.....	201
	<b>Annexes.....</b>	<b>205</b>
	<b>Références.....</b>	<b>213</b>

# Abréviations

---

**5-HIAA** : acide 5-hydroxyindolacétique

**5-HT** : sérotonine (5-hydroxytryptamine)

**5-HTr** : récepteur à la sérotonine

**αSyn** : α-synucléine

**AD** : (traitement) antidépresseur

**ADN/ADNc** : acide désoxyribonucléique / ADN complémentaire

**ANOVA** : analyse de la variance

**ARN/ ARNm** : acide ribonucléique / ARN messenger

**AP** : axe antéropostérieur

**CamKII** : protéine kinase Ca<sup>2+</sup>/calmoduline-dépendantes

**COMT** : catéchol-O-méthyltransférase

**CORT** : corticostérone

**Cq** : cycle de quantification

**Cre** : cyclization recombinase

**CSD** : défaite sociale chronique [*Chronic Social Defeat*]

**DA** : dopamine

**DEX** : dexaméthasone

**DV** : axe dorsoventral

**ECS** : stimulation électroconvulsive [*Electroconvulsive seizure*]

**ECT** : électroconvulsivothérapie

**EDTA** : acide éthylène diamine tétra-acétique

**EPM** : labyrinthe en croix surélevée [*Elevated Plus Maze*]

**ERO** : espèce réactive de l'oxygène

**Flx** : fluoxétine

**GFAP** : protéine d'acide fibrillaire gliale [*Glial Fibrillary Acid Protein*]

**GFP** : protéine fluorescente verte [*Green Fluorescent Protein*]

**GRE/ARE** : élément de réponse aux récepteurs des glucocorticoïdes/androgènes

**H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>** : peroxyde d'hydrogène

**HAM-D** : échelle de degré de dépression de Hamilton

**hMAO-A** : monoamine oxydase humaine

**HPLC** : chromatographie liquide haute pression [*High Pressure Liquid Chromatography*]

**hSyn** : synapsine 1 humaine

**Ig** : anticorps (immunoglobuline)  
**I-MAO** : inhibiteur de la MAO-A  
**i.p.** : intrapéritonéal  
**IRSN** : inhibiteur de la recapture de la sérotonine et de la noradrénaline  
**ISRS** : inhibiteur sélectif de la recapture de la sérotonine  
**KLF11** : facteur de type Kruppel 11 [*Kruppel-like factor 11*]  
**ko** : *knock-out*  
**L** : axe latéral  
**LCRa** : liquide céphalorachidien artificiel  
**MAO-A** : monoamine oxydase isoforme A  
**MAO-B** : monoamine oxydase isoforme B  
**moMAO-A** : MAO-A murine [*mouse MAO-A*]  
**NaCl** : chlorure de sodium  
**NA** : noradrénaline  
**NSF** : test de l'alimentation supprimé par la nouveauté [*Novelty Suppressed Feeding*]  
**OF** : test en champ ouvert [*Open Field*]  
**PBS** : tampon phosphate salin [*Phosphate-Buffered Saline*]  
**PCR** : réaction de polymérisation en chaîne [*Polymerase Chain Reaction*]  
**(m)PFC** : cortex préfrontal (médian) [*(medial) Prefrontal Cortex*]  
**RT-qPCR** : PCR quantitative en temps réel ou avec transcription inverse [*Real Time or Reverse Transcription quantitative PCR*]  
**SEM** : erreur type à la moyenne [*Standard Error of the Mean*]  
**SERT** : transporteur de recapture de la sérotonine  
**Sirt1** : : sirtuine 1  
**SPT** : test de préférence d'eau sucrée [*Sucrose Preference Test*]  
**TBE** : Tris, Borate, EDTA  
**TDC** : trouble dépressif caractérisé  
**UCMS** : stress chronique imprévisible du milieu [*Unpredictable Chronic Mild Stress*]  
**VNTR** : variation du nombre de répétition d'un tandem  
**VTA** : aire tegmentale ventrale  
**WT** : sauvage [*Wild Type*]  
**ZNF** : Zero-Net Flux

# Liste des figures

---

FIGURE 1 : NIVEAU D'EXPRESSION DES MAOS DANS DIFFERENTS TISSUS ET ORGANES DE L'ORGANISME HUMAIN .....	22
FIGURE 2 : LOCALISATION DES ELEMENTS DE REPOSE AUX FACTEURS DE TRANSCRIPTION REGULANT L'EXPRESSION DU GENE DE LA MAO-A .....	23
FIGURE 3 : STRUCTURE DE LA MAO-A HUMAINE OBTENUE PAR CRISTALLOGRAPHIE .....	30
FIGURE 4 : MECANISME MOLECULAIRE DE LA DEAMINATION OXYDATIVE DES MONOAMINES PAR LES MAOS .....	33
FIGURE 5 : HYPOTHESE DE LA SUREXPRESSION DE LA MAO-A CHEZ LES PATIENTS ATTEINT DE DEPRESSION .....	47
FIGURE 6 : MECANISME MOLECULAIRE PERMETTANT L'EXPRESSION DU TRANSGENE DE LA HMAO-A UNIQUEMENT DANS LES NEURONES PYRAMIDAUX .....	62
FIGURE 7 : LOCALISATION INTRACELLULAIRE DE LA HMAO-A PAR CO-IMMUNOHISTOCHEMIE .....	63
FIGURE 8 : EXPRESSION ET ACTIVITE DE LA MAO-A APRES TRANSFECTION DE CELLULES HEK PAR LES VECTEURS VIRAUX .....	63
FIGURE 9 : EFFET DE LA SUREXPRESSION DE LA HMAO-A SUR LE POTENTIEL DE LA MEMBRANE ET DE L'INTEGRITE DES MITOCHONDRIES .....	64
FIGURE 10 : MODULATION DE L'EXPRESSION PROTEIQUE AU NIVEAU MITOCHONDRIAL SUITE A LA SUREXPRESSION DE HMAO-A .....	65
FIGURE 11 : SCHEMA SIMPLIFIE DU MAINTIEN DE LA LIGNEE CAMKII-CRE .....	72
FIGURE 12 : STRUCTURE COMPLETE DU TRANSGENE "CRE-DEPENDANT" .....	74
FIGURE 13 : STRUCTURE COMPLETE DU TRANSGENE CIBLANT LES ASTROCYTES .....	74
FIGURE 14 : CADRE STEREOTAXIQUE ET MISE EN PLACE DE L'ANIMAL .....	75
FIGURE 15 : LOCALISATION DES POINTS D'INJECTIONS ET D'IMPLANTATION DES SONDAS DE MICRODIALYSE .....	75
FIGURE 16 : STRUCTURE D'UNE SONDE DE MICRODIALYSE FABRIQUEE AU SEIN DU LABORATOIRE .....	77
FIGURE 17 : PRINCIPE DE LA MICRODIALYSE .....	78
FIGURE 18 : DISPOSITIF DE MICRODIALYSE .....	79
FIGURE 19 : CHRONOLOGIE D'UNE EXPERIENCE DE MICRODIALYSE EN ZERO-NET FLUX .....	80
FIGURE 20 : CHRONOLOGIE D'UNE EXPERIENCE DE MICRODIALYSE CONVENTIONNELLE .....	81
FIGURE 21 : DEBUT ET FIN DES COUPES EFFECTUEES ET REGIONS PRELEVEES POUR LES ANALYSES BIOCHIMIQUES .....	86
FIGURE 22 : CONTROLE QUALITE DES ARNM .....	87
FIGURE 23 : TEST EN CHAMPS OUVERT .....	93
FIGURE 24 : TEST DE LA CROIX SURELEVEE .....	93
FIGURE 25 : TEST DE L'ALIMENTATION PAR LA NOUVEAUTE .....	94
FIGURE 26 : TEST D'ASPERSION (OU <i>SPLASH TEST</i> ) .....	95
FIGURE 27 : LOCALISATION PAR IMMUNOHISTOCHEMIE DE LA HMAO-A SYNTHETISEE A PARTIR DU VECTEUR VIRAL « CRE-DEPENDANT » .....	101
FIGURE 28 : LOCALISATION PAR IMMUNOHISTOCHEMIE DE LA HMAO-A SYNTHETISEE A PARTIR DU VECTEUR VIRAL « CRE-INDEPENDANT » .....	102
FIGURE 29 : EXPRESSION DE LA HMAO-A DANS LES NEURONES PYRAMIDAUX APRES INJECTION DU VECTEUR VIRAL DANS LE MPFC	103

FIGURE 30 : ACTIVITE ENZYMATIQUE DE LA MAO-A DANS LE MPFC SUITE A L'INJECTION D'UN VECTEUR VIRAL CONTENANT LE TRANSGENE DE LA HMAO-A.....	104
FIGURE 31 : DIMINUTION DES NIVEAUX BASAUX EN 5-HT DANS LE MPFC DE SOURIS SUREXPRIMANT LA HMAO-A DANS LES NEURONES PYRAMIDAUX .....	106
FIGURE 32 : EFFETS COMPORTEMENTAUX DE LA SUREXPRESSION DE LA HMAO-A DANS LES NEURONES PYRAMIDAUX DU PFC.....	107
FIGURE 33 : SCORE D'EMOTIONNALITE SUITE A LA SUREXPRESSION DE LA HMAO-A DANS LES NEURONES PYRAMIDAUX DU PFC ...	108
FIGURE 34 : EFFET SUR LE COMPORTEMENT HEDONIQUE DE LA SUREXPRESSION DE HMAO-A DANS LES NEURONES PYRAMIDAUX DU PFC .....	109
FIGURE 35 : EFFETS COMPORTEMENTAUX DE LA SUREXPRESSION DE LA HMAO-A DANS LES NEURONES PYRAMIDAUX DU PFC.....	110
FIGURE 36 : MODULATION DE L'EXPRESSION DE GENES DES VOIES MONOAMINERGIQUES DANS LE MPFC EN REPONSE A LA SUREXPRESSION NEURONALE DE LA HMAO-A DANS LE MPFC. ....	112
FIGURE 37 : MODULATION DE L'EXPRESSION DE GENES DES VOIES MONOAMINERGIQUES DANS LES NOYAUX DU RAPHE EN REPONSE A LA SUREXPRESSION NEURONALE DE LA HMAO-A DANS LE MPFC .....	113
FIGURE 38 : EFFETS COMPORTEMENTAUX DE LA SUREXPRESSION DE LA HMAO-A DANS LES ASTROCYTES DU PFC .....	116
FIGURE 39 : SCORE D'EMOTIONNALITE SUITE A LA SUREXPRESSION DE LA HMAO-A DANS LES ASTROCYTES DU PFC.....	117
FIGURE 40 : EFFET SUR LE COMPORTEMENT HEDONIQUE DE LA SUREXPRESSION DE HMAO-A DANS LES ASTROCYTES DU PFC.....	118
FIGURE 41 : EFFETS COMPORTEMENTAUX DE LA SUREXPRESSION DE LA HMAO-A DANS LES ASTROCYTES DU PFC .....	119
FIGURE 42 : REPONSE NEUROCHIMIQUE A UN TRAITEMENT AIGUË PAR LA FLX APRES SUREXPRESSION DE HMAO-A DANS LES NEURONES PYRAMIDAUX .....	121
FIGURE 43 : REPONSE NEUROCHIMIQUE A UN TRAITEMENT AIGUË PAR LA FLX APRES SUREXPRESSION DE HMAO-A DANS LES ASTROCYTES .....	122
FIGURE 44 : REPONSE NEUROCHIMIQUE A UN TRAITEMENT AIGUË PAR LA KET APRES SUREXPRESSION DE HMAO-A DANS LES NEURONES PYRAMIDAUX .....	124
FIGURE 45 : REPONSE NEUROCHIMIQUE A UN TRAITEMENT AIGUË PAR LA KET APRES SUREXPRESSION DE HMAO-A DANS LES ASTROCYTES .....	125

## Liste des tableaux

---

TABLEAU 1 : EFFET DE L'EXPRESSION DE DIFFERENTS FACTEURS LIE AU SYSTEME DU CYCLE CIRCADIEN SUR L'ACTIVITE DU GENE DE LA MAO-A .....	26
TABLEAU 2 : CARACTERISTIQUE ENZYMATIQUE DES MAOS POUR DIFFERENTES MONOAMINES (D'APRES (YOU DIM, EDMONDSON ET AL. 2006)) .....	33
TABLEAU 3 : VOLUME DE DISTRIBUTION DE LA MAO-A CHEZ DES SUJETS SAINS ET DES PATIENTS SOUFFRANT DE TDC (D'APRES MEYER ET AL, 2006) .....	46
TABLEAU 4 : NIVEAUX D'EXPRESSION DE LA MAO-A (REFLETES PAR LE VOLUME DE DISTRIBUTION DU RADIOLIGAND HARMINE C <sup>11</sup> ) EN FONCTION DE LA SEVERITE DES SYMPTOMES DU TDC DANS LES DIFFERENTES REGIONS CEREBRALES (D'APRES CHIUCCARIELLO ET AL, 2014) .....	49
TABLEAU 5 : NIVEAUX D'EXPRESSION ET D'ACTIVITE DE LA MAO-A DANS DIFFERENTS MODELES D'ANXIETE/DEPRESSION .....	60
TABLEAU 6 : SEQUENCE DES AMORCES POUR LA PCR DE GENOTYPAGE DE LA LIGNEE CAMKII-CRE .....	73
TABLEAU 7 : COMPOSITION DU LCRA .....	79
TABLEAU 8 : COMPOSITION DE LA PHASE MOBILE POUR LE DOSAGE EN HPLC DE LA 5-HT .....	81
TABLEAU 9 : COMPOSITION DE LA SOLUTION DE DERIVATISATION DES ECHANTILLONS .....	82
TABLEAU 10 : COMPOSITION DE LA PHASE MOBILE POUR LE DOSAGE EN HPLC DU GABA ET DU GLUTAMATE .....	82
TABLEAU 11 : COMPOSITION DU MILIEU REACTIONNEL "MAISON" POUR QPCR .....	89
TABLEAU 12 : COMPOSITION DU GEL DE WESTERN BLOT .....	91
<b>TABLEAU 13</b> : LISTE DES ANTICORPS UTILISES POUR LE WESTERN BLOT .....	91
TABLEAU 14 : COMPOSITION DE LA SOLUTION H .....	91
TABLEAU 15 : DIFFERENCE DES NIVEAUX D'ARNM DES GENES IMPLIQUES DANS LES VOIES MONOAMINERGIQUES. ....	114
<b>TABLEAU 16</b> : DIFFERENCE D'EXPRESSION DES GENES CIBLES CHEZ LES REPONDEURS ET LES NON-REPONDEURS AUX ECS AVANT ET APRES LE TRAITEMENT PAR ECS CHRONIQUE .....	203

## Liste des annexes

---

ANNEXE 1 : STATISTIQUES DES ETUDES BIOCHIMIQUES, COMPORTEMENTALES ET DE LA <i>ZERO-NET FLUX</i> .....	208
ANNEXE 2 : STATISTIQUES DES ETUDES DE MICRODIALYSE AVEC INJECTION D'UN ANTIDEPRESSEUR .....	210



# Résumé

---

Le trouble dépressif caractérisé (TDC) constitue une pathologie psychiatrique sévère qui affecte une part importante de la population mondiale et s'avère être la première cause d'invalidité dans le monde selon l'OMS, caractérisée par un taux de suicide élevé. Malgré de nombreuses années d'études, la physiologie et les mécanismes sous-jacents à la survenue de la dépression demeurent mal identifiés.

Parmi les hypothèses avancées, il est supposé l'importance cruciale de la transmission monoaminergique. En effet, chez les patients déprimés comme dans les modèles animaux de la pathologie, les niveaux en neurotransmetteurs monoaminergiques (notamment la sérotonine et la noradrénaline) sont diminués et le rôle majeur de cette neurotransmission est renforcé par le fait que les antidépresseurs classiques ont pour principal mécanisme d'augmenter le niveau synaptique de ces monoamines.

De plus, il a été identifié chez les patients souffrant de dépression l'augmentation de l'expression et de l'activité d'une enzyme, la monoamine oxydase A (MAO-A), qui s'avère être la principale enzyme responsable de la dégradation des neurotransmetteurs monoaminergiques impliqués dans la dépression. Les études précliniques menées chez les rongeurs ont également confirmé cette observation. L'hypothèse émise serait donc que cette augmentation d'expression et d'activité entraînerait une dégradation accrue de la sérotonine et de la noradrénaline, conduisant donc à la diminution de leurs niveaux cérébraux et potentiellement à l'émergence de la pathologie.

L'objectif de ce travail de thèse a donc consisté à modéliser cette hausse d'expression et d'activité de la MAO-A pour déterminer le rôle précis de celle-ci dans la survenue de la dépression et déterminer si elle pouvait participer aux mécanismes de résistance aux antidépresseurs.

Afin d'étudier les potentiels effets d'une élévation de l'expression de la MAO-A, un vecteur viral permettant une expression constitutive de l'isoforme humaine de l'enzyme et ciblant un type cellulaire spécifique est injecté dans le cortex préfrontal (mPFC). Après deux semaines de récupération, le comportement émotionnel des animaux est évalué par *Open Field*, labyrinthe en croix surélevée (EPM), test de néophagie (NSF) et test d'aspersion (*Splash Test*). La surexpression de la MAO-A est confirmée par RT-qPCR et par *Western Blot* et l'activité

enzymatique résultante déterminée. L'effet sur les niveaux en sérotonine (5-HT), mais aussi en dopamine, GABA et glutamate, est déterminé par microdialyse en situation basale (sans traitement), ou après un traitement antidépresseur (fluoxétine ou kétamine).

La surexpression dans les neurones pyramidaux de la MAO-A engendre dans le mPFC une diminution des niveaux extracellulaires en 5-HT. Elle est aussi, d'un point de vue comportemental, responsable d'une diminution du temps de toilettage dans le *Splash Test* synonyme d'un effet dépressiogène et, hypothétiquement, anhédonique ce qui n'est toutefois pas confirmé par un test de préférence de sucrose. Cette hausse de l'activité de la MAO-A est aussi associée à l'adaptation de l'expression génique de certains récepteurs à la 5-HT et d'acteurs de la synthèse et de la recapture de la noradrénaline. Lorsque cette surexpression est induite au niveau astrocytaire, elle est à l'origine d'une diminution du temps passé et du nombre d'entrée dans les bras ouverts de l'EPM, marquant un effet anxiogénique de cette surexpression. Enfin, cette hausse des niveaux de MAO-A est responsable de la perte de l'effet neurochimique de l'administration en aiguë de fluoxétine.

Les études précliniques réalisées dans les présents travaux apportent des arguments en faveur d'un rôle de la surexpression de la MAO-A observée chez les patients dépressifs dans la survenue de la pathologie, mais également un probable rôle dans les mécanismes imputables à l'apparition d'une non-réponse aux traitements classiques.

---

# Introduction

---



# 1. Les monoamines oxydases

---

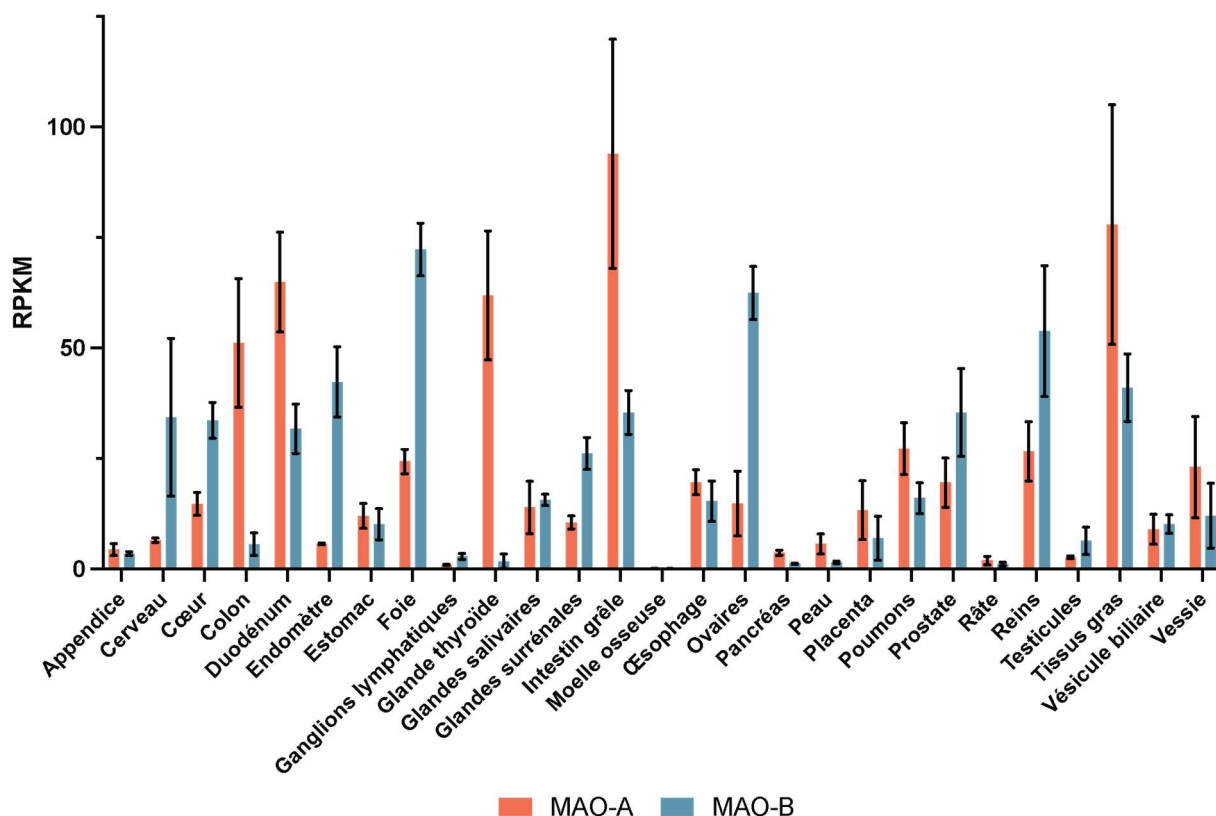
## 1.1. Généralité sur les MAO

Les monoamines oxydases (MAOs) sont des enzymes mitochondriales fixées à la membrane externe des mitochondries. On distingue deux isoformes de MAOs, appelées A et B (respectivement MAO-A et MAO-B), codées par deux gènes différents qui partagent une homologie de séquence de 73% (Bach, Lan et al. 1988, Shih, Grimsby et al. 1993), suggérant une origine commune aux deux gènes (Bach, Lan et al. 1988). Chaque isoforme est fortement conservée entre les espèces de mammifères puisque, à titre d'exemple, les gènes codant pour la MAO-A humaine et celle de rat possèdent une homologie de 87% (Shih, Grimsby et al. 1993).

Les MAOs catalysent la réaction de désamination oxydative des monoamines endogènes, participant ainsi à l'inactivation de celles-ci, et plus particulièrement dans le cas des neurotransmetteurs de type monoaminergiques : la sérotonine (5-HT), la noradrénaline (NA) et la dopamine (DA).

Ces deux enzymes se distinguent notamment par leur spécificité de substrat, la MAO-A catalysant la dégradation préférentiellement de la 5-HT et de la NA tandis que la MAO-B catabolisant d'autres monoamines endogènes telles que la phényléthylamine et la benzylamine. En ce qui concerne la DA, si certains auteurs intègrent cette monoamine parmi la liste des substrats de la MAO-A (Youdim, Edmondson et al. 2006), il semblerait davantage que sa dégradation soit sous l'effet de la MAO-B (Garrick and Murphy 1980). Les MAO-A et MAO-B sont également discriminées à partir des inhibiteurs de celles-ci : si certaines molécules comme l'iproniazide ne sont pas sélectives, d'autres inhibent spécifiquement la MAO-A (le moclobémide) ou la MAO-B (la sélégiline et la pargyline).

Les MAOs sont exprimées dans la plupart des tissus de l'organismes. Toutefois, les niveaux d'expressions varient selon les tissus et en fonction de l'isoforme considérée (Figure 1). Ainsi, la MAO-A est très majoritairement exprimée dans le tube digestif (duodénum, colon) et dans les tissus gras ainsi que dans la thyroïde alors que son expression est plus faible dans d'autres tissus ; *a contrario*, la MAO-B apparait fortement exprimée dans le foie, les reins ou encore le cœur et le cerveau. L'expression des MAOs varie également en fonction des régions comme cela est observé dans le cerveau.



**Figure 1 :** Niveau d'expression des MAOs dans différents tissus et organes de l'organisme humain

Les niveaux d'expression de la MAO-A et de la MAO-B ont été déterminés chez l'homme à la fois au niveau transcriptomique par *RNA-seq* et au niveau protéomique par immunodétection (Fagerberg, Hallstrom et al. 2014) (d'après <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene/4128> et <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene/4129>).

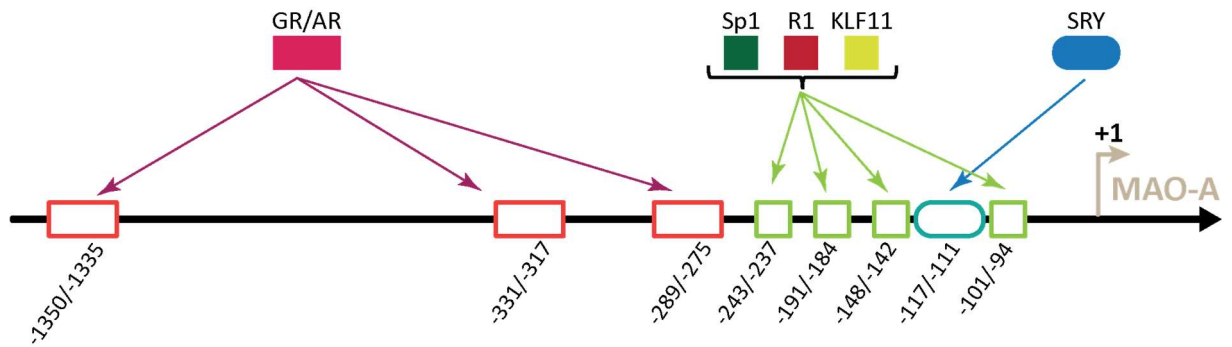
## 1.2. Génétique de la MAO-A

### 1.2.1. Localisation chromosomique du gène de la MAO-A

Le gène codant la MAO-A (comme celui codant la MAO-B) est localisé sur le bras court du chromosome X, au niveau du locus Xp11.23. Toutefois, par le mécanisme d'inactivation d'un des deux chromosomes X chez la femme, l'un des allèles du gène de la MAO-A se retrouve inactivé (Carrel and Willard 2005, Stabellini, Vasques et al. 2009), permettant un niveau d'expression comparable du gène chez les hommes et chez les femmes.

### 1.2.2. Régulation de l'expression du gène de la MAO-A

Le gène de la MAO-A est sous le contrôle d'un promoteur pouvant fixer sur différents éléments de réponses des facteurs activateurs et inhibiteurs de la transcription (Figure 2).



**Figure 2 :** Localisation des éléments de réponse aux facteurs de transcription régulant l'expression du gène de la MAO-A

L'activité du gène de la MAO-A est sous le contrôle de différents facteurs de transcriptions pour la plupart activateurs tels que les récepteurs aux glucocorticoïdes et androgènes, ainsi que Sp1 et KLF11, mais également de répresseurs dont notamment le facteur R1. Les facteurs Sp1, KLF11 et R1 appartenant à la même famille de facteurs de transcription et ayant une homologie structurale proche, ceux-ci peuvent se lier au promoteur du gène de la MAO-A par les mêmes éléments de réponse.

Ce promoteur est ainsi porteur de trois éléments de réponse aux récepteurs des glucocorticoïdes et androgènes (GRE/ARE). Ces récepteurs, en se liant au troisième GRE/ARE, sont responsables de l'activation du promoteur et donc de l'augmentation d'expression de la MAO-A (Ou, Chen et al. 2006). Ainsi, le traitement par un dérivé du cortisol (la dexaméthasone, DEX) de cellules contenant un plasmide permettant l'expression d'un gène rapporteur (la luciférase) sous le contrôle du promoteur de *mao-a* augmente d'un facteur de 2,6 l'activité du promoteur de la MAO-A ; cette augmentation atteint un facteur de 5,3 lorsque les cellules surexpriment après transfection le récepteur aux glucocorticoïdes. L'effet positif des glucocorticoïdes, libéré en réponse à un stress (Finsterwald and Alberini 2014), laisse envisager un effet direct du stress sur l'expression de la MAO-A.

L'expression du gène de la MAO-A est également sous le contrôle des facteurs de transcription KLF11, R1 et Sp1 (Duncan, Johnson et al. 2012).

Toujours en utilisant les vecteurs plasmidiques, Ou et ses collaborateurs démontrent également le rôle important du facteur de transcription Sp1 dans la régulation de l'expression de la MAO-A (Ou, Chen et al. 2006). Le facteur Sp1 possède dans le promoteur du gène de la MAO-A quatre éléments de réponses (tous proches des GRE/ARE). Lorsque ces éléments de réponse sont mutés ou délétés, l'activité transcriptomique basale du gène en aval du promoteur de la MAO-A est réduite. De plus, lorsque le troisième élément de réponse à Sp1 est muté et ce malgré la surexpression des récepteurs aux glucocorticoïdes l'activité du promoteur est

réduite : Ou en déduit que cet élément de réponse contribue fortement à l'activation du gène de la MAO-A par les GRE/ARE.

Par ailleurs, Ou et ses collaborateurs ont constaté par immunoprécipitation que le facteur répresseur R1 interagissait avec le GR et que cette interaction diminuait lorsque les cellules étaient traitées avec un glucocorticoïde tandis qu'en parallèle le GR interagissait davantage avec Sp1. Le facteur Sp1 semble ainsi favoriser, lors d'un stress, l'activation du gène de la MAO-A tandis que le facteur R1 empêche, en l'absence de cortisol (et donc de stress), le rôle activateur du GR.

Tout comme les facteurs Sp1 et R1, le facteur de transcription KLF11 participe à la régulation du gène de la MAO-A (Grunewald, Johnson et al. 2012). En effet, en co-transfectant des cellules humaines de neuroblastome avec le promoteur du gène *mao-a* en amont du gène de la luciférase et le gène de KLF11, Grunewald observe une augmentation de l'activité du gène rapporteur et donc du promoteur. Dans cette étude, l'auteur démontre également chez des rats soumis à un stress par défaite sociale chronique (CSD) une augmentation d'expression de KLF11 dans le cortex préfrontal (PFC) et le thalamus ; ce résultat est aussi observé dans le cortex préfrontal de souris soumises au CSD (Harris, Johnson et al. 2015). Cette surexpression de KLF11 est également retrouvée chez des patients souffrant de dépression ; en effet, le dosage protéique par Western Blot sur des biopsies de cortex PFC de patients dépressifs décédés a mis en évidence une augmentation de 36% de la protéine KLF11 (Harris, Johnson et al. 2015).

En 2018, il a été constaté que le blocage de l'expression protéique du facteur de transcription sirtuine 1 (Sirt1) conduisait à une diminution des niveaux d'ARNm et de protéine de la MAO-A : le gène de la MAO-A est sous régulation positive du facteur de transcription Sirt1 (Peng, Xue et al. 2018). Par ailleurs, l'expression de Sirt1 est corrélée positivement à celle de l'expression de la MAO-A : dans le cas d'un stress répété les niveaux d'ARNm et de protéine de Sirt1 augmentent tandis qu'ils sont réduits après recours à un traitement antidépresseur (Peng, Xue et al. 2018). Toutefois, cette régulation positive de l'expression de la MAO-A par Sirt1 implique un intermédiaire, le facteur de transcription NHLH2, et non une interaction directe de Sirt1 avec un quelconque élément de réponse dans le promoteur du gène *mao-a* (Libert, Pointer et al. 2011). Plus précisément, Sirt1 catalyse la déacétylation de NHLH2, rendant ce dernier actif et lui permettant donc d'interagir avec ses éléments de réponse (au nombre de 2) localisés dans la partie proximale du promoteur, à proximité des éléments de réponse à Sp1 (Libert, Pointer et al. 2011).

Une étude récente menée par Jia et son équipe (Jia, Cheng et al. 2021) a mis en évidence l'intervention de la protéine  $\alpha$ -synucléine ( $\alpha$ SYN) dans la régulation de l'expression du gène de la MAO-A. Il a, en effet, été observé qu'une surexpression de  $\alpha$ SYN dans des cellules murines de neuroblastome entraînait une augmentation de l'activité du gène de la MAO-A ainsi que la quantité de transcrits et de protéine de l'enzyme. Toutefois, par co-immunoprécipitation de la chromatine, il n'a été constaté aucune interaction entre  $\alpha$ SYN et le promoteur du gène. En s'intéressant aux facteurs de transcription R1 et Sp1, les chercheurs ont alors constaté que cette augmentation d'expression de  $\alpha$ SYN était à l'origine d'une augmentation d'expression du facteur de transcription Sp1 : la balance régulatrice de l'expression du gène de la MAO-A se déplace par conséquent en faveur de la transcription du gène (Jia, Cheng et al. 2021).

La régulation de l'expression du gène de la MAO-A est aussi dépendante du sexe de l'individu. En effet, si chez la femme la présence de deux gènes de la MAO-A (car deux chromosomes X) est compensée par rapport à l'homme par inactivation de l'un des gènes, chez l'homme le facteur de transcription SRY participe à la régulation du gène de la MAO-A. Ainsi, la surexpression de SRY dans des cellules en culture conduit à une augmentation de l'expression et de l'activité enzymatique de la MAO-A (Wu, Chen et al. 2009). Inversement, le *knockdown* du gène de SRY par des petits ARN interférents conduit à une diminution de 45% de l'activité de la MAO-A. De plus, lorsque le promoteur de la MAO-A (sous sa forme entière ou tronquée) est placée en amont du gène rapporteur de la luciférase, il est observé que l'augmentation d'expression du facteur SRY est associé à une activité du gène rapporteur jusqu'à la forme tronquée ne contenant que les 240 paires de base en amont du nucléotide initiateur de la transcription. Les études de co-immunoprécipitation de la chromatine et d'analyse des séquences du promoteur ont permis d'identifier que la protéine SRY pouvait interagir directement avec le promoteur de la MAO-A sur une région proche des éléments de réponse à Sp1 (Wu, Chen et al. 2009). Si le facteur SRY joue un rôle d'activateur de la transcription du gène de la MAO-A, son action est favorisée de manière synergique par le facteur Sp1 : la surexpression des deux facteurs en même temps entraîne une augmentation de l'activité du gène de la MAO-A supérieure à l'augmentation induite par la surexpression d'un seul de ces deux facteurs et le *knock-out* (ko) de Sp1 en parallèle de la surexpression de SRY réduit l'activité du gène. Enfin, les protéines SRY et Sp1 semblent pouvoir interagir directement (Wu, Chen et al. 2009) entre elles pour réguler positivement l'expression du gène de la MAO-A.

### 1.2.3. Régulation circadienne de l'expression du gène de la MAO-A

Nous venons de voir que l'expression du gène de la MAO-A était soumise à un certain nombre de facteurs de transcriptions régulant l'expression du gène en réponse à des stimuli environnementaux comme le stress. Toutefois, une étude menée en 2008 par Hampp et ses collaborateurs a montré que la régulation de l'expression transcriptomique de la MAO-A était aussi soumise au cycle circadien (Hampp, Ripperger et al. 2008), autrement dit que le niveau de transcription du gène variait en fonction du moment de la journée dans certaines régions associées au contrôle des émotions et de l'humeur (le noyau accumbens, le putamen et l'aire tegmentale ventrale (VTA)) dont l'activité évolue en fonction du cycle circadien.

En effet, l'utilisation d'un gène rapporteur précédé du promoteur de la MAO-A a permis de mettre en évidence une activité cyclique du gène sur 24 heures (Hampp, Ripperger et al. 2008) : le gène de la MAO-A s'exprime de manière oscillatoire en fonction du moment de la journée. De plus, la co-transfection de cellules avec la construction "promoteur de la MAO-A + gène rapporteur" avec le gène de un ou plusieurs facteurs du système d'horloge biologique montre un effet différent selon la combinaison étudiée (Tableau 1). L'immunoprécipitation de la chromatine utilisant des anticorps dirigés contre le facteur de transcriptions liés à la régulation temporelle des gènes ("*circadian-clock genes*") Bmal1 a montré que le gène de la MAO-A interagissait de manière oscillante avec cette protéine dans les neurones de la VTA en fonction du moment de la journée. Par ailleurs, l'analyse de l'expression transcriptomique de la MAO-A dans des souris ayant perdu le fonctionnement du facteur Per2 a montré une diminution de l'expression de la MAO-A ainsi qu'une disparition de l'activité circadienne du gène : le facteur Per2 favorise l'expression de la MAO-A de manière cyclique.

Combinaison de facteurs du cycle circadien	Effet sur l'activité du promoteur de la MAO-A
Bmal1 +Npas2	↑
Bmal1+Clock	∅
Bmal1+Npas2+Cry1	↑
Bmal1+Npas2+Per2	↑↑

**Tableau 1** : Effet de l'expression de différents facteurs lié au système du cycle circadien sur l'activité du gène de la MAO-A

Les facteurs BMAL1, NPAS2 et Per2 favorise l'expression circadienne de la MAO-A tandis que le facteur Clock apparait comme un répresseur de l'activité transcriptomique du gène de la MAO-A.

#### 1.2.4. Polymorphismes du gène

Le gène de la MAO-A, comme tout autre gène, présente des variations de séquences ou polymorphisme. Certains de ces polymorphismes ont été associés à la survenue de la dépression ou à une augmentation de la réponse aux antidépresseurs.

Parmi ces polymorphismes, celui impliquant une variation du nombre de répétition d'un tandem (uVNTR) situé en position proximal du nucléotide initiateur de la transcription dans le promoteur du gène de la MAO-A a été particulièrement étudié. Il consiste en la répétition de 2 à 5 fois d'une séquence nucléotidique de 30 bases (Sabol, Hu et al. 1998) : les allèle de 2 et 3 répétitions est dit allèle court tandis que les 3,5, 4 et 5 répétitions constituent un allèle dit long. La forme longue de l'uVNTR est préférentiellement associé au diagnostic du trouble dépressif caractérisé (TDC), notamment chez la femme, ainsi qu'à un fort risque de développer des complications chez les patients souffrant d'un TDC (Kersting, Kroker et al. 2007). Cet allèle est également associé à une réponse aux antidépresseurs amoindrie par rapport à des patients souffrant de TDC non porteur de cet allèle (Domschke, Hohoff et al. 2008).

Ces différents allèles du VNTR proximal sont à l'origine d'une structuration différente de la chromatine au niveau du promoteur du gène *mao-a*, notamment en ce qui concerne les motifs de méthylation du promoteur et les facteurs de transcriptions pouvant se lier sur ce dernier (Manca, Pessoa et al. 2019). Ainsi, l'allèle à 4 copies se caractérise par un niveau de méthylation plus élevé que les allèles courts. Inversement, les facteurs de transcription CTCF, Sp1, hnRNPK, CNBP et nucléoline semblent pouvoir lier plus facilement l'allèle à 3 copies du promoteur par rapport à l'allèle à 4 copies (Manca, Pessoa et al. 2019).

Les études sur le polymorphisme du gène de la MAO-A, bien que moins nombreuses que celles sur le VNTR, mettent tout de même en évidence que d'autres polymorphismes sont associés à la pathologie du TDC ou à l'efficacité du traitement. Ainsi, l'étude menée par Leuchter et ses collaborateurs en 2004 montre que le polymorphisme *rs6323* est associé à une différence de réponse à un traitement des patients, les patients porteurs de l'allèle responsable d'une plus grande activité du gène (allèle G ou G/G) souffrant d'un plus grand nombre d'épisodes de dépressions et étant davantage résistant aux traitements (Leuchter, McCracken et al. 2009).

De même, la récente étude de Chappell montre une association entre le polymorphisme *rs979605* et l'efficacité d'un traitement antidépresseur d'une part et une association entre ce même polymorphisme et le sexe de l'individu d'autre part (Chappell, Colle et al. 2022). En effet, les femmes homozygotes pour l'allèle G de ce polymorphisme présente une diminution du score de Hamilton (17 items) après 6 mois de traitement AD ; inversement, les femmes

homozygotes pour l'allèle A ne présente pas de réelle diminution des symptômes dépressifs après 6 mois de traitement en comparaison de leur état au début du traitement. En revanche, l'effet du traitement ne semble pas être affecté par l'unique allèle présent chez les hommes (qu'il soit A ou G), ni chez les femmes hétérozygotes (dont l'effet est similaire à ce qui est observé chez les femmes « répondant » au traitement antidépresseur).

Le promoteur du gène *mao-a* comporte un second VNTR situé en position plus distale (dVNTR) que celui cité ci-dessus ; ce VNTR est constitué de deux courts décimères (CTCCTCCCCG et CCCCTCCCCG) flanquée d'îlots CpG dont le nombre de copies varie de 8 à 11 (Philibert, Wernett et al. 2011). L'allèle constitué de 9 copies assure une plus grande activité transcriptionnelle au gène *mao-a* que les autres allèles, l'allèle constitué de 10 copies assurant même la plus faible des activités du gène *mao-a* (Philibert, Wernett et al. 2011).

L'analyse fonctionnelle de ces deux tandems de répétition a permis de mettre en évidence qu'une délétion de l'uVNTR n'avait pas d'impact sur les niveaux d'expressions du gène alors qu'une délétion du dVNTR seul suffit à fortement réduire l'activité transcriptomique du gène *mao-a* (Manca, Pessoa et al. 2018) : le dVNTR est une séquence régulant positivement l'expression du gène de la MAO-A. Les deux tandems de répétition assurent également, par combinaison de leurs polymorphismes, un rôle de modulation négative de l'activité du gène de la MAO-A. Les différentes combinaisons d'allèles des deux VNTR, répartis de manière non équitable dans la population, ont un impact plus ou moins fort sur la régulation négative de l'expression du gène (Checknita, Maussion et al. 2015, Manca, Pessoa et al. 2018).

#### 1.2.5. Isoformes du transcript de la MAO-A

L'analyse en bioinformatique des ARNm issus de la transcription du gène *mao-a* révèle l'existence de quatre isoformes différentes du gène, nommées 201, 202, 203 et 204 (Manca, Pessoa et al. 2018). Les isoformes 202 et 203 sont des transcripts courts du gène de la MAO-A dont le codon initiateur de la traduction est inexistant (isoforme 202) ou très proche de la fin de l'ARNm (isoforme 203), rendant ces isoformes non codantes (Manca, Pessoa et al. 2018). Les deux autres isoformes assurent la formation d'isoforme de l'enzyme MAO-A. Toutefois, si le transcript 201 permet la traduction d'une isoforme protéique fonctionnelle de la MAO-A, la structure du transcript 204 amène à la production d'une isoforme non fonctionnelle de la MAO-A. En effet, le transcript 204, plus long que le 201 (sa séquence incorpore l'uVNTR évoqué en §1.2.4) présente un second codon d'initiation de la traduction qui conduit à un décalage du cadre de lecture et à la présence d'un codon STOP prématuré : l'enzyme synthétisée à partir de

cette séquence nucléotidique est tronquée, ne comportant pas de domaine de liaison au FAD nécessaire à l'activité de l'enzyme (Manca, Pessoa et al. 2018).

### 1.2.6. Régulation épigénétique du gène de la MAO-A

Comme de nombreux autres gènes, celui codant la MAO-A est soumis à une régulation de son activité par des mécanismes épigénétiques. Le principal élément de régulation épigénétique est la méthylation d'îlots cytosine-guanidine (CpG) qui induit une régulation négative de l'activité des gènes. L'analyse de la séquence génétique du gène de la MAO-A comprenant son promoteur a montré la présence de deux îlots CpG, l'un couvrant uniquement une région du promoteur qui contient par ailleurs le tandem de répétition évoqué précédemment (cf 1.2.4), l'autre couvrant la partie la plus proximale du promoteur ainsi que l'ensemble du premier exon et le début du premier intron (Shumay and Fowler 2010).

Toutefois, une étude réalisée post-mortem sur le cortex de patients humains ne révèle pas d'association entre les niveaux d'expression de l'enzyme et de méthylation du gène (Cervera-Juanes, Wilhem et al. 2016). Mais le résultat de cette étude diffère des études *in vitro* ainsi qu'une autre étude menée chez des sujets humains. En effet, les études *in vitro* menées avec le gène rapporteur de la luciférase ont montrées que le niveau de méthylation du promoteur du gène conduisait à une variation du niveau d'activité du gène (Checknita, Maussion et al. 2015, Schiele, Ziegler et al. 2018). De la même manière, l'étude de Shumay (Shumay, Logan et al. 2012) a été conduite chez des sujets cette fois-ci vivant à l'aide de l'imagerie par PET scan après administration de clorgyline radiomarké ; il a alors été montré une augmentation de l'activité cérébrale de la MAO-A qui était corrélée à une diminution de la méthylation du promoteur du gène de la MAO-A. Toutefois, il est à noter que la détermination du niveau de méthylation chez les sujets humains a été réalisé à partir de l'ADN de cellules sanguines.

## 1.3. L'enzyme de la MAO-A

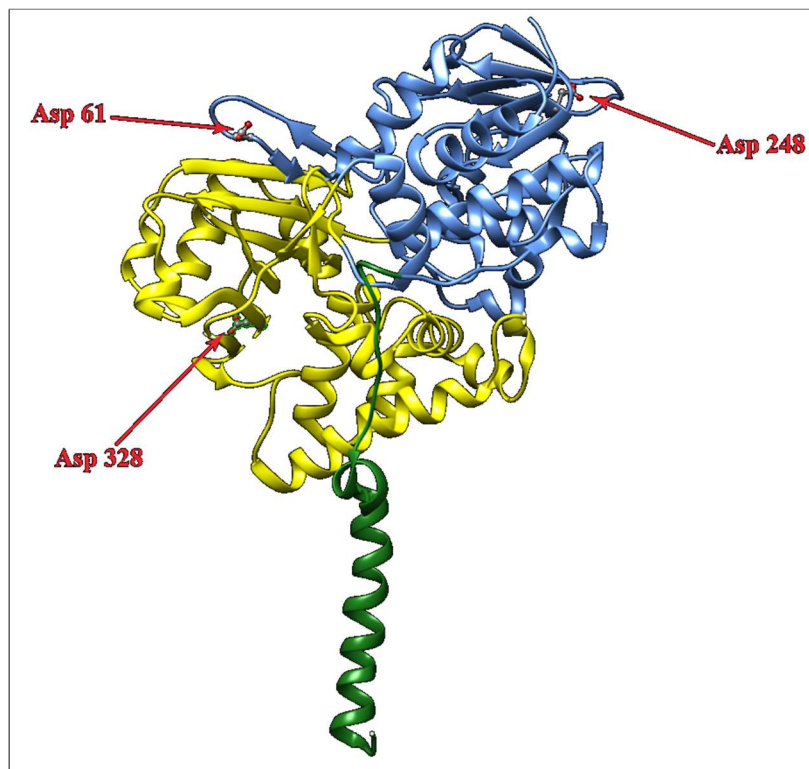
### 1.3.1. Structure protéique de la MAO-A

La MAO-A est une enzyme monomérique qui s'attache à la membrane extérieure de la mitochondrie par l'intermédiaire d'une hélice située au niveau de la région en C terminal de la séquence primaire de la MAO-A (qui débute par l'acide aminé en position 497).

La MAO-A humaine reste sous forme monomérique (De Colibus, Li et al. 2005, Edmondson, DeColibus et al. 2007), contrairement à son isoforme MAO-B et à la MAO-A murine qui forment des dimères. De manière surprenante, les séquences en acides aminés du site actif des formes humaine et du rat de la MAO-A sont identiques mais leurs formes diffèrent

considérablement (De Colibus, Li et al. 2005) ce qui pourrait expliquer en fonction des espèces la différence de spécificité de substrat. La forme monomérique de la MAO-A humaine semble garantir une plus faible stabilité à la température que la forme dimérique de la MAO-A chez les rongeurs, l'enzyme perdant 60% de son activité après 120 minutes à 25°C (Wang and Edmondson 2007).

L'analyse structurale cristallographique a également permis de déterminer que la structure de la MAO-A formait trois domaines fonctionnels distincts (Figure 3), un domaine de liaison du substrat, un domaine de liaison du co-facteur et un domaine d'ancrage à la membrane constitué essentiellement par une hélice  $\alpha$  localisé dans la région C terminale de la protéine (De Colibus, Li et al. 2005).



**Figure 3 :** Structure de la MAO-A humaine obtenue par cristallographie

La détermination de la structure de la MAO-A humaine a permis d'identifier 3 domaines nécessaires pour son fonctionnement : un domaine de liaison au FAD (en bleu), un domaine de liaison du substrat (en jaune) et le domaine d'ancrage à la membrane mitochondriale (en vert). Le site catalytique correspond à la cavité hydrophobe partagée entre les deux domaines de liaisons. Sont indiquées sur ce schéma les 3 résidus aspartates impliqués dans l'activité de la MAO-A.

Nous avons vu précédemment que l'expression de la MAO-A était sujette à une régulation fine au niveau transcriptomique, ce qui, théoriquement, pourrait avoir une incidence sur l'activité globale de l'enzyme (si les niveaux d'expression en transcript et en protéine étaient

corrélés). Toutefois, l'activité de l'enzyme dépend également de son fonctionnement intrinsèque, autrement dit de sa capacité à catalyser la réaction de déamination oxydative des monoamines.

La structure en acides aminés impacte le fonctionnement de la MAO-A. En effet, trois acides aspartique localisés dans le domaine de liaison au cofacteur FAD (en positions 61 et 248) et dans le site de liaison du substrat (en position 328) sont nécessaires à différents degrés au fonctionnement de l'enzyme (Wei, Satram-Maharaj et al. 2012). Ainsi, la substitution par mutagenèse dirigée a permis de déterminer que les acides aspartiques en 248 et 328 étaient nécessaires à l'activité enzymatique de la MAO-A ; toutefois, ces deux résidus n'ont pas la même importance pour l'activité de l'enzyme. En effet, la substitution du premier résidu entraîne une diminution de l'activité catalytique de la MAO-A au niveau de la protéine même sans pour autant réduire l'activité globale de la MAO-A au niveau cellulaire. Lorsque l'acide aspartique en 328 est remplacé par un autre résidu, le fonctionnement de l'enzyme est totalement perdu. En revanche, l'acide aspartique 61 ne semble pas avoir de rôle dans l'activité catalytique de la MAO-A (sa substitution n'entraînant pas de perte d'activité), mais semble intervenir dans l'activité sensible au calcium en modulant l'interaction avec le FAD qui assure un rôle dans la stabilité et le maintien de la conformation de l'enzyme (Nandigama and Edmondson 2000, Wei, Satram-Maharaj et al. 2012).

Si les séquences primaires des protéines de la MAO-A et de la MAO-B partagent une homologie de 73%, la spécificité en termes de substrats et d'inhibiteurs s'expliquerait par un seul nucléotide qui diffère entre les deux isoformes (Geha, Rebrin et al. 2001). En effet, par mutagenèse dirigée, il a été constaté que le remplacement de l'isoleucine présente en position 335 par une tyrosine modifiait la spécificité de l'enzyme vis-à-vis de ses substrats et inhibiteurs : cette substitution induit une plus grande sélectivité de la MAO-A pour les substrats et les inhibiteurs de la MAO-B que ceux pouvant interagir avec une MAO-A non modifiée (Geha, Rebrin et al. 2001). En parallèle, la substitution de la tyrosine en position 326 de la MAO-B par une isoleucine conduit au phénomène inverse : la MAO-B interagit alors sélectivement avec les substrats et inhibiteurs de la MAO-A mais plus avec ses substrats et inhibiteurs conventionnels.

### 1.3.2. La flavine adénine dinucléotide, co-facteur de la MAO-A

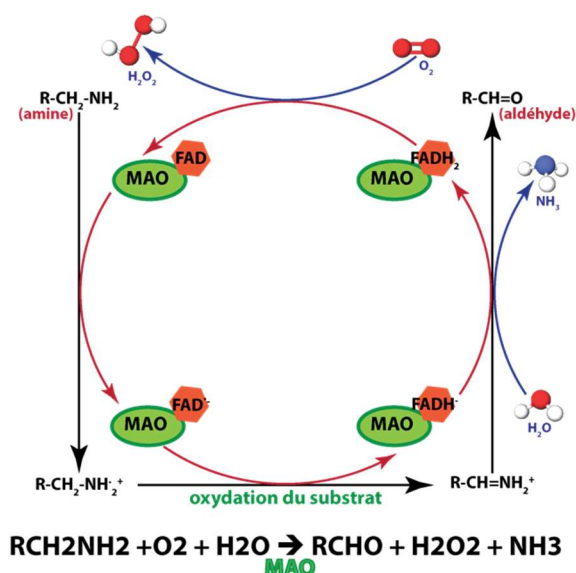
La réaction catalysée par la MAO-A fait aussi intervenir un co-facteur redox, la flavine adénine dinucléotide (FAD). Ce co-facteur est lié de manière covalente au domaine de liaison

au FAD (Figure 3) par la formation d'un pont disulfure avec une cystéine entre le FAD et la cystéine en position 406 (Kearney, Salach et al. 1971) ; la cystéine liant le FAD est par ailleurs comprise dans un pentapeptide (sérine-glycine-glycine-cystéine-tyrosine) conservé entre les deux isoformes et situés à des positions relativement similaires dans la structure des protéines (Bach, Lan et al. 1988). La perte de cette liaison covalente entre l'enzyme et son co-facteur (substitution de la cystéine par une alanine) n'empêche pas la liaison entre les deux molécules et n'abolit pas la réaction catalysée (Hiro, Tsugeno et al. 1996, Nandigama and Edmondson 2000) ; toutefois, lorsque cette liaison est supprimée, l'activité catalytique de la MAO-A est tout de même réduite suggérant une influence de cette liaison covalente sur l'efficacité de l'enzyme (Nandigama and Edmondson 2000). De plus, cette liaison covalente n'est pas nécessaire que ce soit pour le repliement de la protéine ou pour son adressage à la membrane externe des mitochondries.

### 1.3.3. Substrats de la MAO-A et mécanismes enzymatiques

De manière générale, les MAOs catalysent la déamination oxydative des monoamines, ce qui entraîne l'inactivation de ces dernières. Cette réaction libère un aldéhyde dérivé de la monoamine qui sera à son tour pris en charge par des aldéhydes déshydrogénases pour former respectivement de l'acide 5-hydroxyindolacétique (5-HIAA) et de l'acide vanillylmandélique à partir de la 5-HT et de la NA. La réaction de déamination des monoamines par les MAOs libère aussi du peroxyde d'hydrogène ( $H_2O_2$ ) et de l'ammonium.

Toutefois, chez l'être humain les deux isoformes de MAOs présentent une spécificité de substrat plus importante que leurs homologues murines. Ainsi, la MAO-A désamine préférentiellement la 5-HT et la NA et, selon certains articles, la DA tandis que la MAO-B intervient surtout pour la dégradation des autres monoamines, telles que la tryptamine et la tyramine (Tableau 2) (Youdim, Edmondson et al. 2006).



**Figure 4 :** Mécanisme moléculaire de la déamination oxydative des monoamines par les MAOs

La déamination oxydative des monoamines fait intervenir des molécules d'eau pour permettre l'élimination du groupement amine sous la forme d'ammonium suite à l'oxydation de ce même groupement rendu possible par la réduction du FAD. Ce dernier est régénéré par intervention d'une molécule de dioxygène qui prend en charge les atomes d'hydrogènes récupérés lors de la formation de l'aldéhyde résiduel de la déamination de la monoamine.

Monoamine	MAO-A			MAO-B		
	K <sub>m</sub> (μM)	V <sub>max</sub> (pmol/min.mg)	K <sub>m</sub> /V <sub>max</sub>	K <sub>m</sub> (μM)	V <sub>max</sub> (pmol/min.mg)	K <sub>m</sub> /V <sub>max</sub>
5-HT	137	228	3,03	1093	6,6	1,75
NA	284	561	3,21	238	321	3,07
adrénaline	125	379	1,66	266	465	0,006
DA	212	680	1,98	229	702	1,35
tryptamine	35	58	0,14	35	108	77,3
tyramine	127	182	1,66	107	343	2,84
2-phényléthyl-amine	140	20	1,43	4	309	3,21

**Tableau 2 :** Caractéristique enzymatique des MAOs pour différentes monoamines (d'après (Youdim, Edmondson et al. 2006))

Le ratio K<sub>m</sub>/V<sub>max</sub> apporte une information importante sur l'efficacité de l'enzyme, là où le K<sub>m</sub> est un reflet de la capacité de l'enzyme à lier/prendre en charge le substrat.

#### 1.3.4. Régulation de l'activité enzymatique de la MAO-A par le calcium

Si l'activité enzymatique de la MAO-A dépend de sa structure et plus particulièrement de certains résidus aspartates, elle dépend aussi de la concentration d'ions calcium  $\text{Ca}^{2+}$  disponibles dans le cytoplasme pour l'enzyme. En effet, le *ko* de la protéine antiapoptotique *Bax Inhibitor 1* (BI-1), protéine assurant une régulation des niveaux cytosolique et dans le réticulum endoplasmique en  $\text{Ca}^{2+}$ , induit une augmentation de l'activité de la MAO-A sans modifier son niveau d'expression (Lee, Lee et al. 2013), associée à une augmentation de la libération de  $\text{Ca}^{2+}$  dans le cytosol des cellules. De plus, les animaux *ko* pour BI-1 montrent une plus grande vulnérabilité au stress environnemental chronique et une diminution des quantités de 5-HT et de NA.

#### 1.3.5. MAO-A et preseniline 1 (PS-1)

En étudiant le rôle de la PS-1 dans la maladie d'Alzheimer, des chercheurs se sont intéressés au comportement de cette protéine avec la MAO-A. En recourant à la co-immunoprécipitation de la PS-1, les auteurs ont alors constaté que la MAO-A précipitait avec PS-1 et que les deux protéines interagissaient. En étudiant l'activité de l'enzyme MAO-A dans un modèle de souris transgénique mutée pour la PS-1 (remplacement d'une méthionine par une valine comme dans la pathologie d'Alzheimer), il a été montré que le variant étudié pouvait être à l'origine d'une inhibition de l'activité de la MAO-A (Wei, Gabriel et al. 2012). Une autre étude, menée antérieurement à celle de Wei, a montré que des femmes porteuses d'autres variants de la PS-1 souffraient davantage de dépression que des sujets sains (Ringman, Diaz-Olavarieta et al. 2004). Bien que ces études aient porté dans le cadre de la dépression précédant la survenue de la maladie de Alzheimer, elles laissent penser que la PS-1 pourrait moduler l'activité de la MAO-A en interagissant directement avec l'enzyme.

#### 1.3.6. Fonctions assurées par la MAO-A

La MAO-A, comme la MAO-B, assurent la dégradation des monoamines qu'elles soient endogènes ou exogène. Cela se traduit au niveau cérébral par la dégradation de la 5-HT et de la NA par la MAO-A ce qui assure la régulation des quantités de ces deux neurotransmetteurs et par conséquent le *turn-over* (autrement dit la dégradation d'une partie des stocks en même temps que leur production). Au niveau hépatique, les MAOs assurent la dégradation des monoamines captées dans l'alimentation participant donc à la dégradation de molécules potentiellement réactives.

Via la régulation des niveaux en neurotransmetteurs monoaminergiques, la MAO-A participe aussi de manière indirecte au développement neuronal et donc à la maturation du cerveau et des circuits neuronaux (pour revue, voir (Jones and Raghanti 2021)).

La production d'espèces réactives de l'oxygène (ERO) par la MAO-A conduit à l'implication de celle-ci dans un certain nombre de phénomènes physiologiques et pathologiques. En effet, les EROs peuvent jouer un rôle de médiateur dans la régulation de la croissance cellulaire (Yoon, Yun et al. 2002), la signalisation cellulaire ou encore la régulation de la mort cellulaire par apoptose (Finkel 1999). De plus, ces EROs peuvent directement intervenir dans les mécanismes de mort cellulaire (Tatton and Olanow 1999) telle que l'apoptose et donc participer à des pathologies neurodégénératives.

### 1.3.7. Intervention de la MAO-A dans la cascade d'évènements liées à l'apoptose

Il a été observé que la MAO-A était activée dans les cellules entrant en apoptose avant même l'activation de la caspase 3 qui initie la cascade des caspases, les enzymes effectrices de l'apoptose (Fitzgerald, Ufer et al. 2007). Cela semble indiquer que la MAO-A participerait au signal apoptotique, ce que semble confirmer l'inhibition de la MAO-A : en réduisant l'activité de la MAO-A, il est observé que l'activation des caspases était réduite et que la perte de viabilité cellulaire diminuait par rapport à des cellules non traitées avec un I-MAOA. Par ailleurs, lorsque la MAO-A pour laquelle le résidu aspartate situé en position 328 (voir ci-dessus) est remplacée par un acide aminé inactif, l'expression des protéines anti-apoptotiques Bcl-2 et Bcl-xl est augmentée et est associée à une augmentation de la survie cellulaire (Wei, Satram-Maharaj et al. 2012). L'ensemble de ces observations laisse apparaître clairement que la MAO-A joue un rôle majeur dans la cascade des évènements associée à la survenue de l'apoptose.

### 1.3.8. Rôle de la MAO-A dans la respiration mitochondriale et la production d'ERO

La MAO-A en oxydant les monoamines génère du H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. Cette production de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> peut conduire à un stress oxydant, entraînant la consommation du glutathion sous forme réduite et l'inactivation de la chaîne respiratoire, plus particulièrement du complexe I (Cohen and Kesler 1999). Cette augmentation de production d'espèces réactives de l'oxygène et l'inactivation de la chaîne respiratoire mitochondriale est associée à différentes pathologies telles que les maladies neurodégénératives (Cohen and Kesler 1999), le développement de cancers en participant indirectement à la reprogrammation cellulaire et en induisant la prolifération des

cellules cancéreuses (Chen, Guo et al. 2020), ou encore le vieillissement et des dysfonctionnements cardiaques par endommagement des mitochondries (Mialet-Perez, Santin et al. 2018).

De manière surprenante par rapport aux précédents travaux, la récente étude de Graves montre que l'activité des MAOs, et plus particulièrement l'isoforme B de la MAO, aurait un effet positif pour les neurones dopaminergiques (Graves, Xie et al. 2020). En effet, les auteurs constatent, qu'après augmentation des niveaux cytosoliques en DA, l'inhibition de la MAO-B conduit à une augmentation de l'oxydation des molécules dans le cytosol et notamment des thiols comme le glutathion ; ils en émettent l'hypothèse que les MAOs préviendraient l'auto-oxydation de la DA et donc la consommation des thiols réduits qui assurent la protection de la cellule contre un stress oxydant. De plus, ils observent que les électrons libérés par l'oxydation de la DA dépendante des MAOs sont transférés au complexe IV de la chaîne respiratoire ce qui favorise la sortie de protons depuis la matrice mitochondriale et la production d'ATP. Graves et ses collaborateurs supposent également que l'activité des MAOs, et notamment de la MAO-B, permet d'augmenter la production d'énergie pour soutenir les besoins de la cellule quant à la libération de DA (Graves, Xie et al. 2020).

#### **1.4. Expression différentielle des MAOs durant le développement cérébral**

L'étude aux stades précoces de l'expression des ARNm des MAOs dans des cerveaux d'embryons (stades E10 à E18) et de jeunes souris (de la naissance à 5 mois post-natal) a montré qu'il existait un profil d'expression complémentaire entre les deux isoformes au niveau des neurones monoaminergiques (Vitalis, Fouquet et al. 2002), à l'exception notable des neurones sérotoninergiques pour lesquels les deux isoformes sont co-exprimés de manière similaire.

Ainsi, l'ARNm de la MAO-A est fortement détecté dans les neurones noradrénergiques et adrénérgiques, et notamment dans le locus cœruleus, durant la période embryonnaire et persiste à la période post-natale ; ces mêmes neurones n'expriment pas ou peu la MAO-B. Le schéma d'expression inverse est ainsi observé dans les neurones dopaminergiques pour lesquels l'ARNm de la MAO-B prédomine fortement, schéma d'expression qui est retrouvé tout autant lors de la période embryonnaire que durant la vie post-natale ; en revanche, l'expression de la MAO-A n'est détectée qu'à partir des phases tardives de la période embryonnaire et augmente durant la phase post-natale. Enfin, l'expression des deux isoformes est importante dans les neurones sérotoninergiques durant la période embryonnaire avec un devenir différent à la période post-natale selon l'isoforme et les noyaux cérébraux : si l'expression de la MAO-B

demeure constante, celle de la MAO-A va décroître durant la période post-natale dans les noyaux ventraux du raphé tandis que l'expression reste élevée dans les noyaux dorsaux de cette même région. Dans les autres populations de neurones "monoaminergiques" (histaminergiques, cholinergiques et mélatoninergiques), la MAO-B est seule exprimée soit dès la période embryonnaire soit plus tardivement dans le cas des neurones cholinergiques. Toutefois, une expression embryonnaire importante de MAO-A et qui diminue à la période post-natale est retrouvé dans un groupe de neurones cholinergiques du cerveau postérieur, et plus particulièrement dans les nerfs moteurs (Vitalis, Fouquet et al. 2002).

Dans les populations neuronales non-monoaminergiques, la MAO-A apparait particulièrement exprimée dans l'hippocampe (avec une prédominance dans la sous-région 3 de la corne d'Ammon), mais également dans d'autres régions associées à la régulation de l'humeur comme les noyaux centraux et antérieurs de l'amygdale ou encore le cortex pyriforme. Cette forte expression est conservée dans le cerveau mature. La MAO-B est exprimée au sein des populations de neurones dits non-monoaminergiques essentiellement dans les zones ventriculaire et subventriculaire ainsi que dans l'hippocampe et l'amygdale, mais cette expression décroît rapidement à la fin de la période embryonnaire (Vitalis, Fouquet et al. 2002).

## 2. Le Trouble Dépressif Caractérisé

---

### 2.1. Symptomatologie et épidémiologie du Trouble Dépressif Caractérisé

Le Trouble Dépressif Caractérisé (TDC) est le trouble psychiatrique avec la plus forte prévalence au niveau mondial selon l'Organisation Mondiale de la Santé qui estimait en 2022 que le TDC affectait près de 280 millions de personnes (World Health Organization 2022); de plus, il est estimé que près de 16% de la population mondiale (soit un 6<sup>e</sup> des êtres humains) serait amené à souffrir de symptômes dépressifs et de dépression (Kessler, Berglund et al. 2003). Outre cette prévalence, le TDC constitue la première cause d'invalidité dans le monde, ayant un fort impact sur la société et l'économie des pays.

Un patient est diagnostiqué comme souffrant de TDC dès lors qu'il présente comme symptôme une association de l'un des deux symptômes majeurs de la dépression (humeur dépressive ou perte d'intérêt/plaisir à l'accomplissement de tâche sensé en procurer) avec au minimum quatre symptômes dit mineurs (dont des troubles de la prise alimentaires/troubles du poids, la sensation de culpabilité ou encore des troubles du sommeil) dont la liste est établie dans le Manuel Diagnostique et Statistique des Troubles Mentaux (DSM-5) (American Psychiatric Association 2013). Parmi ces symptômes, on retrouve aussi les pensées suicidaires, un symptôme auquel une attention particulière doit être apportée puisque le taux de mortalité pour cause de suicide concerne près de 10% des patients dépressifs (Goncalves Peter, Lopez Molina et al. 2020).

Il est aussi important de noter qu'il existe une inégalité de prévalence de la pathologie au regard du sexe des patients puisqu'il est estimé que les femmes souffrent deux fois plus de dépression que les hommes (Kessler 2003).

Enfin, l'hétérogénéité des symptômes et le nombre élevé de combinaisons possibles entre eux est à l'origine de 227 profil symptomatiques différents, pouvant s'élever à près de 16.400 dès lors que l'on prend en considération l'ensemble des sous-symptômes (Fried and Nesse 2015).

Le traitement clinique du TDC a pour premier objectif de réduire les symptômes dépressifs, mais également de réduire les risques de rechutes. Ce traitement repose principalement sur l'utilisation de molécules antidépressives, notamment dans le traitement des formes modérées et sévères de la maladie. Le degré de sévérité de la pathologie est déterminée par l'utilisation d'échelles d'évaluations cliniques, à l'instar des échelles de Hamilton («*Hamilton Rating Scale*

for Depression», HAM-D) et de Montgomery et Åsberg (*Montgomery-Asberg Depression Rating Scale*, MADRS).

## 2.2. Physiopathologie du TDC et l'hypothèse monoaminergique

Les facteurs en cause dans la survenue des TDC restent à ce jour complexes et mal identifiés, même si différentes hypothèses ont été émises tels que l'intervention de facteurs environnementaux ainsi que différents mécanismes biologiques et physiologiques.

La plus ancienne hypothèse avancée pour tenter d'expliquer la survenue de la dépression est l'hypothèse monoaminergique. Cette hypothèse suppose que le TDC, comme d'autres troubles de l'humeur, serait causé par une déplétion importante des quantités de neurotransmetteurs monoaminergiques (5-HT, DA, NA) au niveau cérébral. Les bases de cette hypothèse remontent au début des années 1950 lorsque il a été observé chez des patients traités pour hypertension par la réserpine, une molécule induisant une déplétion en monoamine, que ces patients développaient pour la plupart d'entre eux une dépression (Freis 1954). Cette hypothèse fut renforcée lorsque fut découvert les propriétés antidépresseurs de l'iproniazide identifiée ultérieurement comme étant un inhibiteur des MAOs (I-MAO).

Dans une étude ultérieure (Neumeister, Nugent et al. 2004), la déplétion en tryptophane, le précurseur de la 5-HT, entraîne chez des patients en rémission une augmentation transitoire mais sévère du score HAM-D, supérieure à celle observée chez des sujets sains eux-aussi déplétés en tryptophane ; lorsque ces mêmes sujets (patients et sujets sains) étaient soumis à un placebo (*depletion sham*), aucune augmentation significative du HAM-D n'était observé. Selon les auteurs de cette étude clinique, la déplétion en tryptophane et donc le déficit en 5-HT aurait permis de mettre en lumière des modifications fonctionnelles dans les circuits neuronaux qui seraient impliqués dans l'étiologie du TDC (Neumeister, Nugent et al. 2004). La méta-analyse de l'ensemble des études cliniques menées sur la déplétion en précurseur des monoamines (Ruhe, Mason et al. 2007) confirme qu'une déplétion en monoamines chez des patients en rémission induisait une baisse de l'humeur, similaire à celle observée chez les patients souffrant de TDC. De plus, cette méta-analyse fait ressortir une plus grande sensibilité des femmes vis-à-vis des hommes à la déplétion en précurseurs de la 5-HT.

Si la déplétion en précurseur de la 5-HT entraîne des symptômes similaires à ceux observés chez les patients atteint de dépression et plaide en faveur de l'hypothèse des monoamines, d'autres arguments vont dans le même sens. En effet, la plupart des traitements antidépresseurs

agissent directement sur les niveaux en monoamines dans la fente synaptique, en inhibant la recapture ou la dégradation (I-MAOs).

Néanmoins, l'hypothèse du déficit en monoamines ne fait pas l'unanimité. Ainsi, pour certains auteurs (Delgado 2000, Hirschfeld 2000, Boku, Nakagawa et al. 2018), les limites des antidépresseurs (ci-après, §2.3.2) remettraient en cause cette hypothèse monoaminergique. Ainsi, d'autres hypothèses sont mises en avant pour tenter d'expliquer la survenue de la dépression, telles qu'une modification de la neuroplasticité et de la neurogenèse (voir (Boku, Nakagawa et al. 2018, Moncrieff, Cooper et al. 2023) pour revue). De la même manière, la méta-analyse de Ruhe évoquée précédemment met en lumière le fait qu'une déplétion en neurotransmetteurs monoaminergiques n'induit pas de dégradation de l'humeur des sujets sains ; toutefois, une baisse légère était observée chez ceux ayant des antécédents familiaux de troubles de l'humeur (Ruhe, Mason et al. 2007).

## 2.3. Traitement courant du TDC et ses limites

### 2.3.1. Les traitements antidépresseurs

Les principaux traitements de la dépression se basent sur la pharmacothérapie ciblant les voies monoaminergiques. Les premiers traitements antidépresseurs (AD) ont été découverts par sérendipité en 1952 : lors de l'étude de l'iproniazide comme antituberculeux, les chercheurs ont pu constater que cet I-MAO entraînait une amélioration de l'humeur des patients (Lopez-Munoz and Alamo 2009). Cette découverte permis la mise au point de l'une des premières familles d'AD. Mais en raison, entre autres, de leurs sévères effets indésirables, les I-MAO se retrouvent supplantés dès les années 1960-70 par les AD de la famille des tricycliques comme l'imipramine (plus efficaces et mieux tolérés). En effet, si les I-MAO apportaient une réponse thérapeutique suffisante, ils inhibaient tout autant les MAOs centrales que périphériques ; de cette inhibition résultait la difficulté de métaboliser et éliminer les monoamines apportées par l'alimentation et notamment la tyramine, entraînant une intoxication des patients (crise hypertensive) par ce même composé retrouvé dans nombre d'aliments et majoritairement le fromage (d'où l'appellation "d'effet fromage"/"*cheese effect*") et dans les cas les plus sévères le décès du patient (notamment s'il n'était pas traité à temps).

Par la suite, afin d'améliorer l'efficacité des traitements tout en réduisant les effets indésirables, des molécules ciblant les transporteurs de recapture des monoamines, les inhibiteurs sélectifs de la recapture de la 5-HT (ISRS) et les inhibiteurs mixtes de la recapture de la 5-HT et de la NA (IRSN), ont été développées.

### 2.3.2. Limitations à l'usage des AD, la résistance aux antidépresseurs et la latence avant leurs effets.

Dans sa méta-analyse de 2018, Cipriani met en évidence que tous les antidépresseurs testés (soit 21 dans cette étude) sont plus efficaces qu'un quelconque placebo pour le traitement du TDC (Cipriani, Furukawa et al. 2018). Toutefois, malgré l'efficacité des AD, leur utilisation se heurte à un écueil majeur : la résistance aux AD.

Cette résistance au traitement a été étudiée dans le cadre de l'étude clinique STAR\*D, menée aux États-Unis auprès d'environ 4 000 patients souffrant de TDC. Les patients inclus dans cette étude étaient traités par différents antidépresseurs (appartenant le plus souvent aux familles des ISRS ou des IRSN), et admis dans des protocoles impliquant jusqu'à 4 traitements successifs de traitement. Cette étude clinique a ainsi mis en évidence que près de la moitié des patients traités pour TDC avec deux AD différents atteignaient le stade de rémission, et que cette proportion montait à 67% (cumul des taux de rémissions) des patients lorsque ceux-ci recevaient jusqu'à 4 traitements différents (Rush, Trivedi et al. 2006). De plus, près du tiers des patients (soit ceux qui ne sont pas entrés en rémission après 4 étapes de traitement) sont diagnostiqués comme souffrant d'une dépression résistante au traitement (Rush, Trivedi et al. 2006).

Outre cette résistance, l'efficacité des AD est aussi limitée par le délai d'action des médicaments pour induire les premiers effets bénéfiques. En effet, si les effets pharmacologiques attendus des AD ne sont observés qu'au bout de 4 à 6 semaines, les effets indésirables sont quant à eux présents dès les premiers jours de traitement.

De plus, une part importante des patients en rémission d'un TDC développent un à plusieurs épisodes de rechutes nécessitant un maintien du traitement au long court après la fin des symptômes. Si le risque de rechute diminue avec le temps de rémission, plus un patient a vécu d'épisode et plus le risque de récurrence du TDC augmente (Solomon, Keller et al. 2000). Ces rechutes se caractérisent par ailleurs par des symptômes généralement plus sévères que ceux observés lors du premier épisode dépressif (Hollon, Shelton et al. 2006).

## 3. Altérations de l'expression et de l'activité de la MAO-A

---

### 3.1. Déficience d'expression de la MAO-A

#### 3.1.1. Déficience en MAO-A chez l'être humain

La MAO-A est, comme nous l'avons expliqué précédemment, l'enzyme responsable de la dégradation de la 5-HT et de la NA. Il a été observé chez des patients souffrant de troubles psychiatriques associés à un comportement agressif une altération du métabolisme de la 5-HT, notamment un déficit de la dégradation du neurotransmetteur.

Chez des patients apparentés souffrant d'un trouble *borderline* ayant un comportement agressif, il a été observé une mutation du gène de la MAO-A conduisant à une forme tronquée (présence d'un codon stop dans l'exon 8) n'ayant plus d'activité (Brunner, Nelen et al. 1993). Par ailleurs, cette même étude révèle que les femmes portant de manière hétérozygote la mutation responsable de la perte d'activité de la MAO-A ne souffraient pas du trouble psychiatrique qui n'est alors retrouvé que chez les mâles. Ce résultat, associé avec une diminution des taux de 5-HIAA, produit de dégradation de la 5-HT par oxydation, permet aux auteurs de cette étude de formuler l'hypothèse d'un lien fort entre la déficience en activité de la MAO-A et de la survenue d'un comportement agressif chez les sujets mâles porteurs de cette déficience. Cette déficience par une protéine de la MAO-A tronquée non fonctionnelle répond depuis au nom de syndrome de Brunner.

De manière générale, il a été observé depuis cette étude qu'un déficit en MAO-A est associé à des troubles du comportement de type agressif induit par le stress et des comportements impulsifs (Lenders, Brunner et al. 1998). De plus, le syndrome de Brunner se caractérise aussi par un comportement impulsif sévère. Par ailleurs, le traitement de patients souffrant de dépression par des inhibiteurs de la MAO-A ne conduit pas à des symptômes similaires à ceux observés dans le syndrome de Brunner laissant supposer que la déficience en MAO-A aurait des effets dès les périodes précoces (avec des modifications neuronales et physiologiques) et une influence des événements arrivant précocement dans la vie des sujets souffrant de cette pathologie (Brunner 1996).

#### 3.1.2. Modèles précliniques de déficience, le ko du gène de la MAO-A

La déficience en expression du gène de la MAO-A est responsable chez l'être humain d'un comportement agressif et violent. La modélisation de cette déficience en MAO-A chez des souris pour le gène de la MAO-A reproduit ce comportement agressif dans le test de

« confrontation à un intrus » (*resident-intruder confrontation*) : lorsque les souris ko pour la MAO-A sont mises en présence d'une souris intruse, le comportement agressif de ces souris est supérieur à celui des souris ayant une activité non altérée de la MAO-A (Cases, Seif et al. 1995, Popova, Skrinkskaya et al. 2001, Chen, Cases et al. 2007). Ce déficit en MAO-A est associé à une augmentation des niveaux en 5-HT, DA et NA ainsi qu'une diminution des niveaux en leurs métabolites (Cases, Seif et al. 1995, Chen, Holschneider et al. 2004).

Ce comportement agressif, induit par la déficience en activité enzymatique de la MAO-A, n'est pas reproduit lorsque des animaux adultes exprimant l'enzyme sont traités avec des I-MAOA, à une seule exception. En effet, le traitement chronique des juvéniles par un I-MAOA conduit tout de même à un comportement agressif, qui reste malgré tout restreint par rapport à ce qui est observé chez les souris ko pour la MAO-A (Cases, Seif et al. 1995).

La déficience en MAO-A par un ko du gène se caractérise aussi par une baisse du comportement exploratoire au regard de la nouveauté. Ainsi, des souris Tg8 (déficientes par un codon stop prématuré) passent moins de temps à explorer les trous présents sur le couvercle de la cage de test dans une étude comportemental de Popova en 2001 (Popova, Skrinkskaya et al. 2001). De la même manière, les souris ko pour la MAO-A explorent moins les objets nouvellement mis en leur présence modérément lorsque les souris effectuent le test dans une nouvelle cage et plus fortement lorsqu'elles le réalisent dans leur cage d'hébergement (Godar, Bortolato et al. 2011). Les auteurs de cette dernière étude émettent alors l'hypothèse que la déficience sévère en MAO-A serait à l'origine d'une néophobie, et plus particulièrement d'une mal-adaptation émotionnelle qu'ils définissent comme des réponses défensives non adaptées aux stimuli issus de l'environnement des souris déficientes.

Si les modèles de déficience d'expression ou d'activité de la MAO-A sont à l'origine d'un comportement émotionnel atypique, l'étude du comportement anxieux ne révèle pas de comportement anxieux que ce soit dans le labyrinthe en croix surélevée (EPM) (Godar, Bortolato et al. 2011) ou le test de *light-dark boxes* (Popova, Skrinkskaya et al. 2001). Étrangement, Chen et ses collaborateurs observent dans leur modèle une diminution de l'exploration de la zone centrale de l'*open field* et du nombre d'entrée dans les bras ouverts de l'EPM marquant donc un effet anxiogène de la déficience en MAO-A ; ils suggèrent alors que les niveaux en 5-HT et l'anxiété étaient liés par une "relation en U". Toutefois, cette hypothèse doit être prise avec vigilance de par le fait que le modèle utilisé est un double ko des MAO-A et MAO-B. Par ailleurs, la déficience génétique en MAO-A est responsable d'une altération structurelle de la couche IV du cortex sensori-moteur primaire et une modification

morphologique des neurones granulaires et des axones thalamocorticaux (Chen, Cases et al. 2007).

En revanche, si le gène de la MAO-A permet la production d'une enzyme dont l'activité est fortement réduite sans pour autant être totalement perdue, les souris ne présentent plus qu'une plus grande vulnérabilité au déficit social sans présenter de comportement agressif (Bortolato, Chen et al. 2011). De plus, dans ce modèle d'une enzyme MAO-A hypomorphique, les niveaux en neurotransmetteurs monoaminergiques ne sont pas impactés de la même manière selon les régions comme cela est observé pour un ko du gène ou pour une perte totale d'activité : dans le cas d'un allèle hypomorphique de la MAO-A, les niveaux en 5-HT, DA et NA sont augmentés dans l'hippocampe et le cerveau médian mais ne varient pas par rapport à des souris porteuses d'un allèle avec une activité non altérée dans le PFC et l'amygdale (Bortolato, Chen et al. 2011). Les auteurs de cette étude évoquent alors l'hypothèse que l'agressivité des individus présentant un hypomorphisme de la MAO-A serait due à une exposition précoce à des stress sociaux, comme nous l'évoquions dans le paragraphe précédent (cf §3.1.1).

Enfin, la récupération partielle de l'expression de la MAO-A dans l'encéphale de souris ko pour le gène de la MAO-A restaure les niveaux en neurotransmetteurs monoaminergiques et prévient la survenue d'un comportement agressif (Chen, Cases et al. 2007). De plus, cette récupération (induite par l'injection d'un vecteur viral contenant le transgène humain de la MAO-A) entraîne une récupération de la morphologie des neurones et des structures cérébrales altérées par le déficit en MAO-A. Chen et ses collaborateurs émettent alors l'hypothèse que l'augmentation en monoamines induite par l'absence de dégradation par la MAO-A entraînerait une cascade d'évènements qui conduirait à une modification structurelle des régions cérébrales à des âges précoces desquelles résulterait une altération du comportement.

Comme nous avons pu le voir dans le cas de la déficience en MAO-A, cette enzyme semble avoir par sa capacité à réguler les niveaux en neurotransmetteurs de type monoamine un rôle clé dans la régulation du comportement et de l'émotionnalité. Par conséquent, qu'en est-il lorsque l'expression et l'activité de la MAO-A sont augmentées ? Il s'agit du cœur même du présent projet que nous allons aborder dès la partie suivante.

## 3.2. Augmentations d'expression et d'activité de la MAO-A chez des patients souffrant de dépression

### 3.2.1. La MAO-A est surexprimée et son activité augmentée chez les patients dépressifs

Comme nous l'avons vu précédemment, l'une des hypothèses pour expliquer la survenue de la dépression serait un déficit en neurotransmetteurs monoaminergiques (5-HT, DA, NA). Ce déficit serait dû à une augmentation du catabolisme de ces neurotransmetteurs par la MAO-A, impliquant par conséquent une augmentation d'expression de l'enzyme et/ou de son activité.

L'utilisation de l'harmine (capable de se lier à la MAO-A de manière sélective et réversible) marquée au carbone 11 a permis d'étudier la distribution (et donc le niveau d'expression protéique) de la MAO-A *in vivo* chez des patients (Zanderigo, D'Agostino et al. 2018). Ainsi, dans une étude clinique menée sur une vingtaine de patients déprimés, Meyer et ses collaborateurs ont observé une augmentation significative du volume de distribution de la MAO-A (autrement dit de la densité/quantité de protéines MAO-A) de 34% en moyenne et dans l'ensemble des régions cérébrales (Tableau 3) (Meyer, Ginovart et al. 2006). L'équipe de chercheurs-cliniciens émet l'hypothèse qu'au cours d'un TDC cette densité plus élevée de MAO-A serait à l'origine d'une augmentation du métabolisme des neurotransmetteurs de type monoamine. Néanmoins, dans cette étude, il n'a pas été permis de déterminer la localisation exacte au niveau cellulaire de cette augmentation, ou même de déterminer quel type cellulaire était le plus impacté entre les cellules gliales et les neurones. De plus, les auteurs soulignent le fait qu'il n'est pas permis, à ce stade, de déterminer si cette augmentation serait due à une augmentation de la densité en MAO-A par mitochondrie ou s'il s'agit d'une augmentation de la densité en mitochondries et donc artificiellement en MAO-A (Figure 5).

Toutefois, l'étude menée par Meyer est réalisée chez des patients vivants en recourant à l'imagerie médicale qui ne permet d'avoir accès que de manière indirecte (le volume de distribution d'un ligand radiomarqué) au niveau en MAO-A. En dosant les niveaux en protéines MAO-A par Western Blot sur des échantillons de PFC prélevé chez des patients atteints de TDC décédés, il a été observé une augmentation de la quantité en protéines MAO-A, avec une valeur d'augmentation oscillant entre 28% dans l'étude de Harris (Harris, Johnson et al. 2015) à 39-40% dans celle de Johnson (Johnson, Stockmeier et al. 2011). Dans l'étude de Harris, l'immunomarquage a également permis de déterminer que le niveau le plus important était retrouvé dans les astrocytes tandis que le signal mesuré dans les neurones était moindre (Harris,

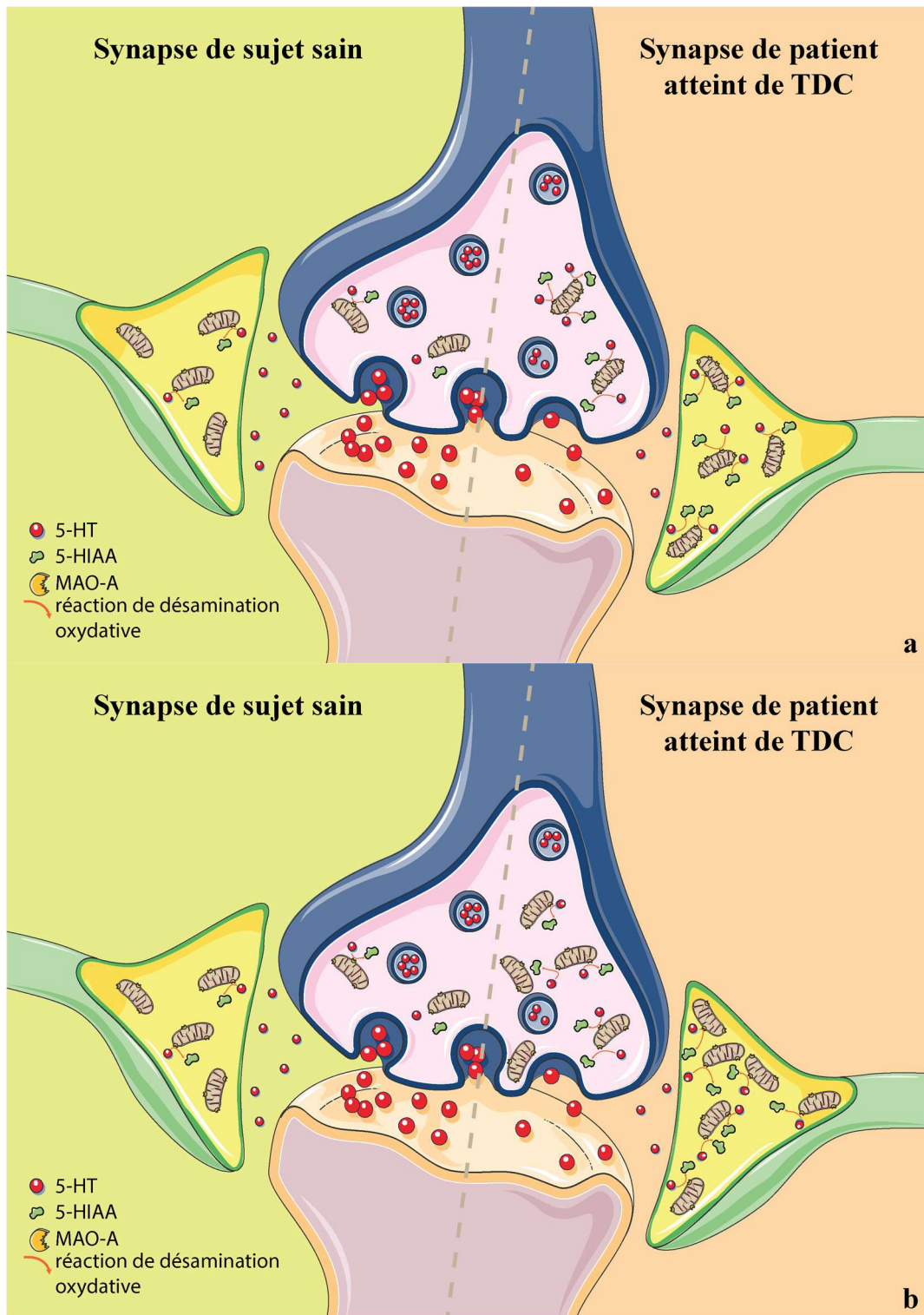
Johnson et al. 2015). Par ailleurs, l'activité enzymatique de la MAO-A est augmenté de 19 à 24,5% (respectivement pour les patients traités et non traité pour le TDC) dans le PFC de patients TCD décédés (Johnson, Stockmeier et al. 2011).

Région cérébrale	Volume de distribution de la MAO-A		Significativité
	Sujets sains	Patients TDC	
Cortex préfrontal	15,61	20,88	*
Cortex temporal	15,54	23,68	*
Cortex cingulaire antérieur	18,77	25,09	†
Cortex cingulaire postérieur	18,95	25,35	*
Thalamus	21,58	30,00	*
Noyau caudé	13,86	19,47	†
Putamen	16,75	21,75	†
Hippocampe	18,25	23,33	†
Cerveau médian	18,25	22,81	‡

**Tableau 3** : Volume de distribution de la MAO-A chez des sujets sains et des patients souffrant de TDC (d'après Meyer et al, 2006)

Les volumes de distribution de l'harmine C<sup>11</sup> (radioligand), reflète des niveaux d'expression et d'activité de la MAO-A dans le cerveau ont été mesurés dans des cohortes de patient souffrant de TDC et de sujet sain par PET scan. La mesure du marquage a été réalisé sur l'ensemble du cerveau et les régions présentant une différence entre les deux groupes ont été représentés dans le tableau ci-dessus. \*  $p < 1.10^{-5}$ , †  $p < 1.10^{-4}$ , ‡  $p < 0,01$

Nous venons de voir que l'augmentation d'expression et d'activité de la MAO-A dans les différentes régions cérébrales impliquées dans la régulation de l'humeur étaient corrélées à la survenue du TDC. Il apparait aussi que cette surexpression, et l'hyperactivité enzymatique qui en découle, est corrélée à la sévérité de la pathologie. En effet, le volume de distribution de la MAO-A dans le PFC et le cortex cingulaire antérieur chez les patients atteints d'un TDC sévère est supérieur à celui des patients dont les symptômes sont légers ou modérés (Chiucciariello, Houle et al. 2014).



**Figure 5 :** Hypothèse de la surexpression de la MAO-A chez les patients atteints de dépression

Chez les patients souffrant de dépression, la quantité de MAO-A est augmentée dans les cellules formant la synapse tripartite (neurone sérotoninergique en bleu, neurone pyramidal post-synaptique en orange et astrocyte en vert) induisant une diminution de la quantité de sérotonine disponible à la libération suite à l'arrivée d'un potentiel d'action, celle-ci étant dégradée par l'excès de MAO-A. Deux possibilités sont émises pour expliquer cette augmentation en MAO-A : soit une augmentation intrinsèque MAO-A sans modification du nombre de mitochondries (a) avec donc une augmentation de la densité en MAO-A par

mitochondrie, soit une augmentation de la densité cellulaire en mitochondrie (b) sans modification significative de la densité en MAO-A par mitochondrie.

Dans une autre étude menée par l'équipe de Meyer, les auteurs s'intéressent au niveau de MAO-A à la suite d'un traitement par ISRS de patients souffrant de TDC (Meyer, Wilson et al. 2009). Après injection de <sup>11</sup>C-harmine chez des patients souffrant de TDC, l'acquisition par PETscan des volumes de distribution de la MAO-A met en évidence qu'un traitement de 6 semaines avec un ISRS entraînait une faible diminution (de 1,6 à 9,2% selon la région cérébrale) des niveaux en MAO-A par rapport à celle observée juste avant le traitement ces chez mêmes patients. Le volume de distribution de la MAO-A reste également très élevé (supérieur au volume observé chez des sujets sains servant de contrôle) pour ces patients lorsqu'ils se retrouvent en phase de rémission, avec une absence de différence par rapport à leur situation avant traitement (Meyer, Wilson et al. 2009). Les auteurs supposent alors que, bien que les ISRS permettent de traiter le TDC, cette classe d'AD ne parviens pas à agir sur ce paramètre biologique de la pathologie.

Par ailleurs, si le niveau d'expression en MAO-A est augmenté chez les patients souffrant de TDC, il a aussi été observé que l'expression du facteur KLF11, qui favorise la transcription du gène de la MAO-A, était augmentée d'environ 36% dans le cerveau des patients souffrant de TDC (Harris, Johnson et al. 2015). Inversement, l'expression du facteur de transcription répresseur R1 est diminuée chez les patients atteints de TCD (Johnson, Stockmeier et al. 2011), avec un effet plus marqué chez les patients non traités (une diminution de 37,5%) que chez les patients ayant reçu un traitement (une diminution de 30%) ; cette réduction est par ailleurs corrélée à l'augmentation d'activité de la MAO-A, laissant supposer que l'expression du facteur de répression participerait à l'étiologie du TDC.

Région cérébrale	Volume de distribution de la MAO-A		
	Sujets sains	Symptômes légers à modérés	Symptômes modérés à sévères
Cortex préfrontal	20,21	22,19	24,48
Cortex cingulaire antérieur	21,04	23,44	25,21
Striatum ventral	19,90	21,88	23,13
Putamen dorsal	19,38	21,04	22,60
Thalamus	28,54	31,04	33,75
Cerveau médian	20,31	23,02	24,58
Hippocampe	22,29	24,58	26,15

**Tableau 4 :** Niveaux d'expression de la MAO-A (reflétés par le volume de distribution du radioligand harmine C<sup>11</sup>) en fonction de la sévérité des symptômes du TDC dans les différentes régions cérébrales (d'après Chiucciariello et al, 2014)

Une des conséquences possibles et tragique de la dépression, qu'il s'agisse d'un TDC ou d'une autre forme, est comme nous l'avons vu précédemment le suicide du patient. En comparant le génotype de patients souffrant de TDC et mort par suicide à celui de sujets servant de contrôle, il a été observé qu'un allèle responsable d'une plus forte activité du gène de la MAO-A pouvait constituer un facteur de risque au suicide chez les patients sujets à la dépression (Du, Faludi et al. 2002). En effet, parmi les deux allèles étudiés, celui associé à une plus forte expression du gène était retrouvé en plus grande proportion dans la population de patients souffrants de TDC et mort par suicide que chez les sujets sains mort d'autres raisons. Mais à la vue de ces résultats, une question demeure : ce lien de corrélation serait-il réellement dû à un effet du polymorphisme/de la surexpression de l'enzyme ? ou alors le fait que le taux de suicide chez les patients en dépression étant plus élevé que dans la population générale et que les polymorphismes associés à une plus grande expression de la MAO-A est plus répandu chez mêmes patients ne crée-t-il pas un biais de corrélation ?

### 3.2.2. L'activité de la MAO-A est modulée au cours de la période post-partum

Nous venons de voir que le TDC se caractérisait par une augmentation des niveaux en MAO-A. Toutefois, cette augmentation d'activité et de distribution de la MAO-A est également observée lors de la période post-partum précoce (Sacher, Wilson et al. 2010), et notamment au 5<sup>e</sup> jour qui correspond à la période durant laquelle les femmes venant de donner naissance présentent une humeur faible voir développent une dépression post-partum. Cette observation s'ajoute à toutes celles évoquées précédemment comme argument en faveur d'un rôle de la MAO-A dans l'étiologie de la dépression.

### 3.2.3. Activité de la MAO-A lors d'un stress aiguë

La dépression est, entre autre, causée par la chronicité de stress environnementaux et sociaux et associée à une augmentation des niveaux de cortisol et d'expression de la MAO-A. Lorsque des sujets sains sont soumis à un stress aiguë, la distribution de la MAO-A est réduite de 7 à 16% (Soliman, Udemgba et al. 2012). De manière similaire, lorsque des cellules dérivées d'une tumeur cérébrale (cellules SH-SYS5) sont traitées en aiguë par de la DEX, l'activité de l'enzyme comme son expression protéique sont réduites d'un tiers. Les auteurs de cette étude

concluent que cette diminution d'activité de la MAO-A suite à un stress aiguë (déjà observé par Clow en 1997 (Clow, Patel et al. 1997)) permettrait une augmentation de la quantité de 5-HT disponible afin d'activer l'axe hypothalamo-hypophyso-surrénalien pour répondre au stress. Les auteurs supposent également que c'est la chronicité du stress qui aurait un effet négatif sur le système et qui pourrait donc conduire à un état dépressif voir à l'émergence de la dépression dans les cas les plus sévères.

#### 3.2.4. Le polymorphisme uVNTR du promoteur est corrélé avec la survenue de la pathologie

Le polymorphisme uVNTR présent dans le promoteur du gène de la MAO-A, que nous avons abordé précédemment, affecte les niveaux d'expression et d'activité de l'enzyme. En effet, les allèles longs sont associés à un niveau d'activité transgénique plus élevé que l'allèle court (Deckert, Catalano et al. 1999), et donc à une expression et une activité de la MAO-A plus élevées. Les différentes études cliniques menées sur l'effet des allèles de l'uVNTR dans des cohortes de patients dépressifs montrent une corrélation entre la présence de l'allèle long (donc une expression et une activité augmentées) et la survenue de la pathologie (Schulze, Muller et al. 2000, Yu, Yang et al. 2005). Toutefois, ces études mettent aussi en évidence une association plus forte chez les femmes que chez les hommes.

#### 3.2.5. Impact d'autres polymorphismes sur les niveaux d'expression et d'activité de la MAO-A

Si le nombre de répétition de l'uVNTR a un effet sur le niveau d'expression de la MAO-A, il ne s'agit pas du seul polymorphisme ayant un impact sur l'activité du gène. Ainsi, les polymorphismes rs6323 et rs1137070, localisés respectivement dans les huitième et quatorzième exons codant du gène, affectent également l'activité du gène de la MAO-A : le remplacement d'une thymidine par une guanidine en position 941 et/ou d'une cytosine par une thymidine en position 1460 est responsable d'une augmentation d'activité du gène, et donc d'une surexpression de l'enzyme MAO-A (Hotamisligil and Breakefield 1991).

Des autres polymorphismes du gène de la MAO-A que nous avons précédemment évoqué, le rs979605 présente des résultats contradictoires selon les auteurs. Ainsi, dans son étude de 2005, Jansson observe une diminution d'activité de la MAO-A dans les cellules issues de patientes porteuses de deux allèles G en comparaison de celles porteuses d'un double allèle A (Jansson, McCarthy et al. 2005); de manière opposé, l'étude plus récente de Chappell ne met pas en évidence de différence significative entre les deux allèles quant à l'activité de l'enzyme.

Toutefois, comme le suppose l'auteur de la plus récente étude, cette différence de résultat peut s'expliquer par la méthode de détermination de l'activité de l'enzyme : l'étude de 2005 a déterminée de manière directe l'activité de l'enzyme par radiométrie tandis que l'étude de 2022 (Chappell, Colle et al. 2022) a estimée de manière indirecte l'activité des MAOs en dosant par chromatographie liquide couplée à la spectrométrie de masse le métabolite principal de la 5-HT, le 5-HIAA, ce qui pourrait être une mesure plus spécifique de l'activité de la MAO-A (bien que indirecte). De plus, ces deux études ont déterminé l'activité des MAOs au niveau plasmatique (dans les plaquettes majoritairement) où l'isoforme B de l'enzyme est majoritaire : ces résultats doivent donc être pris avec précaution quant à l'influence de ce polymorphisme sur l'activité et les niveaux d'expressions de la MAO-A.

### 3.2.6. Hypométhylation du gène de la MAO-A chez les patients souffrant de dépression

Comme nous avons vu précédemment (confère 1.2.5), l'expression du gène de la MAO-A peut être régulée par son niveau de méthylation au niveau de séquences riches en îlots CpG. Différentes études épigénétiques menées chez des patientes souffrant de dépression ont montrées une diminution de la méthylation des îlots CpG dans le gène de la MAO-A en comparaison du niveau de méthylation chez des sujets sains (Melas, Wei et al. 2013, Melas and Forsell 2015, Peng, Xue et al. 2018). Cette hypométhylation concerne la seconde région pouvant être méthylée, autrement dit celle chevauchant la partie proximale du promoteur jusqu'au début du premier intron : selon les études, ce sont 10 (Melas, Wei et al. 2013, Melas and Forsell 2015) ou 4 (Peng, Xue et al. 2018) îlots CpG présents sur les deux parties du gène qui sont déméthylés chez les patientes dépressives.

La réduction de méthylation des îlots CpG du gène de la MAO-A semblent ne pas être associée uniquement à la survenue de la dépression, mais également dans la prédiction de la réponse aux antidépresseurs. En effet, l'étude de pharmacogénomique de Domschke et ses collaborateurs de 2015 (Domschke, Tidow et al. 2015) met en évidence deux sites CpG dont le faible niveau de méthylation est prédictif d'une réponse réduite aux ISRS.

### 3.2.7. La MAO-A, un potentiel biomarqueur de dépression ?

Comme nous l'avons vu, il existe un lien de corrélation entre le niveau d'expression/activité de la MAO-A et le degré de sévérité des symptômes de la dépression. C'est en se basant sur ce lien et le fait que le système sérotoninergique fait partie des systèmes altérés chez les patients

dépressifs que Uzbekov propose d'utiliser les niveaux d'expression et d'activité catalytique de la MAO-A comme biomarqueurs des troubles psychiatriques (pour revue, voir (Uzbekov 2021).

Toutefois, l'expression et l'activité de la MAO-A sont, comme cela a été décrit précédemment, augmentées dans les différentes régions cérébrales associées à la régulation de l'humeur. S'il est expérimentalement possible d'accéder au volume de distribution et donc à l'activité de la MAO-A dans ces régions cérébrales chez des patients vivants, l'administration de la <sup>11</sup>C-harimine associée à la tomographie par émission de positron demeure une méthode lourde, contraignante et coûteuse. Habituellement, les marqueurs biologiques du suivi d'une pathologie et/ou de l'efficacité d'un traitement sont retrouvés dans le sang, tissu biologique facilement accessible ; au premier abord, l'utilisation de la MAO-A comme biomarqueur de la dépression semble donc compromise.

Toutefois, dans une étude plus ancienne, Uzbekov et ses collaborateurs ont constaté que le niveau d'expression et le niveau d'activité de la MAO-A plaquettaires étaient augmentés de 94% chez les patients souffrants de TDC (Uzbekov, Misionzhnik et al. 2006).

### **3.3. Surexpression et augmentation d'activité dans les modèles précliniques**

#### **3.3.1. La MAO-A est surexprimée et son activité augmentée dans des modèles d'anxiété/dépression**

##### **a. Effet du stress chronique du milieu sur l'expression et l'activité de la MAO-A**

Comme nous avons pu le voir dans les paragraphes précédents, les études cliniques ont mis en évidence un lien de corrélation entre les niveaux d'expression et d'activité de la MAO-A et la survenue ainsi que la gravité des symptômes de la maladie. De plus, les travaux menés par Ou et son équipe pour étudier le fonctionnement du promoteur du gène de la MAO-A a montré que la DEX, un dérivé de l'hormone du stress induisait une augmentation d'un facteur de 2,6 l'activité du promoteur qui peut être augmenté à un facteur de 5,3 si le récepteur aux glucocorticoïdes était surexprimé. (Ou, Chen et al. 2006) : le stress semble avoir un effet positif sur l'expression de la MAO-A. Toutefois, et bien que peu d'études aient été menées sur des modèles animaux, il ressort de l'analyse de la littérature des résultats proche de ceux observés chez l'être humain.

La première étude à s'intéresser à l'effet d'un stress chronique imprédictible (UCS) sur l'activité des MAOs, datée de 1978, mets en évidence une augmentation de l'activité enzymatique des MAOs et de la catéchol-O-méthyltransférase (COMT) dans le cerveau de rats

(Maura, Versace et al. 1978), enzyme qui assure le métabolisme de la DA et de la NA. Cette augmentation d'activité des MAOs a lieu dans différentes régions cérébrales en fonction de la durée de stress : après un stress de court terme (3 semaines) l'augmentation d'activité est retrouvée dans le cortex, le cervelet et dans le mésencéphale alors qu'après un stress prolongé (4 mois) cette augmentation est retrouvée dans l'hippocampe, l'hypothalamus et le striatum. Ces modifications d'activité des MAOs ne perdurent cependant qu'une dizaine de jours avant de revenir à un état basal (Maura, Versace et al. 1978).

De manière similaire, Lin et ses collaborateurs décrivent en 2005 une augmentation d'activité des deux isoformes de l'enzyme mais en distinguant chacune d'elle contrairement à l'étude de 1978, augmentation d'activité présente dans l'ensemble du cerveau de rats mâles (Lin, Liu et al. 2005). D'autres études s'intéressent de manière plus ciblée à différentes régions et retrouvent le plus souvent cette augmentation d'activité de la MAO-A lorsque le modèle d'anxiété/dépression par UCMS est utilisé. Ainsi, Yu retrouve cette augmentation lorsqu'il étudie spécifiquement le PFC, l'hippocampe, l'hypothalamus et le striatum (Yu, Wang et al. 2013), résultats qui seront confirmés par Peng dans le PFC (Peng, Xue et al. 2018) et par Doron dans l'hypothalamus (Doron, Versano et al. 2019). En revanche, Doron ne retrouve pas d'augmentation d'activité de l'enzyme dans le striatum lorsqu'il recourt à l'UCMS.

Si l'activité de la MAO-A est augmentée dans le modèle d'anxiété/dépression par stress chronique, il en est de même pour les niveaux de transcript et de protéine de la MAO-A. Ainsi, Qiu observe une augmentation d'ARNm de la MAO-A dans l'hippocampe (Qiu, Yang et al. 2014) que ne retrouve pas Stefanovic deux ans plus tard alors qu'il observe une augmentation de la protéine dans cette même région (Stefanovic, Spasojevic et al. 2016). Yang quant à lui constate bien une augmentation de l'ARNm et de la protéine de la MAO-A (Yang and Wang 2018) dans l'hippocampe lorsqu'il soumet des rats à un stress chronique. Tout comme dans l'hippocampe, le modèle UCMS est responsable d'une augmentation de la transcription du gène de la MAO-A dans le PFC (Peng, Xue et al. 2018).

En parallèle de l'augmentation d'expression et d'activité de la MAO-A induites par le stress chronique, il est observé une diminution des niveaux en neurotransmetteurs monoaminergiques, notamment dans le PFC et le striatum, et est associé à une augmentation du niveau en 5-HIAA (Lee, Lee et al. 2013, Yu, Wang et al. 2013, Peng, Xue et al. 2018). De plus, lorsque des rats soumis à l'UCMS sont traités avec des molécules pouvant inhiber l'activité enzymatique de la MAO-A (moclobémide, trans-resveratrol à forte dose), les niveaux en monoamines étaient réhaussés au niveau de ceux observés chez des rats contrôles (Yu, Wang et al. 2013).

#### b. La défaite sociale induit des effets similaires à l'UCMS

Outre le stress lié à l'environnement, la modélisation de l'anxiété/dépression peut se faire chez les rongeurs par le stress induit lors d'un CSD. Les différentes études menées sur ce modèle montrent pour l'essentiel une augmentation de l'expression de la MAO-A dans différentes régions cérébrales : dans le noyau du raphé (Filipenko, Beilina et al. 2002, Filipenko, Beilina et al. 2002) (région contenant les somas des neurones sérotoninergiques) et dans le cortex (Grunewald, Johnson et al. 2012, Harris, Johnson et al. 2015). L'étude de Harris met en évidence que l'augmentation d'un facteur de 3,7 de la transcription du gène de la MAO-A était associée à une augmentation de 24% de l'activité enzymatique dans le cortex préfrontal des souris. De plus, dans ses études de 2002, Filipenko montre que la surexpression de la MAO-A (augmentation des niveaux d'ARNm d'un facteur 3) dans le noyau du raphé était associée à un doublement de l'activité transcriptomique du gène du transporteur de la sérotonine (SERT).

Paradoxalement, l'étude menée par Boyarskikh en 2013 démontre un résultat opposé à ceux obtenus par son prédécesseur Filipenko (Boyarskikh, Bondar et al. 2013) : les niveaux de transcript de la MAO-A et de la SERT sont diminués chez les souris ayant subi une défaite sociale à répétition ; de plus, cette modification du profil d'expression de l'enzyme perdure au moins 2 semaines après la fin du CSD. Toutefois, ces deux études diffèrent par la durée du CSD, de 10 jours pour Filipenko contre 21 jours pour Boyarskikh, que l'auteur considère comme étant deux stades différents de la pathologie (respectivement une étape d'évolution de la dépression et une étape de profonde dépression). Il émet aussi l'hypothèse que cette hypofonction du système sérotoninergique ferait suite à une activation prolongée de ce même système en réponse du CSD.

Comme nous l'avons vu précédemment, le stress induit par le CSD conduit à une augmentation de l'expression de KLF11, un facteur de transcription qui est impliqué dans la régulation de l'activité du gène de la MAO-A. Lorsque des souris pour lesquelles le gène de KLF11 est délété (ko) sont soumises à un protocole de CSD, l'augmentation d'expression et d'activité de la MAO-A normalement observée chez des souris stressées par CSD n'a plus lieu (Grunewald, Johnson et al. 2012, Harris, Johnson et al. 2015) confirmant le rôle de KLF11 dans l'activation de la transcription du gène de la MAO-A, et donc de sa surexpression en réponse à une situation anxiogénique. Par ailleurs, ces souris ko pour KLF11 ne présentent plus de phénotype comportemental de type anxio-dépressif.

Par ailleurs, l'augmentation d'expression et d'activité de la MAO-A est aussi associée à une diminution des niveaux de 5-HT de 29% dans le PFC et de 45% dans le thalamus chez des rats soumis à un CSD de 28 jours (Grunewald, Johnson et al. 2012).

### c. Privation de sommeil, dépression et expression de la MAO-A

Les troubles du sommeil constituent, comme nous l'avons vu précédemment, un des symptômes qui caractérisent le TDC. Il a aussi été constaté que l'absence de sommeil sur une période prolongée pouvait induire des lésions tissulaires (Rechtschaffen, Gilliland et al. 1983) et était responsable d'une augmentation des taux de glucocorticoïdes (Campbell, Guinan et al. 2002) qui est aussi augmenté chez les patients suivis pour TDC et dans les modèles animaux de dépression. En outre, les sujets présentant une qualité mauvaise du sommeil présentent un risque accru de développer un trouble anxieux-dépressif en comparaison de sujets ayant un sommeil de qualité suffisante (Szklo-Coxe, Young et al. 2010).

Des souris ont ainsi été privées de sommeil pendant 3 jours ou 5 jours afin de modéliser cette mauvaise qualité de sommeil et d'en déterminer les effets au niveau comportemental et sur le niveau d'expression de la MAO-A (Wang, Chen et al. 2017). La privation de sommeil apparaît suffisante pour induire un état émotionnel mimant l'anxiété/dépression chez les souris qu'à moyen ou long terme, les souris privées de sommeil pendant seulement 3 jours ne présentant pas le comportement anxieux/dépressif que présentent les souris privées pendant 5 jours de sommeil. La privation de sommeil pendant 5 jours est aussi responsable d'une augmentation de l'expression transcriptomique et protéique du gène de la MAO-A dans l'hippocampe et l'amygdale, mais pas dans le PFC et l'hypothalamus. Outre la confirmation de l'impact de la qualité du sommeil sur l'état émotionnel d'un individu, l'étude de Wang a permis la mise au point d'un autre modèle d'étude de la dépression, mais aussi des troubles associés à celle-ci.

### d. Modulation de l'expression de la MAO-A dans un modèle pharmacologique d'anxiété/dépression

Les modèles d'anxiété/dépression couramment utilisés et que nous avons abordés précédemment s'intéressaient aux causes exogènes de l'anxiété et de la dépression, à savoir l'influence de l'environnement (qu'il soit lié au mode de vie ou la situation sociale). Toutefois, comme nous l'avons évoqué précédemment, les patients souffrant de dépression présentent un profil hormonal dans lequel les niveaux en hormone du stress sont augmentés.

C'est sur cet aspect que Raitsin et ses collaborateurs se sont en partie penchés. Ainsi, chez des rats traités en continu pendant 28 jours avec un analogue de synthèse des glucocorticoïdes (la DEX), l'activité enzymatique de la MAO-A augmente de 7% à 17% (selon la dose de corticoïde utilisée) dans le PFC et de 9% dans le cortex cingulaire antérieur (Raitsin, Tong et al. 2017) ; cette augmentation est aussi présente dans l'hippocampe mais uniquement sous la forme d'une tendance forte. Par ailleurs, le niveau de 5-HIAA est lui aussi augmenté dans le PFC et les niveaux des précurseurs de la 5-HT (le tryptophane) et de la NA (la tyrosine) réduits

mais sans variation des niveaux de 5-HT et NA. Les auteurs de cette étude estiment que l'augmentation d'activité de la MAO-A serait alors associée à une augmentation du renouvellement des monoamines dégradées, ce que semble confirmer la réduction des stocks en précurseurs. Toutefois, l'étude de Raitsin que nous évoquons ici s'intéresse à l'effet de différentes sources de stress sur l'organisme de jeunes individus. Les résultats observés *in vivo* après un traitement par des corticoïdes reproduisent les résultats obtenus *in vitro* que nous avons abordés précédemment concernant la régulation de l'expression de la MAO-A (§1.2.2).

Dans cette même étude, les analyses biochimiques mettent en évidence une augmentation des niveaux de 5-HIAA chez les rats ayant reçu un traitement à la DEX. En revanche, il n'est pas retrouvé de variation des niveaux de 5-HT suggérant, selon les auteurs, un taux de renouvellement plus important de la 5-HT en réponse au traitement chronique à la DEX.

### 3.3.2. Effet d'un stress oxydant sur l'activité de la MAO-A

Dans son étude parue en 2017 (Raitsin, Tong et al. 2017), Sofia Raitsin a observé que l'augmentation des niveaux de corticostéroïdes (par injection de DEX) conduisait à une augmentation des niveaux d'expression et d'activité de la MAO-A. Toutefois, si l'augmentation des niveaux en hormone du stress constitue une des principales hypothèses pour expliquer l'étiologie de la dépression, d'autres hypothèses suggèrent qu'un stress oxydant pourrait également intervenir. En effet, il a été observé dans le cortex de patients décédés et ayant été diagnostiqués d'une MDD une diminution des niveaux en glutathion réduit, ce qui, selon les auteurs de cette étude, conduirait à une augmentation de la sensibilité des patients au stress oxydant au niveau cérébral par une perte des capacités anti-oxydantes des cellules cérébrales (Gawryluk, Wang et al. 2011).

Dans son étude parue en 2017, l'équipe de Raitsin s'est également intéressée à l'effet du stress oxydant sur l'activité de la MAO-A. Pour cela, les chercheurs de cette équipe ont injecté du maléate de diéthyle (un agent conjuguant du glutathion) à des rats de manière aiguë ou chronique afin d'induire une déplétion en glutathion réduit. Ils observent alors que le stress oxydant, induit par la perte des capacités anti-oxydantes des cellules, est responsable d'une augmentation de l'activité de la MAO-A dans le PFC ainsi qu'une tendance dans le cortex cingulaire antérieur, ainsi qu'une augmentation de l'activité de la MAO-B dans le PFC et l'hippocampe (Raitsin, Tong et al. 2017). Toutefois, selon les auteurs, l'augmentation la plus forte serait celle observée dans le modèle pharmacologique par traitement chronique à la DEX.

Néanmoins, si l'activité de la MAO-A est bien augmentée en réponse à ce stress oxydant au niveau cérébral, il n'est pas confirmé par un quelconque test comportemental que les animaux ont développé un phénotype émotionnel de type anxieux/dépressif.

### 3.3.3. Modélisation de la dépression post-partum et activité de la MAO-A

Tous les modèles que nous avons présentés jusqu'à présent modélisaient soit le TDC classique, soit s'intéressaient à des mécanismes cellulaires fortement suspectés d'intervenir dans l'étiologie de la pathologie. Toutefois, comme nous l'avons vue dans la partie consacrée à l'étude clinique des niveaux en MAO-A dans la dépression, d'autres formes de dépression existent.

Afin de modéliser la dépression post-partum, Raitsin et ses collaborateurs ont traité des rates, préalablement ovariectomisées, de manière chronique avec de l'œstrogène et de la progestérone par minipompe (afin d'induire un état de pseudo-gestation) avant d'arrêter ledit traitement pour mimer la phase précoce de la période post-partum. Les chercheurs observent alors une hyperactivité de la MAO-A dans le cortex cingulaire antérieur uniquement, qui augmente avec la durée de suppression du traitement hormonal. Ces résultats vont donc dans le même sens que ceux observés chez des patientes en période post-partum (voir en §3.2.2, (Sacher, Wilson et al. 2010)).

Toutefois, cette expérience doit être considérée avec précaution concernant l'étude de l'activité de la MAO-A dans le cadre de la dépression post-partum due au fait qu'aucun test comportemental n'a été réalisé afin de confirmer que les rates présentaient un comportement de type anxieux/dépressif.

### 3.3.4. D'autres formes de stress induisent un effet d'hyperactivité du gène de la MAO-A

La dépression est aussi connue pour être une comorbidité des troubles métaboliques. C'est en partant de ce constat que Engel et son équipe se sont intéressés à l'activité mais aussi au comportement émotionnel dans un modèle transgénique murin du trouble métabolique de l'hypercholestérolémie (Engel, de Oliveira et al. 2016). Les chercheurs ont ainsi observé qu'en augmentant les taux circulants de cholestérol par ko du récepteur aux LDL, les souris développaient un phénotype comportemental retrouvé dans les modèles classiques d'anxiété/dépression comme l'UCMS (diminution de la consommation de sucrose dans le test de préférence à l'eau sucrée, diminution du temps de toilettage dans le *Splash Test*,

augmentation du temps d'immobilité dans le test de suspension par la queue). Ils observent aussi dans ce modèle une augmentation de l'activité de la MAO-A dans l'hippocampe, associée à une augmentation de la production d'EROs.

Si la dépression se caractérise entre autres par un état émotionnel « négatif », cet état est également retrouvé dans le cadre des addictions, et notamment chez les personnes dépendantes à l'alcool. Dans une étude récente, des rats ont été exposés à des vapeurs d'alcool pendant 8 semaines afin d'induire une accoutumance puis sevrés soit sur une courte période soit sur une période plus longue. L'activité de la MAO-A était alors augmentée de 12 à 15% dans le PFC et le cortex cingulaire antérieur pour une augmentation des niveaux protéique de 25 à 30% chez les animaux sevrés pendant une courte période de 1 à 3 jours (Matthews, Tong et al. 2018) ; cet effet n'est pas retrouvé lorsque le sevrage dure plus longtemps.

Enfin, la dépression peut être observée chez des patients ayant subi un fort traumatisme tel que les grands brûlés. Dans une étude publiée en 2017 (Wang, Chen et al. 2017), des souris dont la peau du dos a été préalablement brûlée à l'éthanol (pour mimer une brûlure au 3<sup>e</sup> degré) présentent un phénotype comportemental de type anxieux/dépressif. Dans ce modèle, les niveaux en transcript et en protéine de la MAO-A sont également augmentés dans l'hippocampe.

### 3.3.5. Effet de l'augmentation d'expression de Sirt1

Lorsque était évoquée précédemment la régulation de l'activité transcriptomique du gène codant la MAO-A, une attention a été apportée au rôle de la protéine Sirt1 dans cette régulation. De part ce rôle de régulateur de la MAO-A, Sirt1 a un impact sur le comportement et l'état émotionnel. En effet, dans un modèle de ko de Sirt1, il est observé une diminution de l'expression de la MAO-A qui est corrélée avec un comportement de type anxiolytique/antidépresseur (Libert, Pointer et al. 2011) : les souris n'exprimant plus Sirt1 passent plus de temps dans les cadrans ouverts du labyrinthe en O surélevé et pénètrent plus fréquemment et plus longtemps dans la zone centrale de l'*Open Field*. *A contrario* dans cette même étude, les souris génétiquement modifiées pour surexprimer Sirt1 présentent un comportement similaire à celui observé dans des modèles d'anxiété/dépression (qu'il soit comportemental, génétique ou pharmacologique), autrement dit l'exploration des cadrans ouverts dans le O surélevé et de la zone centrale de l'*Open Field* est réduite (Libert, Pointer et al. 2011) ; par ailleurs, tout comme les souris ko pour Sirt1 présentaient une corrélation entre ce ko et la diminution de l'expression de la MAO-A, cette surexpression est elle corrélée avec une augmentation de l'expression de l'enzyme dégradant les monoamines.

Ces observations sont également confirmées par le test de la nage forcée de Porsolt, les souris ko pour *Sirt1* restant actives (nage et sauts le long des parois pour s'échapper) plus longtemps que des souris contrôles tandis que les souris surexprimant *Sirt1* présentent au contraire une augmentation de l'immobilité (Libert, Pointer et al. 2011). Les auteurs en déduisent par conséquent que le ko de *Sirt1* rendrait les souris moins susceptibles à la survenue de la dépression alors que la surexpression de cette protéine en serait plutôt un facteur favorable ; toutefois, ces résultats obtenus dans le test de Porsolt restent à prendre avec précaution en raison du fait que ce test a été développé pour identifier les propriétés antidépresseurs des molécules et non déterminer si un animal présentait un comportement mimant l'état dépressif (Porsolt, Bertin et al. 1977, Molendijk and de Kloet 2022).

### **3.1. Arguments en faveur de l'hypothèse d'un rôle majeur de l'augmentation d'activité de la MAO-A dans l'étiologie de la dépression**

Ainsi, nous avons vu que la MAO-A était surexprimée et son activité augmentée chez les patients souffrant de dépression. Cette augmentation d'activité et d'expression de l'enzyme est retrouvée en préclinique dans différents modèles pouvant induire un phénotype de type anxieux/dépressif (UCMS, CSD, pseudo-postpartum). Dans les deux cas (clinique et préclinique), cette augmentation d'expression et/ou d'activité est corrélée avec les symptômes (patients souffrant de TRD) ou le phénotype comportemental (modèles animaux).

Les études menées sur des molécules ayant la capacité d'inhiber l'activité de la MAO-A montrent que cette inhibition a des effets antidépresseurs sur les modèles animaux (moclobémide, *trans*-resvératrol, pirlindol). Ce constat renforce l'hypothèse d'une implication forte de la MAO-A dans l'étiologie de la dépression, d'autant plus que les premiers traitements antidépresseurs (iproniazide, phénelzine) étaient des I-MAO (non sélectifs).

Toutefois, si un lien de corrélation a pu être établi entre le niveau d'expression de la MAO-A et la survenue des TDC, aucun lien de causalité n'a pu être défini : cette surexpression participe-t-elle à l'émergence de la pathologie ? ou, au contraire n'est-elle qu'une conséquence de la survenue du TDC ?

Modèle			ARNm	Protéine	Activité	Référence	
modèle de stress	espèce	région cérébrale					
UCMS	souris	cerveau entier			↑	(Chhillar and Dhingra 2013, Dhingra and Bhankher 2014, Martins and Brijesh 2020)	
		PFC			↑	(Doron, Versano et al. 2019)	
		hypothalamus			↑	(Doron, Versano et al. 2019)	
	rat	cerveau entier				↑	(Lin, Liu et al. 2005)
		PFC	↑ <sup>2</sup>	↑ <sup>2</sup>	↑ <sup>1, 2, 3</sup>		<sup>1</sup> (Maura, Versace et al. 1978), <sup>2</sup> (Peng, Xue et al. 2018), <sup>3</sup> (Yu, Wang et al. 2013)
		striatum				↑	(Yu, Wang et al. 2013)
		hippocampe	↑ <sup>1, 3</sup>	↑ <sup>2, 3</sup>	↑ <sup>4</sup>		<sup>1</sup> (Qiu, Yang et al. 2014), <sup>2</sup> (Stefanovic, Spasojevic et al. 2016), <sup>3</sup> (Yang and Wang 2018), <sup>4</sup> (Yu, Wang et al. 2013)
		hypothalamus				↑ ↓	(Yu, Wang et al. 2013)
		cerveau médian				↑	(Maura, Versace et al. 1978)
cervelet				↑			
CSD	souris	cerveau entier	↑			(Harris, Johnson et al. 2015)	
			↑			(Filipenko, Beilina et al. 2002, Filipenko, Beilina et al. 2002)	
		noyau du raphé	↓			(Boyarskikh, Bondar et al. 2013)	
	rat				↑	(Grunewald, Johnson et al. 2012)	
Pharmacologique (modèle CORT)	rat	PFC			↑		
		cortex cingulaire			↑		
		hippocampe			↑		
Pseudo-gestation / pseudo-postpartum	rat	cortex cingulaire			↑	(Raitsin, Tong et al. 2017)	
Stress oxydant	rat	PFC			↑		
		cortex cingulaire			↑		
Privation de sommeil prolongée	souris	hippocampe	↑	↑		(Wang, Chen et al. 2017)	
		amygdale	↑	↑			
Brulure sévère	souris	hippocampe	↑	↑		(Wang, Chen et al. 2017)	
Retrait d'alcool après exposition chronique	rat	PFC			↑		
		cortex cingulaire			↑	(Matthews, Tong et al. 2018)	
Trouble métabolique	souris	hippocampe			↑	(Engel, de Oliveira et al. 2016)	

Tableau 5 : Niveaux d'expression et d'activité de la MAO-A dans différents modèles d'anxiété/dépression

## 4. La construction d'un modèle de surexpression de la MAO-A

---

### 4.1. L'absence de modèle de surexpression nécessite la mise en place de celui-ci

La recherche bibliographique approfondie sur la MAO-A montre qu'il n'a été à ce jour développé aucun modèle de surexpression ou de l'augmentation d'activité constitutive de la MAO-A. Comme nous l'avons évoqué précédemment, des modèles d'étude de l'altération de l'expression de la MAO-A ont déjà été mis au point, mais il s'agit de modèles de délétion pour lesquels un phénotype comportemental différent est étudié.

Le développement d'un nouveau modèle permettant la surexpression de la MAO-A apparaît donc nécessaire afin de déterminer les conséquences exactes de l'augmentation d'expression et d'activité de cette enzyme observée chez les patients souffrant de TDC. Cette nécessité est amplifiée par les observations précliniques dans des modèles d'anxiété-dépression qui confirment cette surexpression de la MAO-A.

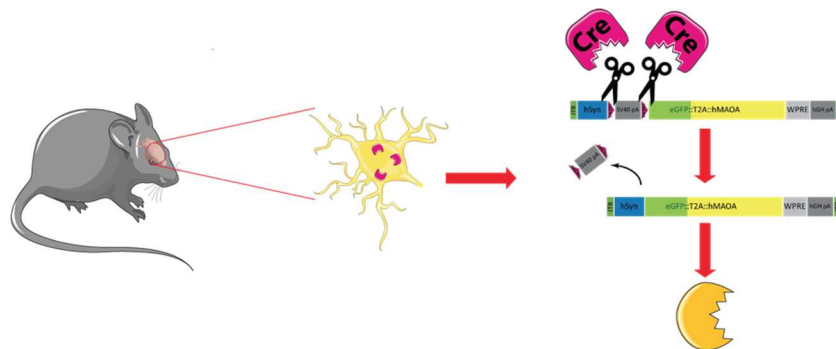
### 4.2. La mise au point d'un nouveau modèle

#### 4.2.1. L'utilisation de vecteur viraux pour induire la surexpression de la MAO-A

Dans le cadre de ce projet, nous cherchons à faire surexprimer la MAO-A au niveau cérébral en ciblant une région et un type cellulaire à la fois. Afin de cibler très précisément une région donnée, nous recourons à l'injection d'un vecteur viral contenant comme transgène la version humaine sans intron du gène de la MAO-A. Le choix de surexprimer la forme humaine et non la forme murine a été fait notamment en raison de la spécificité des substrats pris en charge par l'enzyme : la MAO-A d'origine humaine (hMAO-A) possède une affinité très élevée pour la 5-HT et la NA, alors que la MAO-A murine (moMAO-A) est moins spécifique des monoamines catabolisées (la MAO-A murine pouvant cataboliser la dopamine et la plupart des monoamines qui ne sont pas des neurotransmetteurs).

Le transgène contenant la séquence de la hMAO-A est sous le contrôle d'un promoteur qui lui permet une expression ciblant un type cellulaire en particulier (neurones pyramidaux, astrocytes ou autre). Pour cibler un type cellulaire précis, le transgène de la hMAO-A est sous le contrôle du promoteur d'un gène spécifique de la cellule cible : le promoteur de la protéine

d'acide fibrillaire glial (GFAP) pour les astrocytes, celui de la synapsine 1 humaine (hSyn) pour les neurones. Toutefois, pour cibler une sous-population particulière de neurones (par exemple les neurones pyramidaux glutamatergiques), une séquence bloquant la transcription (séquence Sv40 polyA) et flanquée de séquences de restriction loxP est ajoutée entre le promoteur et le transgène. La présence de cette construction nécessite par conséquent l'intervention de l'enzyme de recombinaison Cre : les cellules exprimant la Cre peuvent ouvrir l'ADN du vecteur viral pour retirer la séquence bloquante et permettre ainsi l'expression du transgène.



**Figure 6 :** Mécanisme moléculaire permettant l'expression du transgène de la hMAO-A uniquement dans les neurones pyramidaux

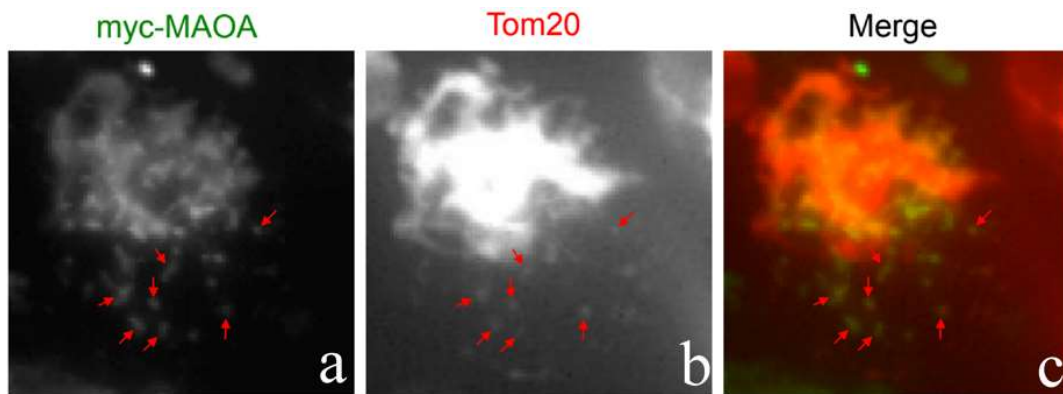
#### 4.2.2. Le recours à la lignée CamKII-Cre

Comme nous venons de l'expliquer, les vecteurs viraux développés dans le cadre de ce projet ne permettent pas de cibler de manière spécifique un type de neurone. Pour cela, nous avons décidé, afin d'étudier l'effet d'une augmentation d'expression de la MAO-A dans les neurones pyramidaux d'utiliser une lignée de souris exprimant exclusivement dans ces-dit neurones l'enzyme de restriction Cre. Pour cela, nous avons utilisé la lignée de souris CamKII-Cre, une lignée dérivée de la souche C57Bl/6 dont le génome contient le gène de la recombinaise Cre sous le contrôle du promoteur de la protéine kinase calcium-calmoduline dépendante.

#### 4.2.3. Effets de la transfection des vecteurs viraux dans un modèle *in vitro*

Après production des vecteurs viraux contenant le transgène de la hMAO-A, nos collaborateurs de l'Université de Toronto ont étudié les effets de la transfection de cellules en culture par ledit virus. Ils ont dans un premier temps confirmé que la protéine issue de l'expression du transgène était localisée au niveau de la mitochondrie : l'immunomarquage de l'isoforme humaine de la MAO-A est co-localisé à celui d'une protéine de la membrane

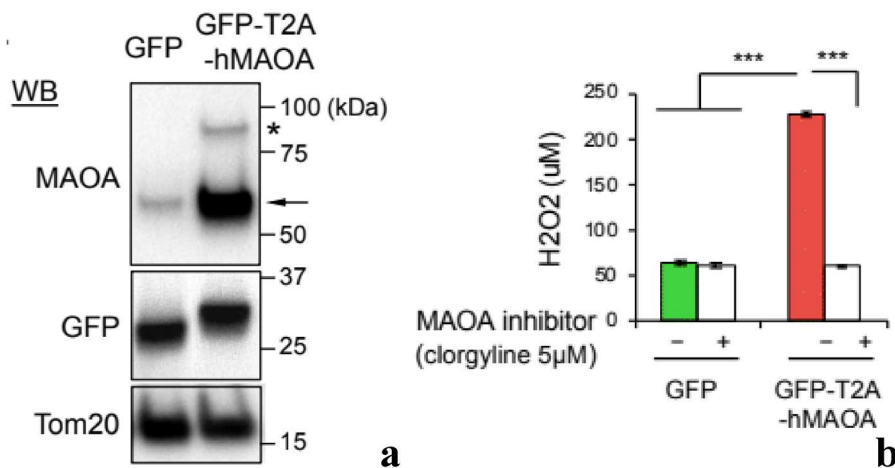
mitochondriale, le récepteur à la protéine d'import mitochondriale TOM20 (Figure 7, Zhou et al, non publié).



**Figure 7 :** Localisation intracellulaire de la hMAO-A par co-immunohistochimie

Les immunomarquages de la MAO-A (a) et de la protéine mitochondrial Tom20 (b) sont colocalisés au niveau des mitochondries (c) (d'après Zhou et al, non publié).

De plus, l'utilisation de la technique semi-quantitative du Western Blot a permis de confirmer que la transfection de cellules avec un vecteur contenant le transgène permettait d'augmenter significativement la quantité de protéine et l'activité de la MAO-A (Figure 8, Zhou et al, non publié). L'augmentation de l'activité a été confirmée par l'utilisation d'un inhibiteur spécifique de la MAO-A (clorgyline) : l'augmentation de production de peroxyde d'hydrogène suite à la surexpression de la hMAO-A par le vecteur viral est perdue.



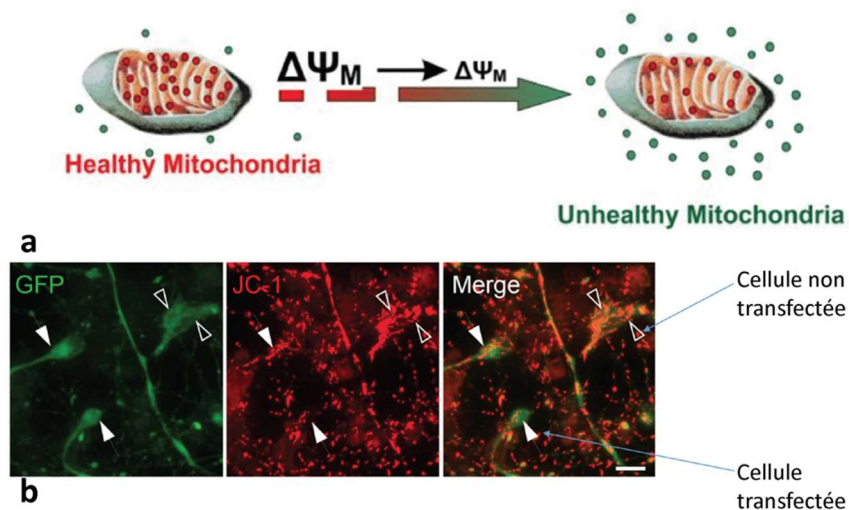
**Figure 8 :** Expression et activité de la MAO-A après transfection de cellules HEK par les vecteurs viraux

La transfection de cellules HEK avec le vecteur viral contenant le transgène de la hMAO-A est responsable de l'augmentation de l'expression protéique de la MAO-A (a) en Western Blot et d'une augmentation d'activité (b) dans un test d'activité enzymatique par production de peroxyde d'hydrogène (d'après Zhou et al, non publié).

Afin d'étudier l'impact de la surexpression de la hMAO-A sur la viabilité des mitochondries, des cultures cellulaires transfectées ont été incubées avec la sonde mitochondriale JC-1 : la sonde JC-1 est une sonde qui fluoresce en vert lorsqu'elle est sous forme monomérique (ce qui est observée pour un potentiel électrique faible) et en rouge lorsqu'elle se dimérise, ce qui s'observe pour un fort potentiel du milieu (

Figure 9a). Le ratio d'intensité de la fluorescence verte sur celui de la fluorescence rouge permet ainsi de déterminer la différence de potentiel de part et d'autre d'une membrane et donc l'état de viabilité d'une mitochondrie. L'utilisation de la sonde JC-1 révèle que la surexpression de la hMAO-A induisait un déficit en potentiel membranaire des mitochondries (

Figure 9b).

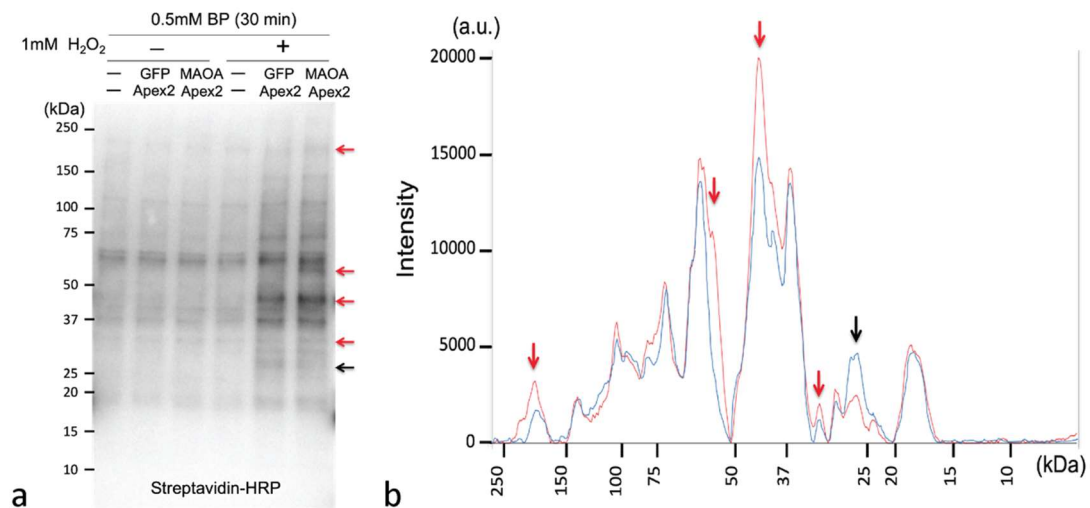


**Figure 9 :** Effet de la surexpression de la hMAO-A sur le potentiel de la membrane et de l'intégrité des mitochondries

Afin d'étudier l'intégrité et le potentiel de membrane des mitochondries suite à la surexpression de la hMAO-A, les cellules transfectées ont été incubées avec la sonde mitochondriale JC-1 (a) ; cette sonde a la capacité de fluorescer à des longueurs d'ondes différentes selon qu'elle se trouve sous forme monomérique ou dimérique, respectivement en vert ( $\lambda \approx 529\text{nm}$ ) et en rouge ( $\lambda \approx 585\text{nm}$ ). Lorsque la mitochondrie est dans un état non altéré, la majeure partie de JC-1 est internalisée dans la matrice et peut se dimériser, inversement lorsque l'intégrité de la mitochondrie est altérée JC-1 ressort abondamment et reste sous forme de monomère. Après transfection du transgène de la hMAO-A, le ratio de fluorescence vert/rouge est plus prononcé vers le vert que pour les cellules contrôles (b) (d'après Zhou et al, non publié).

Enfin, l'analyse du protéome mitochondrial des cellules surexprimant la hMAO-A montre que 4 protéines sont davantage exprimées tandis qu'une cinquième protéine est au contraire

sous-exprimée. Cette variation d'expression de 5 protéines mitochondriales n'est observée que lorsque le milieu est enrichi en  $H_2O_2$  : la modulation d'expression de ces protéines semble être une réponse adaptative à l'accumulation de  $H_2O_2$  qui suit l'augmentation d'expression de la hMAO-A. Néanmoins, ces protéines n'ayant pas été identifiées à ce jour, il nous est impossible d'émettre une hypothèse quant à la raison de leur surexpression (prise en charge du stress oxydant ou réponse cellulaire pour pallier à la dégradation des monoamines ?).



**Figure 10 :** Modulation de l'expression protéique au niveau mitochondrial suite à la surexpression de hMAO-A

## 5. Objectifs

---

Le TDC, trouble mental le plus répandu au monde, constituent un enjeu majeur de santé tant par le fait qu'il est la première cause d'invalidité dans le monde mais aussi que l'une des issues possibles est le suicide. Si les antidépresseurs s'avèrent le meilleur traitement du TDC selon une méta-analyse de 2018 (Cipriani, Furukawa et al. 2018), il en demeure que près de la moitié des patients ne répondent pas correctement à cette thérapie et que près d'un tiers sont diagnostiqués résistant aux antidépresseurs.

Au niveau neurochimique, les études précliniques ont montré que la dépression était associée à une diminution de la concentration extracellulaire en neurotransmetteurs monoaminergiques, et notamment la sérotonine. De la même manière, des études cliniques menées par imagerie chez des patients vivant a démontré une augmentation de l'activité enzymatique de la MAO-A. Les études précliniques menées dans différents modèles de stress et d'anxiété-dépression ont confirmées cette augmentation d'activité ainsi qu'une augmentation de l'expression de cette même enzyme. Toutefois, aucun lien de cause à effet n'a été à ce jour établi entre les niveaux d'expression et d'activité de la MAO-A avec la survenue de la dépression : seul un lien de corrélation a pu être à ce jour démontré par l'ensemble de ces études.

Ainsi, le rôle exact de la MAO-A dans la dépression reste à élucider : l'augmentation d'expression et d'activité de ladite enzyme est-elle la cause ou une conséquence de l'apparition de la maladie ? Dans le cas où elle serait une cause, l'est-elle dans un état basal ou bien constitue-t-elle un facteur prédisposant ou aggravant de la maladie ? Par ailleurs, parmi les molécules utilisées comme antidépresseurs, certaines agissent en étant des inhibiteurs de la MAO-A mais ces dernières ne sont que peu utilisées en raison de leurs nombreux effets indésirables : l'augmentation d'activité de l'enzyme pourrait-elle être une des causes de résistance aux traitements antidépresseurs conventionnels (à l'instar des ISRS et IRSN) ?

Actuellement, aucun modèle de surexpression de la MAO-A existe, seul des modèles de KO de cette enzyme ont été développés. La MAO-A est exprimé au niveau du parenchyme cérébral par les neurones et les astrocytes afin de réguler les niveaux en neurotransmetteurs monoaminergiques de type 5-HT et NA. Une augmentation d'expression et d'activité de la MAO-A est observées chez les patients atteint de dépression comme dans les modèles précliniques d'anxiété/dépression, principalement dans les régions impliquées dans la régulation de l'humeur et des émotions ainsi que dans l'émergence et l'étiologie des troubles de l'humeur. Par ailleurs, aucune de ces études (préclinique comme clinique) n'a discriminer

quel type cellulaire parmi celles constituant le parenchyme cérébral présentaient une augmentation d'activité de la MAO-A. De plus, les formes humaine et murine divergeant quant à leur spécificité de substrat, l'enzyme du gène humain ayant une plus grande spécificité pour la 5-HT et la NA que l'enzyme issue du gène murin, il apparaît nécessaire d'orienter l'étude sur le gène humain. **Notre premier objectif a donc consisté à développer un modèle permettant une surexpression ainsi qu'une augmentation d'activité cellule-spécifique et régio-spécifique de la MAO-A humaine.**

La MAO-A assure au niveau du parenchyme cérébral la dégradation des neurotransmetteurs monoaminergiques, essentiellement la 5-HT et la NA. Par conséquent, une augmentation d'expression et d'activité de la MAO-A devrait induire un catabolisme exacerbé de ces monoamines et donc conduire, au niveau neurochimique, à une diminution de la concentration en celles-ci au niveau de la fente synaptique. Ces neurotransmetteurs assurent par ailleurs la transduction de l'influx nerveux dans les régions cérébrales impliquées dans la régulation de l'humeur et du comportement ; par conséquent, si l'augmentation d'activité de la MAO-A induit un déficit en 5-HT et en NA, il est envisageable que cette augmentation d'activité engendre une altération du fonctionnement des régions impliquées et donc une modification du comportement ou de l'état émotionnel des animaux. **De ce fait, notre second objectif, divisé en deux parties, s'est intéressé aux effets neurochimiques et comportementaux de la surexpression de la MAO-A afin de déterminer si d'une part les niveaux en 5-HT étaient réduits après surexpression de la MAO-A et d'autre part si l'état émotionnel des animaux était affecté par cette augmentation.**

Enfin, l'étude clinique STAR\*D menée aux États-Unis a montré que près du tiers des patients souffrants de TDC développaient une résistance aux antidépresseurs. Du fait que les AD utilisés en première intention, et donc le plus couramment utilisés, ciblent la recapture de la 5-HT et de la NA, l'activité enzymatique élevée de la MAO-A serait à l'origine d'une forte déplétion en monoamines que ne pourrait pas compenser l'inhibition de la recapture : la dégradation des monoamines conduirait à un niveau en neurotransmetteurs libérables faible de manière basal induisant donc une concentration faible suite à la libération de ceux-ci. **Notre troisième et dernier objectif était donc de déterminer si la surexpression de la hMAO-A pouvait affaiblir ou abolir la réponse à différentes catégories d'antidépresseurs.**



---

# Matériels & méthodes

---



# 1. Modèles animaux

---

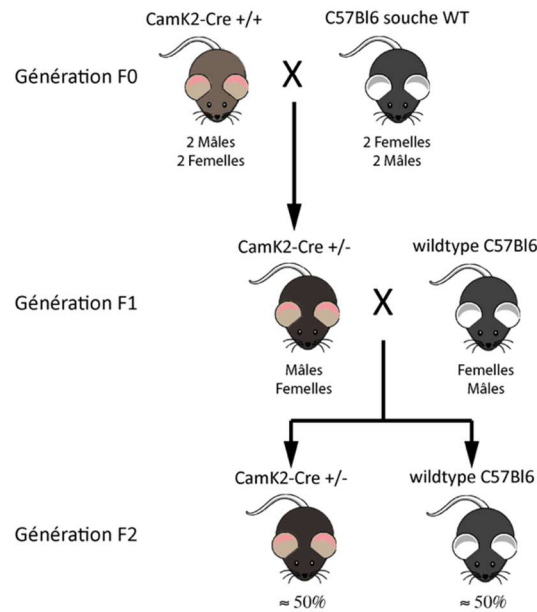
## 1.1. Lignée CamKinase II-Cre

Dans l'objectif d'exprimer spécifiquement la hMAOA dans les neurones pyramidaux du cortex préfrontal médian, nous utilisons des souris de la lignée CaMKII-Cre ( $\text{Ca}^{2+}$ /Calmodulin-dependant protein kinase II – Cre). Ces souris ont la particularité d'exprimer l'enzyme Cre-recombinase spécifiquement dans les neurones CaMKII permettant ainsi de cibler ces neurones pour la transfection du gène.

La lignée a été établie en accouplant des souris CamKII-Cre homozygote (CamKII-Cre<sup>+/+</sup>) de souche C57Bl/6, obtenues auprès du Jackson Laboratory (Maine, -Unis, <https://www.jax.org/strain/005359>), avec des souris C57Bl/6 de type sauvage (WT, pour *Wild Type*). Ces premiers couples donnent naissance à des souris de génération F1, toutes de génotype CamKII-Cre hétérozygote (CamKII-Cre<sup>+/-</sup>). Certaines des souris de la génération F1 sont alors accouplées à leur tour avec des souris C57Bl/6 sauvage ; ces couples donnent alors naissance à des portées ayant en moyenne autant de souris CamKII-Cre<sup>+/-</sup> que de WT (Figure 11).

Les jeunes souris sont sevrées et isolées de leurs parents dans de nouvelles cages à l'âge de 5 semaines ; mâles et femelles d'une même portée sont séparés lors du sevrage. A ce moment, les animaux sont identifiés par un marquage auriculaire (perforation), qui sert aussi de prélèvement de biopsie pour le génotypage des animaux.

Les animaux sont hébergés au sein du Service Commun de l'Animalerie de la Faculté (plateforme IPSIT - Animex) dans des cages d'élevage standard sur un portoir ventilé, avec un accès *ad libitum* à l'eau et à la nourriture (cycle jour/nuit : 12h/12h non inversé). La température des pièces était maintenue à un niveau constant de 22±1°C.



**Figure 11** : Schéma simplifié du maintien de la lignée CamKII-Cre

## 1.2. Génotypage des individus

Les biopsies auriculaires sont incubées avec une solution de lyse directe (*Direct PCR Lysis Reagent*, Fisher Scientific, États-Unis) contenant 1,2% d'inhibiteur de protéinase K à 55°C pendant toute une nuit, afin de digérer les tissus et les membranes cytoplasmiques. Le lendemain, 1µL d'échantillon est amplifié par PCR en utilisant des billes pour PCR (*PCR beads*, Avantor, France), dilué dans 24µL d'eau osmosée contenant 2% d'amorces encadrant une séquence du gène Cre (Tableau 6). La séquence ciblée est amplifiée par PCR à l'aide d'un thermocycleur (Techne Prime®, VWR, États-Unis) en suivant le programme :

- dénaturation initiale : 94°C, 3 minutes ;
- amplification (42 cycles) :
  - a) séparation des brins : 94°C, 30 secondes,
  - b) hybridation des amorces : 55°C, 30sec,
  - c) élongation : 68°C, 40secondes ;
- élongation finale : 72°C, 5 minutes.

Après amplification, les échantillons (additionné de bleu de charge) migrent par électrophorèse (U=90V, I=80mA) dans un gel d'agarose (2% agarose, 1% TBE) placé dans une cuve contenant un tampon de migration à 1% de TBE. Une fois le front de migration ayant atteint la limite de migration, le gel est observé sous rayonnement ultraviolet dans un imageur (E-box, Vilber, France) permettant l'acquisition d'image.

Amorce Sens	ATTTGCCTGCATTACCGGTC
Amorce Anti-Sens	TCCATGAGTGAACGAACCTG

**Tableau 6** : Séquence des amorces pour la PCR de génotypage de la lignée CamKII-Cre

## 2. Vecteurs viraux de surexpression de la hMAOA

La surexpression de la hMAOA est assurée par l’injection dans la région cible d’un vecteur plasmidique. Ce vecteur, qui dérive des virus adéno-associés (AAV) de type 5, intègre un insert contenant le transgène (une séquence sans intron du gène humain de la MAO-A couplé au gène de la GFP ou le gène de la GFP seul pour l’AAV contrôle), précédé d’un promoteur qui permet une expression préférentielle dans un type cellulaire spécifique et terminé par deux séquences améliorant l’expression de la hMAOA :

- un élément de régulation post-transcriptionnel dérivé du virus de l’hépatite de la marmotte (*Woodchuck hepatitis virus Posttranscriptional Regulatory Element*, WPRE) permettant l’export nucléaire du transcrit ;
- une séquence poly-adénine (hGH pA) augmentant la longévité (et donc la stabilité) du transcrit.

L’ensemble de la cassette est encadré par deux séquences de répétition terminales inversées (*Inverted Terminal Repeat*, ITR) qui permettent de l’intégrer au sein de l’AAV, qui comporte aussi deux séquences ITR.

Deux versions différentes de l’insert contenant le transgène ont été testées, l’une dite “Cre-dépendant” car nécessitant l’expression de l’enzyme Cre-recombinase pour pouvoir être exprimé dans les cellules ciblées, l’autre dite “Cre-indépendante”.

### **2.1. Surexpression spécifique dans les neurones pyramidaux par un vecteur “Cre-dépendant”**

Le transgène inséré dans le vecteur viral est précédé du promoteur du gène de la Synapsine-1 humaine (hSyn) ce qui permet une expression de ce transgène dans les cellules neuronales. Toutefois, afin de cibler spécifiquement les neurones pyramidaux, un vecteur viral “Cre-dépendant” a été utilisé. Dans la construction de ce vecteur viral, le promoteur et le transgène sont séparés par une séquence du virus simiesque 40 polyA (SV40 pA), bloquant la transcription du transgène, flanquée de deux séquences loxFAS clivées par la Cre-recombinase : seules les cellules exprimant l’enzyme peuvent exprimer le transgène, soit les

neurones pyramidaux dans notre cas, car l'enzyme Cre clive les séquences loxFAS permettant de supprimer la séquence bloquant la transcription du transgène (Figure 12).

Les deux gènes contenus dans la cassette du transgène sont séparés par une courte séquence “2A self-cleaving peptide” induisant un saut de traduction par le ribosome : le transcrit est traduit en deux protéines distinctes.



**Figure 12** : Structure complète du transgène “Cre-dépendant”

Ces vecteurs viraux permettent l'expression de la hMAO-A et du GFP (A) ou de la GFP seul qui sert de contrôle (B).

## 2.2. Surexpression dans les astrocytes, le vecteur GFAP<sup>+</sup>

Le transgène inséré dans le vecteur viral est précédé du promoteur du gène de la protéine acide fibrillaire gliale (GFAP) ce qui permet une expression du transgène dans les astrocytes.

Les deux gènes contenus dans la cassette du transgène sont séparés par une courte séquence “2A self-cleaving peptide” induisant un saut de traduction par le ribosome : le transcrit est traduit en deux protéines distinctes.

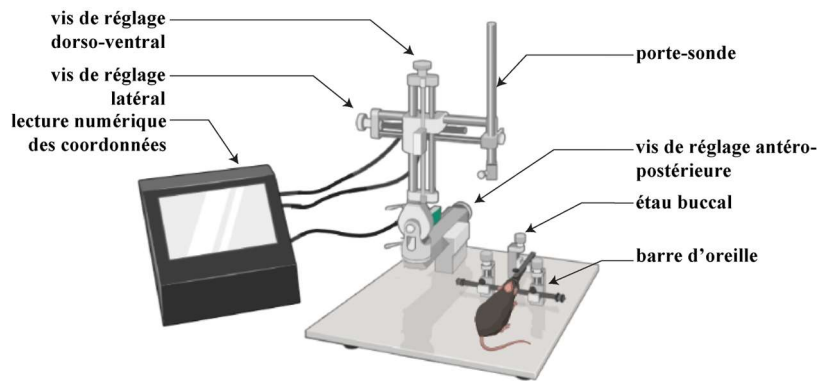


**Figure 13** : Structure complète du transgène ciblant les astrocytes

Ces vecteurs viraux permettent l'expression de la GFP seule servant de contrôle (A) ou de la hMAO-A et du GFP (B).

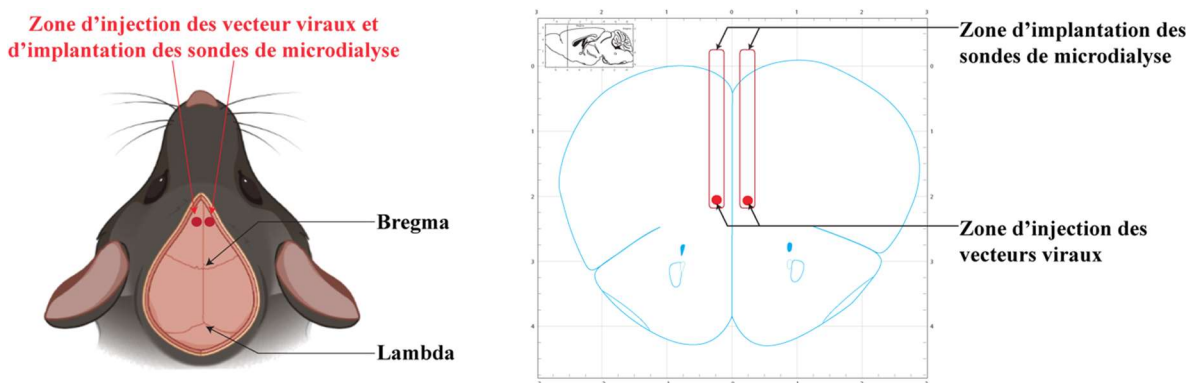
## 3. Chirurgie stéréotaxique

Les souris sont anesthésiées par injection d'hydrate de chloral (400 mg/kg ; i.p.), puis placées sur un cadre stéréotaxique afin de les maintenir immobile grâce aux barres d'oreilles et à l'étai buccal (fixant la mâchoire supérieure). Le cadre stéréotaxique (Figure 14) permet le déplacement avec une grande précision d'un bras muni de vis micrométriques portant la sonde de dialyse dans les trois dimensions (Antéro-postérité, Latéralité et Ventralité).



**Figure 14 :** Cadre stéréotaxique et mise en place de l'animal

Après l'incision longitudinale de la peau du crâne, celle-ci est écartée et l'os crânien nettoyé avec de l'eau oxygénée. Le bregma, point d'intersection des lignes de suture des os du crâne est alors visible et sert de point de référence (point "zéro") antéro-postérieur (AP) et latéral (L) (Figure 15). Avant chaque opération (injection virale ou implantation de sonde), la position horizontale de la tête de l'animal est vérifiée en s'assurant que la différence de hauteur entre le bregma et le lambda ne dépasse pas 20µm. A partir de ce point et grâce aux coordonnées données par l'atlas stéréotaxique de la souris (AP=+2,2mm, L=±0,25mm), l'os du crâne est percé à l'aide d'une vrille diamantée portée par un outils multi-usage rotatif (Dremel®, Etats-Unis) au-dessus des deux (injection virale) ou d'un seul (implantation de sonde) hémisphère du mPFC ; le choix de ne pas réaliser de microdialyse dans les deux hémisphères a été pris en raison de la trop grande proximité des deux points empêchant la pose de deux sondes simultanément. La surface de la dure-mère constitue le point de coordonnée "zéro" de l'axe ventral.



**Figure 15:** Localisation des points d'injections et d'implantation des sondes de microdialyse

L'injection tout comme l'extrémité ventrale de la sonde sont situées aux coordonnées AP = +2,2mm, L = ± 0,25mm et DV = -2,45mm par rapport au Bregma

### 3.1. Injection de vecteur viral

L'injection des vecteurs est effectuée à l'aide d'un pousse-seringue (Stéréotaxie Legato 130, Phymep, France) placé sur le bras du cadre stéréotaxique et portant une seringue Hamilton de 10 $\mu$ L dont l'embout est muni d'un cathéter en silice (Phymep, France). Une fois la dure-mère percée, l'ensemble pousse-seringue – seringue est descendu manuellement et très lentement pour limiter les conséquences de la destruction tissulaire jusqu'à une profondeur de 2,5mm pour l'extrémité du cathéter d'injection.

Un délai de 30 secondes est observé pour laisser le parenchyme cérébral s'adapter à l'élément exogène. Un volume de 0,2 $\mu$ L de solution virale ( $10^{12}$  gc/ml) est ensuite injectée lentement à un débit de 0,2 $\mu$ L/min. Une fois l'injection terminée, le virus est laissé diffuser pendant 2 minutes avant de retirer le cathéter d'injection en remontant l'ensemble lentement.

L'animal est ensuite libéré du cadre stéréotaxique et des points de suture sont réalisés pour refermer la peau du crâne. L'animal est replacé dans sa cage d'hébergement pendant 2 semaines avant d'être utilisé pour les expérimentations.

### 3.2. Implantation de sonde

La sonde est descendue manuellement et très lentement pour limiter les conséquences de la destruction tissulaire jusqu'à une profondeur de 2,5mm, puis collée à l'os crânien avec du ciment dentaire (GACD, Paris, France). Après cette étape de chirurgie, les souris sont placées isolément dans des cages cylindriques en plexiglas dans lesquelles elles sont libres de leurs mouvements et ont un accès ad libitum à l'eau et à la nourriture. Le jour suivant la chirurgie, les animaux sont prêts à être utilisés pour les expériences de microdialyse.

## 4. Microdialyse

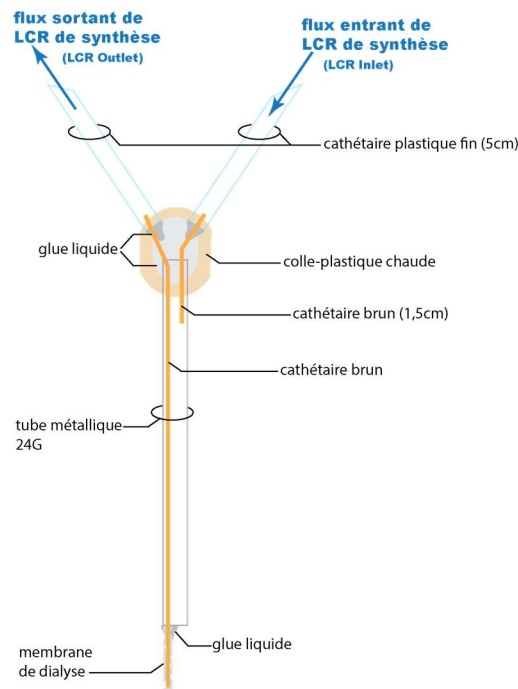
---

### 4.1. Fabrication de sondes pour microdialyse

Les sondes de microdialyse sont fabriquées au sein du laboratoire (Figure 16). Celles-ci se composent d'un tube en acier inoxydable, de cathéters en polyéthylène et en silice (Phymep, France) ainsi que d'une membrane en cuprophane capable de laisser passer les molécules d'un poids moléculaire inférieur à 6.000 Daltons (Geearts, Duranteau et al. 2008).

Les cathéters d'entrée et de sortie des fluides sont composés de l'assemblage d'un cathéter en PE et d'un cathéter en silice (plus court que le tube inox pour l'entrée, plus long pour la sortie), maintenus assemblés par de la colle forte. Les deux cathéters sont assemblés avec le

tube inox tel que montré sur la Figure 16, l'ensemble étant rendu étanche, toujours par de la colle forte. Le cathéter en silice de sortie, dépassant du tube inox d'une longueur permettant d'atteindre le centre de la région cérébrale ciblée (soit 4mm dans cette étude), est recouvert de la membrane en cuprophane, refermée à son extrémité libre par un point de colle (un mince espace est laissé entre ce bouchon et l'extrémité du cathéter en silice pour permettre la sortie du dialysat) et maintenue au tube inox par un second point de colle.



**Figure 16 :** Structure d'une sonde de microdialyse fabriquée au sein du laboratoire

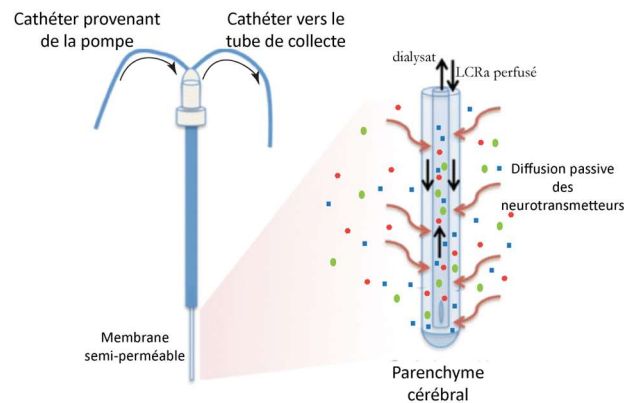
## 4.2. Procédure de microdialyse – recueil des échantillons de dialysat

### 4.2.1. Principe de base de la microdialyse

Le principe de la microdialyse (Delgado, DeFeudis et al. 1972, Ungerstedt 1991) repose sur la loi de diffusion passive de composés de faibles poids moléculaires à travers une membrane poreuse du compartiment le plus concentré en neurotransmetteurs (l'espace extracellulaire synaptique) vers le compartiment le moins concentré (la sonde de dialyse perfusé avec une solution tampon à pH physiologique ne contenant pas de neurotransmetteurs) (Figure 17). La microdialyse est réalisée chez la souris éveillée et libre de ses mouvements. Elle permet le recueil d'échantillons (dialysats) toutes les 25 minutes avec un débit de  $1\mu\text{l}/\text{min}$ . Dans ces échantillons sont mesurés la sérotonine (5-HT) et son métabolite, l'acide 5-hydroxyindolacétique (5-HIAA). Ces molécules sont ensuite quantifiées par chromatographie

liquide haute performance (HPLC) couplée à un détecteur électrochimique pour les monoamines. Les concentrations de neurotransmetteurs mesurées reflètent l'équilibre physiologique entre le mécanisme de libération calcium-dépendant du neurotransmetteur et celui de sa recapture par le transporteur sélectif (tel que le transporteur neuronal SERT pour la sérotonine). Une étude complète de microdialyse intracérébrale comporte 4 phases :

- (1) l'implantation chirurgicale de la sonde par stéréotaxie sous anesthésie (voir section précédente) ;
- (2) le recueil des dialysats
- (3) le prélèvement des cerveaux en vue de la vérification macroscopique précise du site d'implantation de la membrane de microdialyse
- (4) l'analyse chromatographique des dialysats.

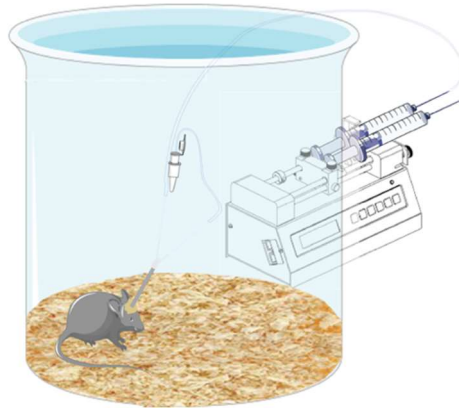


**Figure 17** : Principe de la microdialyse

Le flux constant de LCRa dans la membrane permet de capter les neurotransmetteurs qui traversent la membrane par diffusion passive (gradient de concentration).

#### 4.2.2. Déroulement de la microdialyse

Les expériences de microdialyse débutent le lendemain de l'implantation de la sonde. L'entrée de celle-ci est reliée à un perfuseur automatique (PHD ULTRA 10 MultiRack, Harvard Apparatus) délivrant du liquide céphalorachidien artificiel (LCRa, composition en Tableau 7) en continu à un débit de 1  $\mu\text{L}/\text{min}$ . Après 1 heure de stabilisation, la collecte des dialysats peut commencer avec le même débit de LCR de 1  $\mu\text{L}/\text{min}$  (Figure 18), les tubes de dialysats étant récupérés toutes les 33 minutes (soit 33 $\mu\text{L}$ ), séparés en deux aliquots de 21 $\mu\text{L}$  et 12 $\mu\text{L}$  (respectivement destinées au dosage de la 5-HT/DA et du GABA/Glutamate), et immédiatement conservés à -20°C pour une analyse proche (-80°C en cas d'analyse retardée).



**Figure 18 :** Dispositif de microdialyse

L'entrée et la sortie de la sonde cérébrale sont connectées respectivement à la seringue contenant le LCRA (positionnée dans le pousse-seringue) et au tube de collecte par deux cathéters en PE.

Deux protocoles de microdialyse différents sont réalisés : la microdialyse en *zero-net flux* et la microdialyse standard avec injection d'un antidépresseur (Chefer, Thompson et al. 2009). A la fin de la séance de microdialyse, les souris sont euthanasiées par perfusion intracardiaque (voir section suivante) afin de prélever leur cerveau en vue de réaliser une étude immunohistochimique.

<b>Composants/Ions</b>	<b>Concentrations (en mM)</b>
<b>NaCl</b>	147
<b>KCl</b>	3,5
<b>CaCl<sub>2</sub>-2</b>	1,26
<b>MgCl<sub>2</sub>-6</b>	1
<b>NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub></b>	1
<b>NaHCO<sub>3</sub></b>	25
<b>eau osmosée</b>	
<b>pH</b>	7,4 ± 0,2

**Tableau 7 :** Composition du LCRA

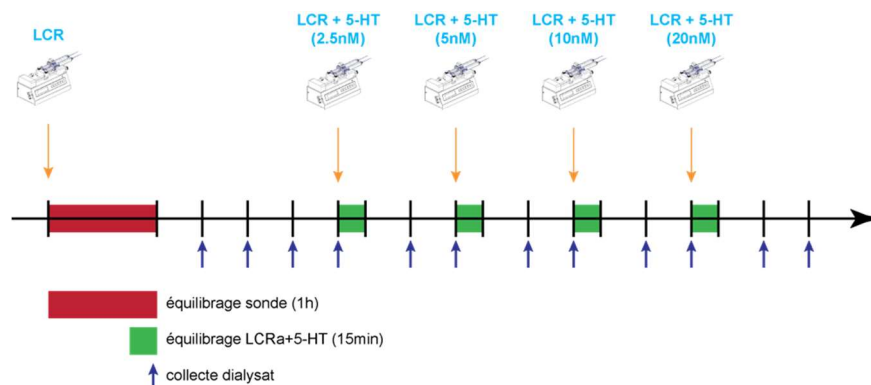
Le LCRA mime les concentrations en sels telles qu'elle sont présentes dans le LCR des animaux. Le pH est ajusté par ajout progressif de HCl jusqu'à obtenir le pH recherché.

#### 4.2.3. Détermination des niveaux basaux de libération de sérotonine : la microdialyse en Zero-Net Flux

Les sondes de microdialyse utilisées ne permettent pas de recueillir les neurotransmetteurs avec un rendement de 100%, autrement dit elles ne permettent que d'avoir des valeurs relatives aux concentrations exactes présentes dans le parenchyme cérébral. Toutefois, la valeur de cette concentration peut être obtenue indirectement par le protocole de microdialyse en *Zero-Net*

*Flux* (Parsons and Justice 1994). Ce protocole repose sur l'ajout progressif dans le LCRa de concentrations croissantes d'un neurotransmetteur précis : la diffusion du neurotransmetteur (de concentration  $C_{out}$ ) présent dans le milieu extracellulaire à travers la membrane s'équilibre en fonction de la concentration en neurotransmetteur dans le LCRa (noté  $C_{in}$ ), la concentration en neurotransmetteur à la sortie de la sonde étant alors  $C_{in}-C_{out}$ . Les concentrations dosées obéissent alors à l'équation  $C_{in}-C_{out}=f(C_{in})$  permettant alors de calculer une régression linéaire dont l'abscisse à l'origine ( $C_{in}$  pour lequel  $C_{in}-C_{out}=0$ ) correspond au *zero-net flux*, c'est-à-dire la valeur exacte de concentration en sérotonine dans le milieu extracellulaire (équilibre des concentrations de part et d'autre de la membrane de dialyse sans flux à travers la membrane).

Après branchement de la sonde au flux de LCRa ( $[5-HT]_{in}=0$ ), elle est laissée une heure pour stabilisation avant de recueillir les 4 premiers dialysats qui donneront la concentration basale de chaque souris. Le LCRa est ensuite remplacé par un LCRa contenant de la 5-HT à la concentration de 2,5nM : après un équilibrage de 15 minutes, deux dialysats sont recueillis et la solution de LCRa remplacée par celle contenant la concentration supérieure en sérotonine. Le même enchaînement de phases est répété pour les 3 concentrations successives : 5nM, 10nM et 20nM (Figure 19).



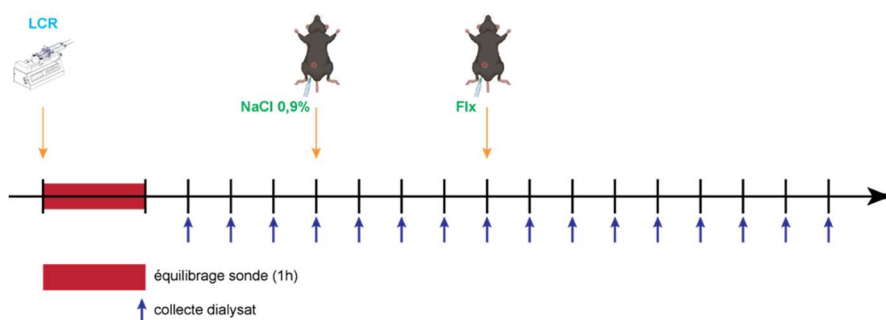
**Figure 19** : Chronologie d'une expérience de microdialyse en zero-net flux

#### 4.2.4. Détermination des effets de molécules antidépresseur par microdialyse standard

La sonde est laissée en équilibrage pendant une heure avant de débiter le recueil des dialysats. Au cours de cette expérience, 16 tubes de dialysats sont recueillis (Figure 20), tels que :

- les tubes numéros 1 à 4 permettent de doser le niveau basal en neurotransmetteurs ;
- les tubes numéros 5 à 8 permettent de doser le niveau de neurotransmetteurs répondant à une injection de chlorure de sodium (90mg/kg) par voie intrapéritonéale (i.p.) ;

- les tubes numéros 9 à 16 permettant le suivi longitudinal après l'injection d'un antidépresseur (fluoxétine (18mg/kg, i.p.) ou kétamine (10mg/kg, i.p.).



**Figure 20** : Chronologie d'une expérience de microdialyse conventionnelle

Du NaCl 0,9% est injecté après collecte du 4<sup>e</sup> tube et l'antidépresseur testé après collecte du 8<sup>e</sup> tube.

### 4.3. Dosage des neurotransmetteurs par HPLC

La sérotonine et la dopamine sont dosées dans 19 $\mu$ L de dialysat (prélevés dans les 33 $\mu$ L recueillis précédemment), par chromatographie liquide à haute pression (HPLC ou *High Performance Liquid Chromatography*) avec une colonne contenant de la silice greffée de chaînes aliphatiques de 18 carbones (colonne Nucléodur C18 de 4,6 x 75 mm, particules de 3  $\mu$ m ; Macherey et Nagel) couplée à un détecteur ampérométrique (VT03; Antec Leyden, The Netherlands) [limite de sensibilité pour 5-HT  $\approx$  0,5 fmol/échantillon (signal-to-noise ratio = 2)]. La composition de la phase mobile est décrite dans le Tableau 8. Le temps de rétention de la 5-HT dans la colonne oscille entre 12 et 15 minutes et celui de la DA entre 6 et 9 minutes selon les conditions ; la quantité en femtomol pour chaque échantillon est calculé à partir de la hauteur des pics obtenus en chromatographie rapporté sur une gamme standard d'étalonnage.

Composants	Concentrations
NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	107 mM
EDTA	140 $\mu$ M
C <sub>8</sub> H <sub>17</sub> NaO <sub>3</sub> S	770 $\mu$ M
méthanol	12%
eau osmosée	
pH	4,1 $\pm$ 0,2

**Tableau 8** : Composition de la phase mobile pour le dosage en HPLC de la 5-HT

La phase mobile utilisée ici permet le dosage à la fois de la 5-HT et de la DA. Le pH est ajusté par ajout progressif d'acide orthophosphorique jusqu'à obtenir le pH recherché.

Le glutamate (Glu) et le GABA sont dosés dans 10 $\mu$ L (prélevés dans les 33 $\mu$ L précédemment recueillis) par HPLC avec une colonne greffée en C18 (100 x 1mm, particules

de 1,7 $\mu$ m ; Waters) le système ALEXYS Neurotransmitter Analyzer (Antec, Zoeterwoude, Pays-Bas). Dans ce système, les 10  $\mu$ L de dialysat sont additionnés de 1  $\mu$ L d'une solution de dérivation dont la composition est décrite dans le Tableau 9. La séparation est effectuée grâce à une phase mobile dont la composition est détaillée dans le Tableau 10. La détection est effectuée dans un détecteur decade 2 équipée d'une cellule de carbone de 2 mm de diamètre (Sencell, Antec, Zoeterwoude, Pays-Bas). La détection et la colonne sont maintenues à une température constante de 40°C et le potentiel de détection est de +850mV vis-à-vis d'une électrode de référence au KCl. Les concentrations de GABA et de Glu de chaque échantillon ont été calculées en mesurant les aires des pics par rapport à une gamme standard. Les limites de quantification de ce système sont respectivement de 12nM pour le GABA et de 8nM pour le Glu (signal-to-noise ratio = 3).

<b>Composants</b>	<b>Concentrations</b>
orthophtalaldéhyde	37 mM
tampon borate	90 mM, pH=10,4
sulphite de sodium	50 mM
éthanol	5%
eau osmosée	

**Tableau 9 :** Composition de la solution de dérivation des échantillons

Le GABA et le glutamate n'étant pas détectable directement par la cellule électrochimique, il est nécessaire d'ajouter un groupement de dérivation afin de les détecter.

<b>Composants</b>	<b>Concentrations</b>
acide orthophosphorique	50 mM
acide citrique	50 mM
EDTA	100 $\mu$ M
acétonitrile	2%
eau osmosée	

**Tableau 10 :** Composition de la phase mobile pour le dosage en HPLC du GABA et du glutamate

#### **4.4. Extraction des cerveaux et contrôle de l'implantation de la sonde par coloration au Crésyl Violet**

À la fin de la microdialyse, les animaux sont sacrifiés par élongation cervicale. Leur cerveau est prélevé et instantanément congelés en étant plongé dans de l'isopentane refroidi à -20°C. Des coupes 35 $\mu$ m d'épaisseur sont réalisées au cryostat et montées sur des lames en verre SuperFrost. Les coupes sont ensuite colorées au Crésyl violet selon la succession d'étape suivante :

- (1) fixation des coupes dans un bain de paraformaldéhyde à 4% (1 heure) ;
- (2) rinçage dans deux bains d'eau osmosée (2x2 minutes) ;
- (3) coloration au Crésyl violet 0,5% (1 minute) ;
- (4) rinçage dans trois bains successifs d'eau osmosée (3x10 secondes) ;
- (5) déshydratation des coupes dans cinq bains successifs d'éthanol de concentration croissante (70% puis 90% 30 secondes, 95% 1 minute puis 100% 2x2 minute) ;
- (6) rinçage de l'éthanol dans deux bains successifs de xylène (2x2 minutes).

Les coupes sont ensuite recouvertes d'une lamelle, montée à l'aide d'Eukitt, dont le xylène constitue le solvant.

## **5. Immunohistochimie**

---

### **5.1. Perfusion des animaux et extraction des cerveaux**

La souris est anesthésiée par une injection d'hydrate de chloral (10 mg/kg). L'anesthésie est contrôlée en effectuant une pression sur la patte arrière de l'animal : l'absence de réaction permet d'entreprendre la chirurgie.

L'animal est fixé sur une planche en liège, sur le dos. Une incision au niveau médian de l'abdomen permet d'introduire les ciseaux de chirurgie et de remonter jusqu'au diaphragme par les flancs de l'animal. Le diaphragme sectionné laisse entrevoir le cœur. La peau qui recouvrait l'abdomen est rabattue en arrière puis fixée, permettant un accès dégagé jusqu'au cœur. Il est primordial d'opérer rapidement l'animal pour conserver la propriété pulsatile du cœur. Cette capacité va permettre de rincer et fixer les tissus cérébraux, ce qui est nécessaire pour obtenir des marquages sans pollution par des cellules sanguines résiduelles.

Un cathéter relié à une pompe péristaltique (W40578, Fisher Scientific SAS, France) est inséré dans le ventricule gauche du cœur. Cette pompe permet de perfuser en premier lieu une solution de NaCl 0.9% conservée froide dans la glace ; cette solution permet de rincer les tissus en ôtant les cellules sanguines résiduelles qui risqueraient de contaminer les tissus prélevés. Une fois le cathéter en place, une incision de l'oreillette droite va permettre au cœur et à la pompe d'évacuer le sang du corps de l'animal. Après 1,5 minutes, on peut constater une décoloration de certaines zones du corps de l'animal telles que le foie ou les pattes avant, une décoloration qui sert d'indicateur du bon déroulement du processus. Le NaCl 0.9% est alors remplacé par une solution de paraformaldéhyde 4% dans 0,2M de solution de Sørensen pendant 2 minutes. Cette solution va permettre de fixer les tissus et de stopper toute activité cellulaire ; durant cette étape, la queue et les pattes de l'animal peuvent se raidir, signe du bon déroulement de la perfusion.

Le cerveau est ensuite prélevé et conservé pendant la première journée dans une solution de paraformaldéhyde 4% à 4°C. Cette solution est ensuite substituée par une solution de tampon phosphate (PBS) + sucrose 30% + azide 0.1% à 4° (remplacée trois fois par une solution neuve, chaque 24 heures) ce qui permettra de protéger et conserver les tissus jusqu'à leur prochaine utilisation.

## **5.2. Préparation des coupes cérébrales**

Les cerveaux sont placés à l'envers dans des blocs en plastique individuels préalablement remplis avec de l'OCT (Tissue-Tek, Optimal Cutting Temperature). Ainsi préparés, les blocs sont plongés dans une boîte en polystyrène contenant de la carboglace (-60°C). La propriété de l'OCT à se solidifier à basse température va contenir le cerveau dans un bloc. Ils sont ensuite démoulés puis conservés au congélateur à -80°C. Le bloc d'OCT est fixé sur une platine amovible à l'aide d'OCT, à l'intérieur d'un dispositif réfrigéré à -20°C (Leica CM 3000, Leica Biosystems, Allemagne). Cet appareil va permettre de faire des sections du bloc, ici définies à 35 µm d'épaisseur. On équilibre ensuite le cerveau par rapport à la lame du couteau du cryostat de façon à obtenir une morphologie symétrique des structures cérébrales. Après l'identification du début du cortex préfrontal et de la zone du tronc cérébral contenant le raphé à l'aide de l'atlas pour Souris (mPFC : Bregma +2,8 à +1,94mm, raphé : Bregma -4,04 à -5,02mm ; Franklin et Paxinos, 2007), chaque section du cortex préfrontal puis des noyaux du raphé est collectée.

Le stockage des coupes de cerveaux se fait à l'aide d'une boîte de 24 puits. Chaque ligne correspond à un cerveau. Les puits sont remplis par une solution de PBS + sodium azide (0.1%) qui préservera les tissus d'une éventuelle dégradation par les bactéries ou champignons. Le cortex préfrontal se subdivisera par 6 à 8 séries (en moyenne) de 6 coupes. Dans chaque puit, nous retrouvons donc 1/6 du cortex préfrontal et du tronc cérébral, et chaque section est espacée de la suivante par 210µm.

## **5.3. Immunomarquage et observation microscopique**

Les coupes sont en premier lieu incubées 30 minutes dans une solution de PBS contenant 1% de sérum d'âne (Normal Donkey Serum (NDS), Jackson ImmunoResearch) et 0,3% de Triton. Cette solution vise à la fois à perméabiliser la membrane des cellules pour permettre le passage des anticorps et à bloquer les sites antigéniques aspécifiques et donc à diminuer le bruit de fond au moment de la révélation du signal lié au marquage de la hMAO-A. Les coupes sont ensuite incubées à 4 °C sous agitation toute la nuit dans une solution d'anticorps anti-MAOA

(anticorps primaire de lapin recombinant) dilués au 1:100 dans du PBS et contenant 1% de NDS et 0,3% de triton (solution Ab). Le lendemain, les coupes sont à nouveau rincées 3 fois 5 minutes dans de la solution Ab ne contenant pas d'anticorps avant d'être incubées 1 heure l'anticorps secondaire (Cy<sup>TM</sup>3 AffiniPure Donkey Anti-Rabbit IgG (H+L), Jackson ImmunoResearch) dilué au 1:500 dans la solution Ab. Après 3 nouveaux rinçages à la solution Ab, cette fois-ci dans le noir, les coupes sont incubées 30 minutes avec une solution de Hoechst afin de marquer les noyaux des cellules. Les coupes sont une dernière fois lavées 3 fois puis montées entre « lame et lamelle » à l'aide d'un milieu de montage Fluoromount (Sigma-Aldrich). Les neurones exprimant hMAO-A sont quantifiés sur 1/6 du mPFC par visualisation au microscope multiphoton en épifluorescence (Leica TCS SP8) en utilisant le filtre approprié.

## **6. Biochimie**

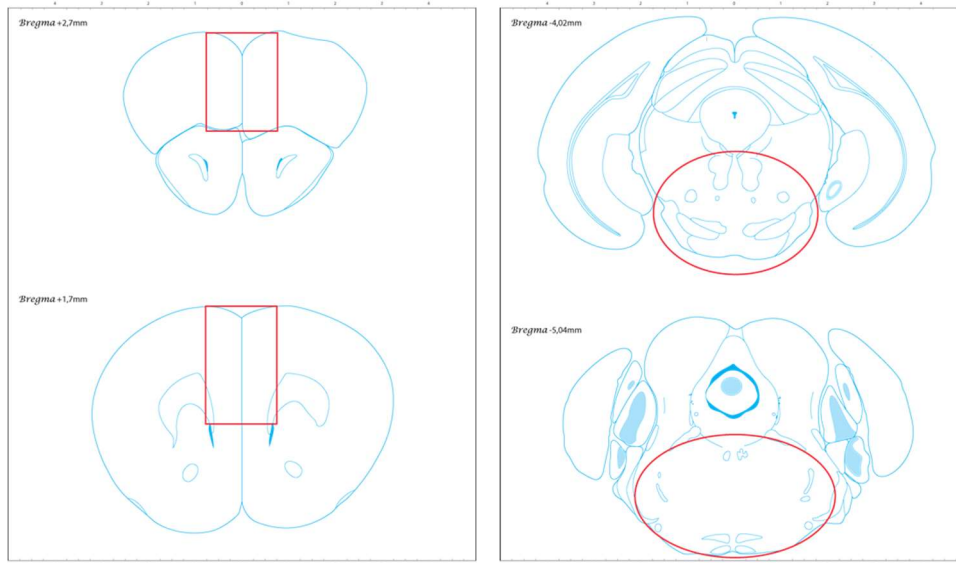
---

### **6.1. Extraction des régions cérébrales**

Une fois les tests comportementaux achevés, les souris sont sacrifiées par élongation cervicale en vue de récupérer le cerveau. Pour se faire, la peau du crâne est incisée puis la jonction entre la moelle épinière et le tronc cérébral coupée et, toujours à l'aide de la paire de ciseaux, l'arrière de la boîte crânienne coupé. Après ouverture aux ciseaux chirurgicaux de la boîte crânienne, enfoncés en amont du Bregma et ouverts pour écarter les plaques osseuses, ces dernières sont retirées à la pince. Les ciseaux sont ensuite délicatement passés en-dessous du cerveau pour servir de levier afin de l'extraire de la boîte crânienne.

Le cerveau est ensuite placé dans une matrice à stries coronales afin d'isoler une coupe de 1mm d'épaisseur au niveau du cortex prélimbique ( $\approx +1,7$  à  $+2,7$  du Bregma) et des noyaux du raphé ( $\approx -4,02$  à  $-5,02$  du Bregma). Les coupes sont ensuite re-découper pour ne conserver que la région médiane du PFC médian (Figure 21). Les noyaux du raphé et un hémisphère du PFC médian sont utilisés pour l'analyse transcriptomique tandis que le second hémisphère du PFC médian est utilisé pour le dosage de la MAO-A par Western Blot.

L'ensemble des expériences de biochimie qui suivent sont réalisées sur glace afin de ralentir/éviter la dégradation des macromolécules (ARNm et protéines).



**Figure 21** : Début et fin des coupes effectuées et régions prélevées pour les analyses biochimiques

Les zones extraites sont encadrées (PFC) ou entourées (tronc cérébral) en rouge. L'analyse des noyaux du raphé dans le tronc cérébral permet d'étudier l'effet de la surexpression de la hAMO-A dans le corps des noyaux sérotoninergiques.

## 6.2. Détermination de l'effet de la surexpression de la MAO-A sur la transcription des gènes associés à la voie des monoamines

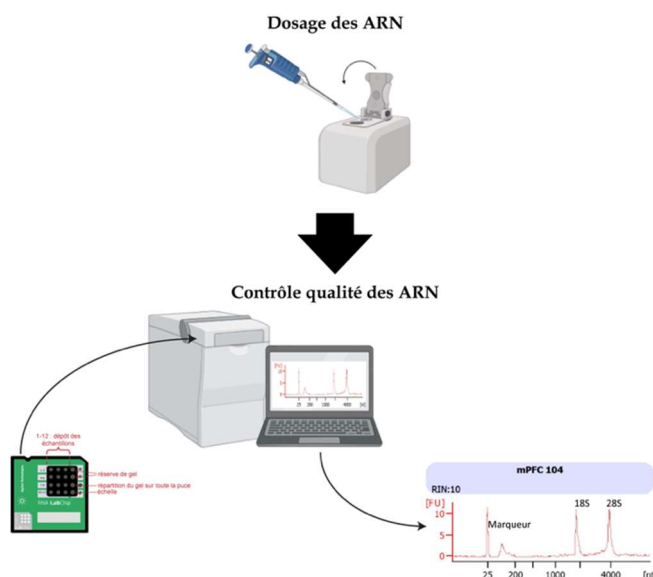
### 6.2.1. Extraction et purification des ARNm

Les régions cérébrales extraites sont immergées dans du Trizol® (Invitrogen, life technologies, États-Unis) avant d'être broyées à l'aide d'une seringue munie d'une aiguille de 18G puis de 23G : les aller-retours du tissu avec le Trizol® homogénéise le tissu. Un volume de chloroforme équivalent au cinquième de celui de Trizol® est ajouté et l'ensemble vigoureusement agité. Les échantillons sont ensuite centrifugés 15 minutes à 10.000G pour récupérer le surnageant qui contient l'ensemble des ARN (dont les transcrits messagers). Le volume de solution est complété par de l'isopropanol (de volume équivalent à la moitié du volume initial de Trizol®); les échantillons sont ensuite vigoureusement agités. Les échantillons sont laissés au repos toute une nuit à -20°C.

Le lendemain, les échantillons sont centrifugés 15 minutes à 12.000G. Le surnageant est alors éliminé délicatement pour conserver le culot qui est deux fois rincés à l'éthanol 75% : après centrifugation, le culot est repris et resolubilisé dans 0,2mL d'éthanol 75% avant d'être centrifugé 5 minutes à 10.000G. Après le deuxième rinçage, les culots sont laissés à sécher 10 minutes, le tube renversé restant ouvert et étant placé pour ne pas décrocher le culot. Le culot est ensuite repris et solubilisé dans 100µL d'eau distillée ionisée.

### 6.2.2. Dosage et contrôle qualité des ARNm

Le dosage de la quantité d'ARN extraite est réalisé par spectrophotométrie grâce au NanoDrop 2000 (ThermoFisher Scientific, États-Unis). Pour ce faire, 1  $\mu$ L d'échantillon ARN est déposé sur l'électrode inférieure du NanoDrop puis l'électrode supérieure rabattue sur l'échantillon et le dosage effectué.



**Figure 22 :** Contrôle qualité des ARNm

Après dosage au NanoDrop, un extrait des ARNm est déposé dans une puce nano, placée dans le BioAnalyser qui effectue une électrophorèse capillaire : les ARN sont séparés et le ratio de 28S et 18S calculé pour déterminer le RIN.

L'intégrité des ARN est ensuite évaluée par électrophorèse capillaire sur puce à l'aide du kit RNA 6000 Nano LabChip sur Bioanalyser 2100 (Agilent Technologies, États-Unis). Les réactifs du kit de contrôle qualité sont, au préalable, équilibrés à température ambiante pendant 30 minutes. La matrice du gel, fournie dans le kit, est préparée par centrifugation pendant 10 minutes à 1.500 g à travers un filtre rotatif. Pour la préparation du gel pour une puce (16 puits, Figure 22), 65 $\mu$ L de la matrice sont mélangés à 1 $\mu$ L du concentré de teinture bleu fourni dans le kit, après agitation de cette teinture durant 10 secondes. Ce mélange est agité puis centrifugé pendant 10 minutes à 13.000 g. En parallèle, l'échelle de poids moléculaire est dénaturée par chauffage à 70°C durant 2 minutes. Les échantillons d'ARN ne sont en revanche pas dénaturés, du fait du faible volume disponible et du phénomène d'évaporation qui se produit lors du chauffage. L'échelle et les échantillons sont maintenus au froid sur glace. La préparation de la puce est réalisée sur une station d'amorçage munie d'une seringue : après centrifugation, 9  $\mu$ L du gel contenant la teinture est déposés dans le puit prévu à cet effet puis réparti sur l'ensemble

de la puce grâce à l'application d'une pression reproductible à l'aide de la seringue maintenue par son clip durant 30 secondes. Les deux puits de réserve de gel sont également remplis de 9 $\mu$ L de gel chacun. Un volume de 5 $\mu$ L du marqueur moléculaire contenu dans le kit est déposé dans les puits devant accueillir les échantillons ainsi que l'échelle. Un volume de 1 $\mu$ L d'échantillon et de l'échelle sont déposés dans les puits prévus à cet effet ; la concentration des échantillons doit être comprise entre 2 et 250ng/ $\mu$ L, ceux dont la concentration est supérieure à 250ng/ $\mu$ L étant alors dilués. La puce est vortexée 1 minute, durée pendant laquelle les électrodes du Bioanalyser 2100 sont nettoyées en étant plongée dans une solution de RNaseZAP (1 minute), rincées à l'eau exempte d'ARN (10 secondes) puis séchées à l'air libre durant 10 secondes. La puce est alors placée dans le Bioanalyser 2100 (Figure 22) qui sépare les ARNm par électrophorèse capillaire, permettant la visualisation des fragments d'ARN 18S et 28S. Au cours de cette étape, un facteur d'intégrité de l'ARN (RIN, RNA Integrity Number) est déterminé pour chaque échantillon : les ARN sont considérés de bonne qualité pour l'obtention de résultats exploitables pour la RT-qPCR lorsque le RIN est égale ou supérieur à 8.

### 6.2.3. Transcription inverse – synthèse des ADNc

La transcription inverse de l'ARN en ADN complémentaire (ADNc) est réalisée avec le kit pour RT-PCR quantitative Maxima First Strand cDNA Synthesis (ThermoFisher Scientific, Etats-Unis). Le mélange de réaction et la transcriptase inverse (Maxima Reverse Transcriptase) fournis avec le kit sont mélangés, suivit de l'ajout de 1 $\mu$ g d'ARN. Après une agitation délicate et une centrifugation des échantillons, la réaction de transcription inverse est effectuée au thermocycleur en suivant le programme préconisé par le kit : 10 minutes à 25 °C, puis 15 minutes à 50 °C et enfin 5 minutes à 85 °C. Les échantillons d'ADNc obtenus sont dilués au 1/5 (volume final de 100 $\mu$ L). Les échantillons d'ADNc sont conservés à -20°C jusqu'à utilisation pour la PCR quantitative.

### 6.2.4. Quantification des ARNm cibles par amplification PCR

L'amplification de l'ADN par PCR quantitative en temps réel est réalisée à l'aide du CFX Connect Real-Time PCR Detection System (Bio-Rad, États-Unis) qui mesure la fluorescence émise à chaque cycle par le SYBR Green dans les 96 puits de la plaque. Deux mélanges réactionnels ont été utilisés : un mélange "maison" (Tableau 11) et le mélange SsoAdvanced Universal SYBR Green Supermix (Bio-Rad). Le mélange réactionnel, la paire d'amorce et

l'échantillon d'ADNc sont déposés dans les puits selon un plan de plaque établi. Pour chaque échantillon, l'expression de trois gènes référence, l'actine, la glycéraldéhyde-3-phosphate déshydrogénase (GAPDH) et la cyclophiline A (cycloP), ont été évaluées en plus de l'expression des gènes étudiés. L'évaluation de l'expression de gène est réalisée à partir d'un triplicat (3 puits par gène) pour chaque échantillon.

Les plaques, placées dans le CFX, sont soumises au programme :

- dénaturation initiale : 95°C, 2 minutes ;
- amplification (40 cycles) :
  - a) dénaturation : 95°C, 10 secondes,
  - b) hybridation des amorces : 59°C, 10 secondes
  - c) élongation : 72°C, 10 secondes ;
- élongation terminal : 65°C, 5 secondes puis 95°C, 5 secondes.

A chaque fin de cycle d'amplification, la quantité d'ADN est mesurée grâce au niveau de fluorescence correspondant à l'incorporation de l'intercalant SYBR Green. Le suivi de cette fluorescence permet d'obtenir la valeur d'un cycle de quantification (Cq) durant lequel la quantité d'ADN amplifiée double à chaque cycle. En coordonnées logarithmiques, cette phase est représentée par une droite. Plus le Cq est faible, plus le gène est fortement exprimé, ce qui indique que la quantité initiale d'ADNc présente est d'autant plus importante.

Le niveau d'expression de chaque gène est normalisé par différence du Cq moyen obtenu pour ce gène avec le Cq moyen obtenu avec les gènes de référence. Cette différence est calculée entre le gène et l'actine, entre le gène et la GAPDH et entre le gène et la cycloP Une moyenne géométrique de ces trois  $\Delta Cq$  est calculé pour obtenir le  $\Delta\Delta Cq$  du gène considéré.

<b>Composants</b>	<b>Concentrations</b>
<b>MgCl<sub>2</sub></b>	3mM
<b>dNTP</b>	0,2mM/chacun
<b>Mix pour PCR</b>	1:10
<b>Taq*</b>	0,025u/μL
<b>SYBR green*</b>	1:20
<b>eau osmosée</b>	

**Tableau 11** : Composition du milieu réactionnel "maison" pour qPCR

Les deux derniers composant (\*) sont ajoutés au dernier instant (lors de la préparation de la plaque). Le mélange commercial *SsoAdvance* contient les mêmes composants.

## 6.3. Détermination des niveaux protéiques de la MAO-A par Western Blot

### 6.3.1. Extraction des protéines et dosage

L'échantillon de PFC médian immergé dans une solution de RIPA/inhibiteurs de protéases refroidi et broyé au Potter mécanique, puis 3 secondes par ultrasons (sonicateur Branson 450 Digital Sonifier, Marshall Scientific, États-Unis) ; les cellules sont lysées par action du RIPA à +4°C sous agitation pendant 2 heures. Après centrifugation (13.000G, 20 minutes, 4°C), le surnageant contenant entre autre les protéines est collecté.

Afin de déposer la même quantité de protéines dans chaque puits, les protéines de chaque échantillon sont quantifiées par un dosage de Bradford. Cette technique combine la réaction de Biuret avec une détection colorimétrique hautement sensible et sélective des ions cuivre en utilisant un réactif contenant l'acide bicinchoninique (Thermo Scientific Pierce BCA Protein Assay Kit, Pierce Biotechnology, États-Unis).

### 6.3.2. De la migration des protéines à leur détection par un marquage anticorps, technique du Western Blot

L'électrophorèse est réalisée dans un gel fabriqué au laboratoire (Tableau 12) de polyacrylamide additionné de 10% de laurylsulfate de sodium (SDS-PAGE) pendant 3h sous une tension de 80 V. Les protéines sont ensuite transférées sur une membrane de polyvinylidène difluoride (PVDF, 0,45µm, Amersham™ Hybond™, Life Science, GE Healthcare, États-Unis) dans du tampon de transfert pendant 1h sous une tension de 100V à 4°C. La présence de protéine est vérifiée en plaçant brièvement la membrane PVDF dans du rouge Ponceau. Après une série de rinçages et le blocage des sites non spécifiques au Régilait®, les membranes sont incubées avec l'anticorps primaire pour détecter la quantité totale en MAO-A. L'anticorps anti-β-actine permet de détecter et doser directement la β-actine afin de normaliser les résultats obtenus pour la MAO-A.

<b>Composants</b>	<b>Proportion (gel de séparation)</b>	<b>Proportion (gel de concentration)</b>
<b>Trisaminométhane</b>	20,2%	10,1%
<b>Acrylamide</b>	25,2%	10,1%
<b>Sodium dodécylsulfate</b>	0,5%	0,5%
<b>Per sulfate d'ammonium</b>	0,5%	0,5%
<b>TEMED</b>	0,1%	0,2%
<b>eau osmosée</b>	53,5%	78,6%

**Tableau 12 :** Composition du gel de Western Blot

La solution de trisaminométhane est au pH de 8,8 pour le gel de séparation et de 6,8 pour le gel de concentration.

L'anticorps primaire est détecté grâce à des anticorps secondaires couplés à la HRP (horseradish peroxydase). Lors de la révélation, du réactif ECL (ECL™ Prime Western Blotting Detection Reagent, Amersham™, Life Science, GE Healthcare) est déposé sur la membrane PVDF et le signal est quantifié grâce au système ChemiDoc XRS (Bio-rad, Marnes-La-Coquette, France).

Les images de révélation sont acquises en utilisant le logiciel Image Lab, et les bandes quantifiées en utilisant le logiciel Image (Daravinejad).

Anticorps primaire	Dilution	Espèce hôte	Référence	Fournisseur
MAO-A	1:1000	lapin	Ab126751	Abcam
b-actine	1:5000		SC47778	Santa Cruz Biotechnologies
Anti-Ig lapin	1:5000	âne	#7074	Cell Signaling Technology

**Tableau 13 :** Liste des anticorps utilisés pour le Western Blot

## 6.4. Détermination de l'activité enzymatique MAO-A

### 6.4.1. Extraction de la fraction membranaire et dosage des protéines

L'échantillon de PFC médian est immergé dans de la solution H (Tableau 14) et broyé au Potter mécanique puis aux ultrasons (5 fois 2 secondes, les deux fois l'échantillon étant refroidi dans de la glace). Après centrifugation (20.000G, 5 minutes, +4°C), le culot est re-suspendu dans 150µL de tampon phosphate salin (PBS).

Afin de déterminer précisément l'activité enzymatique par quantité de protéines, les protéines sont quantifiées par un dosage de Bradford (confère ci-dessus).

Composants	Concentrations
EGTA	0,2mM
TES	5,5mM
sucrose	300mM
eau osmosée	
pH	7,2

**Tableau 14 :** Composition de la solution H

La solution H permet d'extraire les protéines membranaires sans dénaturer leur structure afin que les enzymes conservent leur activité, permettant ainsi que mesurer cette dernière. Le pH est ajusté par ajout de KOH.

#### 6.4.2. Mesure de l'activité enzymatique MAO-A

La mesure de l'activité enzymatique de la MAO-A est effectuée en utilisant un kit (Oxiselect™ Monoamine Oxidase Assay Kit (Colorimetric), MyBioSource, États-Unis). Cette mesure repose sur le dosage de la production de peroxyde d'hydrogène (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) par la MAO lorsqu'elle oxyde la tyramine ; la concentration en H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> est dosée par réaction colorimétrique. La mesure de l'absorbance, qui permet de calculer la concentration en H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, est effectuée sur un volume de 50µL d'échantillon par un lecteur de plaque (Multiskan FC, ThermoFischer, États-Unis) à différents temps (5, 10, 20, 30 minutes et 1 heure) afin de déterminer une cinétique de la réaction.

La valeur de l'activité enzymatique est calculée à partir de la concentration en H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> à l'aide de la formule :

$$\text{activité MAO} = \left( \frac{[\text{H}_2\text{O}_2]}{\text{temps de la réaction}} \right) \times \text{facteur de dilution de l'échantillon}$$

Cette valeur d'activité, exprimée en unité arbitraire par volume (U/L), est normalisée en la rapportant à la quantité en protéines pour permettre l'analyse statistique entre les groupes.

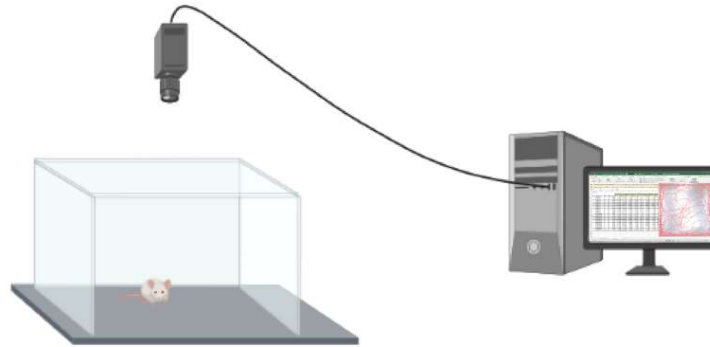
## 7. Comportement

---

### 7.1. Le test en champ ouvert

L'animal est placé dans une enceinte étrangère en plexiglas (43 x 43 cm). Le nombre d'entrées ainsi que le temps passé dans le centre (32 x 32 cm) sont les paramètres évalués pendant 30 minutes, grâce à un système par infrarouge (Ugo Basile, Italie) (Figure 23). Une caméra placée au-dessus du dispositif et reliée à un logiciel de suivi (Any-Maze, Dublin, Ireland) permet l'enregistrement des déplacements, le logiciel Any-Maze permettant aussi de calculer les paramètres étudiés (temps et nombre d'entrée dans les bras ouverts). En général, les animaux présentent un haut degré d'évitement de l'aire centrale, par rapport à la périphérie.

Le test en champ ouvert (*Open Field*, OF) est un test permettant de mesurer à la fois l'anxiété de l'animal (notamment pendant les 5-10 premières minutes du test), ainsi que l'activité ambulatoire (lorsque le test est réalisé sur 30 minutes). L'administration aiguë d'un anxiolytique, tel qu'une benzodiazépine, ou l'administration chronique d'un antidépresseur augmentent le nombre d'entrées et le temps passé dans le centre de l'enceinte.

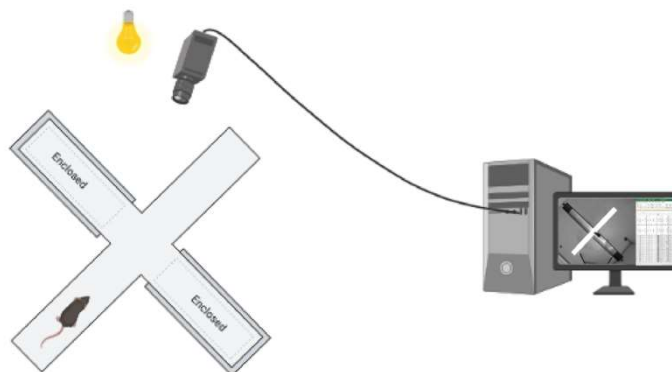


**Figure 23 :** Test en champs ouvert

Les mouvements de la souris dans le labyrinthe sont tracés par vidéo et les données analysées pour calculer le nombre d'entrée et le temps passé dans les zones périphérique et centrale.

## 7.2. Labyrinthe de la croix surélevée

Le labyrinthe EPM (Ugo Basile, Italie) se compose de deux bras ouverts et de deux bras fermés reliés par une plateforme centrale, située à 50cm au-dessus du sol et éclairé par une faible puissance (20 watts). Lors de son passage, chaque souris est placée sur la plateforme centrale, face à un bras ouvert ; elle peut alors explorer librement l'ensemble du labyrinthe pendant 5 minutes. Une caméra placée au-dessus du dispositif et reliée à un logiciel de suivi (Any-Maze, Dublin, Ireland) permet l'enregistrement des déplacements, le logiciel Any-Maze permettant aussi de calculer les paramètres étudiés (distances parcourues et temps de mobilité/immobilité).



**Figure 24 :** Test de la croix surélevée

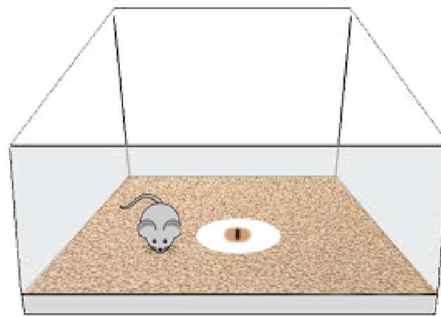
Les mouvements de la souris dans le labyrinthe sont tracés par vidéo et les données analysées pour calculer le nombre d'entrée et le temps passé dans chaque zone.

Le test du labyrinthe en croix surélevé (ou *Elevated Plus Maze*, EPM) permettant d'évaluer le phénotype anxieux d'un animal. La mesure du nombre total d'entrées ainsi que de la distance parcourue dans les 4 bras est mesuré, afin de corriger les résultats en fonction de l'activité de

l'animal dans ce test. Un phénotype anxieux se caractérise par une diminution du temps passé dans les bras ouverts par rapport au temps passé dans les bras fermés.

### 7.3. Test d'alimentation supprimé par la nouveauté

Le test de l'alimentation supprimé par la nouveauté (*Novelty Suppressed Feeding Test*, NSFT) est un test prédictif d'une activité mixte anxiolytique/antidépresseive des antidépresseurs. Ce test induit une situation de motivation conflictuelle entre l'envie d'aller se nourrir et la peur de s'aventurer au centre de l'enceinte, qui est fortement éclairée (Figure 25). L'animal à jeun depuis 24 heures est placé dans un coin d'une enceinte (55 x 40 x 18 cm), où en son centre fortement éclairé une croquette de nourriture a été posée sur un cercle de papier blanc. Le temps de latence que la souris met pour mordre manifestement la croquette est mesuré. L'animal est ensuite replacé dans sa cage d'origine avec une croquette : on mesure alors le temps de latence et la consommation de nourriture pendant 5 minutes, afin de vérifier que l'appétence des souris n'est pas affectée par le traitement à la fluoxétine (David, Samuels et al. 2009).



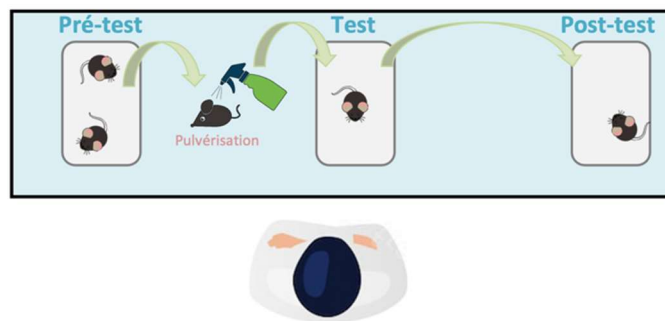
**Figure 25 :** Test de l'alimentation par la nouveauté

Après 24h de jeûne, l'animal est placé dans une arène fortement éclairée (milieu anxiogène) au centre de laquelle se trouve une croquette. On mesure alors sur 10 min la latence avant que l'animal ne croque dans la croquette.

### 7.4. Test d'aspersion (*Splash Test*)

Le test d'aspersion (*Splash Test*, ST) est assimilé au caractère dépressif puisqu'il met en œuvre la capacité de toilettage chez le rongeur. Les animaux d'une même cage sont placés 30 à 60 minutes dans une nouvelle cage (dite cage de pré-test). Au moment du test, une solution de sucrose à 10% est vaporisée en une seule fois et de manière modérée sur le cou et le dos de l'animal. Cette solution est à la fois collante (permettant d'initier le toilettage chez le rongeur) et appétante. L'animal est directement introduit dans sa cage d'hébergement sans nourriture ni eau pour la durée du test, soit 5 minutes. Un chronomètre est lancé simultanément. Plusieurs

paramètres sont mesurés : la latence à initier un toilettage (qui doit durer plus de deux secondes et comprend une action des pattes sur la face ou un léchage du pelage ventral ou dorsal), le temps total ainsi que la fréquence de toilettage sur la période du test. A la fin du test, la souris est introduite dans une nouvelle cage temporaire (dite cage post-test), le temps que les autres souris de la même cage aient effectuées le test (Figure 26).



**Figure 26** : Test d'aspersion (ou *Splash Test*)

Après aspersion de l'animal par de l'eau sucrée (10%), le temps de toilettage est mesuré et le nombre d'épisode de toilettage compté.

## 7.5. Le test de préférence d'eau sucré

Le test de préférence d'eau sucré (*Sucrose Preference Test*, SPT) est un test prédictif d'un effet anéhdonique reposant sur la différence de consommation d'eau neutre (eau du robinet) et d'eau sucrée : les rongeurs ont une appétence supérieure pour les aliments et boissons sucrées. La réalisation de ce test implique l'isolement de chaque animal afin de pouvoir mesurer avec précision la consommation de chaque animal.

Durant les premières 24 heures du test chaque souris a accès à deux biberons contenant de l'eau, afin de déterminer si les animaux ont une préférence de place vis-à-vis des biberons. Pour les 48 heures qui suivent, chaque animal a accès à un biberon contenant de l'eau et un biberon contenant une solution de sucrose à 2%. Au début du test et toutes les 24 heures les deux biberons sont pesés, les biberons d'eau et de sucrose étant inversés au bout de 24 heures afin d'éviter une habitude de place des animaux. La consommation de chaque boisson (en mL) correspond à la différence de poids (en g) pour chaque biberon.

## 7.6. Calcul du score d'émotivité (Z-score)

A l'image de l'échelle d'Hamilton, questionnaire composé de plusieurs items qui permet d'évaluer quantitativement la sévérité de la pathologie, le score d'émotivité (ou «

*emotionality score* ») est un outil préclinique qui permet d'évaluer l'état anxio-dépressif de l'animal en prenant en compte l'ensemble des résultats obtenus lors de l'étude comportementale, et ce de façon à diminuer la variabilité intrinsèque de chaque test (Guilloux, Seney et al. 2011). En effet, il existe plusieurs causes de variabilités des résultats : le jour ou le moment de la journée où le test est effectué, les conditions du test (bruit, etc...) qui peuvent influencer sur le comportement animal. Un animal peut présenter un phénotype anxieux fort dans un test, et un phénotype moins prononcé dans un second test réalisé quelques jours plus tard. Cette méthode permet ainsi de normaliser les paramètres des différents tests correspondant au comportement d'anxiété-dépression, par une standardisation de type « z ». Cette normalisation des résultats obtenus à des moments différents et de différentes cohortes, permet ainsi leur comparaison et leur compilation.

La formule de normalisation des résultats par z-normalisation est la suivante :

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

- X : valeur du paramètre observé
- $\mu$  : moyenne du groupe véhicule (contrôle)
- s : écart-type du groupe véhicule (contrôle)
- z : score d'émotivité

On obtient de cette façon le z-score pour chaque paramètre considéré comme marqueur d'un phénotype anxio-dépressif dans chaque test (OF : temps dans le centre et distance ratio. EPM : Temps dans les bras ouverts, ratio d'entrées dans les bras ouverts/entrées totales. NSF : latence à aller se nourrir. ST : Durée de toilettage). On moyenne ensuite tous les z-paramètres d'un test pour calculer le z-score du test considéré. Enfin, on réalise une moyenne tous les « z-scores » de chaque test ( $Z_{OF}$ ,  $Z_{EPM}$ ,  $Z_{NSF}$  et  $Z_{ST}$ ) pour obtenir le score d'émotivité global de l'expérience. Ce score nous permettra notamment d'évaluer si une souris présente un phénotype anxio-dépressif stable dans chaque test. Plus le score est élevé, plus le comportement des souris sera considéré comme anxio-dépressif. Nous considérerons que les souris ont répondu au traitement si on observe une diminution d'au moins 50% du score après administration d'un antidépresseur.

## 8. Vérification des étapes du cycle menstruel chez la femelle

---

Les altérations comportementales (anxiété-dépression) peuvent être associées à une dérégulation de l'axe hypothalamo-hypophysaire et donc une augmentation des concentrations plasmatiques de corticostérone chez les animaux (Grippe, Sullivan et al. 2005). Une partie de notre étude étant réalisée chez la femelle, il est important d'évaluer l'état du cycle menstruel chez ces animaux afin d'exclure des variations de comportement interindividuelles qui pourraient être dues à la variation du cycle. En effet, le comportement chez la souris peut varier en fonction des états de leur cycle ovarien, celui-ci pouvant être sujet à des changements liés à l'activité de l'axe hypothalamo-hypophysaire (ter Horst, de Kloet et al. 2012).

Une façon d'évaluer le cycle ovarien de manière non-invasive est d'observer les changements de la structure des cellules épithéliales vaginales (Goldman, Murr et al. 2007, Caligioni 2009). Des frottis vaginaux sont ainsi réalisés en introduisant une pipette contenant 15 $\mu$ l de NaCl 0.9% dans l'orifice vaginal de la souris (Figure 20). Le frottis ainsi obtenu est déposé sur une lame, recouvert d'une lamelle avant d'être observé au microscope (grossissement x10), sans coloration. Chez les rongeurs, le cycle dure de 4 à 5 jours et comporte 4 stades qui se différencient par la proportion des 3 types de cellules observées (cellules cornées, cellules épithéliales et leucocytes) : proœstrus, œstrus, metœstrus et diœstrus.

L'état du cycle est vérifié après chaque test comportemental afin de l'intégrer comme facteur dans nos analyses statistiques. Ainsi, pour toute analyse chez les femelles, une ANOVA à 2 facteurs (facteurs traitements et cycles) a été réalisée.

## 9. Analyses statistiques

---

Les résultats des études comportementales et biochimiques sont présentés sous la forme de moyenne  $\pm$  erreur standard à la moyenne (SEM).

Les données obtenues dans les différentes expériences sont dans un premier temps traitées sur Excel afin de calculer les valeurs finales qui sont ensuite utilisées pour les tests statistiques. Les données sont ensuite analysées à l'aide du logiciel de statistique GraphPad Prism 9. La normalité des groupes est testée par un test de Shapiro-Wilk. Selon les conditions, différents tests statistiques sont utilisés :

- un test de Student (t-test) lorsque les deux groupes suivent une loi Normale ou un test de Wilcoxon-Mann-Whitney (test non-paramétrique) lorsqu'au moins un des deux groupes ne suit pas la loi Normale ;

- une ANOVA à 2 facteurs est appliquée pour la comparaison des groupes GFP et hMAOA en tenant compte du sexe des individus ;

- une analyse de survie de Kaplan-Meier est réalisée pour le test comportemental du NSF, du fait que la distribution des données ne suit pas une loi Normale, puis le test du log-rank de Mantel-Cox a été utilisé pour comparer les courbes de survie

Le seuil de significativité statistique est fixé à  $p < 0,05$ .

---

# Résultats

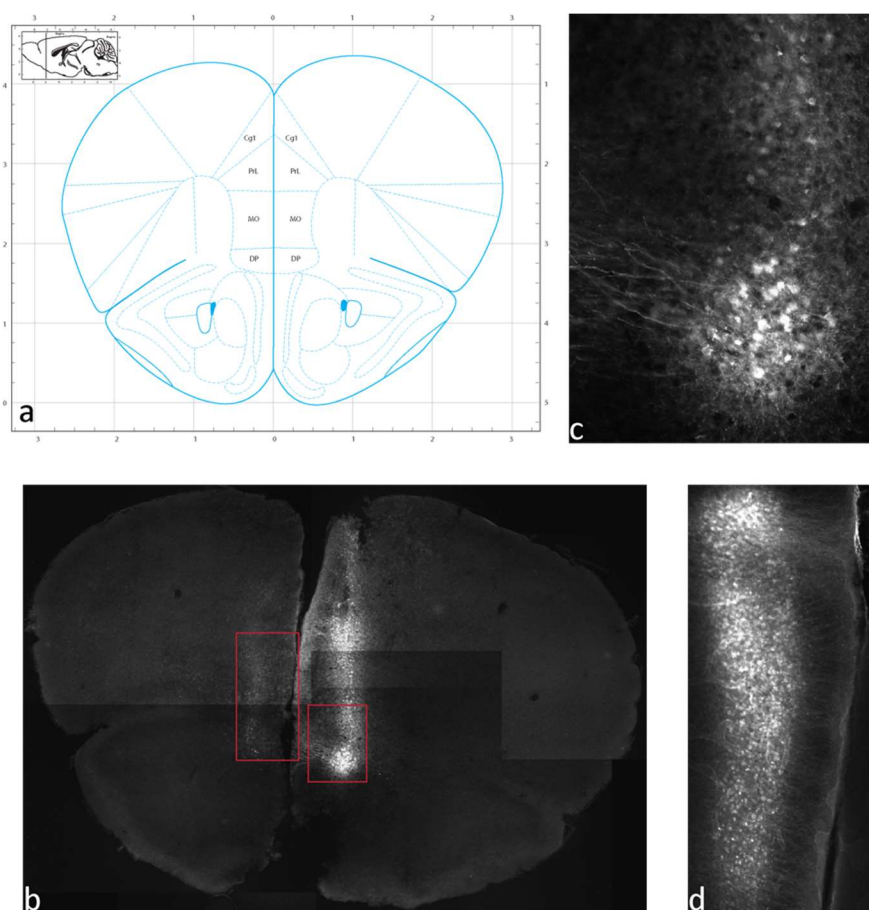
---



# 1. Mise au point d'un modèle murin de surexpression et d'augmentation de l'activité de la MAO-A

## 1.1. Localisation de la surexpression de la MAO-A

L'immunomarquage de la hMAO-A sur des coupes de cerveau au niveau du PFC (approximativement entre +2,3 et +2,1 mm en antérieur du Bregma) montre que l'injection du vecteur viral dit « Cre-dépendant » permet une expression de la hMAO-A au niveau du site d'injection (Figure 27 **b**). Au niveau cellulaire, le marquage est observé au niveau du corps cellulaire des neurones mais aussi faiblement dans les axones (Figure 27 **c** et **d**). Par ailleurs, outre les cellules au niveau du point d'injection, l'immunomarquage marque aussi faiblement les cellules situées le long du passage du cathéter d'injection laissant supposer une légère migration de la solution virale lors de la remontée du cathéter ou peu après.

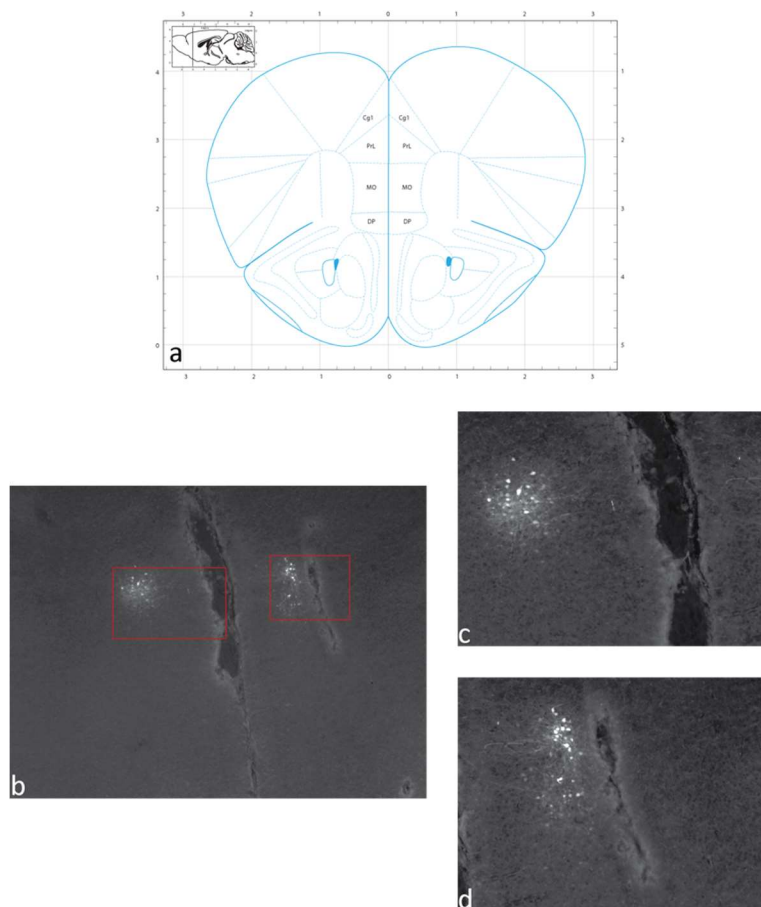


**Figure 27** : Localisation par immunohistochimie de la hMAO-A synthétisée à partir du vecteur viral « Cre-dépendant »

L'immunohistochimie pour détecter la localisation précise de la surexpression de la hMAO-A a été réalisée dans le mPFC sur des coupes de cerveau situées vers la coordonnée de +2,2 mm par rapport au Bregma (a). Le grossissement x4 (b) permet de localiser la zone où la hMAO-A est surexprimée à partir

des vecteurs viraux ; les grossissements x10 et x40 (c et d respectivement) des zones d'expression du vecteur permettent de confirmer que l'expression est neuronale.

Un second vecteur viral ciblant les neurones de manière non spécifique (car ne possédant pas de séquence Sv40pA flanquée de séquences Lox) et dit «Cre-indépendant» a également été testé. L'immunomarquage montre également une expression de la hMAO-A aux coordonnées d'injection (Figure 28 **b**), mais l'intensité de ce marquage est beaucoup plus faible que pour celui des coupes du PFC (Figure 28 **b-d**) issues des souris injectées avec le vecteur « Cre-dépendant ». Du fait de la faible efficacité du vecteur viral à induire une surexpression de la hMAO-A, il a été décidé de ne pas poursuivre avec ce modèle.

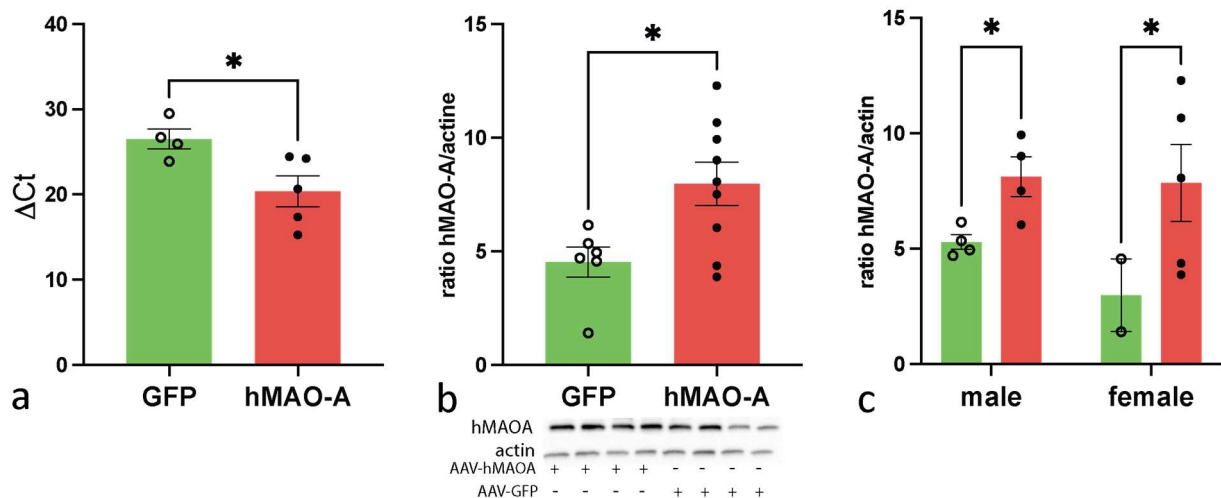


**Figure 28** : Localisation par immunohistochimie de la hMAO-A synthétisée à partir du vecteur viral « Cre-indépendant »

L'immunohistochimie pour détecter la localisation précise de la surexpression de la hMAO-A a été réalisée dans le mPFC sur des coupes de cerveau situé vers la coordonnée de +2,2 mm par rapport au Bregma (a). Le grossissement x4 (b) permet de localiser la zone où la hMAO-A est surexprimée à partir des vecteurs viraux ; les grossissements x10 (c et d) des zones d'expression du vecteur permettent de confirmer que l'expression est neuronale.

## 1.2. Détermination des niveaux d'expression suite à la transfection virale

Afin de confirmer que l'injection des vecteurs viraux dans le mPFC entraînait une augmentation d'expression de la hMAO-A, l'ARNm et la protéine de la MAO-A ont été quantifiés. Le  $\Delta Ct$ , inversement corrélé à la quantité d'un ARNm donné, est significativement réduit chez les animaux ayant été injectés avec le vecteur contenant le transgène de la hMAO-A par rapport aux animaux ayant reçu le vecteur viral contrôle (Figure 29 a,  $p$ -value = 0,032) :  $\Delta Ct_{hMAOA} = 20 (\pm 1,8)$  contre  $\Delta Ct_{GFP} = 27 (\pm 1,2)$ .



**Figure 29** : Expression de la hMAO-A dans les neurones pyramidaux après injection du vecteur viral dans le mPFC

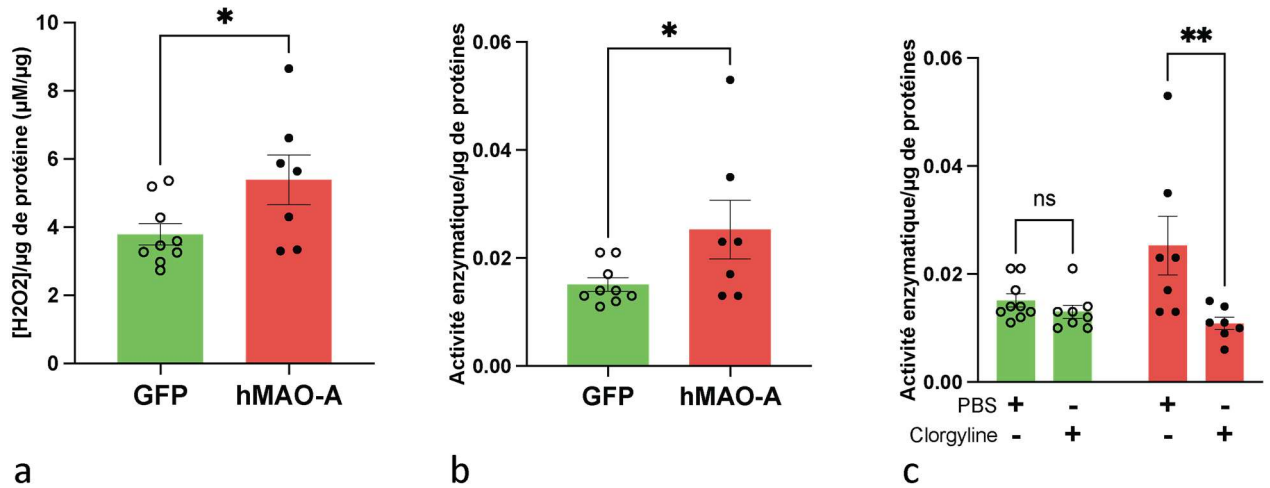
Le niveau d'expression transcriptomique de la hMAO-A chez les souris injectées avec le transgène du GFP (n = 4 ou 6) ou le transgène de la hMAO-A (n = 5 ou 10) a été déterminé par RT-qPCR (a) et la quantité en protéine résultant de cette surexpression par Western Blot (b). Les résultats de la RT-qPCR sont représentés en  $\Delta Ct$ , autrement dit plus la valeur est élevée et plus la quantité en ARNm est faible. Les résultats sont exprimés en moyenne  $\pm$  SEM.

L'injection du vecteur viral contenant le transgène de la hMAO-A est aussi responsable d'une augmentation significative de 97% (Figure 29 b,  $p$ -value = 0,024) : ratio MAO-A/actine<sub>hMAO-A</sub> = 8,9 contre ratio MAO-A/actine<sub>GFP</sub> = 4,5.

## 1.3. Détermination de l'activité enzymatique suite à la transfection virale

Afin de déterminer le niveau d'activité de l'enzyme MAO-A dans le mPFC des souris ayant été transfectées soit avec le transgène du GFP soit avec celui de la hMAO-A, nous avons mesuré la quantité de  $H_2O_2$  produite par la MAO-A. Ainsi, la surexpression de MAO-A est responsable

d'une augmentation significative (**Figure 30a**,  $p\text{-value} = 0,046$ ) moyenne de 42% de la production de  $\text{H}_2\text{O}_2$  (Figure 30a,  $[\text{H}_2\text{O}_2]_{\text{GFP}} = 3,8\mu\text{M} \pm 0,32$  contre  $[\text{H}_2\text{O}_2]_{\text{hMAO-A}} = 5,4 \mu\text{M} \pm 0,73$ ).



**Figure 30 :** Activité enzymatique de la MAO-A dans le mPFC suite à l'injection d'un vecteur viral contenant le transgène de la hMAO-A

L'activité enzymatique de la MAO-A dans le mPFC (b) a été déterminé à partir de la production de  $\text{H}_2\text{O}_2$  (a) dans la fraction de protéines membranaires du mPFC de souris ayant reçu le vecteur viral contenant soit le transgène du GFP seul ( $n=9$ ) soit le transgène hMAO-A ( $n=7$ ). Le dosage de  $\text{H}_2\text{O}_2$  produit par la MAO-A a également été réalisé en présence d'un inhibiteur spécifique de la MAO-A, la clorgyline (b). Les résultats sont exprimés en moyenne  $\pm$  SEM.

L'augmentation de production de  $\text{H}_2\text{O}_2$  est un reflet de l'augmentation de l'activité de la MAO-A. En effet, suite à la surexpression de la hMAO-A, l'activité enzymatique est significativement augmentée de 66,7% (Figure 30 b,  $p\text{-value} = 0,0296$ ) : groupe hMAO-A :  $0,025\mu\text{M}\cdot\text{min}^{-1}\cdot\mu\text{g}^{-1}$  de protéines  $\pm 0,014$ , groupe GFP :  $0,015\mu\text{M}\cdot\text{min}^{-1}\cdot\mu\text{g}^{-1}$  de protéines  $\pm 0,0037$ . Toutefois, afin de confirmer que cette augmentation de production de  $\text{H}_2\text{O}_2$  est liée à une augmentation d'activité de l'enzyme, nous avons aussi mesurer la production de  $\text{H}_2\text{O}_2$  en présence d'un inhibiteur sélectif de la MAO-A (Figure 30 c) : l'ajout de clorgyline diminue significativement l'activité enzymatique ( $p\text{-value} = 0,0012$ ). En revanche, l'activité de la MAO-A des échantillons issus des souris surexprimant la hMAO-A traités avec la clorgyline ne diffère pas de l'activité enzymatique dans les échantillons des souris contrôles, que ces échantillons soient traités ou non avec l'inhibiteur de la MAO-A.

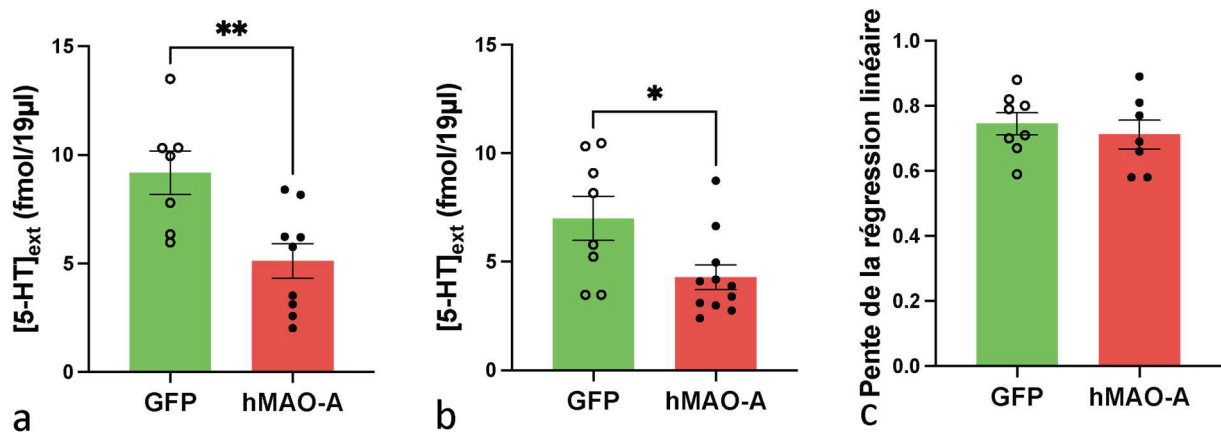
## 2. Effets biochimiques et comportementaux de l'augmentation d'expression et d'activité de la MAO-A

### 2.1. Surexpression de la hMAO-A dans les cellules pyramidales glutamatergiques du cortex préfrontal médian

#### 2.1.1. L'augmentation d'activité de la MAO-A réduit l'homéostasie de la sérotonine dans le mPFC

La surexpression de la hMAO-A dans les neurones pyramidaux du mPFC est responsable d'une diminution significative des niveaux extracellulaires basaux en 5-HT (Figure 31 **b**,  $p$ -value = 0,025). Toutefois, la sonde de microdialyse ayant un rendement inférieur à 100%, afin de déterminer avec précision les niveaux réels en 5-HT dans le parenchyme du mPFC, le protocole de microdialyse en *Zero-Net-Flux* a été utilisé. Ainsi, la surexpression de la hMAO-A est responsable d'une diminution significative de la concentration en 5-HT dans le LCRa à l'équilibre (Figure 31 **a**,  $p$ -value < 0,01).

Par ailleurs, la pente de la régression linéaire des valeurs du *Zero-Net Flux* est un reflet de l'activité de SERT. Ainsi, la surexpression de la hMAO-A dans les neurones pyramidaux du mPFC n'induit pas de variation significative de la pente de la régression linéaire (Figure 31 **c**,  $p$ -value = 0,55) avec des pentes de régression linéaire moyenne de 0,8 et 0,7 respectivement pour les souris contrôles et surexprimant la hMAO-A : par conséquent, l'activité de recapture de la 5-HT par SERT n'est pas différente entre les deux groupes. De ce résultat, il est possible de considérer que la diminution des niveaux extracellulaires en 5-HT est probablement due à une dégradation de celle-ci par le niveau élevé en hMAO-A.

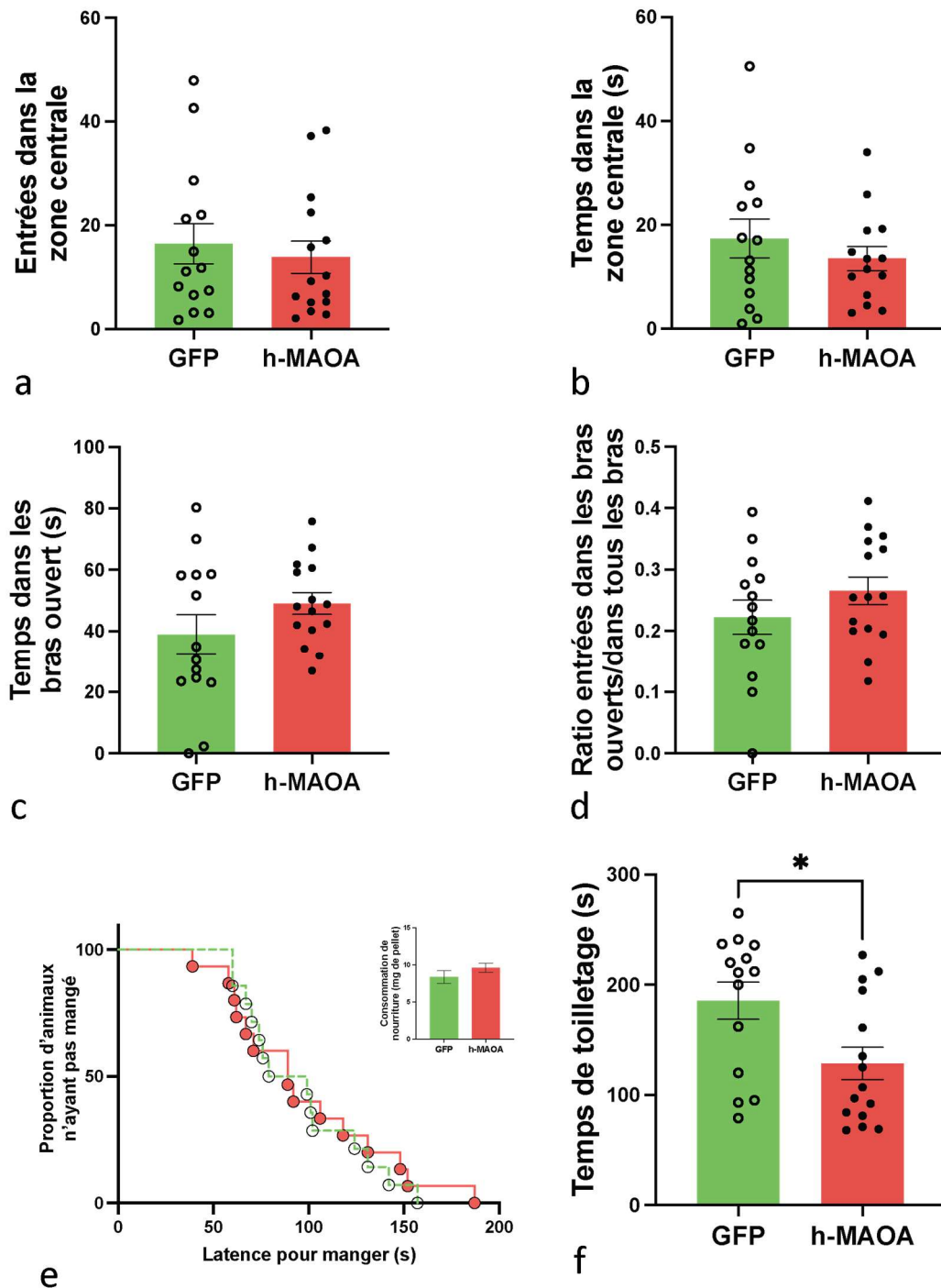


**Figure 31** : Diminution des niveaux basaux en 5-HT dans le mPFC de souris surexprimant la hMAO-A dans les neurones pyramidaux

Le niveau basal en 5-HT dans le mPFC des souris contrôles (n=8) et surexprimant la hMAO-A (n=11) a été déterminé en recourant au protocole de microdialyse en *Zero-Net Flux*. Ce protocole a permis de déterminer le *Not-Net Flux* (a), autrement dit la concentration de 5-HT dans le LCRa à l'entrée de la sonde en équilibre avec la concentration endogène en 5-HT dans le mPFC. Le niveau basal en 5-HT (b) a été déterminé. La pente de la régression linéaire (c) des valeurs obtenues en *Zero-Net Flux* est utilisé comme reflet de l'activité du transporteur SERT. L'ensemble des résultats sont exprimés en moyenne  $\pm$  SEM.

### 2.1.2. Effets de la surexpression de la hMAO-A sur le comportement émotionnel

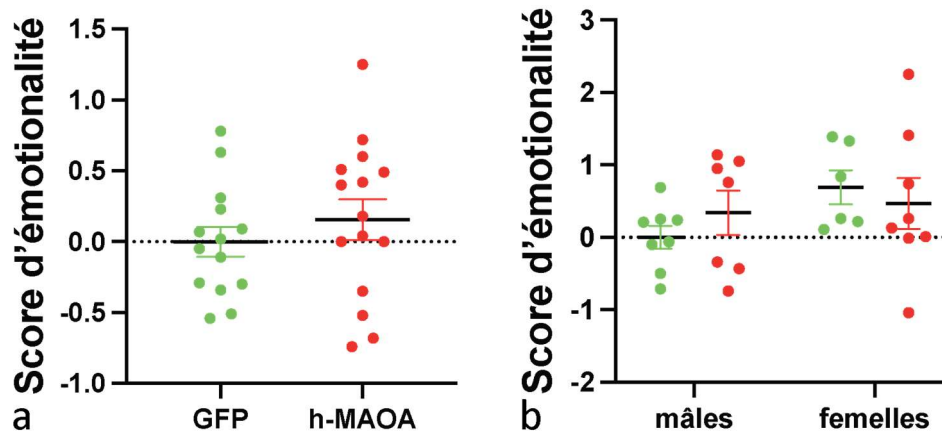
La surexpression de la hMAO-A dans les neurones pyramidaux du mPFC n'a pas d'effet sur le comportement des animaux dans les tests de l'*Open Field* (Figure 32 **a-b**), de l'EPM (Figure 32 **c-d**) et du NSF (Figure 32 **e**). En revanche, la surexpression de la hMAO-A est responsable d'une diminution de 14% du temps de toilettage (185 secondes pour le groupe GFP contre 159 secondes pour le groupe hMAO-A) dans le *splash test* (Figure 32 **f**, *p-value* = 0,014).



**Figure 32 :** Effets comportementaux de la surexpression de la hMAO-A dans les neurones pyramidaux du PFC

Le comportement émotionnel des animaux a été étudié 3 semaines après l'administration des vecteurs viraux dans 4 tests comportementaux successifs, permettant de déterminer 6 paramètres associés à l'émotionnalité des animaux : le nombre d'entrées (a) et le temps passé (b) dans la zone centrale de l'*Open Field*, le temps passé dans les bras ouverts (c) et le ratio entre le nombre d'entrées dans les bras ouverts et le nombre d'entrée dans l'ensemble des bras (d) dans l'EPM, le temps de latence avant de manger le pellette de nourriture (e) lors du test du NSF ainsi que le temps total de toilettage (f) lors du test d'aspersion. Les résultats sont exprimés en moyenne  $\pm$  SEM ;  $\circ$  : groupe GFP (n=14),  $\bullet$  : groupe hMAO-A (n=15).

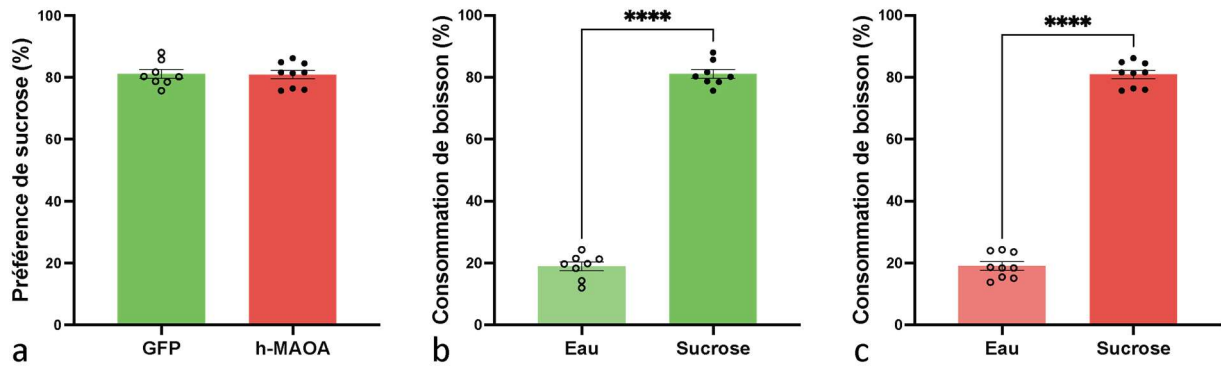
Après normalisation des résultats de chaque paramètre étudié, le score d'émotionnalité est calculé à l'aide de la moyenne des normalisations de chaque paramètre. Aucune différence significative du score d'émotionnalité n'est détectée entre les groupes des souris contrôles et des souris surexprimant la hMAO-A que cela soit d'un point de vue global (Figure 33 a) ou en séparant mâles et femelles (Figure 33 b).



**Figure 33** : Score d'émotionnalité suite à la surexpression de la hMAO-A dans les neurones pyramidaux du PFC

Les normalisations des résultats obtenus pour chacun des paramètres dans les 4 tests comportementaux sont additionnés ou soustraits entre eux, selon respectivement qu'une haute valeur ou une faible valeur soit synonyme d'un effet anxiogène/«dépressiogène». Le score d'émotionnalité est calculé pour chaque groupe (a) ou en fonction de chaque groupe et du sexe (b). Les résultats sont exprimés en moyenne  $\pm$  SEM.

La différence de temps de toilettage entre les groupes GFP et hMAO-A ne semble pas avoir d'incidence sur le score global. De ce fait, nous avons émis l'hypothèse que la différence observée dans le test d'aspersion serait non pas due à un effet dépressiogène mais à un effet anhédonique de l'augmentation d'activité de la MAO-A. Nous avons alors réalisé un test de préférence de sucrose (*Sucrose Preference Test* ou SPT) pour déterminer si cette différence pouvait être due à un effet anhédonique. Dans ce test, les deux groupes démontrent une consommation d'eau sucrée de 81% ( $\pm$  1,4% et 1,3% respectivement pour les groupes GFP et hMAO-A) marquant une préférence forte pour l'eau sucrée pour les souris contrôles (Figure 34 b,  $p$ -value < 0,0001) et les souris surexprimant la hMAO-A (Figure 34 c,  $p$ -value < 0,0001). En revanche, aucune différence de consommation d'eau sucrée entre les deux groupes n'est mise en évidence (Figure 34 a).

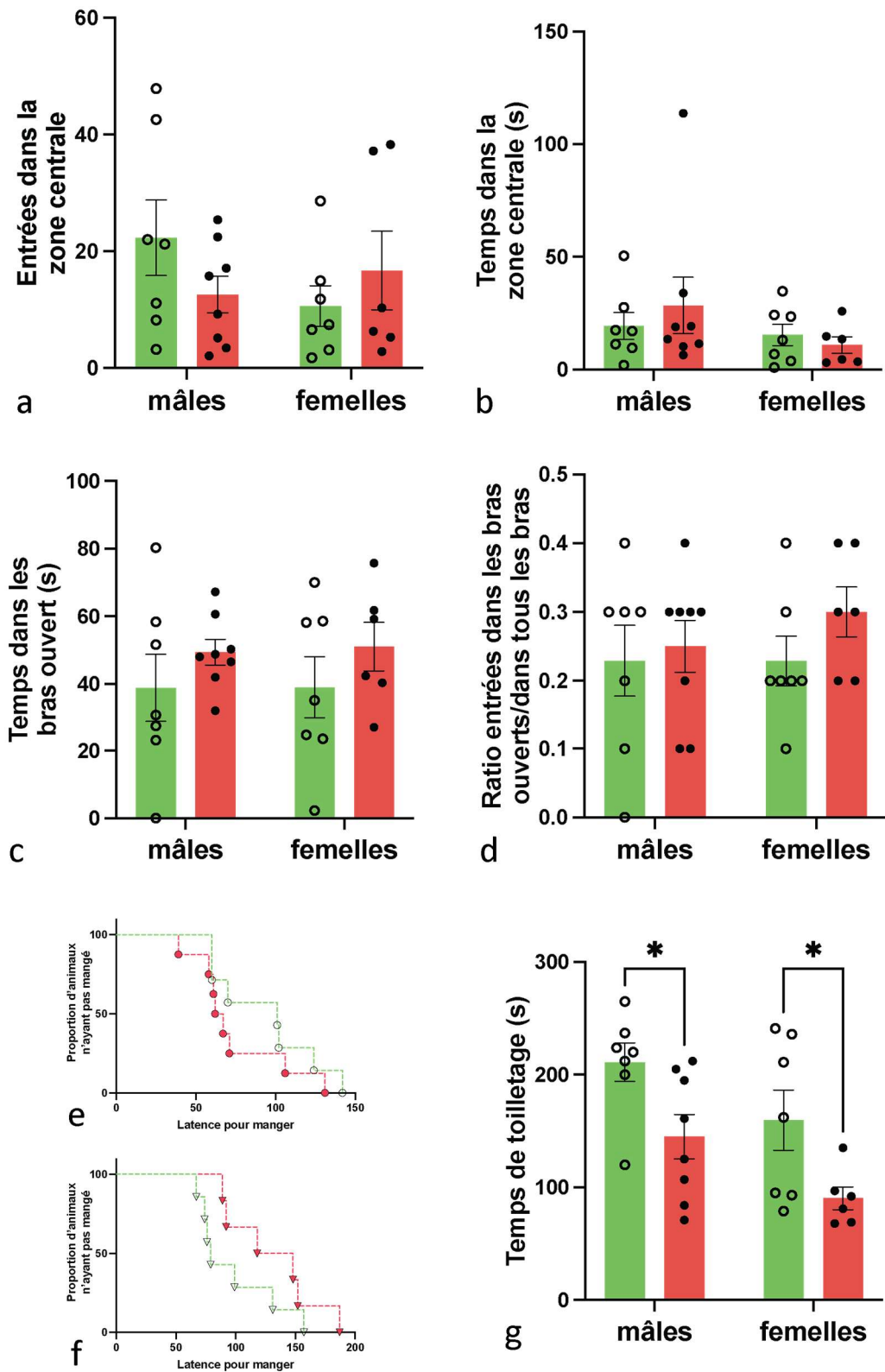


**Figure 34 :** Effet sur le comportement hédonique de la surexpression de hMAO-A dans les neurones pyramidaux du PFC

(a) Proportion de la consommation d'eau sucrée par rapport à la consommation totale ; (b) proportion d'eau brute et d'eau sucrée consommée par les animaux contrôles ; (c) proportion d'eau brute et d'eau sucrée consommée par les animaux surexprimant la hMAO-A dans les neurones pyramidaux du PFC. Les résultats sont exprimés en moyenne  $\pm$  SEM.

Les résultats présentés en Figure 32 regroupent mâles et femelles, ne permettant pas de déterminer si le sexe pouvait avoir une incidence sur les paramètres étudiés. Par conséquent, les valeurs obtenues ont été comparées en séparant les mâles des femelles dans les analyses statistiques. La séparation entre mâles et femelles ne permet pas de détecter de différence liée au sexe dans les 3 premiers tests que sont : l'*open field* (Figure 35 a-b), l'EPM (Figure 35 c-d) ou encore le NSF (Figure 35 e-f).

L'analyse ANOVA à deux facteur du temps de toilettage dans le *Splash Test* (Figure 35 g) montre à la fois un effet de la surexpression de hMAO-A ( $p$ -value  $<$  0,01) et du sexe ( $p$ -value  $<$  0,01), sans qu'il n'y ait d'effet de l'interaction entre ces deux paramètres ( $p$ -value = 0,94). Si les comparaisons multiples confirment que la surexpression de la hMAO-A entraîne une diminution du temps de toilettage chez les mâles ( $p$ -value = 0,024) comme chez les femelles ( $p$ -value = 0,027), elles ne confirment pas significativement un effet sexe au sein de chaque groupe.



**Figure 35** : Effets comportementaux de la surexpression de la hMAO-A dans les neurones pyramidaux du PFC

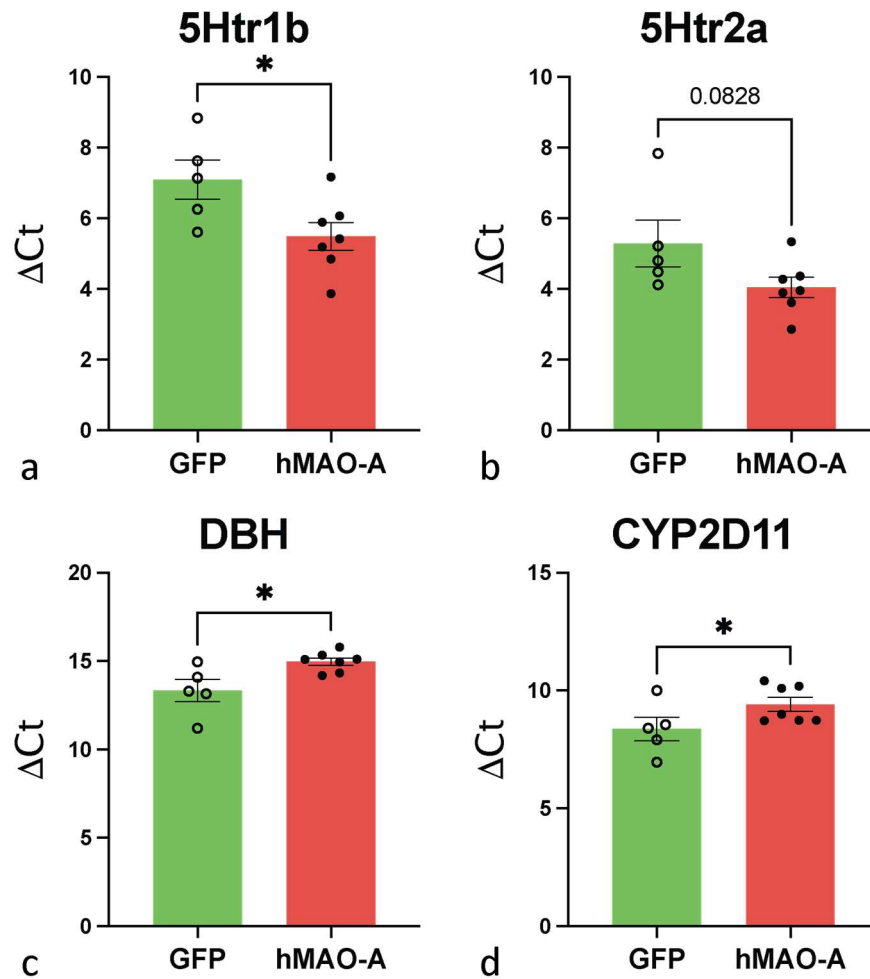
Le comportement émotionnel des animaux a été étudié 3 semaines après l'administration des vecteurs viraux dans 4 tests comportementaux successifs, permettant de déterminer 6 paramètres associés à l'émotionnalité des animaux : le nombre d'entrées (a) et le temps passé (b) dans la zone centrale de l'*Open Field*, le temps passé dans les bras ouverts (c) et le ratio entre le nombre d'entrées dans les bras ouverts et

le nombre d'entrées dans l'ensemble des bras (d) dans l'EPM, le temps de latence avant de manger la pellette de nourriture pour les mâles (e) et pour les femelles (f) lors du test du NSF ainsi que le temps total de toilettage (g) lors du test d'aspersion. Les résultats sont exprimés en moyenne  $\pm$  SEM ;  $\ominus$  : groupe GFP mâle (n=7),  $\nabla$  : groupe GFP femelle (n=7),  $\bullet$  : groupe hMAO-A mâle (n=8),  $\blacktriangledown$  : groupe hMAO-A femelle (n=7).

### 2.1.3. Modulation de l'expression d'autres gènes associés aux voies monoaminergiques en réponse à la surexpression de la MAO-A

En vue de déterminer si la surexpression de la MAO-A pouvait affecter l'expression d'autres gènes impliqués dans les voies monoaminergiques, l'expression transcriptomique d'un grand nombre de gènes impliqués dans ces voies a été quantifiée par RT-qPCR. Il est ainsi possible de constater que la surexpression de la hMAO-A dans le mPFC entraînait la diminution significative de la valeur du  $\Delta$ Ct pour l'ARNm codant pour le récepteur 5Htr1b (Figure 36 **a**,  $p$ -value = 0,035). De manière similaire, il a été observé une tendance à la diminution du  $\Delta$ Ct pour l'ARNm codant pour le récepteur 5Htr2a (Figure 36 **b**,  $p$ -value = 0,08).

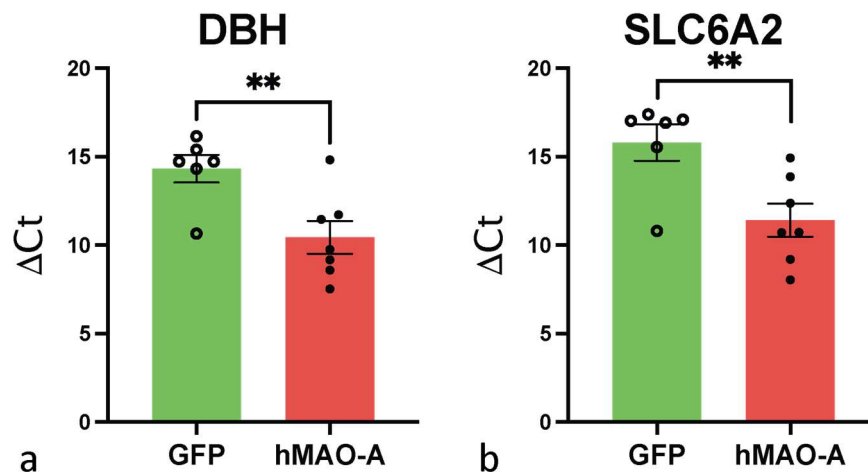
La surexpression de la hMAO-A est aussi responsable dans le mPFC d'une augmentation du  $\Delta$ Ct pour les ARNm codant l'enzyme de synthèse DBH (Figure 36 **c**,  $p$ -value = 0,012) et le cytochrome P450 (Figure 36 **d**,  $p$ -value = 0,04). En revanche, cette surexpression de la hMAO-A n'engendre pas d'adaptation de l'expression du gène endogène de la MAO-A, ni de celui de la MAO-B (Tableau 15,  $p$ -value<sub>(moMAO-A)</sub> = 0,42 et  $p$ -value<sub>(moMAO-B)</sub> = 0,35).



**Figure 36** : Modulation de l'expression de gènes des voies monoaminergiques dans le mPFC en réponse à la surexpression neuronale de la hMAO-A dans le mPFC.

Le niveau d'expression de différents gènes impliqués dans les voies monoaminergiques a été déterminé chez les animaux contrôles (n = 5) et surexprimant la hMAO-A (n = 6 ou 7) par RT-qPCR. Des variations d'expression ont été observées pour les gènes du 5Htr1b (a), du 5Htr2a (b), de la DBH (c) et du cytochrome P450 2D11 (d).

Les corps des neurones sérotoninergiques étant localisés dans les noyaux du raphé, l'expression de l'ensemble des gènes étudiés ci-dessus a également été quantifiée dans cette région. La RT-qPCR a ainsi permis d'identifier deux gènes pour lesquels la valeur du  $\Delta\text{Ct}$  était diminuée, traduisant une augmentation de la quantité initiale d'ARNm pour ces deux gènes : l'expression de l'enzyme DBH est augmentée de 28,5% (Figure 37 a, *p-value* = 0,009) et celle du transporteur SLC6A2 (aussi nommé NET) est augmentée de 31,25% (Figure 37 b, *p-value* = 0,008).



**Figure 37** : Modulation de l'expression de gènes des voies monoaminergiques dans les noyaux du raphé en réponse à la surexpression neuronale de la hMAO-A dans le mPFC

Le niveau d'expression de différents gènes impliqués dans les voies monoaminergiques a été déterminé chez les animaux contrôles ( $n = 5$ ) et surexprimant la hMAO-A ( $n = 7$ ) par RT-qPCR. Des variations d'expression ont été observées pour les gènes de la DBH (a), et du transporteur NET / SLC6A2 (b).

L'expression transcriptomique des autres gènes des voies monoaminergiques étudiés n'est pas modifiée par la surexpression et la hausse d'activité de la MAO-A dans les neurones pyramidaux du mPFC. Les différences de Ct entre les souris contrôles et les souris surexprimant la MAO-A, ainsi que les *p-values* sont indiquées dans le Tableau 15.

L'ensemble des gènes étudiés interviennent de différentes manières dans les voies des monoamines : il a ainsi été étudié des facteurs de transcription connus pour réguler l'expression du gène de la MAO-A, des enzymes de synthèse des monoamines, des récepteurs aux monoamines, des transporteurs et des protéines de la recapture ainsi que des enzymes de dégradation des monoamines.

Nomenclature	Nom	mPFC		Noyaux du raphé	
		$\Delta\Delta C_t$	p-value	$\Delta\Delta C_t$	p-value
<b>Régulation de l'expression génique de la MAO-A (facteurs de transcription)</b>					
CDCA7L (R1)	Cell division cycle associated 7 like	0,11	0,77	-0,65	0,52
FOXO1	Foxhead box O1	-0,12	0,4	0,17	0,62
KLF11	Kruppel-like factor 11	0,13	0,33	-0,11	0,7
SIRT1	Sirtuin 1	-0,73	0,08	-0,07	0,79
SP1	Trans-acting transcription factor 1	0,44	0,24	-0,34	0,6
<b>Synthèse des monoamines</b>					
AANAT	Arylalkylamine N-acetyltransferase	-0,49	0,23	0,61	0,16
CYP2C29	Cytochrome P450 family 2, subfamily c, polypeptide 29	-1,59	0,11	0,9	0,49
CYP2D9	Cytochrome P450 family 2, subfamily d, polypeptide 9	-0,35	0,28	0,25	0,53
CYP2D10	Cytochrome P450 family 2, subfamily d, polypeptide 10	-0,5	0,25	0,19	0,51
CYP2D11	Cytochrome P450 family 2, subfamily d, polypeptide 11	-0,84	0,03	-0,05	0,87
DBH	Dopamine $\beta$ -hydroxylase	-2,07	0,01	3,7	0,02
DDC	Dopa decarboxylase	1,06	0,32	-0,07	0,93
IDO1	Indolamine 2,3-dioxygenase 1	0,74	0,23	2,9	0,29
TH	Tyrosine hydroxylase	0,54	0,45	0,64	0,45
TPH1	Tryptophane hydroxylase	0,48	0,31	0,55	0,60
<b>Signalisation neuronale (récepteurs aux monoamines)</b>					
5HTR1B	Serotonin 1B receptor	1,6	0,04	-0,05	0,93
5HTR2A	Serotonin 2A receptor	1,25	0,08	0,06	0,93
DRD2	Dopamine D2 receptor	0,05	0,96	-0,09	0,89
<b>Transport et recapture</b>					
SLC6A2 (NET)	Solute carrier family 6 member 2	-1,2	0,18	4,24	0,004
SLC6A3 (DAT)	Solute carrier family 6 member 3	-0,44	0,33	-0,77	0,32
SLC6A4 (SERT)	Solute carrier family 6 member 4	-1,83	0,17	2,84	0,18
SLC18A2 (VMAT)	Solute carrier family 18 member 2	-0,37	0,19	-0,13	0,87
SLC22A1 (OCT1)	Solute carrier family 22 member 1	0,04	0,95	0,28	0,44
SLC22A2 (OCT2)	Solute carrier family 22 member 2	-0,44	0,32	0,01	0,99
SLC22A3 (OCT3)	Solute carrier family 22 member 3	1,14	0,12	0,61	0,16
SLC29A4 (PMAT)	Solute carrier family 29 member 4	-1,51	0,26	0,47	0,56
<b>Dégradation des monoamines</b>					
hMAO-A	Monoamine oxidase type A (human gene)	3,54	0,03	-	-
COMT	Catechol-O-methyltransferase	0,41	0,35	-0,32	0,65
moMAO-A	Monoamine oxidase type A (murin gene)	0,07	0,42	0,03	0,9
MAO-B	Monoamine oxidase type B	-0,15	0,35	0,31	0,45
SOD1	Soluble superoxide dismutase 1	-0,66	0,18	0,39	0,25
SOD2	Soluble superoxide dismutase2	1,19	0,13	0	0,99
SOD3	Soluble superoxide dismutase3	-0,26	0,25	-0,23	0,36

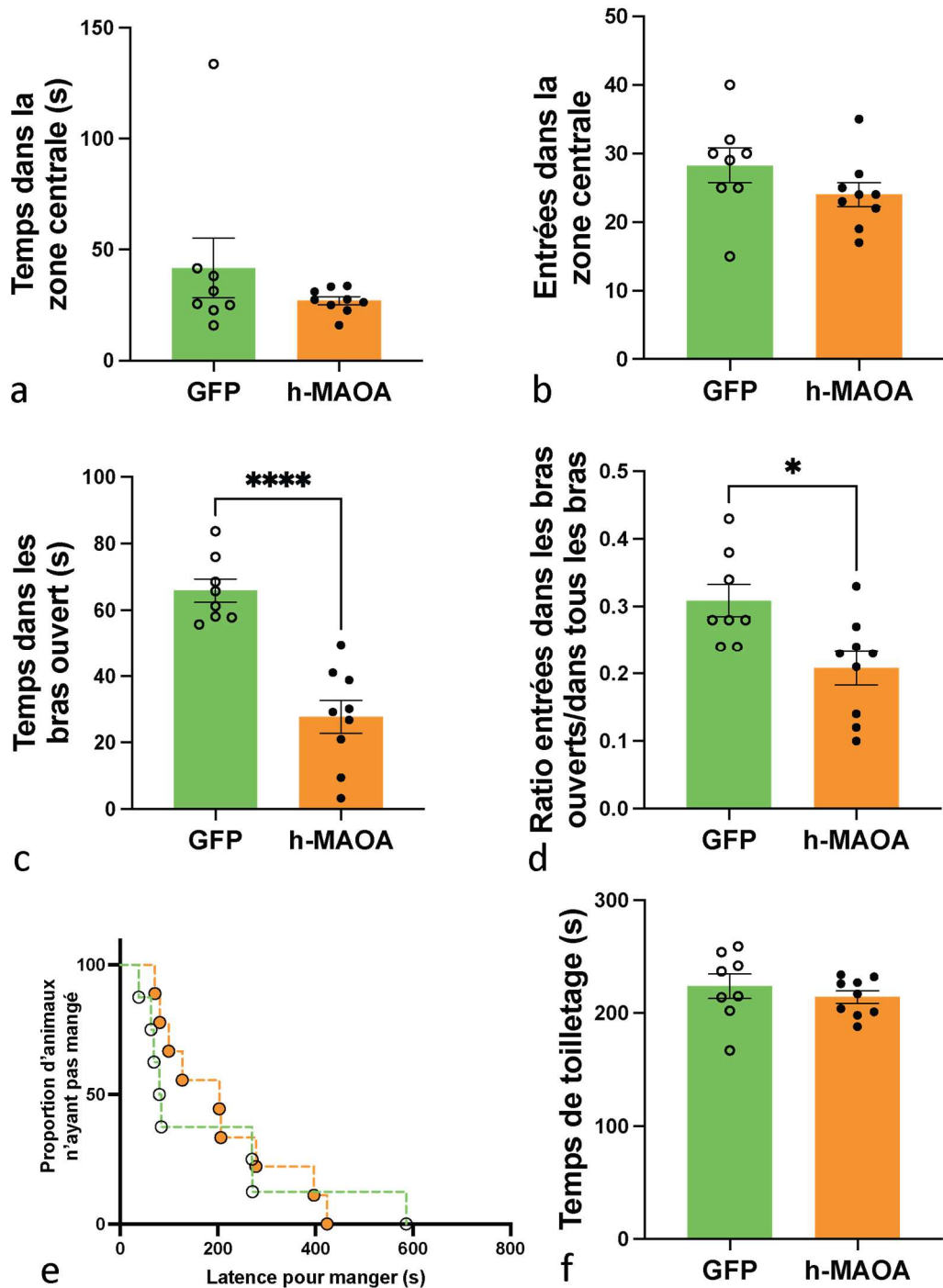
**Tableau 15 :** Différence des niveaux d'ARNm des gènes impliqués dans les voies monoaminergiques.

La valeur du  $\Delta\Delta C_t$  représente la différence de  $C_t$  entre les souris contrôles et les souris surexprimant la MAO-A ( $\Delta C_{t(\text{GFP})} - \Delta C_{t(\text{hMAO-A})}$ ), une valeur positive indiquant un niveau d'expression des ARN<sub>m</sub> plus élevé chez les souris du groupe hMAO-A et une valeur négative indiquant un niveau d'expression des ARN<sub>m</sub> plus élevé chez les souris du groupe contrôle (GFP).

## 2.2. Surexpression de la hMAO-A dans les astrocytes du cortex préfrontal médian : effets sur le comportement émotionnel

De manière similaire à ce qui a été observé chez les souris modélisant une surexpression neuronale de la hMAO-A, la surexpression de la hMAO-A dans les astrocytes du mPFC n'affecte pas le comportement des animaux dans le test de l'*Open Field*, le temps passé et le nombre d'entrée dans la zone centrale ne différant pas de celui des animaux contrôles (Figure 38 **a-b**), ni le comportement dans le test du NSF (Figure 38 **e**). De plus, la surexpression de la hMAO-A au niveau astrocytaire n'induit plus d'effet anhédonique lors du *Splash Test* (Figure 38 **f**) en comparaison de ce qui était observé lorsque la surexpression avait lieu dans les neurones pyramidaux.

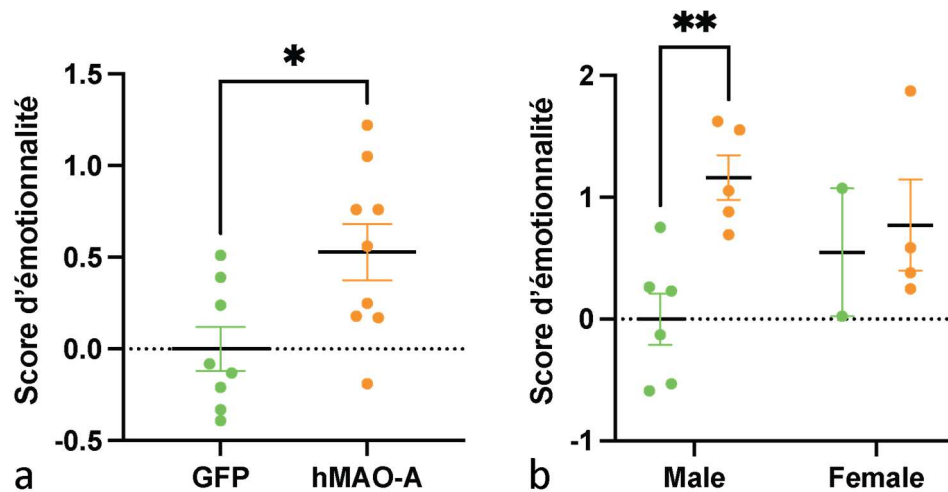
En revanche, la surexpression de la hMAO-A dans les astrocytes est responsable d'un comportement de type anxieux dans le test de l'EPM. En effet, le temps de présence dans les bras ouverts des souris surexprimant l'enzyme est diminué en comparaison des souris contrôles (Figure 38 **c**,  $p\text{-value} < 10^{-4}$ ); de plus, le ratio des entrées dans les bras ouverts sur la somme des entrées dans tous les bras est également significativement réduit chez les animaux en comparaison des animaux contrôles (Figure 38 **d**,  $p\text{-value} = 0,011$ ).



**Figure 38** : Effets comportementaux de la surexpression de la hMAO-A dans les astrocytes du PFC

Le comportement émotionnel des animaux a été étudié 3 semaines après l'administration des vecteurs viraux dans 4 tests comportementaux successifs, permettant de déterminer 6 paramètres associés à l'émotionnalité des animaux : le nombre d'entrées (a) et le temps passé (b) dans la zone centrale de l'*Open Field*, le temps passé dans les bras ouverts (c) et le ratio entre le nombre d'entrées dans les bras ouverts et le nombre d'entrée dans l'ensemble des bras (d) dans l'EPM, le temps de latence avant de manger le pellette de nourriture (e) lors du test du NSF ainsi que le temps total de toiletteage (f) lors du test d'aspersion. Les résultats sont exprimés en moyenne  $\pm$  SEM ;  $\circ$  : groupe GFP (n= 8),  $\bullet$  : groupe hMAO-A (n= 9).

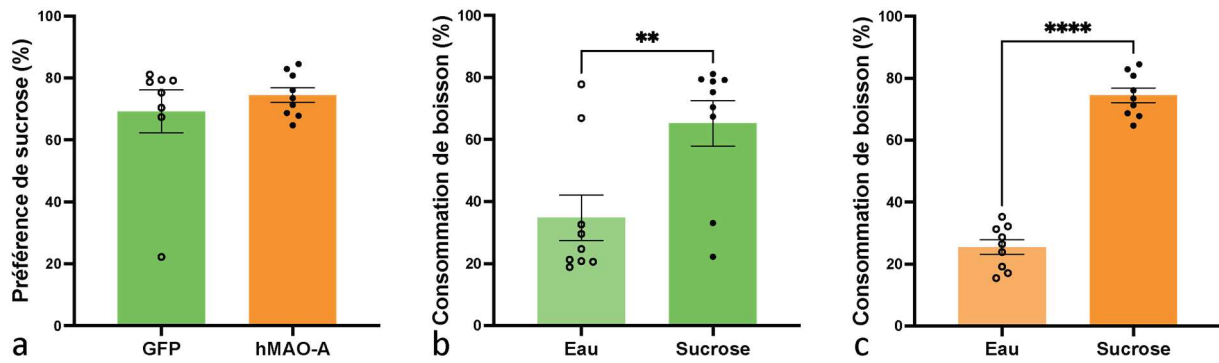
Comme précédemment (cf § 2.1.2), le score d'émotionnalité a été calculé pour les animaux surexprimant la hMAO-A dans les astrocytes du mPFC et les animaux contrôles. Nous pouvons ainsi constater que la surexpression de la hMAO-A au niveau astrocytaire dans le mPFC entraînait une augmentation du score d'émotionnalité (Figure 39 a,  $p$ -value = 0,004), caractéristique d'un phénotype émotionnel de type anxieux-dépressif. En séparant mâles et femelles pour les deux groupes, et en normalisant à partir de la moyenne du groupe contrôle des mâles, l'augmentation du score d'émotionnalité chez les mâles surexprimant la hMAO-A est retrouvée (Figure 39 b,  $p$ -value = 0,034) ; en revanche, les trop faibles effectifs pour les deux groupes de femelles ne permettent pas de conclure sur l'effet de la surexpression au niveau du comportement émotionnel.



**Figure 39** : Score d'émotionnalité suite à la surexpression de la hMAO-A dans les astrocytes du PFC

Les normalisations des résultats obtenus pour chacun des paramètres dans les 4 tests comportementaux sont additionnés ou soustraits entre eux, selon respectivement qu'une haute valeur ou une faible valeur est synonyme d'un effet anxiogène/«dépressiogène». Le score d'émotionnalité est calculé pour chaque groupe (a) ou en fonction de chaque groupe et du sexe (b). Les résultats sont exprimés en moyenne  $\pm$  SEM.

Nous nous sommes aussi intéressés à l'effet d'une surexpression de la hMAO-A sur l'appétence envers une boisson sucrée. Ainsi, comme nous avons pu constater précédemment (cf §2.1.2), les souris du groupe contrôle comme les souris du groupe hMAO-A ont une appétence plus élevée pour l'eau sucrée à 2% que pour l'eau conventionnelle (Figure 40 b,  $p$ -value = 0,01 ; Figure 40 c,  $p$ -value <  $10^{-4}$ ). De plus, et de manière similaire à la cohorte surexprimant la hMAO-A dans les neurones pyramidaux, aucune différence de proportion de consommation d'eau sucrée n'est détectée entre les animaux contrôle et les animaux surexprimant la hMAO-A dans les astrocytes (Figure 40 a).

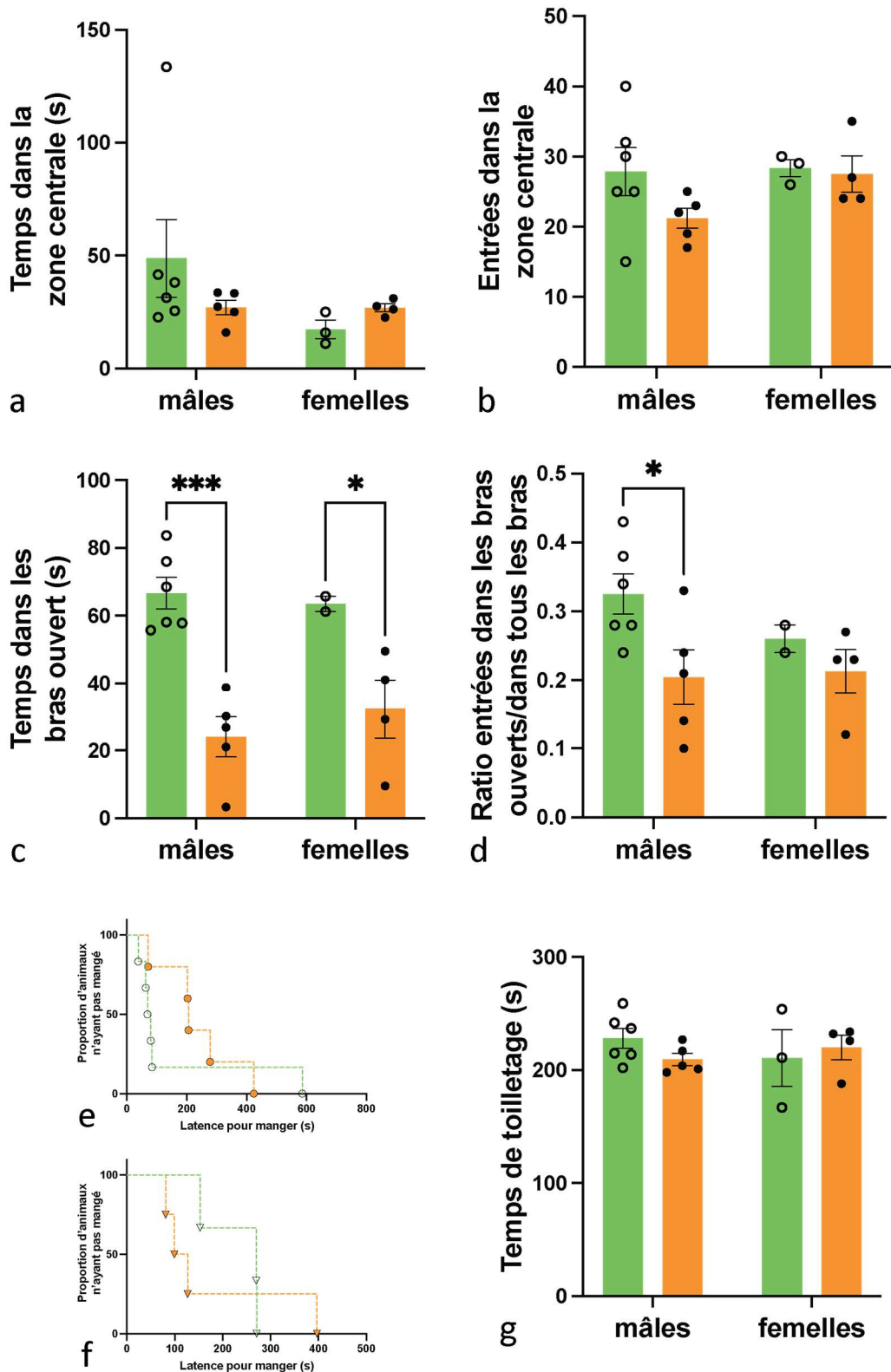


**Figure 40** : Effet sur le comportement hédonique de la surexpression de hMAO-A dans les astrocytes du PFC

(a) Proportion de la consommation d'eau sucrée par rapport à la consommation totale ; (b) proportion d'eau brute et d'eau sucrée consommée par les animaux contrôles ; (c) proportion d'eau brute et d'eau sucrée consommée par les animaux surexprimant la hMAO-A dans les astrocytes du PFC. Les résultats sont exprimés en moyenne  $\pm$  SEM.

Comme précédemment (cf 2.1.2), les résultats présentés dans la Figure 38 correspondent aux résultats obtenus dans les différents tests comportementaux en regroupant mâles et femelles : les analyses statistiques ont donc été réalisées dans un second temps en séparant mâles et femelles.

La séparation entre les mâles et les femelles confirme pour chaque sexe ce qui est observé dans les résultats globaux (Figure 41) : aucune différence de comportement n'est observée dans les tests de l'*open field* (Figure 41 **a-b**), du NSF (Figure 41 **e-f**) et du *Splash Test* (Figure 41 **g**) tandis qu'une diminution du temps passé dans les bras ouverts chez les mâles comme les femelles est observée dans l'EPM (Figure 41 **c**,  $p$ -value =  $10^{-4}$  et  $1,7 \cdot 10^{-2}$  respectivement pour les mâles et les femelles). De manière étonnante, lorsque l'on calcule le ratio du nombre d'entrées dans les bras ouverts reporté à celui dans l'ensemble des bras, on constate que la diminution n'est retrouvée que pour les mâles (Figure 41 **d**,  $p$ -value =  $1,8 \cdot 10^{-2}$ ) mais plus pour les femelles.



**Figure 41** : Effets comportementaux de la surexpression de la hMAO-A dans les astrocytes du PFC

Le comportement émotionnel des animaux a été étudié 3 semaines après l'administration des vecteurs viraux dans 4 tests comportementaux successifs, permettant de déterminer 6 paramètres associés à l'émotionnalité des animaux : le nombre d'entrées (a) et le temps passé (b) dans la zone centrale de l'*Open Field*, le temps passé dans les bras ouverts (c) et le ratio entre le nombre d'entrées dans les bras ouverts et le nombre d'entrée dans l'ensemble des bras (d) dans l'EPM, le temps de latence avant de manger le pellette

de nourriture pour les mâles (e) et pour les femelles (f) lors du test du NSF ainsi que le temps total de toilettage (g) lors du test d'aspersion. Les résultats sont exprimés en moyenne  $\pm$  SEM ;  $\ominus$  : groupe GFP mâle (n = 6),  $\nabla$  : groupe GFP femelle (n = 2),  $\bullet$  : groupe hMAO-A mâle (n = 5),  $\blacktriangledown$  : groupe hMAO-A femelle (n = 3).

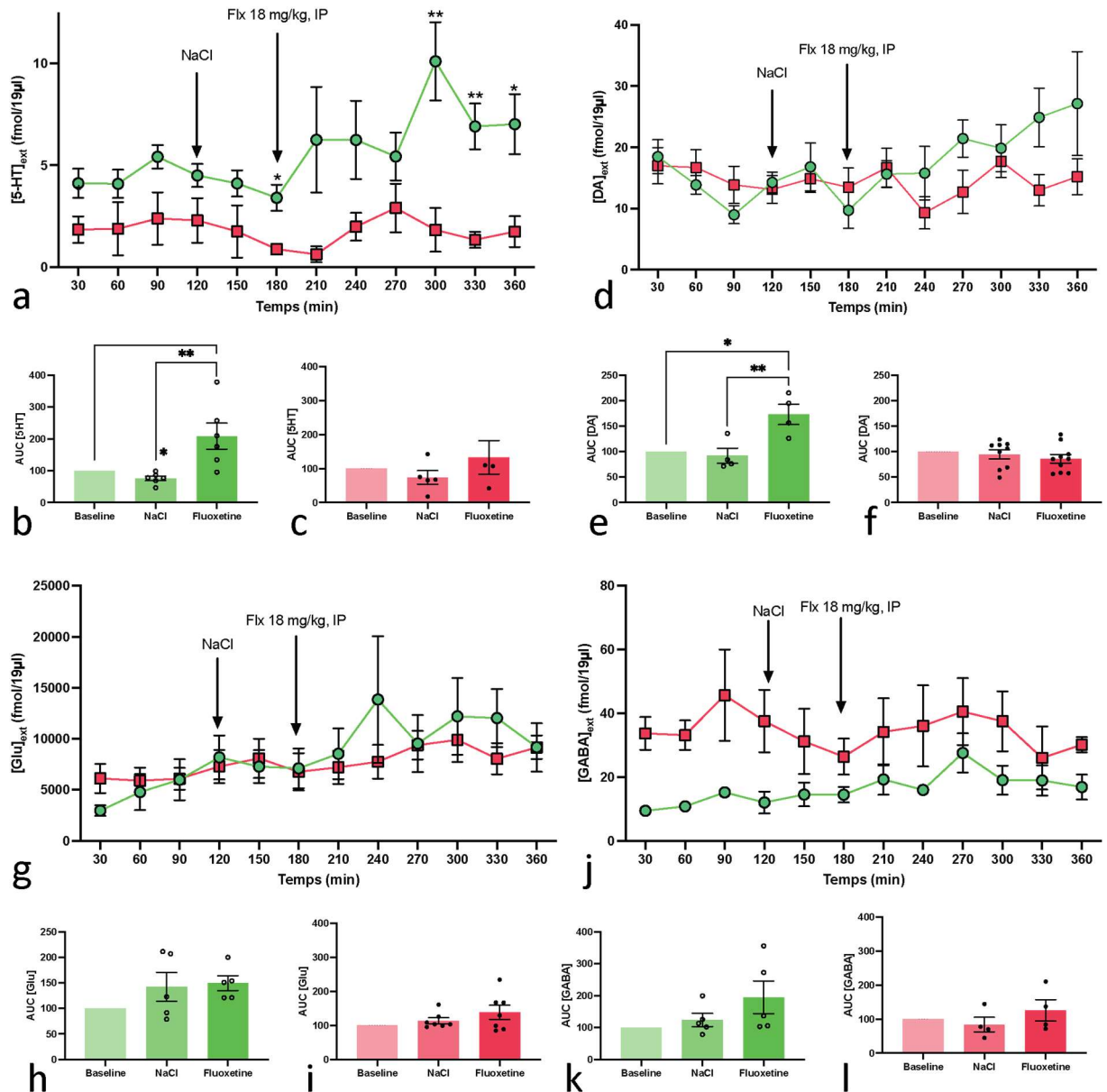
### **3. Effets de l'augmentation d'expression et d'activité de la MAO-A sur la réponse à des antidépresseurs**

#### **3.1. Réponse à un ISRS**

L'administration de Flx à la dose de 18mg/kg de masse corporelle induit chez les souris contrôles (ayant reçu le transgène de la GFP seul) une augmentation des niveaux extracellulaires de 5-HT qui n'est pas retrouvée chez les souris surexprimant la hMAO-A dans les neurones pyramidaux. De plus, il apparaît que le niveau extracellulaire basal en 5-HT chez les souris surexprimant la hMAO-A est inférieur à celui mesuré chez les animaux contrôles, confirmant les résultats obtenus lors de la microdialyse avec le protocole de *Zero-Net Flux*.

Pour la DA, le calcul des AUC met en évidence une augmentation du niveau de DA libérée dans le parenchyme cérébral du mPFC suite à l'administration de Flx chez les souris contrôles qui n'est pas retrouvé chez les souris surexprimant la hMAO-A dans les neurones pyramidaux. Toutefois, cette augmentation n'est pas retrouvée lorsque l'on compare les concentrations à chaque point temporel (Figure 42d). Dans le cas du glutamate et du GABA, aucune variation des niveaux n'est observée suite à l'injection de Flx.

Il est à noter que l'injection de NaCl (et donc le geste d'injection en i.p. en lui-même) n'a pas d'effet significatif sur les niveaux des différents neurotransmetteurs étudiés.

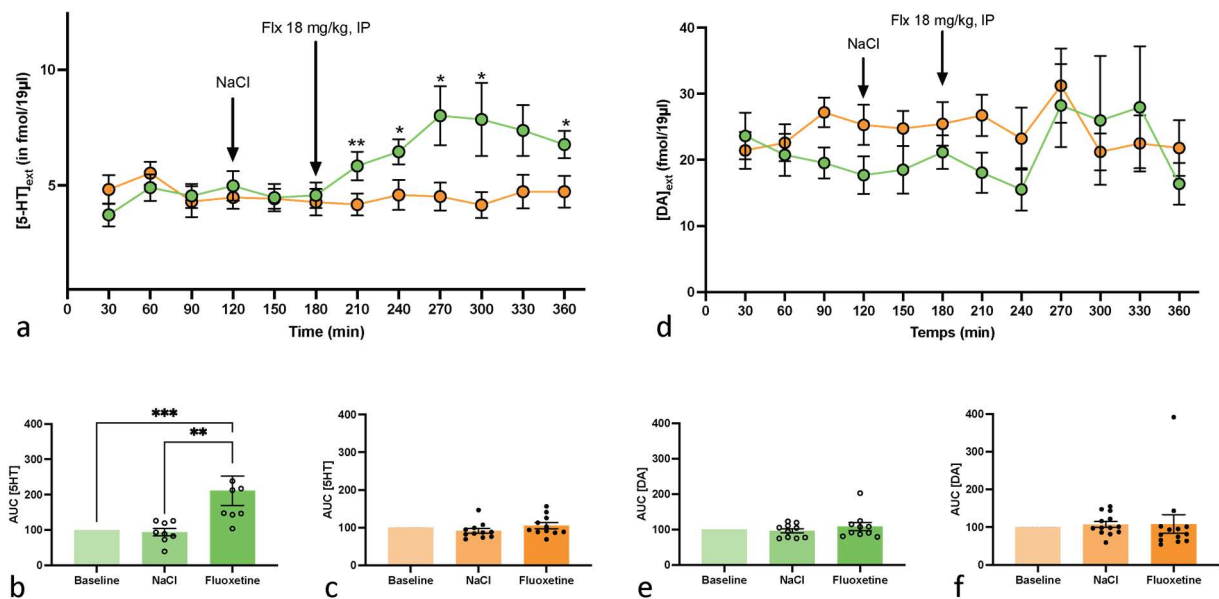


**Figure 42 :** Réponse neurochimique à un traitement aiguë par la Flx après surexpression de hMAO-A dans les neurones pyramidaux

Les niveaux extracellulaires de la 5-HT (a), de la DA (d), du glutamate (g) et du GABA (j) ont été déterminés à partir des dialysats dans une condition de repos (état basal), suite à l'administration d'une solution de NaCl puis de l'administration de Flx chez des souris contrôles (n=6) et surexprimant la hMAO-A dans les neurones pyramidaux (n=5). Le calcul des AUC des courbes suite à l'injection de NaCl ou de Flx pour chaque neurotransmetteur étudié (5-HT : b et c, DA : e et f, glutamate : h et i, GABA : k et l) indépendamment pour les souris contrôles (b, e, h et k) et celles exprimant la hMAO-A (c, f, i et l). Les dosages des neurotransmetteurs ont été dosés en fmol dans 19µL pour la 5-HT et la DA et en nM pour le glutamate et le GABA ; les AUC après injection de NaCl et de Flx sont exprimés en pourcentage par rapport à l'AUC du niveau basal (*baseline*). L'ensemble des résultats sont exprimés en moyenne ± SEM ; ● : groupe GFP, ■ : groupe hMAO-A.

Chez les souris ayant reçu un vecteur viral ciblant les astrocytes, l'administration de Flx entraîne une augmentation des niveaux extracellulaires en 5-HT dans le mPFC des souris du groupe contrôle qui n'est pas retrouvée chez les souris surexprimant dans les astrocytes la hMAO-A. De manière surprenante, aucune différence de niveau basal en 5-HT n'est détectée entre les deux groupes de souris.

De la même manière que précédemment, aucune variation significative des niveaux de DA n'est observée après administration aiguë de Flx, que ce soit chez les souris contrôles ou chez les souris surexprimant la hMAO-A.



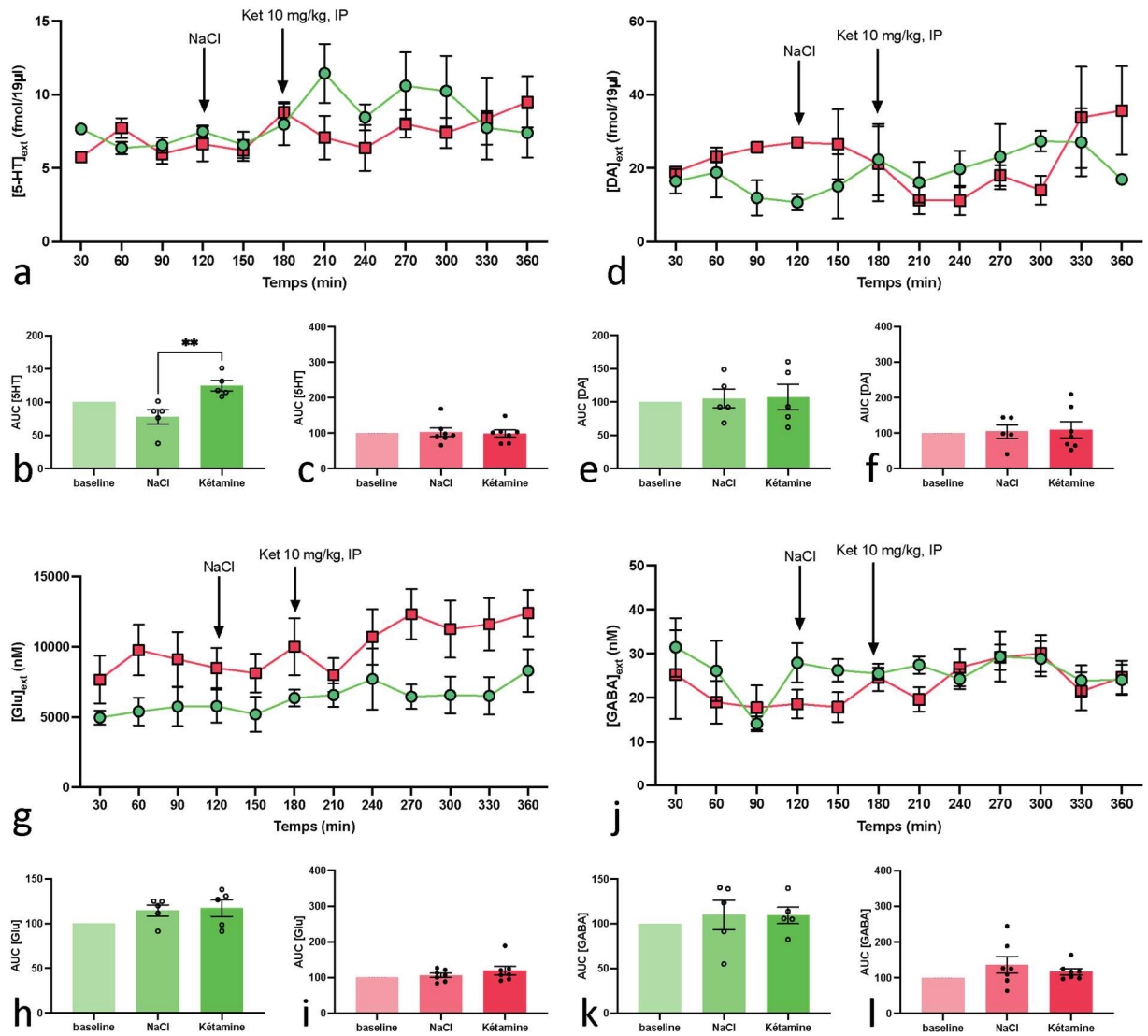
**Figure 43 :** Réponse neurochimique à un traitement aiguë par la Flx après surexpression de hMAO-A dans les astrocytes

Les niveaux extracellulaires de la 5-HT (a) et de la DA (d) ont été déterminés à partir des dialysats dans une condition de repos (état basal), suite à l'administration d'une solution de NaCl puis de l'administration de Flx chez des souris contrôles (n=10) et surexprimant la hMAO-A dans les astrocytes (n=11). Le calcul des AUC des courbes suite à l'injection de NaCl ou de Flx pour chaque neurotransmetteur étudié (5-HT : b et c, DA : e et f) indépendamment pour les souris contrôles (b et e) et celles exprimant la hMAO-A (c et f). Les dosages des neurotransmetteurs ont été dosés en fmol dans 19µL ; les AUC après injection de NaCl et de Flx sont exprimés en pourcentage par rapport à l'AUC du niveau basal (*baseline*). L'ensemble des résultats sont exprimés en moyenne ± SEM ; ● : groupe GFP, ● : groupe hMAO-A.

### 3.2. Réponse à un antidépresseur non-monoaminergique, la kétamine

L'administration de kétamine chez les souris contrôles (exprimant uniquement la GFP dans les neurones pyramidaux) induit une augmentation significative de l'AUC moyenne de la courbe des concentrations en 5-HT (Figure 44 **b**, *p-value* : 0,002). En revanche, aucune variation significative n'est observée chez les animaux surexprimant la hMAO-A dans les neurones pyramidaux (Figure 44 **c**). De manière surprenante, si le calcul des AUC montre une variation de  $[5\text{-HT}]_{\text{ext}}$  uniquement pour les souris contrôles et pas les souris surexprimant la hMAO-A, aucune différence significative de concentration n'est détectée en comparaison directe à chaque temps de mesure (Figure 44 **a**).

Tout comme ce que nous avons observé lorsque l'on administrait de la Flx, la kétamine n'induit pas de variation significative des niveaux extracellulaires de DA, de GABA ou de glutamate (Figure 44 **d-I**).

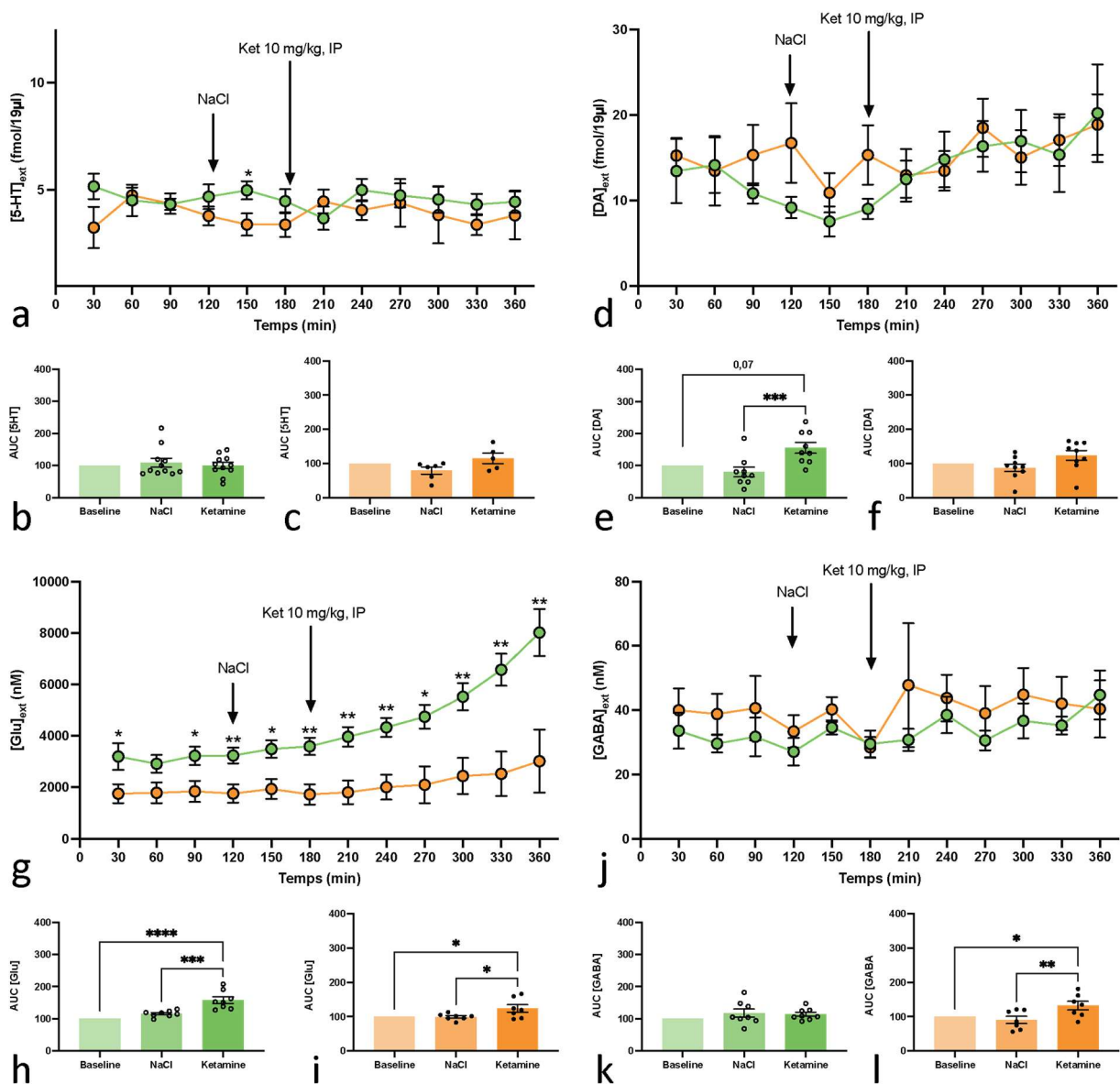


**Figure 44** : Réponse neurochimique à un traitement aiguë par la Ket après surexpression de hMAO-A dans les neurones pyramidaux

Les niveaux extracellulaires de la 5-HT (a), de la DA (d), du glutamate (g) et du GABA (j) ont été déterminés à partir des dialysats dans une condition de repos (état basal), suite à l'administration d'une solution de NaCl puis de l'administration de Ket chez des souris contrôles (n=6) et surexprimant la hMAO-A dans les neurones pyramidaux (n=7). Le calcul des AUC des courbes suite à l'injection de NaCl ou de Ket pour chaque neurotransmetteur étudié (5-HT : b et c, DA : e et f, glutamate : h et i, GABA : k et l) indépendamment pour les souris contrôles (b, e, h et k) et celles exprimant la hMAO-A (c, f, i et l). Les dosages des neurotransmetteurs ont été dosés en fmol dans 19µL pour la 5-HT et la DA et en nM pour le glutamate et le GABA ; les AUC après injection de NaCl et de Flx sont exprimés en pourcentage par rapport à l'AUC du niveau basal (*baseline*). L'ensemble des résultats sont exprimés en moyenne ± SEM ; ● : groupe GFP, ■ : groupe hMAO-A.

L'administration de kétamine chez les animaux contrôles comme chez les animaux surexprimant la MAO-A dans les astrocytes n'induit pas de variation du niveau de 5-HT ni du GABA. En revanche, et contrairement à ce qui était observé chez les animaux contrôles de

l'expérience précédente, l'administration aiguë de kétamine induit une augmentation de la concentration extracellulaire en DA dans le mPFC, hausse qui n'est pas retrouvée chez les animaux surexprimant la hMAO-A dans les astrocytes. De la même manière, une augmentation significative de la concentration extracellulaire en glutamate est observée à la fois chez les animaux du groupe contrôle et chez les animaux surexprimant la hMAO-A, avec toutefois un effet plus marqué chez les animaux contrôles. Toutefois, aucune différence significative n'est détectée entre les groupes lorsque le rati $\text{o}$ n GABA/glutamate (mais cela semble davantage s'expliquer par des écart-types importants pour les valeurs obtenues chez les animaux surexprimant la hMAO-A).



**Figure 45 :** Réponse neurochimique à un traitement aiguë par la Ket après surexpression de hMAO-A dans les astrocytes

Les niveaux extracellulaires de la 5-HT (a) et de la DA (d) ont été déterminés à partir des dialysats dans une condition de repos (état basal), suite à l'administration d'une solution de NaCl puis de l'administration de Ket chez des souris contrôles (n=11) et surexprimant la hMAO-A dans les astrocytes (n=9). Le calcul des AUC des courbes suite à l'injection de NaCl ou de Flx pour chaque neurotransmetteur étudié (5-HT : b et c, DA : e et f) indépendamment pour les souris contrôles (b et e) et celles exprimant la hMAO-A (c et f). Les dosages des neurotransmetteurs ont été dosés en fmol dans 19 $\mu$ L ; les AUC après injection de NaCl et de Ket sont exprimés en pourcentage par rapport à l'AUC du niveau basal (*baseline*). L'ensemble des résultats sont exprimés en moyenne  $\pm$  SEM ; ● : groupe GFP, ● : groupe hMAO-A.

---

# Discussion

---



Le TDC constitue le trouble mental le plus fréquent et la principale cause d'invalidité dans le monde selon l'OMS. Bien que les mécanismes neurobiologiques et cellulaires précis impliqués dans la survenue de la pathologie ne soient pas identifiés, une des hypothèses de l'émergence du TDC est une déplétion en neurotransmetteurs monoaminergiques (5-HT, NA, DA), par une augmentation d'expression et d'activité de la MAO-A.

Mon projet a donc consisté à étudier les effets neurochimiques, neurobiologiques et comportementaux d'une surexpression de ladite enzyme.

## **1. La surexpression de la MAO-A augmente l'activité de l'enzyme**

---

Comme nous l'avons dit précédemment, les troubles dépressifs (TDC, post-partum, choc posttraumatique, etc...) se caractérisent par une augmentation des niveaux en MAO-A, que cela soit chez les patients ou dans les modèles *in vivo*. De ce fait, afin de déterminer les conséquences induites par une augmentation de l'activité de la MAO-A sur le comportement comme au niveau cellulaire, il était nécessaire de mettre au point un nouveau modèle expérimental reposant sur la surexpression de la MAO-A, aucun modèle permettant cette augmentation d'expression n'ayant été développé à ce jour. La surexpression est induite par un vecteur injecté dans la région cérébrale étudiée contenant une version humaine sans intron du gène de la MAO-A précédé d'un promoteur spécifique, constitutivement actif. L'usage d'un vecteur viral, outre une meilleure praticité que la création d'une lignée transgénique, a permis de cibler spécifiquement un type cellulaire (neurones pyramidaux ou astrocytes) pour la surexpression.

Pour induire la surexpression de la hMAO-A dans les neurones du mPFC, deux vecteurs viraux différents ont été développés, l'un contenant un transgène permettant la surexpression de la hMAO-A dans l'ensemble des neurones exprimant la synapsine 1 (Syn<sup>+</sup>), le second ne permettant son expression que dans les neurones pyramidaux (par utilisation d'une lignée de souris exprimant la recombinaise Cre). Après immunomarquage, il s'est avéré que le vecteur ciblant spécifiquement les neurones pyramidaux permettait une meilleure expression de la hMAO-A transgénique en comparaison du vecteur viral ciblant l'ensemble des neurones Syn<sup>+</sup>. De ce fait, il fut décidé de poursuivre l'étude dans les neurones du PFC en recourant au vecteur viral ciblant les neurones pyramidaux.

L'expression de la hMAO-A transgénique suite à l'injection du vecteur viral a été confirmée par analyse transcriptomique (RT-qPCR) et Western Blot, montrant une augmentation d'expression protéique de la MAO-A de 97%. Ce quasi-doublement de la quantité d'enzyme

produite au sein des neurones pyramidaux du mPFC est associé à une augmentation d'activité enzymatique de 67% (et non un doublement de cette activité). Cette différence pourrait s'expliquer par une variabilité méthodologique : si l'analyse de l'activité enzymatique est quantitative, la détermination des niveaux protéiques par Western Blot demeure semi-quantitative.

Par ailleurs, il est à noter que lors de la RT-qPCR les amorces permettant d'amplifier l'ARNm codant la hMAO-A transgénique ont également permis la production d'un produit d'amplification dans les extraits de mPFC des souris contrôles, n'ayant pas reçu le transgène de la MAO-A humaine. Cette amplification pourrait s'expliquer par un manque de spécificité suffisant des amorces qui auraient permis, dans une moindre mesure, d'amplifier également les ARNm codant pour la MAO-A endogène. La détection par qPCR des ARNm codant spécifiquement pour la MAOA humaine et murine est difficile du fait d'une forte homologie de séquence (86%). Des tests d'amorces sont en cours afin de pouvoir tenter de les détecter séparément.

## **2. La surexpression neuronale de la MAO-A affecte l'homéostasie de la 5-HT**

---

La dépression, trouble psychiatrique le plus fréquent et première cause d'invalidité dans le monde, a longtemps été associée à un déficit en neurotransmetteurs de type monoaminergique (Freis 1954). Plus récemment, il a été constaté que l'expression et l'activité de la MAO-A, enzyme responsable de la dégradation de la 5-HT et de la NA, étaient augmentées dans les régions cérébrales associées à la régulation de l'humeur chez les patients souffrant de TDC (Meyer, Ginovart et al. 2006), cette augmentation d'activité étant par ailleurs corrélée au degré de sévérité de la pathologie (Chiuccariello, Houle et al. 2014).

Les analyses neurochimiques effectuées chez les souris surexprimant la hMAO-A ont mis en évidence que cette surexpression était à l'origine d'un déficit en 5-HT dans la région-même où l'activité enzymatique de la MAO-A était augmentée. Toutefois, et ce même si l'un des substrats de l'enzyme est la 5-HT, d'autres mécanismes pourraient expliquer une diminution des niveaux extracellulaires en 5-HT, la microdialyse n'apportant un reflet que de la concentration en neurotransmetteurs présents dans l'environnement externe aux cellules et non stockés au sein de leur cytoplasme. L'activité et l'expression du transporteur qui assure la recapture de la 5-HT, le transporteur SERT, ont donc également été étudiées. L'activité de SERT, approchée de manière indirecte par une valeur obtenue en microdialyse par *Zero-Net*

*Flux*, n'est pas modulée par la hausse d'activité MAO-A ; de la même manière, l'expression (à tout le moins transcriptomique) de SERT n'est pas impactée par cette hausse. Par conséquent, la déplétion en 5-HT extracellulaire observée suite à la hausse d'activité de la hMAO-A est, *a fortiori*, due à l'action directe de l'enzyme : la surexpression de l'enzyme permet la prise en charge des monoamines par une plus grande quantité d'enzymes et donc la dégradation d'une plus grande quantité de neuromédiateurs.

### **3. Réponse cellulaire à une augmentation d'activité de la MAO-A**

---

L'augmentation d'activité de la MAO-A induite par la surexpression de l'enzyme est responsable d'une modification de l'activité transcriptomique de plusieurs gènes participant aux voies des monoamines, et notamment dans la signalisation induite par la 5-HT (récepteurs 5HT<sub>1B</sub> et 5HT<sub>2A</sub>) ainsi que dans le métabolisme des monoamines (voie de synthèse, recapture et dégradation, affectant l'expression de DBH, du cytochrome 2D11 et NET).

Les récepteurs 5HT<sub>1B</sub> et 5HT<sub>2A</sub> sont associés aux effets antidépresseurs, que cela soit par leur activation ou leur inhibition. Ainsi, l'absence d'expression de l'autorécepteur 5HT<sub>1B</sub> (récepteur exprimé sur les neurones présynaptiques, assurant un rétrocontrôle inhibiteur en cas de hausse de la libération de 5-HT) est associée à une diminution des comportements de type anxio-dépressif (Nautiyal, Tritschler et al. 2016) tandis que l'activation de l'hétérorécepteur post-synaptique de 5HT<sub>1B</sub> engendre un effet antidépresseur (Chenu, David et al. 2008). De manière similaire, l'inhibition de l'expression du récepteur 5-HT<sub>2A</sub> engendre un effet antidépresseur (Sibille, Sarnyai et al. 1997). Ces différentes observations et le rôle que joue ces récepteurs dans les effets antidépresseurs suggèrent un possible rôle également dans les mécanismes associés à l'émergence de la dépression.

L'augmentation d'expression de ces deux récepteurs en réponse à la hausse d'activité de la MAO-A serait un mécanisme de compensation à la baisse des niveaux extracellulaires en 5-HT : l'augmentation de la densité en récepteurs permettrait d'augmenter la probabilité de fixer la 5-HT libre dans la fente synaptique afin de limiter la réduction du signal post-synaptique engendrer à la suite de la perte de 5-HT.

La hausse d'expression de la MAO-A induit également une légère diminution de la transcription du gène du cytochrome 2D11. La précédente étude menée sur les cytochromes de

la famille 2D (famille impliquée dans les voies de synthèse de la 5-HT et de la DA) ne démontrait pas de modification de l'activité de ces cytochromes dans le modèle UCMS dans la plupart des régions cérébrales, à l'exception de l'hippocampe où elle était augmentée (Haduch, Rysz et al. 2018). Les cytochromes de la sous-famille 2D pouvant également intervenir dans la synthèse des neurotransmetteurs de type monoamine en parallèle des TH et TPH (Haduch, Bromek et al. 2023), la surexpression de l'isoforme 2D11 suggère une hausse d'activité de ce dernier en vue de tenter de palier au déficit en 5-HT lié à sa dégradation suite à la surexpression de la MAO-A. Ce mécanisme apparaît par ailleurs comme une compensation pour la synthèse de 5-HT en absence de réponse de la TPH-1, principale enzyme impliquée dans la synthèse de la 5-HT.

Outre le système sérotoninergique, le système noradrénergique apparaît lui aussi impacté par la surexpression et la hausse d'activité de la MAO-A. En effet, l'expression de la DBH, enzyme produisant de la NA à partir de la DA, est sous-exprimée au niveau du mPFC mais davantage exprimée dans le cerveau postérieur, surexpression associée à une hausse des niveaux de transcript du transporteur NET. L'analyse approfondie de la littérature montre que l'activité de la DBH a été observée diminuée dans le plasma de patients souffrant de dépression, tant chez les enfants (Paclt, Koudelova et al. 2009) que chez les adultes (Puzynski, Rode et al. 1983).

Les éléments à notre disposition n'étant pas suffisants pour construire une théorie solide sur ces variations de DBH, on peut émettre l'hypothèse que la diminution de DBH au niveau du mPFC pourrait s'expliquer par une diminution de la signalisation sérotoninergique, entraînant donc une réponse des neurones post-synaptiques amoindrie (et donc une production moindre de neurotransmetteur par les projections synaptiques de ces derniers) tandis que la hausse d'expression de DBH (et de NET) dans le cerveau postérieur pourrait traduire un mécanisme de compensation du déficit en 5-HT. Toutefois, il resterait à analyser les niveaux en NA libérée dans les différentes régions suite à l'augmentation d'activité de la MAO-A dans le mPFC et analyser l'activité neuronale par électrophysiologie.

#### **4. Surexpression de la MAO-A et rôle dans l'émergence du comportement anxieux-dépressif**

La hausse d'activité de la MAO-A dans le mPFC, consécutive à la surexpression de cette même enzyme, induit un effet comportemental et émotionnel qui dépend du type cellulaire dans lequel ladite augmentation d'expression a lieu. En effet, la surexpression dans les neurones

pyramidaux est associée à une baisse du temps de toilettage lors du *Splash Test*, ce qui est associé à un effet de type “dépressiogène” tandis que la surexpression de la MAO-A induite spécifiquement dans les astrocytes engendre une diminution du temps passé dans les bras ouverts et du ratio d’entrée dans les bras ouverts sur les entrées dans l’ensemble des bras, signature d’un effet anxiogénique de cette hausse d’activité de la MAO-A. Cette différence d’incidence laisse suggérer une implication différente des deux types cellulaires dans le rôle joué par la MAO-A dans la survenue de la dépression.

La diminution du temps de toilettage dans le *Splash Test* (“*grooming duration*”) est principalement traduite comme lié à un phénotype comportemental de type “dépressif”. Toutefois, en raison de l’utilisation d’eau sucrée pour la conduite de ce test, le *Splash Test* pourrait être aussi un moyen d’accéder à l’état hédonique des animaux, et donc, dans le cas d’une diminution du temps de toilettage, à une perte d’appétence pour le sucre (ou tout autre substance apportant un certain plaisir à la consommation), parfois observé chez les patients souffrant de dépression (American Psychiatric Association 2013). Les animaux surexprimant la MAO-A dans les neurones pyramidaux présentant une réduction du temps de toilettage dans le *Splash Test*, il était possible d’émettre l’hypothèse que l’activité accrue de l’enzyme dans ce type cellulaire pouvait engendrer un effet anhédonique. Afin de le confirmer, une nouvelle cohorte d’animaux surexprimant la MAO-A dans les neurones pyramidaux du mPFC -ainsi que les animaux contrôles correspondants- a été soumise au test de préférence au sucrose (SPT). Toutefois, la conduite de ce test n’a pas permis de mettre en évidence une quelconque perte d’appétence pour la consommation de nourriture et de boisson sucrée pour les souris surexprimant la MAO-A. La première hypothèse pouvant être émise serait une absence d’effet anhédonique engendré par la hausse d’expression et d’activité de la MAO-A, la diminution du temps de toilettage lors du *Splash Test* étant alors uniquement due à un comportement “dépressiogène” n’impliquant pas d’effet anhédonique : on pourrait rapprocher cela à un comportement de négligence volontaire de soi ou *self-neglect*, l’animal s’intéressant moins à l’intégrité de son pelage qu’un animal contrôle. Mais si cette hypothèse apparaît comme étant la plus vraisemblable, la série de tests comportementaux et le SPT ayant été réalisé chez deux cohortes différentes, il persiste l’hypothèse que la surexpression de la hMAO-A apportée par les vecteurs viraux ait été différente entre les deux cohortes avec une quantité différente, soit par une réponse plus faible pour la seconde cohorte à cette surexpression.

La hausse d'activité de la MAO-A dans les astrocytes du mPFC est responsable, chez les souris présentant ce phénotype, de l'émergence d'un comportement de type anxieux. L'étude approfondie de la littérature a montré une implication de l'activité astrocytaire dans les mécanismes associés à la dépression ; en effet, la modélisation d'un comportement "dépressif" par stress environnemental (UCMS) chez des rongeurs entraîne une diminution de l'expression de la GFAP, mettant en évidence une probable altération de la morphologie et du fonctionnement des astrocytes au cours de la dépression (Banar, Chowdhury et al. 2010). Par ailleurs, la lésion des astrocytes par de l'acide L- $\alpha$ -aminoadipique tout comme le blocage de la recapture du glutamate par injection locale d'acide dihydrokaïnique sont responsables d'un comportement émotionnel proche de celui observé dans des modèles de dépression (Banar and Duman 2008, John, Smith et al. 2012) ; cette inactivation astrocytaire est également à l'origine d'un effet anhédonique décrit soit comme une diminution de la consommation globale de sucrose (Banar and Duman 2008) soit comme une augmentation de la latence avant la première consommation de sucrose (John, Smith et al. 2012). Cette anhédonie n'est pas retrouvée dans les expériences menées ici ; toutefois, il est possible de supposer que la surexpression de la MAO-A dans les astrocytes n'induit pas de dysfonctionnement desdites cellules, contrairement aux "lésions" induites dans les expérimentations conduites par Banar et par John : l'anhédonie observée chez les animaux mimant la dépression serait alors induite par un dysfonctionnement des astrocytes supérieur à la simple hausse d'activité de la MAO-A.

## **5. Intervention de l'activité de la MAO-A dans la résistance aux ISRS**

---

Le mécanisme d'action de la plupart des traitements antidépresseurs pharmacologiques repose sur une augmentation de la quantité disponible en monoamines. La plupart des molécules utilisées en première et deuxième intention assurent l'augmentation des taux synaptiques en 5-HT par inhibition de la recapture de cette dernière (famille des ISRS et des inhibiteurs mixtes de la 5-HT et de la NA). Toutefois, une proportion importante de patients traités par des ISRS développent une dépression résistante au traitement. Une des explications qui peut être avancée serait liée à la surexpression et la hausse d'activité enzymatique de la MAO-A observée chez les patients souffrant de TDC : en raison de la hausse de l'activité de l'enzyme, le *turn-over* des monoamines et plus particulièrement de la 5-HT est augmenté dans le sens du catabolisme et par conséquent la disponibilité en 5-HT diminuerait au niveau des synapses sérotoninergiques de sorte que même en bloquant la recapture, la quantité en 5-HT libérable diminuerait.

L'un de mes objectifs, après l'identification du rôle de la surexpression de la MAO-A dans la survenue de la dépression, a donc consisté à déterminer une possible participation de celle-ci dans les mécanismes de non-réponse aux antidépresseurs, notamment au travers de l'hypothèse évoquée au paragraphe précédent. Pour cela, les niveaux extracellulaires en 5-HT, mais aussi en DA, ont été mesurés grâce à la microdialyse chez des animaux contrôles et des animaux surexprimant la hMAO-A dans les 3 heures précédant et les 3 heures succédant l'administration en aiguë d'un ISRS, la fluoxétine.

Chez les animaux ne présentant pas d'augmentation de l'activité catalytique de la MAO-A, le niveau extracellulaire en 5-HT augmentait suite au traitement par la fluoxétine, ce qui était attendu (Bymaster, Zhang et al. 2002, Koch, Perry et al. 2002). En revanche, l'administration de ce même ISRS chez des animaux pour lesquels l'expression de la MAO-A a été artificiellement augmentée ne permettait plus de retrouver cette hausse en 5-HT, et ce que cela soit chez les animaux surexprimant l'enzyme dans les neurones pyramidaux comme chez ceux la surexprimant dans les astrocytes. De manière intéressante, la baisse du niveau basal cortical en 5-HT et observé précédemment (§2), confirmé chez les animaux pour lesquels l'induction d'une forte expression en hMAO-A avait lieu dans les neurones, n'était pas retrouvée dans le cortex des animaux pour lesquels cette hausse d'expression était induite dans les cellules gliales/astrocytaires ; s'il n'est pas pour l'heure possible de la confirmer, il peut être émis l'hypothèse d'une intervention de la MAO-A dans la dégradation de la 5-HT dépendante du type cellulaire : la MAO-A neuronale cataboliserait les monoamines stockées par les neurones présynaptiques ou internalisés avec leur récepteurs par les neurones post-synaptiques, là où la MAO-A exprimée par les astrocytes participerait plutôt à la dégradation des monoamines recapturées après libération par les neurones présynaptiques. Toutefois, cette apparente absence de réduction des niveaux basaux en 5-HT chez les animaux ayant une activité de la MAO-A accrue dans les astrocytes reste à confirmer par le protocole plus précis de *Zero-Net Flux*.

Les niveaux extracellulaires en DA dans le mPFC ressortent également comme affectés par l'accroissement de l'expression de la MAO-A dans les neurones pyramidaux. En effet, chez les animaux contrôles, une hausse de la concentration extracellulaire en DA est observée après traitement par la fluoxétine. Cette hausse des niveaux en DA en réponse à l'administration d'un ISRS a déjà été décrite mais exclusivement pour la fluoxétine (Bymaster, Zhang et al. 2002, Koch, Perry et al. 2002), cet effet n'étant pas retrouvé pour d'autres ISRS tels que le citalopram ou la sertraline. L'auteur de l'étude mettant en évidence ce phénomène l'explique par un potentiel blocage de la recapture des catécholamines induit spécifiquement par la fluoxétine. Toutefois, ce résultat doit être considéré avec prudence dû au fait qu'il n'est retrouvé que chez

les groupes contrôles pour la surexpression dans les neurones pyramidaux mais absents chez ceux présentant une surexpression astrocytaire. Cette hausse des niveaux de DA dans le mPFC ne se produit pas chez les animaux qui surexpriment la hMAO-A lorsqu'ils sont traités par fluoxétine.

Que l'activité catalytique de la MAO-A soit augmentée dans les neurones pyramidaux ou dans les astrocytes du mPFC, celle-ci est responsable d'une forme de résistance d'un point de vue neurochimique à l'action d'un antidépresseur de la famille des ISRS lorsqu'il est utilisé en aiguë. Les résultats obtenus dans le cadre de ce projet constituent des arguments forts allant dans le sens d'une implication de l'enzyme MAO-A, et notamment de la hausse de son activité dans la résistance thérapeutique.

Parmi les nouvelles thérapeutiques antidépressives mises en place ces dernières années, la kétamine apparaît comme intéressante, notamment par son action pharmacologique directe indépendante des voies monoaminergiques et son action antidépressive rapide. De ce fait, l'effet de la hausse d'activité et d'expression de la MAO-A a aussi été étudié chez des animaux traités par la kétamine.

Le traitement en aiguë par la kétamine est responsable d'une augmentation des concentrations extracellulaires, et donc de la libération, en 5-HT et en DA dès les premières heures après administration. Cette augmentation de libération était attendue, et déjà décrite dans la littérature, que cela soit pour la 5-HT (Nishitani, Nagayasu et al. 2014, Pham, Mendez-David et al. 2017, Lopez-Gil, Jimenez-Sanchez et al. 2019) comme pour la DA (Lindfors, Barati et al. 1997) ; les précédentes études menées au sein du laboratoire ont par ailleurs mis en évidence que cette hausse des niveaux de 5-HT dans la synapse perdurait au-delà de 24 heures après l'injection aiguë de kétamine (Pham, Mendez-David et al. 2017), ce qui n'a cependant pas été investigué dans notre cas. L'administration en aiguë à la dose thérapeutique antidépressive de kétamine n'induit pas d'augmentation de libération de GABA, et ce contrairement à ce qui a été précédemment observé au sein du laboratoire dans le cadre d'une autre étude (Nguyen, Defaix et al. 2023) ; cependant, cette étude s'intéressait davantage aux effets neurochimiques induits 24 heures après l'injection de kétamine et non pas aux effets immédiats de cette injection comme dans la présente étude.

Afin de réunir l'ensemble des travaux auxquels j'ai participé durant ma thèse, il est également envisagé de poursuivre l'étude des ECS au sein du modèle de surexpression de la MAO-A. En effet, les ECT étant la stratégie thérapeutique de référence chez les patients pharmaco-résistants, l'objectif sera de déterminer l'impact des ECS chez les animaux

présentant une augmentation de la MAOA et ne répondant pas à la fluoxétine. L'hypothèse est que les ECS conserveront leurs effets sur le comportement émotionnel quel que soit le niveau d'expression de la MAOA.

## **6. Limites et perspectives**

---

Dans ce projet, les paramètres d'injection du vecteur viral (essentiellement le volume injecté) sont à l'origine d'une augmentation d'expression de 97% ce qui correspond à près du double de ce qui était observé chez l'être humain par imagerie par Meyer et son équipe (Meyer, Ginovart et al. 2006). Cependant l'augmentation de l'activité catalytique correspond à ce qui est observé en clinique. Une étude dose-réponse de différentes concentrations virales sera réalisée pour modéliser au mieux les observations cliniques.

De plus, les études cliniques et précliniques précédentes ont montré que la surexpression de la MAO-A chez les patients dépressifs et les animaux mimant la pathologie touchait différentes régions cérébrales, pour la plupart impliquées dans la régulation de l'humeur et des émotions. Inversement mon étude ne s'est intéressée pour le moment qu'à caractériser une surexpression et une hausse d'activité de l'enzyme dans une seule région (le mPFC) et dans un seul type cellulaire (neurones ou astrocytes). Il apparaît clair que ce modèle, bien que très pertinent d'un point de vue mécanistique, ne permet pas de représenter la réalité de la situation pathologique. Il conviendrait donc, dans un futur relativement proche, de modéliser cette surexpression dans l'entièreté du cerveau ; pour cela, il est envisagé d'injecter les vecteurs viraux chez des animaux en période néo-natale (au stade développement post-partum P1 à P5) afin de permettre au virus de diffuser dans un plus grand nombre de régions. Ce protocole permettrait aussi de reproduire davantage la réalité clinique en ce qui concerne les patients ayant une surexpression induite par la génétique (notamment en raison de la forme longue de l'uVNTR du promoteur du gène).

De manière intéressante, les études comportementales que j'ai effectuées dans le cadre de mon projet ont été réalisées chez des animaux naïfs vis-à-vis d'une situation anxiogénique/dépressiogénique, ce qui signifie que je me suis dans un premier temps intéressé sur le rôle direct de la MAO-A comme déclencheur potentiel de la pathologie (avec probablement d'autres facteurs dans la réalité clinique). Mais la hausse d'activité de la MAO-A pourrait aussi jouer un rôle dans la survenue du TDC comme facteur prédisposant et aggravant de ce dernier. Afin de questionner cette possibilité parallèle à celle d'un rôle plus direct, il faudrait tester et caractériser l'impact de la surexpression de l'enzyme dans un modèle établi de dépression ; si le choix du modèle UCMS pourrait être intéressant (de par le fait de

tester l'interaction entre le phénotype cellulaire et l'influence environnemental), ce modèle souffre (comme je l'évoque dans la section dédiée au projet annexe) d'un taux important de résistance au stress, le choix du modèle pharmacologique par administration chronique de corticostérone serait par conséquent à privilégier.

L'étude présentée dans ce manuscrit conclut à un probable rôle de la hausse d'activité de la MAO-A dans la résistance au traitement de type ISRS. Toutefois, cette théorie, et bien qu'elle repose sur des arguments solides, n'a été testée que dans le cadre d'un traitement en aiguë et uniquement au niveau neurochimique sans considération comportementale. Il apparaît clairement nécessaire de poursuivre l'analyse de la réponse aux antidépresseurs chez des sujets surexprimant l'enzyme lorsque ces antidépresseurs sont administrés de manière chronique (mimant par la même la réalité clinique). De plus, il serait pertinent de confirmer ces observations pour d'autres ISRS (afin de déterminer si l'effet ne se produit pas uniquement pour la fluoxétine) ainsi que des antidépresseurs appartenant à d'autres classes thérapeutiques (notamment ne ciblant pas les voies monoaminergiques).

Nous avons évoqué plus haut (cf §1.3.8) que l'activité des MAOs, et notamment de la MAO-B participait activement à la production d'énergie dans les neurones dopaminergiques (Graves, Xie et al. 2020). De ce fait, il serait intéressant de déterminer les effets de la surexpression de la MAO-A sur le métabolisme énergétique et le métabolisme mitochondrial des cellules surexprimant cette enzyme, d'autant plus que les résultats préliminaires *in vitro* obtenus par nos collaborateurs établissent une altération du potentiel énergétique des mitochondries (cf. Introduction §4.2.3). Par ailleurs, la réaction catalysée par la MAO-A étant génératrice de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (Cohen and Kesler 1999), il pourrait être pertinent d'analyser les niveaux de production d'espèces réactives de l'oxygène *in cello* et leur impact sur le fonctionnement des mitochondries.

Enfin, si le recours à la microdialyse nous apporte des informations sur les niveaux extracellulaires en 5-HT, le protocole de *Zero-Net Flux* ne nous donne de manière indirecte accès qu'à l'activité de recapture par le transporteur SERT et la cinétique de la 5-HT dont sa recapture par d'autres transporteurs (à l'instar de PMAT et des OCT) demeure inaccessible par ce biais. Les seules informations obtenues par RT-qPCR démontre l'absence d'adaptation d'un point de vue expression génique des différents acteurs de cette homéostasie ; il est donc envisagé d'étudier cet aspect à l'aide de GRAB-sensors spécifiques de la 5-HT. Cette technique, outre d'étudier la cinétique et l'homéostasie de la 5-HT, permettra aussi de déterminer l'effet de la surexpression de la MAO-A dans un type cellulaire sur l'homéostasie et la cinétique métabolique de la 5-HT au niveau des autres types cellulaires de la région cérébrale étudiée. En

effet, en réponse à la surexpression de la MAO-A dans les neurones et donc à la hausse de la dégradation de la 5-HT, on peut supposer qu'un mécanisme compensatoire par augmentation de la recapture par différents transporteurs (tels que PMAT et OCT) pourrait se mettre en place, appauvrissant l'environnement extracellulaire en 5-HT et affectant donc les imports en 5-HT dans les cellules gliales (une hypothèse similaire pouvant être formulée dans le cas de la surexpression de l'enzyme dans les cellules gliales).

## **7. Conclusion générale**

Plusieurs études ont mis en évidence, que cela soit chez des patients souffrant de dépression ou dans des modèles murins mimant l'anxiété-“dépression”, qu'une hausse de l'expression et de l'activité de la MAO-A était associée avec l'étiologie de la dépression. Toutefois, mis à part un lien de corrélation entre les niveaux d'expression/activité de la MAO-A et la pathologie, aucun lien causal n'a été à ce jour établi. Le projet de recherche présenté dans ce mémoire s'est intéressé à l'effet d'une augmentation de l'expression et de l'activité de la MAO-A, notamment sur la survenue d'un phénotype de type “dépressif”, mais aussi sur la résistance aux traitements antidépresseurs, phénomène responsable d'un échec de la prise en charge d'un tiers des patients souffrant de TDC.

Les premières observations obtenues démontrent que cette hausse d'activité participerait à l'induction de différentes composantes comportementales impliquées dans la dépression selon le type cellulaire affecté par cette augmentation d'activité. Entre autres, la surexpression de l'enzyme dans les neurones pyramidaux post-synaptiques du cortex préfrontal semble être à l'origine de la déplétion en 5-HT observée chez les patients souffrant de dépression. Par ailleurs, cette surexpression de la MAO-A engendre la variation de l'expression de certains gènes déjà identifiés comme associés au TDC, et notamment deux récepteurs à la 5-HT.

Par ailleurs, cette hausse d'activité apparait comme fortement impliquée dans la résistance aux antidépresseurs qui ciblent la recapture des neurotransmetteurs monoaminergiques, puisque d'un point de vue neurochimique l'élévation de l'activité MAO-A empêche la hausse de 5-HT en réponse à un traitement à la fluoxétine.



---

# Projet annexe

---

## 1. Introduction

---

Comme nous l'avons évoqué en prélude du principal projet de recherche mené dans le cadre de ma thèse, le TDC se caractérise par un taux élevé de résistance aux traitements antidépresseurs de type pharmacologique (environ 30%). Dans le cadre de mon projet principal, je me suis intéressé sur la possibilité que la surexpression et par conséquent l'augmentation d'activité de la MAO-A puisse intervenir dans les mécanismes à l'origine de cette pharmacorésistance aux antidépresseurs : il apparaissait alors clairement que cette surexpression diminuait fortement la réponse à la fluoxétine.

Si la MAO-A apparaît comme l'un des mécanismes à l'origine de la pharmacorésistance d'un tiers des patients souffrant de dépression, les effets indésirables sévères engendrés par les I-MAOA en restreignent l'utilisation. Pour améliorer la prise en charge des patients souffrant d'une dépression pharmacorésistante, d'autres stratégies thérapeutiques sont à l'étude depuis de nombreuses années. Outre le recours à des molécules n'intervenant pas sur le système monoaminergique (à l'instar de la kétamine que j'ai également étudié dans mon modèle de surexpression de la MAO-A), des techniques reposant sur des mécanismes physique (stimulation électromagnétique ou courant électrique) sont également intensivement étudiées.

C'est le cas, entre autre, de l'électroconvulsivo-thérapie (ECT) et anciennement connue sous le nom « d'électrochoc » connue depuis les années 1950 comme un traitement antidépresseur efficace. Cet effet antidépresseur est par ailleurs confirmé par les nombreuses études précliniques menées chez les rongeurs et non rongeurs (mini-porc et singe rhésus) à l'aide de la modélisation des ECT chez l'animal de laboratoire et appelé stimulation électroconvulsivante (ECS). Ces études ont également permis de définir que les ECS avaient pour effet de compenser les modifications moléculaires et physiologiques induites par un état d'anxiété-dépression dans des modèles comportementaux (UCMS, CSD), pharmacologique (modèle CORT) ou encore génétiques (rats des lignées Wistar Kyoto et FSL). Certaines de ses études se sont par ailleurs focalisées sur l'étude des effets indésirables mnésiques de l'utilisation des ECS (et par conséquent des ECT pour l'être humain).

L'article qui suit, actuellement en soumission sur BioRxiv (<https://www.biorxiv.org>) et en fin de préparation pour une soumission à *Journal of ECT*, constitue une revue exhaustive à jour des recherches précliniques sur le domaine des ECS administrés en chroniques.

# **Behavioural, neurochemical and cellular effects of electroconvulsive seizures in animal models of anxiety/depression.**

**Short Title:** Preclinic effects of ECS

**Authors:** Rodolphe Lebeau<sup>§</sup>, Alain M Gardier, Denis J David\*, Jean-Philippe Guilloux\*.

Université Paris-Saclay, UVSQ, Centre de recherche en Epidémiologie et Santé des Populations (CESP), UMR 1018, CESP-Inserm, Team Moods, Faculté de Pharmacie, Bâtiment Henri MOISSAN, Orsay, France.

\* co-last authorship

<sup>§</sup> To whom correspondence should be sent:

Rodolphe Lebeau  
Inserm, CESP, Equipe « Moods »  
Université Paris Saclay - Batiment Henri Moissan  
19 avenue des Sciences  
91400 Orsay France  
Tel: +33.(0)1.80.00.63.35  
[rodolphe.lebeau@universite-paris-saclay.fr](mailto:rodolphe.lebeau@universite-paris-saclay.fr)

## **Highlights**

## **Keywords**

Electroconvulsive Seizures, ECS, Antidepressant, Neurogenesis, Vasculogenesis, Behavior.

## **Authors contribution**

RL, DD and JPG compiled the bibliography.

All authors wrote or contributed to the writing of the manuscript.

## ABSTRACT

Major Depressive Disorder (MDD) is the most prevalent psychiatric disease, affecting especially more women. First-line pharmacological treatments for depression, such as Selective Serotonin Reuptake Inhibitors (SSRIs) – e.g., Fluoxetine (Flx) - are commonly prescribed. Nevertheless, despite their proven effectiveness AD treatment presents several drawbacks, including a lack of response in one third of patients and also resistance to a second line of treatment defining treatment-resistant depression (TRD). To address this challenge, alternative therapies including electrical stimulations (vagus nerve stimulation, transcranial magnetic stimulation) have been explored. Among these treatments, electroconvulsive therapy (ECT) presents high efficacy and the highest remission rates in treating individuals with TRD. ECT is still one of the most effective treatment methods, especially in the acute phase of depression. In everyday clinical practice, ECT usually accompanies pharmacological treatment. Nevertheless, ECT is associated with memory-related adverse effects. Despite that ECT are recognized and clinically used since the 1930s, biological mechanisms underlying its therapeutic and adverse effects remains poorly understood. The present review aims at offering a comprehensive summary of over fifty years of research on electroconvulsive seizure (ECS) in rodents, the experimental counterpart of ECT in animal models of anxiety/depression, shedding light on its effects and mechanisms.

## 1 Introduction

Major Depressive Disorder (MDD) is the most prevalent psychiatric disorder, affecting approximately 264 million subjects worldwide, according to World Health Organization. The Diagnostic and Statistical Manual of Mental Diseases<sup>1</sup> highlights that women are 1.5 to 3 times more likely to be diagnosed with MDD than men, and young adult aged 18 and 29 years-old are being particularly vulnerable. Beyond the social impact, MDD is an invalidating illness with everyday life consequences and a high rise of suicide<sup>2</sup>.

The first line treatment for MDD treatments are pharmacological antidepressant drugs mainly selective serotonin reuptake inhibitors (SSRIs -escitalopram-) or serotonin and norepinephrine reuptake inhibitors (SNRI -venlafaxine-). However, response rates to these initial treatments vary widely from 30 to 60% depending on the studies, while remission rates in the first step of the STAR\*D study being around<sup>3-5</sup>. Treatment resistant depression (TRD) is defined as the lack of response to two consecutive and different antidepressant drugs prescribed at adequate doses and for duration<sup>6,7</sup>. TRD occurs in 20% to 30% of MDD<sup>8</sup> particularly those with melancholic and psychotic features and is associated with longer episode duration, longer lifetime hospitalization, higher comorbidity with panic disorder and an increased risk of suicide. While classic augmentation or combined pharmacotherapies have been proposed in TRD<sup>9-12</sup>, recent research has focused mainly on fast-acting antidepressant drugs such as esketamine<sup>13</sup> or psychedelic-based therapies<sup>14</sup>.

Numerous brain stimulation therapies have been investigated and applied in the treatment of TRD: repetitive Transcranial Magnetic Stimulation, Deep Brain Stimulation, Vagus Nerve Stimulation. Electroconvulsive therapy (ECT) is yet the most used and effective treatment strategy in TRD. ECT consists in inducing a transient controlled seizure. ECT is well tolerated and was shown to be associated with response rates of 60% to 80%<sup>15-19</sup>, aside from transient cognitive adverse effects after repeated treatments<sup>20</sup> leading to retrograde<sup>21</sup> and anterograde<sup>22</sup> amnesia which are generally reversible in 3 to 6 months<sup>23</sup>.

While beneficial effects of ECT in treating TRD are well documented<sup>24,25</sup>, its precise mechanism of action remains to be fully determined. The mechanisms are complex, involving multifactorial changes in neurotransmitters levels<sup>26</sup> and in brain regions volume/activity<sup>25</sup>.

To confirm or propose new hypotheses supporting the mechanism of action of ECT, there is a critical need for improved animal models that accurately reflect anxiety/depression-like behavior. Furthermore, a greater overview of preclinical research conducted over the past 20 years is

necessary, In this context, studies often utilize electroconvulsive seizure (ECS), also referred to as electroconvulsive stimulation, as an animal model to mimic human ECT.

Here we propose an up-to-date review of the effects of ECS, from the behavioral to the cellular level, based on preclinical research published in 174 studies. While we believe that to ensure translational clinical validity of preclinical research, the latter should be performed in animal models of MDD, most of the studies presented here have been performed in naïve animals.

## 2 Studies included

The use of ECT to treat psychotic and depressive disorders in patients began at the end of the 1930's. However preclinical studies aiming at understanding its effects started only at the end of the 1970's<sup>27</sup>. For the first twenty years, few studies were conducted on chronic ECS (cECS). In 1999, only 22 publications were listed, but a significant shift occurred in 2000 with an exponential increase in publications concerning the effects of cECS (see Fig. 1).

The studies on cECS are led principally in rodent healthy or anxiety/depression models accounting for 97% of pre-clinical research (see Fig. 2A and Supplementary Table 1), and most especially in Rats. For the few studies not involving rodents, ECS were administered in healthy non-human primates (NHP) or minipigs.

Given the ethical considerations surrounding the use of animal models<sup>28</sup>, we need to test the effects of ECS in animal models of the disease, that mimics some of the endophenotypes observed in MDD and/or in TRD. Unfortunately, as shown in Fig. 2B, most studies used naïve animals with only a few publications performed in animals displaying an anxio-depressive-like behavior. All these studies have been performed in innate animal models, such as the Wistar-Kyoto line, the Flinders Sensitive Line (FSL) or, indirectly, the Gunn line as well as in stress-induced - (chronic mild stress or restrain stress) or corticosterone-induced altered emotional behavior.

The greater prevalence of MDD in women compared to men represents one of the most consistently replicated epidemiological findings in psychiatry, even after accounting for differences in individual reporting and symptom dimensions. Unfortunately, despite the well-documented sex differences in emotionality and response to antidepressant treatment<sup>29</sup>, the preclinic literature in this specific topic continues to exhibit sex-biased<sup>30</sup> with over 90% of the studies conducted in male rodents (see Fig. 2C).

### 3 ECS Protocols

The number of ECS administrations varies across studies, ranging from 3 to more than 14 sessions, with a maximum observed at 24 sessions over a period of 6 weeks. However, the majority of ECS protocols recommend 5 or 10 sessions (see Fig. 3A). Approximately a quarter of studies published used an anesthetic as in clinical procedures (see Fig. 3B), the most used being gaseous anesthesia (halothane or isoflurane).

While the administered dose can be expressed in millicoulombs representing the total charge delivered to rodents, most of the literature only focused on detailing intensity, frequency and pulse width of the ECS. Thus, different combinations of these parameters may result in similar total charge, but induce various effects. The current intensity for ECS is adapted to each species: in mice, the intensity of administered ECS is set at or below to 50mA (see Fig. 3D), while for rats, it is usually at or above 55mA (see Fig. 3C). The stimulation frequency describes the recovery time allowed to the neurons between pulse administered and seems independent of the species, as frequencies used in rats are either 50 Hz or 100 Hz in majority ( $\approx 30\%$  each, see Fig. 3E), while mice are treated preferentially with a frequency of 100 Hz ( $>50\%$  of studies, see Fig. 3F). Pulse width describes the duration for which the neurons are stimulated during each pulse, with settings for ECS in rats and mice at mainly 0.5 ms (see Fig. 3G-H). The ECS duration denoting the total number of stimulatory pulse, rarely exceeds 1s (see Fig. 3I-J). While some authors have tested the effects of various ECS settings on seizure thresholds or seizure durations in rats<sup>31</sup>, little is known on these parameters' benefits or adverse effects on emotional or cognitive behavior.

### 4 Effects of ECS on emotional behavior

Behavioral alterations (such as anhedonia, resignation or loss of interest) are major components of MDD. Overall, studies in rodents have shown that ECS can reverse partially or totally these alterations (see Table 1).

The Forced Swim Test (FST), as the Tail Suspension Test (TST) are used for the screening of antidepressant drug activity and to characterize depressive-like behaviors in mice and Rats (see further discussion follows in the next paragraph). An increase in immobility duration in these tests has been associated in the literature with an helplessness or “depressed-like” behavior and observed across various animal models including genetic models (such as rodent strains naturally anxious,<sup>32</sup>) environmental models (e.g., chronic mild stress, CMS<sup>33-35</sup>) or neuro-endocrine models<sup>36</sup>). Chronic administration of ECS (cECS) has been shown to reduce immobility duration in these

models, but also in naïve models<sup>37,38</sup>, associated with an increase in the time spent climbing<sup>39,40</sup>. This last parameter is considered as an indicator of the motivation mediated by an increase in the noradrenergic activity<sup>41</sup>.

However, behavioral results in the FST can be questionable as mobility duration does not reflect resignation-like behavior or depressive-like behavior<sup>42-46</sup>.

Two studies performed the TST to evaluate the motivation and resignation behavior and observed a reduction in immobility duration following cECS administration, similar to the FST. Nevertheless, the same criticism applicable to the FST holds for this test, especially considering Steru's description of this paradigm as a test to screen antidepressant drugs. This indicates that treatments without antidepressant effects (such as atropine and amphetamine) can produce similar outcomes<sup>47</sup>.

Anhedonia in rodents can be assessed by monitoring sucrose preference (SPT), which is decreased either after a chronic stress<sup>48,49</sup> or in genetic models<sup>49</sup>. This symptom is either reversed partially<sup>48,50</sup> or totally after a single cECS exposure<sup>49,51</sup>. Interestingly, the effect size cECS seems greater in stress models compared to genetic ones<sup>49</sup>. Moreover, the recovery of animals subjected to cECS depends on the charges of cECS and anesthetized animals have a greater increased rate of sucrose consumption than alert animals<sup>50</sup>. More recently, Neyazi and his collaborators<sup>52</sup> have shown that electrode localization impacts the SPT results, as the anhedonic effect of CMS can be reversed more efficiently with cortical electrodes rather than with auricular electrodes.

Three studies used the Novelty Suppress Feeding Test (NSF) to assess the antidepressant-like effect of cECS<sup>39,53,54</sup>. In their studies using the corticosterone model of altered emotional behavior, cECS reduced the latency to feed compared to control mice, confirming the antidepressant properties of ECS.

Only three studies used the Elevated Plus Maze (EPM) or its derivative the elevated O-maze to test the anxiolytic effects of cECS<sup>55-57</sup>, and all three showed an increase in the time spent in the open arms of the maze in cECS-treated animals.

Chronic ECS induces similar behavioral effects in both depressive-like and naive rodent models. Consequently, the question of the hyper-locomotor effect of ECS can be asked. cECS in naïve rats did not affect locomotion<sup>58</sup>. In contrast, models of depressive-like disorders, such as UCMS and the Wistar Kyoto models, display a decreased locomotor activity in the open field compared to naïve models<sup>49</sup>.

In our last study, cECS effects were tested in a mouse model of non-response to antidepressant drug treatment in order to replicate clinical practices for addressing TRD<sup>56</sup>. Mice that did not respond to a 4-week SSRI treatment received 7 ECS sessions over 2 weeks. We demonstrated that cECS could reverse the endocrine-induced depressive-like phenotype in mice that did not respond to a SSRI<sup>59</sup>.

Overall, behavioral studies in rodents led on repeated electroconvulsive stimulation agree with the human clinical observation and confirm the usage of ECT to treat MDD and TRD symptomatology due to antidepressant effects of ECT.

## 5 ECS electrodes localization and ECS effects

The impact of electrode placement on the outcomes of cECS effects has been questioned by several authors. Positioning electrodes on the auricle leads to tonic seizures, whereas placing them on the cortex induces a clonic seizures<sup>38</sup> associated with a lower decrease in immobility duration in the FST<sup>38,52</sup>. Moreover, rodents receiving cortical cECS exhibited greater weight gain compared to those treated with auricular cECS<sup>52</sup>, the latter even showing a weight loss<sup>38</sup>. Distress calls emitted by rats in both Theilmann and Neyazi studies post-cECS with auricular electrodes highlight fear-related behaviors. Theilmann et al. suggested that greater antidepressant efficacy of cortical cECS might be due to a recruitment of different brain regions than auricular cECS. However, this study was performed without anesthesia introducing a confounding variable in the assessment of emotional behavior.

## 6 Electroconvulsive seizure effects on cognition

While ECS can correct emotional behavior changes induced in depression-like models, they are also responsible for memory impairments (see Table 2), mimicking retrograde amnesia observed in some patients treated by ECT<sup>21,22</sup>.

During the restitution phase of the Morris Water Maze (MWM), cECS-treated rats displayed more time to find the escape platform and spent less time in the target quadrant, suggesting deficits in spatial learning and cognitive flexibility<sup>60,61</sup>. Interestingly, prior anesthesia with ketamine in rats during ECS administration has been shown to diminish the amnesic effects of ECS, suggesting an interest in this coadministration<sup>60</sup>. However clinical studies do not support these observation<sup>62</sup>.

Similarly, cECS-treated rats failed to recall an adverse event occurring in the Columbia Obstruction Box<sup>63</sup>. In this test, the latency for rats to enter a dark box where they were priorly exposed to an electric shock was reduced in rats receiving cECS. Whether modulation of ECS parameters may affect their amnesic effect in this behavioural task has been questioned<sup>64</sup> and revealed that changing configurations of cECS stimulation parameters (but with the same finale charge in Coulomb) have no significant differences on latency to enter the dark box.

## 7 Impact of ECS on signaling pathways and gene expression

Electroconvulsive stimulations profoundly alter the expression of a wide variety of genes in a brain-region-dependent manner<sup>65-67</sup>. A summary of the studies assessing the effects of cECS on gene/protein changes and performed in animal models of MDD is provided in Table 3. These variations induced by ECS may be sustained by epigenetic mechanisms and activation of some signal transduction pathways.

### 7.1 Chronic ECS modulates epigenetic regulation of genes:

Among epigenetic regulations, methylation is generally considered as the most stable<sup>68,69</sup>. An acute ECS stimulation is responsible for the methylation of 1,531 genes 4h post-administration in the dentate gyrus (DG) of the hippocampus, with 30% remaining methylated after 24 hours<sup>70</sup>. These genes are primarily involved in synaptic functions, protein phosphorylation and neuronal differentiation. However, DNA methylation is not the only sustainable epigenetic regulation affected by cECS, as it also alters the expression of histone acetyltransferases and deacetylases (HAT and HDAC respectively) as well as histones methyltransferases and demethylases<sup>71</sup>. These different expressions profile is responsible for a reduction in histone acetylation, mainly of histones H3 and H4, which leads in promoting the transcription of several genes<sup>72</sup>.

### 7.2 Signaling pathways are differentially activated by cECS:

In addition to epigenetic regulation, cECS modifies signaling pathways involved in gene expression regulation. ECS stimulation induced the phosphorylation of the most part of the protein component of the MAP kinase pathway. Chronic ECS increases levels of ERK1/2 and MEK1/2 levels starting 5 days after the last session and reaching their maximum on the 10<sup>th</sup> day<sup>73</sup>. It also increases p38<sup>74</sup>, JNK, SEK-1 and MKK-6 in rat hippocampus and cerebellum<sup>75</sup>. This phosphorylation cascade activates the MAP kinase pathway involved in mitosis activation, through c-Fos, whose expression is also enhanced after a chronic treatment with ECS in rats<sup>76</sup>.

Similarly, cECS induces the activating phosphorylation of AKT and PKC in rodents, resulting in the inhibitory phosphorylation of GSK-3 $\beta$ . Inhibition of GSK-3 $\beta$  increases the stability of  $\beta$ -catenin<sup>77</sup> which then translocates into the nucleus to regulate its target genes. The  $\beta$ -catenin pathway is also activated by up-regulation of Wnt pathway actors: the expression of the ligand Wnt<sup>77</sup>, its receptor Frizzled<sup>67</sup> and the terminal effector  $\beta$ -catenin<sup>77</sup> are all over-expressed in the hippocampus after cECS sessions.

The AKT and MAP kinase pathways both activate the transcription factor CREB. cECS also promote the expression of CREB, amplifying the effect of cECS on these pathways<sup>78</sup>.

Finally, cECS leads to the overexpression of other transcription factors, such as Arc<sup>79</sup> and Egr1<sup>76</sup>.

### 7.3 The BDNF and ECS, a long story in ECS research:

Brain-derived neurotrophic factor (BDNF) is one of the most investigated genes in the context of mental health and neurodegenerative diseases. BDNF, a neurotrophic factor, that preferentially binds to its high affinity TrkB receptor, is secreted among other in the brain, promoting the neuronal plasticity and synapse remodeling<sup>80</sup>. Studies consistently show an increase in *Bdnf* mRNA expression in rats subjected to ECS<sup>81,82</sup> and BDNF protein levels in several brain regions such as the frontal cortex, thalamus and hypothalamus, and mainly in the DG of the hippocampus<sup>49,83</sup> as well as increase in *TrkB* mRNA<sup>84</sup>.

Moreover, the cECS-induced overexpression of *Bdnf* could be under the regulation of ERK1/2 pathway, as inhibition of these kinases reduces the expression of *Bdnf* and *Tph2*<sup>85</sup>.

Studies have shown that blood and brain levels of BDNF are correlated<sup>86</sup>. An equilibrium between brain tissue and blood levels of BDNF seems to be reached one week after the last ECS session, and the brain tissue peak of BDNF which occur few time after ECS<sup>86</sup>, a delay that could be explained by an active transport of BDNF through the blood brain barrier<sup>87</sup>. The use of serum BDNF levels to monitor the alteration of central neurotrophin levels could be of interest, although likely with a modest correlation with depressive state<sup>88</sup>. A review on the effects of electrostimulation on central and peripheral BDNF levels in preclinical and clinical studies confirmed that central BDNF levels increase in Rodents after ECS<sup>89</sup>, in a dose dependent manner.

*Bdnf* transcription is regulated by 9 different promoters leading to  $\approx$ 20 different *Bdnf* transcripts isoforms that all encode for the same BDNF protein<sup>90</sup>. The different expressed transcripts have different subcellular localizations and thus functions, allowing a fine tuning of BDNF delivery (Gabriele Baj et al, 2011). ECS seems to exert specific effects on the different *Bdnf* transcript

isoforms, with a -regional/subregional increase pattern for each isoform. In naïve rats, cECS increased exons I, II, III and IV expression in the DG, exon I in the piriform and motor cortex, and exon II throughout cortex regions and amygdala<sup>91</sup>. Interestingly, another study performed in an animal model based on corticosterone-induction of altered emotional behavior<sup>92</sup>, *Bdnf* exons I and IV increased in the cingulate cortex following cECS treatment, confirming prior observation of effect of acute ECS on *Bdnf* transcript expression<sup>93</sup>.

#### 7.4 cECS regulate the expression of a large variety of genes:

Besides *Bdnf*, cECS are known to modulate the expression of genes involved in various cellular functions.

##### 7.4.1 [The Sonic Hedgehog pathway actors](#)

Among the genes altered by cECS are components of the Sonic HedgeHog (Shh) pathway<sup>94</sup>, a pathway involved, among other, in the maturation of brain and neuronal tissues during the embryogenesis and the maintenance of neuronal stem cell niches until adulthood. cECS affect more precisely actors involved in the transduction and the regulation of this pathway rather than the principal effector of the pathway (Shh): cECS up-regulate the expression of the receptor *Patch* (*Ptc*) and downregulate *Smoothened* (*Smo*) expression in adult rat hippocampus<sup>94</sup>, enhancing the activity of the Shh pathway. The administration of cyclopamine, an inhibitor of Shh signaling, prevents the proliferative effects of cECS in the DG, comforting the role of the Shh pathway in the cECS neuronal proliferative effects.

##### 7.4.2 [Membrane and vesicle structure proteins](#)

ECS has been shown to enhance the expression of proteins involved in cellular membrane trafficking, and particularly in endocytosis: Enomoto et al. showed that clathrin, flotillin-1 and caveolin-1 protein levels are increased in rat hippocampus following 10-day ECS<sup>95</sup>. Moreover, these proteins are located in lipid rafts of the hippocampal neuron membrane, reinforcing the hypothesis of the vesicle trafficking involvement in ECS effects on the hippocampus.

Synaptophysin (SYP), another vesicle protein participating in the presynaptic neurotransmitter membrane, is also impacted by ECS<sup>48</sup>. cECS can reverse the chronic stress-induced decrease in SYP expression in the hippocampus at the mRNA and protein levels. Hippocampal electrophysiological recordings in the same animals showed similar variations of effects of stress and cECS on long-term potentiation. Overall this suggests that cECS improves the synaptic functional status in the hippocampus, through changes in SYP expression.

cECS modifies the expression of proteins related to the structure of membranes and vesicles in neuronal cells, this effect being also visible in blood cells. cECS is responsible of the deregulation of Cavin1, Cc2d1b and Sh3glb2, three proteins promoting the endocytosis.

#### [7.4.3 p11](#)

p11, a member of the S100 protein family, partners with calcium-dependent lipid-binding protein annexin A2- and interacts with ion channels and promotes the expression of 5-HT receptors in neurons<sup>96,97</sup>. p11 has been involved in depression-like states and monoaminergic-based antidepressant drug response<sup>98</sup>. cECS in rodents has been shown to increase the methylation of the p11 gene promoter and, consequently, *p11* expression in, but this increase does not occur in all animals, only in those responding to cECS<sup>52</sup>. In rats resistant to conventional antidepressant drugs, gene promoter methylation and expression of p11 in the prefrontal cortex correlated with the antidepressant-like effect of ECS. Interestingly, the use of p11 promoter methylation as a human biomarker for ECT efficiency in MDD subjects was explored, showing a sensitivity and specificity of 70% and 73%, respectively, in identifying responders<sup>52</sup>.

#### [7.4.4 Dopamine and cAMP Regulated Phosphoprotein-32 \(DARPP-32\)](#)

The expression of DARPP-32, an inhibitor protein of the protein phosphatase-1, is affected by ECS. Indeed, Rosa and her team<sup>99</sup> observed a transient increase of the DARPP-32 expression in the hippocampus and striatum after cECS and in the cortex following an acute ECS session. The increase in DARPP-32 was shown after chronic antidepressant administration<sup>100</sup> and stimulation of 5-HT1B and 5-HT6 receptors led to increased phosphorylation of DARPP-32<sup>101</sup> potentially contributing to treatment response. However, studies in knockout mice for DARPP-32 suggest its involvement in memory processes<sup>102</sup>. Whether DARPP32 may participate in side effects of cECS has been proposed, however, memory dysfunction has been associated with DARPP-32 decrease or cleavage<sup>102,103</sup>.

Mughal et al<sup>104</sup> observed a similar increase in DARPP-32-immunolabeled cell numbers in a mouse model of Huntington's disease following cECS, compared to sham-treated animals<sup>104</sup>.

#### [7.4.5 Glial Fibrillary Acidic Protein \(GFAP\)](#)

The effects of cECS on neuroimmune response have been detailed in a recent review<sup>105</sup>. GFAP levels have been shown to decrease in animal models of altered emotional behavior<sup>106</sup>. Many studies highlighted the activation of astrocytes in response to ECS. The first study investigating the effect of cECS on GFAP expression showed that cECS exposure increase the expression of GFAP in hippocampus, amygdala and piriform cortex<sup>107</sup>. Interestingly, another study presented

conflicting findings, showing that chronic cECS did not elevate GFAP expression in the hippocampus or cortex, but did observe an increase in the cerebellum<sup>108</sup>. However, these opposite results might be explained by different ECS protocols, as well as the timing of GFAP levels after the last ECS administration, suggesting that GFAP expression increase is probably transient and occurs in a short time after ECS. This hypothesis has been confirmed in a longitudinal study<sup>109</sup>, showing a transient increase of the GFAP expression following cECS, the increase being maximal 2 hours post-session and returning to baseline levels approximately 24 hours later.

#### 7.4.6 Circadian genes

Circadian genes are other targets of cECS effects. Among these genes, many are regulated in the same direction in mRNA and protein expression (*Rev-erb $\alpha$* , *Rora*, *Bmal1* and *Per1*). Conversely, other genes are expressed in opposite directions between mRNA and protein levels (*Cry1* and *Cry2*, *Clock* and *Per2* (see Table 4)<sup>110</sup>.

Electroconvulsive seizures modify the cyclic expression of circadian genes, shifting earlier the acrophase of *Rev-erb $\alpha$* , *Bmal1*, *Per1*, *Per2*, *Cry1* and *Cry2*. Interestingly, while the expression levels of *Per2* seems to be unaffected by cECS, the cycle is shifted to nearly half a day: the acrophase and bathyphase as well as the increase and decrease in the circadian cycle are reversed compared to untreated mice<sup>110</sup>.

#### 7.4.7 GPR-56

The G protein-coupled receptor 56 (GPR56) plays a pivotal role in the diverse neurobiological processes, including cortical formation, oligodendrocyte development<sup>111</sup>. An increase in *Gpr56* in the blood has been associated with treatment response, while GPR56 expression in the medial prefrontal cortex has been observed in subjects who died by suicide<sup>112</sup>. A 10-days cECS treatment increases GPR56 mRNA and protein expression in the subventricular zone (SVZ) in adult rat brain<sup>113</sup>, one of the two main regions where neurogenesis occurs in adult rodents. These findings suggest that the GPR56 may be involved in the signaling of the neuronal plasticity in the SVZ.

#### 7.4.8 Thrombospondin-1

Thrombospondin-1 (TSP-1) is a protein firstly identified to regulate the platelet aggregation. However, TSP-1 is also expressed in astrocytes and its expression is affected by ECS<sup>109</sup>. Indeed, cECS increases TSP-1 expression, both at the mRNA and protein levels in the hippocampus in rats chronically treated (acute ECS increases only *Tsp-1* mRNA). Moreover, they showed that the ECS-induced expression of *Tsp-1* is regulated by astrocytes activity: the expression of GFAP

transcript and protein occur simultaneously with *Tsp-1* expression during the first hours after ECS treatment<sup>109</sup>.

Interestingly, the overexpression of *Tsp-1* seems to be specific to ECS exposure, as pharmacological interventions (desipramine or paroxetine) induced no changes in its expression.

#### 7.4.9 [Erythropoietin, a potential endogen antidepressant overexpressed by ECS](#)

In 2009, it was observed that cECS increase the expression of erythropoietin (EPO) in the hippocampus, particularly in the DG<sup>114</sup>. Interestingly, the same study highlighted that the intraperitoneal injection of EPO has antidepressant effects in their rat model<sup>114</sup>, as EPO injection decreased the immobility time in the FST and the latency to feed in the Novelty-Induced Hypophagia test.

Girgenti also showed an increase in the expression of the transcription factor Hif1 $\alpha$  (hypoxia-induced factor alpha), which could facilitate the EPO gene transcription through binding to the EPO gene promoter. Overall, these results suggest that the antidepressant effect of cECS involves a neurotrophic signaling cascade in which EPO and Hif1 $\alpha$  participate.

#### 7.4.10 [Aquaporine-4](#)

Aquaporine-4 (AQP-4) is a water-selective channel localized in the membrane in astrocytic endfeet in contact to blood vessels and participates to the hydric homeostasis within the brain. In 2013, Rajkowska observed a decrease in the blood vessel coverage endfeet of astrocytic expressing AQP-4 in post-mortem MDD<sup>115</sup>.

In a model of depressive-like rats, cECS reversed the phenotypic reduction in AQP-4 coverage in the astrocytic endfeet membrane to the blood brain vessel observed in this model<sup>116</sup>. These results are in line with observations that a fluoxetine treatment increase the AQP-4 astrocytic endfeet<sup>117</sup>.

Both studies suggest an effect of various antidepressant strategies on AQP-4. Moreover, the blockade of AQP-4 expression, using miRNA, prevents the AD effects of fluoxetine<sup>117</sup>, suggesting a role of AQP-4 in antidepressant response.

#### 7.4.11 [Tamalin](#)

cECS increases the expression of Tamalin, a protein important for neuronal and brain ECS effects<sup>118</sup>. Indeed, knocking-out the Tamalin gene results in a weaker neuroblast proliferation, neuron differentiation and dendrite growth compared to wild-type animals.

The effects of cECS are also observed in the periphery, especially in peripheral blood mononuclear cells (PBMCs), which can serve as a surrogate for investigating brain changes<sup>119</sup>. Indeed, cECS induces the alteration of the expression of 33 proteins in the PBMCs<sup>56</sup> some of which have been involved in MDD (App, Akap5, Hsg, Prep, Strn and Talin2) or other psychiatric disorders (Adss) at the brain level. Moreover, these proteins are associated with three pathways (Pi3/Akt, NRF2-mediated oxidative stress and glucocorticoid receptor signaling) activates in depressive disorders.

## 8 Effects of ECS on adult hippocampal neurogenesis (AHN)

As defined by Kempermann in a recent review, “Adult hippocampal neurogenesis (AHN) is a unique and exceptional process in the mammalian brain that in a lifelong and activity-dependent way generates new excitatory principal neurons”<sup>120</sup>. This process encompasses three stages: cell proliferation, cell survival and cell maturation into neurons.

Some papers mention effects of ECS on neurogenesis in other parts of the brain, however the use of the term “neurogenesis” is still debated. Full characterization should be performed using multiple co-labelling, as DCX alone has been shown to be a versatile marker of neurogenesis<sup>121</sup>.

### 8.1 Effect of ECS on cell proliferation

Chronic ECS is responsible for an increased cell proliferation in the subgranular zone of the DG of the hippocampus in rats<sup>122-126</sup>, mice<sup>127</sup> and non-human primates<sup>128</sup>. Additionally, these effects are dependent on the number of ECS sessions performed<sup>125</sup>. While these reports were conducted in naïve rodents, other studies showed similar increases in animal models of anxiety/depression<sup>39,129</sup>. Moreover, cECS rescues the decrease in cell proliferation after pharmacological stress induced by corticosterone administration<sup>130-132</sup>. The effects of cECS have been tested in animals where whole brain irradiation has been performed, resulting in a 60% decrease in cell proliferation<sup>133</sup>. In these animals, cECS reversed the irradiation-induced decrease in cell proliferation.

This neuronal proliferation is promoted and supported by ECS-induced increase in BDNF levels and the activation of BDNF-transduction pathway (see Section 7.3). The inhibition of Flk-1, a VEGF receptor, blocks the ECS-induced proliferation of neural precursors<sup>134</sup>. This suggests that VEGF-Flk-1 signal is necessary for pro-neurogenic action of ECS. Segi-Nishida also hypothesize that ECS, through VEGF-Flk-1 signaling, induce a symmetric division of quiescent neural

progenitors in early phase, and their maturation into amplifying neural precursors which proliferate asymmetrically in a later phase to produce immature neurons<sup>134</sup>.

## 8.2 Effect of ECS on cell survival

The first observation of the effects of cECS on cell survival in the DG of the hippocampus effects was obtained by the Duman's team, showing that both conventional antidepressant drug treatment (fluoxetine) and cECS increase cell survival in rats<sup>124</sup>, a finding corroborated by other study<sup>39,122,125,127,132</sup>. One study looked at the effect of cECS (4 sessions) performed at different stages of cell differentiation (D7-14, D14-21 and D21-28) and found no effects of this protocol on cell survival<sup>127</sup>. In non-human primates, cECS was also shown to promote cell survival<sup>128</sup>.

In a more recent study in rats, authors have shown that BrdU-incorporating cells were still detected in the hippocampus one year after incorporating BrdU in their DNA are always present in the brain 1 year after the last session of cECS<sup>35</sup>.

Additionally, cECS reduces cell death and apoptosis, as indicated by decreased cleavage of caspase-3, a marker of the apoptosis process<sup>135</sup>.

## 8.3 Effect of ECS on neuronal maturation

In physiological conditions, most of the stem cells will differentiate into neurons while the little proportion of the other cells differentiate in glial cells and oligodendrocytes or new stem cells<sup>136,137</sup>. Nearly of 80% of the new-born cells (BrdU+) generated after cECS are co-labelled with NeuN<sup>125</sup>. In another study where neurogenesis was monitored 3 months after the last ECS session, 90% of the BrdU+ labelling cells were also NeuN+, strongly suggesting that the majority of new-born cells after cECS differentiate into neurons<sup>138</sup>. Yanpallewar observe an increase in neuroblasts after cECS, as indicated by an increase in DCX labeled cells<sup>118</sup>, however, as previously mentioned, relying solely on DCX may not be adequate for monitoring neurogenesis<sup>121</sup>.

## 8.4 Effect of ECS on cell fate

In the hippocampus, the fate of new-born cells seems to be unaffected following ECS. Madsen observed that the percentage of new oligodendrocytes (BrdU<sup>+</sup>/Rip<sup>+</sup>) remained similar for sham and ECS-treated groups<sup>139</sup>. Similarly, Hellsten noticed that 80% of all newly generated cells differentiated into neurons in untreated rats, while about 70% did so in both acutely and chronically

ECS-treated rats, irrespective of whether the animals were naïve or modeled to exhibit depressive-like states<sup>132</sup>.

Interestingly, a study described a cell population characterized by the expression of the chondroitin sulfate proteoglycan NG2, for which the proportion of new-born cells decreased 3 weeks after the last ECS session. The authors hypothesized that this cell population dies over time or differentiates, thereby losing NG2 expression<sup>136</sup>.

Besides AHN, Imoto and his team demonstrated that ECS induce a decrease in hippocampal neurons in a mature state, and most especially granular cells of the DG<sup>140</sup>. Indeed, markers of mature neurons, i.e. Calb1, Tdo2 or Dsp and Il1r1 are less expressed in the neuronal cells of the DG after ECS, an effect also observed with chronic SSRI treatment. Synaptic transmission was altered as well, with increased excitability of the GC in the DG, resulting in a decrease in EPSP in the pyramidal cells in the CA3 of the hippocampus. However, the “dematuration” of the neurons was partial, Imoto indicating that these neurons kept a mature input resistance and membrane capacitance, normally increased in native immature neurons.

## 9 ECS promote neuroplasticity by synapse modulation

Electroconvulsive stimulation also promotes neuroplasticity, by modulating neuronal structures involved in the synapse structure. First, ECS increases the sprouting of mossy fiber in the subgranular zone (SGZ), resulting in an increase of Timm score in SGZ after chronic ECS session<sup>82,141</sup>.

Concerning neuroplasticity, ECS also promotes the enhancement of the dendritic spine density. In the CORT model of anxio-depressive-like behavior, mice exposed to chronic corticosterone administration showed an increase in the proportion of short dendritic spines, and smaller spine heads<sup>92</sup>. These corticosterone-induced defects in spine morphology were reversed by chronic ECS treatment. Additionally, the crucial involvement of the exon-I isoform of BDNF mRNA to the ECS effect on spine size has been revealed in animal models: ECS in BDNF<sup>exon-1</sup> KO mice results in a reduction of spine density compare to BDNF<sup>exon-1</sup> HZ mice<sup>142</sup>.

Neuroplasticity in mature neurons involves also the remodeling of the cellular membrane: ECS administration in Rats led to an increase in choline, a marker of phospholipase A2 activity and membrane turnover<sup>143</sup>. This membrane turnover can be associated with mossy fiber sprouting, neurogenesis, and synaptic plasticity, supported by the increase in BDNF expression.

## 10 Electroconvulsive stimulation modulates the neuro-immune system and glial cells

### 10.1 Activation of astrocytes and microglia

We previously mentioned that a chronic exposure to ECS increases the expression of GFAP, an intermediate filament of astrocytes serving as a marker of astrocyte activity<sup>107,109</sup>. This increase in astrocyte activity seems due to an increase in the intrinsic activity of preexisting astrocytes rather than an increase in astrocyte number<sup>130</sup>.

The antidepressant neurogenic effects of cECS in hippocampal DG seem to require the activation of the microglia. Indeed, microglia depletion (using a CSF-1 receptor or minocycline) in mice submitted to UCMS decreased in sucrose preference in SPT and increases in immobility in FST after cECS in comparison to microglia non-depleted mice<sup>144</sup>. Moreover, in non-depleted mice, UCMS decreases the number and alters the morphology of microglial cells in the DG, an effect reversed by cECS.

### 10.2 Electroconvulsive seizure activates AMPK pathway and thus autophagy

Recently, Kim and its collaborators<sup>145</sup> have described the modulation of AMPK pathway by ECS. In rodents treated with ECS, AMPK $\alpha$  and other mediators of this pathway (such as TAK-1 or CaMK-4) are more phosphorylated, leading to activation of the pathway, without modifying the quantity of proteins in the cell. This pathway is involved in cell growth and autophagy<sup>146</sup>.

ECS have been shown to enhance autophagy in rodents. Indeed, LC3-II and the ATG5-ATG12 conjugate, two markers of autophagosomes<sup>147</sup>, are overexpressed after ECS treatment<sup>135,145</sup>, strongly suggesting an increase in the autophagosome formation. This hypothesis was confirmed by an increase in the autophagosomes number in cortical neurons cytoplasm by electronic microscopy. According to the authors, ECS-induced autophagy might correct the impairment in autophagy process report in psychiatric disorders<sup>148</sup>.

## 11 Angiogenesis is modulated by ECS

Neurons and glial cells are not the only cells in the brain whose proliferation is enhanced under the influence of ECS treatment. Indeed, mitosis and differentiation of endothelial progenitors are enhanced by ECS treatment in the DG of the hippocampus. This phenomenon occurs in naïve rodents and anxio-depressive models, in which ECS partially reverses the corticosterone-induced

decrease in endothelial cell fraction<sup>118</sup>. However, just like for newborn neuronal cells, the proportion of new endothelial cells relative to all newly born cells remains unchanged<sup>139</sup>.

This angiogenesis is at the origin of an increase in the length and the density of vessels in the hippocampus<sup>149,150</sup>. Thus, it can be hypothesized that this blood vessels elongation in the hippocampus, where the ECS-induced neurogenesis occurs, allows the influx of nutrients and circulating factors for the proper functioning and development of the newborn cells.

## 12 Brain alteration induced by ECS

Electroconvulsive stimulation is responsible of an epilepticus-like seizure similarly to chemical-induced seizure (after kainic acid/kainate or pilocarpine injection), with many biochemical processes in common, such as increase in neurogenesis<sup>151</sup>, or in increase in newborn neurons expressing calretinin<sup>128</sup>.

However, while chemical seizures induced by kainic acid are associated with neuronal lesions and cell death, no injury has been observed after a chronic ECS session. More precisely, studies in *Macaca mulatta* brain showed no change in brain total volume, neuronal and glial density as well as number of neurons and glial cells after the application of electrical stimulation<sup>152</sup>. Interestingly, Dwork previously reported that the immunolabelling of GFAP is greater in the superior frontal gyrus of ECS treated monkeys, suggesting a transient astrocytic activation<sup>153</sup>.

## 13 Neurotransmission changes during and after ECS treatment

Depending on the studies, ECS has been shown to alter serotonergic neurotransmission. Using mice in lacking TPh2, the gene coding for tryptophan hydroxylase, a key enzyme for 5-HT synthesis, authors showed ECS antidepressant-like effect was lost in KO mice compared to WT, associated with a decreased neurogenic effect of ECS<sup>57</sup>.

5-HT<sub>2</sub> receptor binding has been studied using [<sup>18</sup>F]setoperone, a 5-HT<sub>2</sub> receptor ligand with a greater affinity for 5-HT<sub>2A</sub> receptors. Decrease in 5-HT<sub>2</sub> receptor binding has been observed after chronic ECS in non-human primates<sup>154</sup>. In comparison, Landau et al described an increase in 5-HT<sub>2A</sub> receptor binding in cortical and hippocampal regions in minipigs using [<sup>11</sup>C]MDL100,907<sup>155</sup>. These discrepancies may suggest species-dependent effects of ECS on 5-HT<sub>2</sub> regulation. Another possibility accounting for these differential results is the selectivity of the radiolabelled compound MDL100,907 display greater selectivity toward 5-HT<sub>2A</sub> receptors compared to setoperone.

Interestingly, this study in minipigs confirms prior studies in Rats using [<sup>11</sup>C]MDL100,907 which observed an increase in 5-HT<sub>2A</sub> binding after chronic ECS<sup>156</sup>.

The ECS effects also involve dopaminergic neurotransmission: antagonists of the dopamine D<sub>1</sub> receptor have been shown to importantly reduce the ECS effects in the FST<sup>40</sup>. Moreover, chronic ECS increases dopamine D<sub>3</sub> receptor mRNA expression and binding in the nucleus accumbens and the islands of Callejas<sup>157</sup>, but also the interstitial level of dopamine is increased in the striatum and in the frontal cortex following repeated ECS treatment<sup>158,159</sup>.

Electrophysiological studies (see Table 5) report that repeated -ECS greatly reduces the amount of LTP that can be elicited in the DG of the hippocampus when measured by recording the percentage change in EPSP slope and spike amplitude in response<sup>160,161</sup>. This reduction in LTP may indicate that LTP-like synaptic efficacy changes are incrementally induced during repeated ECS and the authors proposed that ECS tends to 'saturate' hippocampal synaptic plasticity such that the capacity for change is reduced. Interestingly, the same team compared the effects of ECS and chronic fluoxetine administration and showed similar effects of both strategies on EPSP slope<sup>61</sup>. Li and colleagues confirm the increase in EPSP slope and add that this effect is in opposition to the effects of stress in a depressive-like model (unpredictable chronic middle stress), in which EPSP is decreased<sup>48</sup>.

## 14 Conclusion

This work reviewed various protocols for assessing the effects of chronic ECS protocols in rodents, and their effects on emotional behavior, and the molecular and cellular changes induced by this procedure in naïve animals and animal models of the disease (see Fig. 4). At the behavioral level, ECS reproduces the behavioral effects of the electroconvulsive therapy ECT in humans. ECS treatment regulates gene expression and increases AHN. Among the genes regulated by ECS, an increase in the expression of neurotrophic and growth factors has been shown in a similar manner to conventional antidepressant drug treatment. The pathophysiology of depression includes processes in the hippocampus such as a decrease in AHN and synaptic plasticity, that can be reversed with antidepressant treatment or ECT, associated with increased angiogenesis. Nevertheless, ECS in rodents is also responsible for memory and learning impairments as ECT induces human retrograde and anterograde amnesia in humans, confirming the validity of this experimental model. The combination of ketamine with ECT emerges as a particularly promising

treatment for depression resistant to antidepressant drugs, due to ketamine's antidepressant action and its partial amnesia-preventive effect alongside its anesthetic properties.

Overall, this preclinical review confirms the beneficial effects of ECS on mood-related disorders and comforts its use for patients who do not respond adequately to various classic antidepressant strategies.

## 15 Acknowledgements

This work was supported by a grant from the Fondation de France, Programme de Recherche sur les Maladies Psychiatriques—Eng 00081237/2017 and by the Ministère de l'Éducation Nationale, de l'Enseignement Supérieur et de la Recherche (MENESR, Paris, France) Fellowship (RL). Selected artwork (cell membranes, cells, transporters, proteins) shown in the figures were used from or adapted from pictures provided by Servier Medical Art (Servier; <https://smart.servier.com/>), licensed under a Creative Commons Attribution 4.0 Unported License.

## 16 Conflict of interest

The authors declare that the research was conducted in the absence of any commercial or financial relationships that could be construed as a potential conflict of interest.

1. Association AP. *Diagnostic and statistical manual of mental disorders (5th ed.)*. Arlington, VA: American Psychiatric Publishing; 2013.
2. Lepine JP, Briley M. The increasing burden of depression. *Neuropsychiatr Dis Treat*. 2011; 7(Suppl 1):3-7.
3. Guilloux JP, David DJ, Samuels BA, et al. Non-response to initial antidepressant therapy. *Psychology*. Rijeka, Croatia: InTech; 2012.
4. Rush AJ, Wisniewski SR, Warden D, et al. Selecting among second-step antidepressant medication monotherapies: predictive value of clinical, demographic, or first-step treatment features. *Arch Gen Psychiatry*. 2008; 65(8):870-880.
5. Trivedi MH, Fava M, Wisniewski SR, et al. Medication augmentation after the failure of SSRIs for depression. *N Engl J Med*. 2006; 354(12):1243-1252.
6. Connolly KR, Thase ME. If at first you don't succeed: a review of the evidence for antidepressant augmentation, combination and switching strategies. *Drugs*. 2011; 71(1):43-64.
7. Ruhe HG, van Rooijen G, Spijker J, et al. Staging methods for treatment resistant depression. A systematic review. *J Affect Disord*. 2012; 137(1-3):35-45.
8. Gaynes BN, Rush AJ, Trivedi MH, et al. The STAR\*D study: treating depression in the real world. *Cleve Clin J Med*. 2008; 75(1):57-66.
9. Cantu F, Ciappolino V, Enrico P, et al. Augmentation with Atypical Antipsychotics for Treatment-Resistant Depression. *J Affect Disord*. 2021; 280(Pt A):45-53.
10. Voineskos D, Daskalakis ZJ, Blumberger DM. Management of Treatment-Resistant Depression: Challenges and Strategies. *Neuropsychiatr Dis Treat*. 2020; 16:221-234.
11. Carter B, Strawbridge R, Husain MI, et al. Relative effectiveness of augmentation treatments for treatment-resistant depression: a systematic review and network meta-analysis. *Int Rev Psychiatry*. 2020; 32(5-6):477-490.
12. Nunez NA, Joseph B, Pahwa M, et al. Augmentation strategies for treatment resistant major depression: A systematic review and network meta-analysis. *J Affect Disord*. 2022; 302:385-400.
13. Kasper S, Cubala WJ, Fagiolini A, et al. Practical recommendations for the management of treatment-resistant depression with esketamine nasal spray therapy: Basic science, evidence-based knowledge and expert guidance. *World J Biol Psychiatry*. 2020:1-15.
14. Carhart-Harris RL, Bolstridge M, Rucker J, et al. Psilocybin with psychological support for treatment-resistant depression: an open-label feasibility study. *Lancet Psychiatry*. 2016; 3(7):619-627.
15. Group UER. Efficacy and safety of electroconvulsive therapy in depressive disorders: a systematic review and meta-analysis. *Lancet*. 2003; 361(9360):799-808.
16. Kellner CH, Kaicher DC, Banerjee H, et al. Depression severity in electroconvulsive therapy (ECT) versus pharmacotherapy trials. *J ECT*. 2015; 31(1):31-33.
17. Pagnin D, de Queiroz V, Pini S, et al. Efficacy of ECT in depression: a meta-analytic review. *J ECT*. 2004; 20(1):13-20.
18. Mutz J, Vipulanathan V, Carter B, et al. Comparative efficacy and acceptability of non-surgical brain stimulation for the acute treatment of major depressive episodes in adults: systematic review and network meta-analysis. *BMJ*. 2019; 364:l1079.
19. Tor PC, Tan XW, Martin D, et al. Comparative outcomes in electroconvulsive therapy (ECT): A naturalistic comparison between outcomes in psychosis, mania, depression, psychotic depression and catatonia. *Eur Neuropsychopharmacol*. 2021; 51:43-54.
20. Fink M. Convulsive therapy: a review of the first 55 years. *J Affect Disord*. 2001; 63(1-3):1-15.
21. Lisanby SH, Maddox JH, Prudic J, et al. The effects of electroconvulsive therapy on memory of autobiographical and public events. *Arch Gen Psychiatry*. 2000; 57(6):581-590.

22. Semkowska M, McLoughlin DM. Objective cognitive performance associated with electroconvulsive therapy for depression: a systematic review and meta-analysis. *Biol Psychiatry*. 2010; 68(6):568-577.
23. Meeter M, Murre JM, Janssen SM, et al. Retrograde amnesia after electroconvulsive therapy: a temporary effect? *J Affect Disord*. 2011; 132(1-2):216-222.
24. Espinoza RT, Kellner CH. Electroconvulsive Therapy. *N Engl J Med*. 2022; 386(7):667-672.
25. Leaver AM, Espinoza R, Wade B, et al. Parsing the Network Mechanisms of Electroconvulsive Therapy. *Biol Psychiatry*. 2021.
26. Nikisch G, Mathe AA. CSF monoamine metabolites and neuropeptides in depressed patients before and after electroconvulsive therapy. *Eur Psychiatry*. 2008; 23(5):356-359.
27. Pandey GN, Heinze WJ, Brown BD, et al. Electroconvulsive shock treatment decrease beta-adrenergic receptor sensitivity in rat brain. *Nature*. 1979; 280(5719):234-235.
28. Couzin-Frankel J. When mice mislead. *Science*. 2013; 342(6161):922-923, 925.
29. Donner NC, Lowry CA. Sex differences in anxiety and emotional behavior. *Pflugers Arch*. 2013; 465(5):601-626.
30. Beery AK, Zucker I. Sex bias in neuroscience and biomedical research. *Neurosci Biobehav Rev*. 2011; 35(3):565-572.
31. Andrade C, Kurinji S, Sudha S, et al. Effects of pulse amplitude, pulse frequency, and stimulus duration on seizure threshold: a laboratory investigation. *J ECT*. 2002; 18(3):144-148.
32. Kyremanteng C, MacKay JC, James JS, et al. Effects of electroconvulsive seizures on depression-related behavior, memory and neurochemical changes in Wistar and Wistar-Kyoto rats. *Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry*. 2014; 54:170-178.
33. Alemu JL, Elberling F, Azam B, et al. Electroconvulsive treatment prevents chronic restraint stress-induced atrophy of the hippocampal formation-A stereological study. *Brain Behav*. 2019; 9(2):e01195.
34. Hageman I, Nielsen M, Wortwein G, et al. Electroconvulsive stimulations normalizes stress-induced changes in the glucocorticoid receptor and behaviour. *Behav Brain Res*. 2009; 196(1):71-77.
35. Olesen MV, Wortwein G, Folke J, et al. Electroconvulsive stimulation results in long-term survival of newly generated hippocampal neurons in rats. *Hippocampus*. 2017; 27(1):52-60.
36. O'Donovan S, Dalton V, Harkin A, et al. Effects of brief pulse and ultrabrief pulse electroconvulsive stimulation on rodent brain and behaviour in the corticosterone model of depression. *Int J Neuropsychopharmacol*. 2014; 17(9):1477-1486.
37. Chang AD, Vaidya PV, Retzbach EP, et al. Narp Mediates Antidepressant-Like Effects of Electroconvulsive Seizures. *Neuropsychopharmacology*. 2018; 43(5):1088-1098.
38. Theilmann W, Loscher W, Socala K, et al. A new method to model electroconvulsive therapy in rats with increased construct validity and enhanced translational value. *J Psychiatr Res*. 2014; 53:94-98.
39. Jonckheere J, Deloulme JC, Dall'igna G, et al. Short- and long-term efficacy of electroconvulsive stimulation in animal models of depression: The essential role of neuronal survival. *Brain Stimul*. 2018; 11(6):1336-1347.
40. Suzuki M, Masuda Y. Effect of repeated electroconvulsive shock treatment on a depression model, mouse forced swimming. *Tohoku J Exp Med*. 1999; 189(1):83-86.
41. Holick KA, Lee DC, Hen R, et al. Behavioral effects of chronic fluoxetine in BALB/cJ mice do not require adult hippocampal neurogenesis or the serotonin 1A receptor. *Neuropsychopharmacology*. 2008; 33(2):406-417.
42. de Kloet ER, Molendijk ML. Floating Rodents and Stress-Coping Neurobiology. *Biol Psychiatry*. 2021; 90(4):e19-e21.
43. Molendijk ML, de Kloet ER. Forced swim stressor: Trends in usage and mechanistic consideration. *Eur J Neurosci*. 2021.
44. Molendijk ML, de Kloet ER. Coping with the forced swim stressor: Current state-of-the-art. *Behav Brain Res*. 2019; 364:1-10.

45. De Pablo JM, Parra A, Segovia S, et al. Learned immobility explains the behavior of rats in the forced swimming test. *Physiol Behav.* 1989; 46(2):229-237.
46. Campus P, Colelli V, Orsini C, et al. Evidence for the involvement of extinction-associated inhibitory learning in the forced swimming test. *Behav Brain Res.* 2015; 278:348-355.
47. Steru L, Chermat R, Thierry B, et al. The tail suspension test: a new method for screening antidepressants in mice. *Psychopharmacology (Berl).* 1985; 85(3):367-370.
48. Li W, Liu L, Liu YY, et al. Effects of electroconvulsive stimulation on long-term potentiation and synaptophysin in the hippocampus of rats with depressive behavior. *J ECT.* 2012; 28(2):111-117.
49. Luo J, Min S, Wei K, et al. Behavioral and molecular responses to electroconvulsive shock differ between genetic and environmental rat models of depression. *Psychiatry Res.* 2015; 226(2-3):451-460.
50. Luo J, Min S, Wei K, et al. Propofol interacts with stimulus intensities of electroconvulsive shock to regulate behavior and hippocampal BDNF in a rat model of depression. *Psychiatry Res.* 2012; 198(2):300-306.
51. Henningsen K, Woldbye DP, Wiborg O. Electroconvulsive stimulation reverses anhedonia and cognitive impairments in rats exposed to chronic mild stress. *Eur Neuropsychopharmacol.* 2013; 23(12):1789-1794.
52. Neyazi A, Theilmann W, Brandt C, et al. P11 promoter methylation predicts the antidepressant effect of electroconvulsive therapy. *Transl Psychiatry.* 2018; 8(1):25.
53. Schloesser RJ, Orvoen S, Jimenez DV, et al. Antidepressant-like Effects of Electroconvulsive Seizures Require Adult Neurogenesis in a Neuroendocrine Model of Depression. *Brain Stimul.* 2015; 8(5):862-867.
54. Lebeau RH, Mendez-David I, Kucynski-Noyau L, et al. Peripheral proteomic changes after electroconvulsive seizures (ECS) in a rodent model of non-response to chronic fluoxetine. *Front Pharm.* 2022 (in press).
55. Walf AA, Frye CA. The use of the elevated plus maze as an assay of anxiety-related behavior in rodents. *Nat Protoc.* 2007; 2(2):322-328.
56. Lebeau RH, Mendez-David I, Kucynski-Noyau L, et al. Peripheral proteomic changes after electroconvulsive seizures in a rodent model of non-response to chronic fluoxetine. *Front Pharmacol.* 2022; 13:993449.
57. Kronenberg G, Petermann M, Dormann C, et al. Brain serotonin critically contributes to the biological effects of electroconvulsive seizures. *Eur Arch Psychiatry Clin Neurosci.* 2018; 268(8):861-864.
58. Park HG, Kim SH, Kim HS, et al. Repeated electroconvulsive seizure treatment in rats reduces inducibility of early growth response genes and hyperactivity in response to cocaine administration. *Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry.* 2011; 35(4):1014-1021.
59. Milev RV, Giacobbe P, Kennedy SH, et al. Canadian Network for Mood and Anxiety Treatments (CANMAT) 2016 Clinical Guidelines for the Management of Adults with Major Depressive Disorder: Section 4. Neurostimulation Treatments. *Can J Psychiatry.* 2016; 61(9):561-575.
60. Zhang F, Huang G, Zhu X. Effect of different charges of modified electroconvulsive seizure on the cognitive behavior in stressed rats: Effects of GluR1 phosphorylation and CaMKIIalpha activity. *Exp Ther Med.* 2019; 17(1):748-758.
61. Stewart CA, Reid IC. Repeated ECS and fluoxetine administration have equivalent effects on hippocampal synaptic plasticity. *Psychopharmacology (Berl).* 2000; 148(3):217-223.
62. Verdijk J, van Kessel MA, Oud M, et al. Pharmacological interventions to diminish cognitive side effects of electroconvulsive therapy: A systematic review and meta-analysis. *Acta Psychiatr Scand.* 2022; 145(4):343-356.
63. Nagaraja N, Andrade C, Sudha S, et al. Glucocorticoid mechanisms may contribute to ECT-induced retrograde amnesia. *Psychopharmacology (Berl).* 2007; 190(1):73-80.
64. Andrade C, Suresh S, Krishnan J, et al. Effects of stimulus parameters on seizure duration and ECS-induced retrograde amnesia. *J ECT.* 2002; 18(1):31-37.

65. Huang CT, Chen CH. Identification of gene transcripts in rat frontal cortex that are regulated by repeated electroconvulsive seizure treatment. *Neuropsychobiology*. 2008; 58(3-4):171-177.
66. Sakaida M, Sukeno M, Imoto Y, et al. Electroconvulsive seizure-induced changes in gene expression in the mouse hypothalamic paraventricular nucleus. *J Psychopharmacol*. 2013; 27(11):1058-1069.
67. Voleti B, Tanis KQ, Newton SS, et al. Analysis of target genes regulated by chronic electroconvulsive therapy reveals role for Fzd6 in depression. *Biol Psychiatry*. 2012; 71(1):51-58.
68. Suzuki MM, Bird A. DNA methylation landscapes: provocative insights from epigenomics. *Nat Rev Genet*. 2008; 9(6):465-476.
69. Reik W. Stability and flexibility of epigenetic gene regulation in mammalian development. *Nature*. 2007; 447(7143):425-432.
70. Guo JU, Ma DK, Mo H, et al. Neuronal activity modifies the DNA methylation landscape in the adult brain. *Nat Neurosci*. 2011; 14(10):1345-1351.
71. Pusalkar M, Ghosh S, Jaggar M, et al. Acute and Chronic Electroconvulsive Seizures (ECS) Differentially Regulate the Expression of Epigenetic Machinery in the Adult Rat Hippocampus. *Int J Neuropsychopharmacol*. 2016; 19(9).
72. Yao ZH, Kang X, Yang L, et al. PBA regulates neurogenesis and cognition dysfunction after repeated electroconvulsive shock in a rat model. *Psychiatry Res*. 2015; 230(2):331-340.
73. Kang UG, Koo YJ, Jeon WJ, et al. Activation of extracellular signal-regulated kinase signaling by chronic electroconvulsive shock in the rat frontal cortex. *Psychiatry Res*. 2006; 145(1):75-78.
74. Ahn YM, Oh SW, Kang UG, et al. An N-methyl-D-aspartate antagonist, MK-801, preferentially reduces electroconvulsive shock-induced phosphorylation of p38 mitogen-activated protein kinase in the rat hippocampus. *Neurosci Lett*. 2000; 296(2-3):101-104.
75. Oh SW, Ahn YM, Kang UG, et al. Differential activation of c-Jun N-terminal protein kinase and p38 in rat hippocampus and cerebellum after electroconvulsive shock. *Neurosci Lett*. 1999; 271(2):101-104.
76. Dyrvig M, Christiansen SH, Woldbye DP, et al. Temporal gene expression profile after acute electroconvulsive stimulation in the rat. *Gene*. 2014; 539(1):8-14.
77. Madsen TM, Newton SS, Eaton ME, et al. Chronic electroconvulsive seizure up-regulates beta-catenin expression in rat hippocampus: role in adult neurogenesis. *Biol Psychiatry*. 2003; 54(10):1006-1014.
78. Tanis KQ, Duman RS, Newton SS. CREB binding and activity in brain: regional specificity and induction by electroconvulsive seizure. *Biol Psychiatry*. 2008; 63(7):710-720.
79. Dyrvig M, Hansen HH, Christiansen SH, et al. Epigenetic regulation of Arc and c-Fos in the hippocampus after acute electroconvulsive stimulation in the rat. *Brain Res Bull*. 2012; 88(5):507-513.
80. Colucci-D'Amato L, Speranza L, Volpicelli F. Neurotrophic Factor BDNF, Physiological Functions and Therapeutic Potential in Depression, Neurodegeneration and Brain Cancer. *Int J Mol Sci*. 2020; 21(20).
81. Altar CA, Laeng P, Jurata LW, et al. Electroconvulsive seizures regulate gene expression of distinct neurotrophic signaling pathways. *J Neurosci*. 2004; 24(11):2667-2677.
82. Chen AC, Shin KH, Duman RS, et al. ECS-Induced mossy fiber sprouting and BDNF expression are attenuated by ketamine pretreatment. *J ECT*. 2001; 17(1):27-32.
83. O'Donovan S, Kennedy M, Guinan B, et al. A comparison of brief pulse and ultrabrief pulse electroconvulsive stimulation on rodent brain and behaviour. *Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry*. 2012; 37(1):147-152.
84. Nibuya M, Morinobu S, Duman RS. Regulation of BDNF and trkB mRNA in rat brain by chronic electroconvulsive seizure and antidepressant drug treatments. *J Neurosci*. 1995; 15(11):7539-7547.
85. Moon HY, Kim SH, Yang YR, et al. Macrophage migration inhibitory factor mediates the antidepressant actions of voluntary exercise. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2012; 109(32):13094-13099.
86. Sartorius A, Hellweg R, Litzke J, et al. Correlations and discrepancies between serum and brain tissue levels of neurotrophins after electroconvulsive treatment in rats. *Pharmacopsychiatry*. 2009; 42(6):270-276.

87. Pan W, Banks WA, Fasold MB, et al. Transport of brain-derived neurotrophic factor across the blood-brain barrier. *Neuropharmacology*. 1998; 37(12):1553-1561.
88. Molendijk ML, Spinhoven P, Polak M, et al. Serum BDNF concentrations as peripheral manifestations of depression: evidence from a systematic review and meta-analyses on 179 associations (N=9484). *Mol Psychiatry*. 2014; 19(7):791-800.
89. Polyakova M, Schroeter ML, Elzinga BM, et al. Brain-Derived Neurotrophic Factor and Antidepressive Effect of Electroconvulsive Therapy: Systematic Review and Meta-Analyses of the Preclinical and Clinical Literature. *PLoS One*. 2015; 10(11):e0141564.
90. Aid T, Kazantseva A, Piirsoo M, et al. Mouse and rat BDNF gene structure and expression revisited. *J Neurosci Res*. 2007; 85(3):525-535.
91. Dias BG, Banerjee SB, Duman RS, et al. Differential regulation of brain derived neurotrophic factor transcripts by antidepressant treatments in the adult rat brain. *Neuropharmacology*. 2003; 45(4):553-563.
92. Maynard KR, Hobbs JW, Rajpurohit SK, et al. Electroconvulsive seizures influence dendritic spine morphology and BDNF expression in a neuroendocrine model of depression. *Brain Stimul*. 2018; 11(4):856-859.
93. Martinowich K, Schloesser RJ, Jimenez DV, et al. Activity-dependent brain-derived neurotrophic factor expression regulates corticostatin-interneurons and sleep behavior. *Mol Brain*. 2011; 4:11.
94. Banerjee SB, Rajendran R, Dias BG, et al. Recruitment of the Sonic hedgehog signalling cascade in electroconvulsive seizure-mediated regulation of adult rat hippocampal neurogenesis. *Eur J Neurosci*. 2005; 22(7):1570-1580.
95. Enomoto S, Shimizu K, Nibuya M, et al. Increased expression of endocytosis-Related proteins in rat hippocampus following 10-day electroconvulsive seizure treatment. *Neurosci Lett*. 2016; 624:85-91.
96. Svenningsson P, Kim Y, Warner-Schmidt J, et al. p11 and its role in depression and therapeutic responses to antidepressants. *Nat Rev Neurosci*. 2013; 14(10):673-680.
97. Warner-Schmidt JL, Flajolet M, Maller A, et al. Role of p11 in cellular and behavioral effects of 5-HT4 receptor stimulation. *J Neurosci*. 2009; 29(6):1937-1946.
98. Svenningsson P, Chergui K, Rachleff I, et al. Alterations in 5-HT1B receptor function by p11 in depression-like states. *Science*. 2006; 311(5757):77-80.
99. Rosa DV, Souza RP, Souza BR, et al. DARPP-32 expression in rat brain after electroconvulsive stimulation. *Brain Res*. 2007; 1179:35-41.
100. Guitart X, Nestler EJ. Chronic administration of lithium or other antidepressants increases levels of DARPP-32 in rat frontal cortex. *J Neurochem*. 1992; 59(3):1164-1167.
101. Svenningsson P, Tzavara ET, Liu F, et al. DARPP-32 mediates serotonergic neurotransmission in the forebrain. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2002; 99(5):3188-3193.
102. Heyser CJ, Fienberg AA, Greengard P, et al. DARPP-32 knockout mice exhibit impaired reversal learning in a discriminated operant task. *Brain Res*. 2000; 867(1-2):122-130.
103. Cho K, Cho MH, Seo JH, et al. Calpain-mediated cleavage of DARPP-32 in Alzheimer's disease. *Aging Cell*. 2015; 14(5):878-886.
104. Mughal MR, Baharani A, Chigurupati S, et al. Electroconvulsive shock ameliorates disease processes and extends survival in huntingtin mutant mice. *Hum Mol Genet*. 2011; 20(4):659-669.
105. An X, Shi X. Effects of electroconvulsive shock on neuro-immune responses: Does neuro-damage occur? *Psychiatry Res*. 2020; 292:113289.
106. Gosselin RD, Gibney S, O'Malley D, et al. Region specific decrease in glial fibrillary acidic protein immunoreactivity in the brain of a rat model of depression. *Neuroscience*. 2009; 159(2):915-925.
107. Kragh J, Bolwig TG, Woldbye DP, et al. Electroconvulsive shock and lidocaine-induced seizures in the rat activate astrocytes as measured by glial fibrillary acidic protein. *Biol Psychiatry*. 1993; 33(11-12):794-800.

108. Cereser KM, Frey BN, Bernardes FB, et al. Glial fibrillary acidic protein expression after electroconvulsive shocks in rat brain. *Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry*. 2006; 30(4):663-667.
109. Okada-Tsuchioka M, Segawa M, Kajitani N, et al. Electroconvulsive seizure induces thrombospondin-1 in the adult rat hippocampus. *Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry*. 2014; 48:236-244.
110. Kim SH, Park HG, Jeong SH, et al. Electroconvulsive Seizure Alters the Expression and Daily Oscillation of Circadian Genes in the Rat Frontal Cortex. *Psychiatry Investig*. 2018; 15(7):717-726.
111. Ganesh RA, Venkataraman K, Sirdeshmukh R. GPR56: An adhesion GPCR involved in brain development, neurological disorders and cancer. *Brain Res*. 2020; 1747:147055.
112. Belzeaux R, Gorgievski V, Fiori LM, et al. GPR56/ADGRG1 is associated with response to antidepressant treatment. *Nat Commun*. 2020; 11(1):1635.
113. Suzuki G, Kanda Y, Nibuya M, et al. Stress and electroconvulsive seizure differentially alter GPR56 expression in the adult rat brain. *Brain Res*. 2007; 1183:21-31.
114. Girgenti MJ, Hunsberger J, Duman CH, et al. Erythropoietin induction by electroconvulsive seizure, gene regulation, and antidepressant-like behavioral effects. *Biol Psychiatry*. 2009; 66(3):267-274.
115. Rajkowska G, Hughes J, Stockmeier CA, et al. Coverage of blood vessels by astrocytic endfeet is reduced in major depressive disorder. *Biol Psychiatry*. 2013; 73(7):613-621.
116. Azis IA, Hashioka S, Tsuchie K, et al. Electroconvulsive shock restores the decreased coverage of brain blood vessels by astrocytic endfeet and ameliorates depressive-like behavior. *J Affect Disord*. 2019; 257:331-339.
117. Di Benedetto B, Malik VA, Begum S, et al. Fluoxetine Requires the Endfeet Protein Aquaporin-4 to Enhance Plasticity of Astrocyte Processes. *Front Cell Neurosci*. 2016; 10:8.
118. Yanpallewar SU, Barrick CA, Palko ME, et al. Tamalin is a critical mediator of electroconvulsive shock-induced adult neuroplasticity. *J Neurosci*. 2012; 32(7):2252-2262.
119. Mendez-David I, El-Ali Z, Hen R, et al. A method for biomarker measurements in peripheral blood mononuclear cells isolated from anxious and depressed mice: beta-arrestin 1 protein levels in depression and treatment. *Front Pharmacol*. 2013; 4:124.
120. Kempermann G. What Is Adult Hippocampal Neurogenesis Good for? *Front Neurosci*. 2022; 16:852680.
121. Mendez-David I, David DJ, Delomenie C, et al. A complex relation between levels of adult hippocampal neurogenesis and expression of the immature neuron marker doublecortin. *Hippocampus*. 2023.
122. Gurok U, Loebbert RW, Meyer AH, et al. Laser capture microdissection and microarray analysis of dividing neural progenitor cells from the adult rat hippocampus. *Eur J Neurosci*. 2007; 26(5):1079-1090.
123. Ito M, Seki T, Liu J, et al. Effects of repeated electroconvulsive seizure on cell proliferation in the rat hippocampus. *Synapse*. 2010; 64(11):814-821.
124. Malberg JE, Eisch AJ, Nestler EJ, et al. Chronic antidepressant treatment increases neurogenesis in adult rat hippocampus. *J Neurosci*. 2000; 20(24):9104-9110.
125. Nakamura K, Ito M, Liu Y, et al. Effects of single and repeated electroconvulsive stimulation on hippocampal cell proliferation and spontaneous behaviors in the rat. *Brain Res*. 2013; 1491:88-97.
126. Svensson M, Grahm M, Ekstrand J, et al. Effect of electroconvulsive seizures on pattern separation. *Hippocampus*. 2015; 25(11):1351-1360.
127. Ueno M, Sugimoto M, Ohtsubo K, et al. The effect of electroconvulsive seizure on survival, neuronal differentiation, and expression of the maturation marker in the adult mouse hippocampus. *J Neurochem*. 2019; 149(4):488-498.
128. Perera TD, Coplan JD, Lisanby SH, et al. Antidepressant-induced neurogenesis in the hippocampus of adult nonhuman primates. *J Neurosci*. 2007; 27(18):4894-4901.
129. Olesen MV, Wortwein G, Pakkenberg B. Electroconvulsive stimulation, but not chronic restraint stress, causes structural alterations in adult rat hippocampus--a stereological study. *Hippocampus*. 2015; 25(1):72-80.

130. Wennstrom M, Hellsten J, Ekstrand J, et al. Corticosterone-induced inhibition of gliogenesis in rat hippocampus is counteracted by electroconvulsive seizures. *Biol Psychiatry*. 2006; 59(2):178-186.
131. Ekstrand J, Hellsten J, Wennstrom M, et al. Differential inhibition of neurogenesis and angiogenesis by corticosterone in rats stimulated with electroconvulsive seizures. *Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry*. 2008; 32(6):1466-1472.
132. Hellsten J, Wennstrom M, Mohapel P, et al. Electroconvulsive seizures increase hippocampal neurogenesis after chronic corticosterone treatment. *Eur J Neurosci*. 2002; 16(2):283-290.
133. Warner-Schmidt JL, Madsen TM, Duman RS. Electroconvulsive seizure restores neurogenesis and hippocampus-dependent fear memory after disruption by irradiation. *Eur J Neurosci*. 2008; 27(6):1485-1493.
134. Segi-Nishida E, Warner-Schmidt JL, Duman RS. Electroconvulsive seizure and VEGF increase the proliferation of neural stem-like cells in rat hippocampus. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2008; 105(32):11352-11357.
135. Otabe H, Nibuya M, Shimazaki K, et al. Electroconvulsive seizures enhance autophagy signaling in rat hippocampus. *Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry*. 2014; 50:37-43.
136. Wennstrom M, Hellsten J, Ekdahl CT, et al. Electroconvulsive seizures induce proliferation of NG2-expressing glial cells in adult rat hippocampus. *Biol Psychiatry*. 2003; 54(10):1015-1024.
137. Dranovsky A, Picchini AM, Moadel T, et al. Experience dictates stem cell fate in the adult hippocampus. *Neuron*. 2011; 70(5):908-923.
138. Madsen TM, Treschow A, Bengzon J, et al. Increased neurogenesis in a model of electroconvulsive therapy. *Biol Psychiatry*. 2000; 47(12):1043-1049.
139. Madsen TM, Yeh DD, Valentine GW, et al. Electroconvulsive seizure treatment increases cell proliferation in rat frontal cortex. *Neuropsychopharmacology*. 2005; 30(1):27-34.
140. Imoto Y, Segi-Nishida E, Suzuki H, et al. Rapid and stable changes in maturation-related phenotypes of the adult hippocampal neurons by electroconvulsive treatment. *Mol Brain*. 2017; 10(1):8.
141. Lamont SR, Stanwell BJ, Hill R, et al. Ketamine pre-treatment dissociates the effects of electroconvulsive stimulation on mossy fibre sprouting and cellular proliferation in the dentate gyrus. *Brain Res*. 2005; 1053(1-2):27-32.
142. Ramnauth AD, Maynard KR, Kardian AS, et al. Induction of Bdnf from promoter I following electroconvulsive seizures contributes to structural plasticity in neurons of the piriform cortex. *Brain Stimul*. 2022; 15(2):427-433.
143. Sartorius A, Neumann-Haefelin C, Vollmayr B, et al. Choline rise in the rat hippocampus induced by electroconvulsive shock treatment. *Biol Psychiatry*. 2003; 53(7):620-623.
144. Rimmerman N, Verdiger H, Goldenberg H, et al. Microglia and their LAG3 checkpoint underlie the antidepressant and neurogenesis-enhancing effects of electroconvulsive stimulation. *Mol Psychiatry*. 2022; 27(2):1120-1135.
145. Kim SH, Yu HS, Park S, et al. Electroconvulsive Seizures Induce Autophagy by Activating the AMPK Signaling Pathway in the Rat Frontal Cortex. *Int J Neuropsychopharmacol*. 2020; 23(1):42-52.
146. Mihaylova MM, Shaw RJ. The AMPK signalling pathway coordinates cell growth, autophagy and metabolism. *Nat Cell Biol*. 2011; 13(9):1016-1023.
147. Tanida I, Ueno T, Kominami E. LC3 conjugation system in mammalian autophagy. *Int J Biochem Cell Biol*. 2004; 36(12):2503-2518.
148. Pierone BC, Pereira CA, Garcez ML, et al. Stress and signaling pathways regulating autophagy: From behavioral models to psychiatric disorders. *Exp Neurol*. 2020; 334:113485.
149. Hellsten J, West MJ, Arvidsson A, et al. Electroconvulsive seizures induce angiogenesis in adult rat hippocampus. *Biol Psychiatry*. 2005; 58(11):871-878.

150. Chen F, Ardalan M, Elfving B, et al. Mitochondria Are Critical for BDNF-Mediated Synaptic and Vascular Plasticity of Hippocampus following Repeated Electroconvulsive Seizures. *Int J Neuropsychopharmacol*. 2018; 21(3):291-304.
151. Gray WP, Sundstrom LE. Kainic acid increases the proliferation of granule cell progenitors in the dentate gyrus of the adult rat. *Brain Res*. 1998; 790(1-2):52-59.
152. Dwork AJ, Christensen JR, Larsen KB, et al. Unaltered neuronal and glial counts in animal models of magnetic seizure therapy and electroconvulsive therapy. *Neuroscience*. 2009; 164(4):1557-1564.
153. Dwork AJ, Arango V, Underwood M, et al. Absence of histological lesions in primate models of ECT and magnetic seizure therapy. *Am J Psychiatry*. 2004; 161(3):576-578.
154. Strome EM, Clark CM, Zis AP, et al. Electroconvulsive shock decreases binding to 5-HT<sub>2</sub> receptors in nonhuman primates: an in vivo positron emission tomography study with [<sup>18</sup>F]setoperone. *Biol Psychiatry*. 2005; 57(9):1004-1010.
155. Landau AM, Alstrup AKO, Noer O, et al. Electroconvulsive stimulation differentially affects [(11)C]MDL100,907 binding to cortical and subcortical 5HT<sub>2A</sub> receptors in porcine brain. *J Psychopharmacol*. 2019; 33(6):714-721.
156. Kellar KJ, Cascio CS, Butler JA, et al. Differential effects of electroconvulsive shock and antidepressant drugs on serotonin-2 receptors in rat brain. *Eur J Pharmacol*. 1981; 69(4):515-518.
157. Lammers CH, Diaz J, Schwartz JC, et al. Selective increase of dopamine D<sub>3</sub> receptor gene expression as a common effect of chronic antidepressant treatments. *Mol Psychiatry*. 2000; 5(4):378-388.
158. Nomikos GG, Zis AP, Damsma G, et al. Electroconvulsive shock produces large increases in interstitial concentrations of dopamine in the rat striatum: an in vivo microdialysis study. *Neuropsychopharmacology*. 1991; 4(1):65-69.
159. Yoshida K, Higuchi H, Kamata M, et al. Single and repeated electroconvulsive shocks activate dopaminergic and 5-hydroxytryptaminergic neurotransmission in the frontal cortex of rats. *Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry*. 1998; 22(2):435-444.
160. Stewart C, Reid I. Electroconvulsive stimulation and synaptic plasticity in the rat. *Brain Res*. 1993; 620(1):139-141.
161. Stewart CA, Reid IC. Ketamine prevents ECS-induced synaptic enhancement in rat hippocampus. *Neurosci Lett*. 1994; 178(1):11-14.
162. Kaae SS, Chen F, Wegener G, et al. Quantitative hippocampal structural changes following electroconvulsive seizure treatment in a rat model of depression. *Synapse*. 2012; 66(8):667-676.
163. Kobayashi Y, Segi-Nishida E. Search for factors contributing to resistance to the electroconvulsive seizure treatment model using adrenocorticotrophic hormone-treated mice. *Pharmacol Biochem Behav*. 2019; 186:172767.
164. Svensson M, Hallin T, Broms J, et al. Spatial memory impairment in Morris water maze after electroconvulsive seizures. *Acta Neuropsychiatr*. 2017; 29(1):17-26.
165. Sorge G, Garozzo R, Mollica F. [Translocation mongolism (presentation of a family with 14/21 translocation)]. *Pediatrics (Napoli)*. 1977; 85(3):465-473.
166. Shen H, Numachi Y, Yoshida S, et al. Electroconvulsive shock increases serotonin transporter in the rat frontal cortex. *Neurosci Lett*. 2003; 341(2):170-172.
167. Burnet PW, Sharp T, LeCorre SM, et al. Expression of 5-HT receptors and the 5-HT transporter in rat brain after electroconvulsive shock. *Neurosci Lett*. 1999; 277(2):79-82.
168. Christensen DZ, Olesen MV, Kristiansen H, et al. Unaltered neuropeptide Y (NPY)-stimulated [<sup>35</sup>S]GTPγ binding suggests a net increase in NPY signalling after repeated electroconvulsive seizures in mice. *J Neurosci Res*. 2006; 84(6):1282-1291.
169. Christiansen SH, Woldbye DP. Regulation of the galanin system by repeated electroconvulsive seizures in mice. *J Neurosci Res*. 2010; 88(16):3635-3643.

170. Elfving B, Bonefeld BE, Rosenberg R, et al. Differential expression of synaptic vesicle proteins after repeated electroconvulsive seizures in rat frontal cortex and hippocampus. *Synapse*. 2008; 62(9):662-670.
171. Benekareddy M, Mehrotra P, Kulkarni VA, et al. Antidepressant treatments regulate matrix metalloproteinases-2 and -9 (MMP-2/MMP-9) and tissue inhibitors of the metalloproteinases (TIMPS 1-4) in the adult rat hippocampus. *Synapse*. 2008; 62(8):590-600.
172. Segawa M, Morinobu S, Matsumoto T, et al. Electroconvulsive seizure, but not imipramine, rapidly up-regulates pro-BDNF and t-PA, leading to mature BDNF production, in the rat hippocampus. *Int J Neuropsychopharmacol*. 2013; 16(2):339-350.
173. Basar K, Eren-Kocak E, Ozdemir H, et al. Effects of acute and chronic electroconvulsive shocks on glycogen synthase kinase 3beta level and phosphorylation in mice. *J ECT*. 2013; 29(4):265-270.
174. Fumagalli F, Pasini M, Sartorius A, et al. Repeated electroconvulsive shock (ECS) alters the phosphorylation of glutamate receptor subunits in the rat hippocampus. *Int J Neuropsychopharmacol*. 2010; 13(9):1255-1260.
175. Kim SH, Kim MK, Yu HS, et al. Electroconvulsive seizure increases phosphorylation of PKC substrates, including GAP-43, MARCKS, and neurogranin, in rat brain. *Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry*. 2010; 34(1):115-121.
176. De Murtas M, Tatarelli R, Girardi P, et al. Repeated electroconvulsive stimulation impairs long-term depression in the neostriatum. *Biol Psychiatry*. 2004; 55(5):472-476.

## Legends

### **Figure 1: Number of studies investigating the effects of chronic ECS (cECS) in preclinical models.**

Distribution of the studies included in this review selected through a search on PubMed using the terms “Electroconvulsive Seizure” or “ECS” in combination with “depressive disorder” or “MDD” as keywords, spanning the years 1979 to 2023.

### **Figure 2: Characteristic studies including animals to study the effects of cECS.**

(A) Proportion of studies depending on the species used in cECS studies (NHP: Non-human primates). (B) Proportion of studies depending on the animal model used. (C) Proportion of studies including males, females, or both sexes in their protocols.

### **Figure 3: Protocols used in preclinical studies evaluating at the effects of ECS**

This figure analyzed the parameters used for ECS administration in the 174 reviewed studies: (A) Proportion of studies depending on the number of ECS sessions administered to animals. (B) Proportion of studies in function of the type of anesthesia administered to animals during ECS administration. (C-J) Electrical parameters of ECS administered in Rats (left) or Mice (right): (C-D) frequency, (E-F) intensity, (G-H) pulse width and (I-J) ECS duration.

### **Figure 4: Effects of cECS in animal models**

(A) Cellular brain effects of ECS: cECS in animal models increases the proliferation of neural and endothelial precursor cells and differentiation of neurons, glial cells and oligodendrocyte. Moreover, cECS modulates signaling pathways, gene regulation and gene expression, contributing to its cellular effects. (B) Global effects of cECS on behavior, biochemistry and brain cells: ECS treatment modulates gene regulation and gene expression enhancing cell proliferation (e.g., neurogenesis, gliogenesis, oligodendrogenesis, astrogenesis and angiogenesis) and synaptogenesis associated with synaptic remodeling and modulation of neuronal current. This enhancement of cell number may participate in increasing hippocampal volume. From the behavioral point of view, ECS reduces phenotypes associated with “depressive-like” behavior but also induces transient amnesia.

#### **Table 1**

Effects of ECS on emotional behavior in animal models of anxio-depressive-like behavior and in controls

#### **Table 2**

Effects of ECS on cognitive behavior in animal models of anxio-depressive-like behavior and in controls

cECS are responsible of a memory impairment, seeing in three different test: the Morris Water Maze, Columbia Obstruction Box and Spontaneous Alternation Behaviour

#### **Table 3**

Effects of ECS on gene/protein expression

**Table 4**

Effect of cECS on circadian genes expression.

<sup>(1)</sup> designate genes for which mRNA and protein expression changes are in the same direction, <sup>(2)</sup> designate gene and protein expression are observed in opposite direction.

**Table 5:**

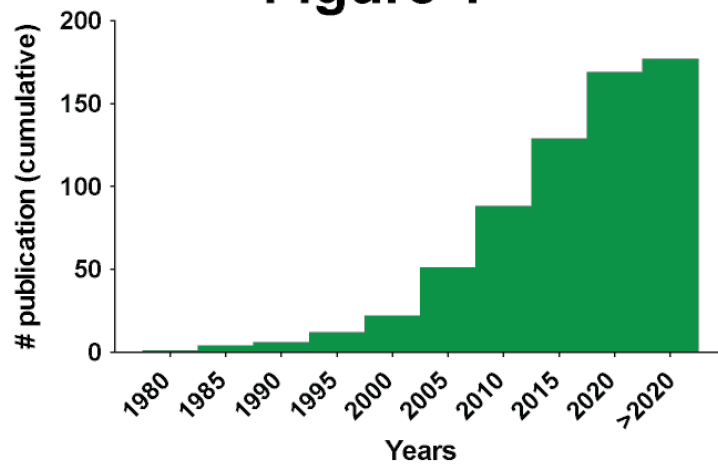
Electrophysiological effects of cECS on depressive or healthy animal model

LTP: long-term potentiation, EPSP: excitatory post-synaptic potential, CA1/3: cornu Ammonis 1 or 3.

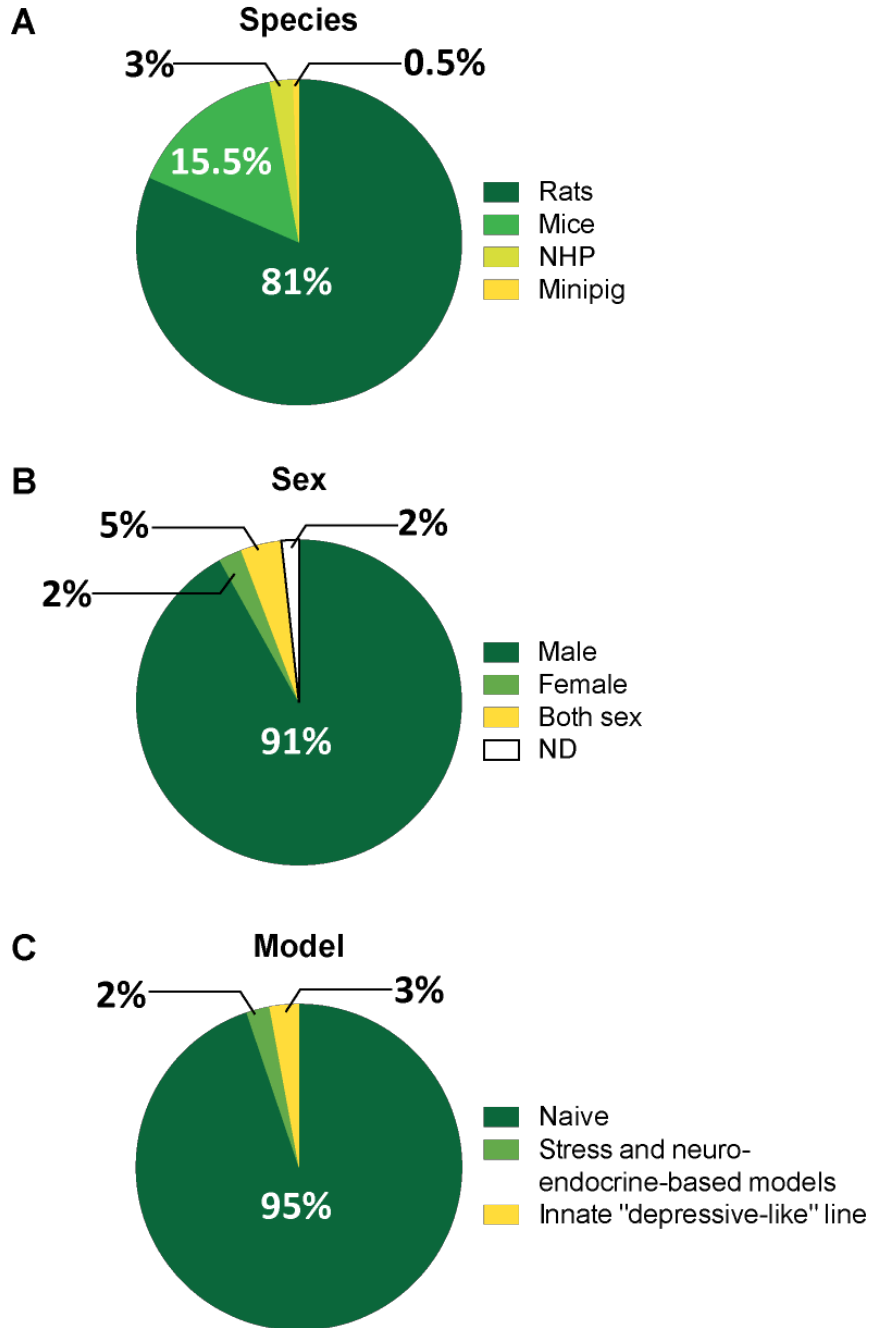
**Supplementals:**

Table S1: List of the articles analyzed in this review.

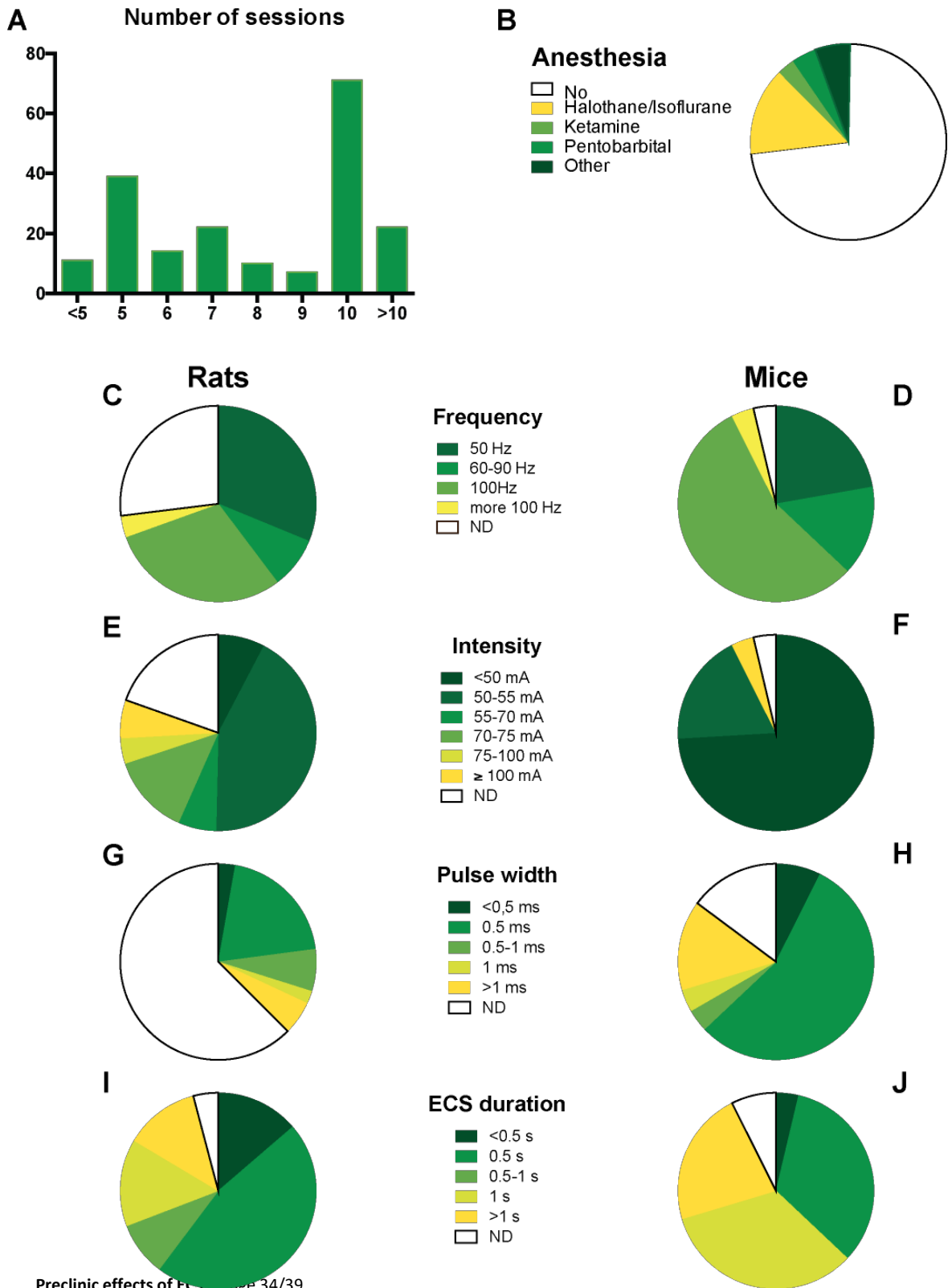
# Figure 1



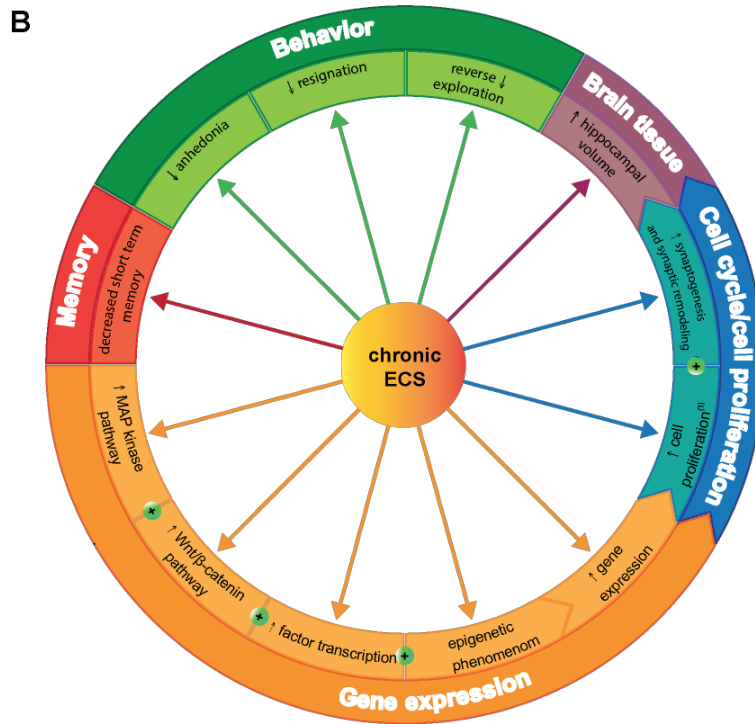
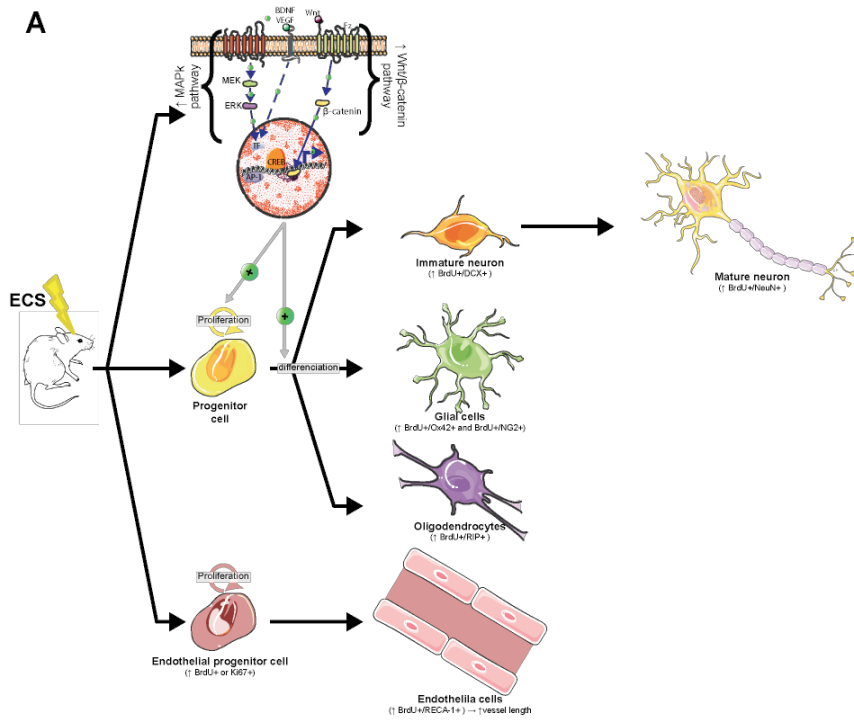
# Figure 2



# Figure 3











**Figure 4**



Test	Animal		Anaesthesia	cECS effects on animal behavior	References
	Model	Specie			
Forced Swimming Test	Healthy	Mice		ECS $\uparrow$ immobility time	Suzuki, and Masuda, 1999; Chang et al, 2018
	FSL				O'Donovan et al, 2012 ; Theilmann et al, 2014
	CRS	Rats	no		Kaae et al, 2012 <sup>162</sup>
	Wistar Kyoto			ECS reverse $\uparrow$ of immobility time	Olesen et al, 2015 ; Olesen et al 2017 ; Hageman et al 2009
	CORT injection			and $\uparrow$ climbing	Kyeremanteg et al, 2014
					O'Donovan et al, 2014
	ACTH injection	Mice	isoflurane	ACTH inhibits ECS $\uparrow$ immobility time	Jonkheere et al, 2018
Novelty Suppress	CORT injection	Mice	isoflurane	ECS reverse $\uparrow$ model-induced	Schloesser et al, 2015 ; Jonkheere et al, 2019
Feeding Test	gene KO			eat latency time	Jonkheere et al, 2018
	CORT injection	Mice	isoflurane	no effect	Jonkheere et al, 2018
Locomotion in Open Field	CUMS		propofol & ketamine	ECS reverse $\uparrow$ distance and rearing in stress group	Zhang, Huang and Zhu, 2019
	CUMS + Wistar Kyoto	Rats	propofol	ECS reverse stress-induced $\uparrow$ locomotion	Li et al, 2012 ; Luo et al, 2012
	Wistar Kyoto				Luo et al, 2015
	Healthy		no	no effect of ECS, cocaine injection $\uparrow$ locomotion	Kyeremanteg et al, 2014
					Park et al, 2011
Sucrose Preference Test	CMS	Rats	no	ECS $\uparrow$ sucrose consumption	Henningsen, Woldbye and Wiborg, 2013
	CUMS			(reverse $\uparrow$ by stress)	Li et al, 2012 ; Luo et al, 2012
	CUMS + Wistar Kyoto		propofol		Luo et al, 2015

**Table 1**

Test	Animal		Anaesthesia	cECS effects on animal memory	References
	Model	Specie			
Morris Water Maze	Healthy	Rats	no	ECS  platform research time and  time in the platform quadrant	Svensson et al, 2017 <sup>164</sup> Sorge, Garozzo and Mollica, 1977 <sup>165</sup>
			PBA reverse ECS effects	Yao et al, 2015	
	halothane		ECS  platform research time and  time in the platform quadrant	Stewart and Reid, 2000	
	CUMS		propofol & ketamine	 escape time and swimming distance in ketamine+ECS group	Zhang, Huang and Zhu, 2019
Conditioning Fear Paradigm	Healthy		No effect	Warner-Schmidt, Madsen and Duman, 2008	
Columbia Obstruction Box	Healthy		ECS  latency time	Nagaraja et al, 2007	
		no	ECS  latency time in comparison of control but any variation between the tested ECS parameters	Andrade, Suresh et al, 2002	
Spontaneous Alternation Behavior (Y-maze)	CMS		ECS reverse  alternation ratio stress-induced	Henningesen, Woldbye and Wiborg, 2013	

**Table 2**

Gene expression:

Up-regulation

**Monoamine neurotransmission :**

- 5-HT transporter <sup>166</sup>
- 5-HT receptors <sup>167</sup>
- D<sub>3</sub> receptor <sup>157</sup>

**Other neurotransmission :**

- Neuropeptide Y <sup>168</sup>
- Galanine <sup>169</sup>

**Trophic factors (and associated proteins):**

- BDNF <sup>49,81</sup>
- VEGF <sup>134</sup>
- NGF <sup>86</sup>

**Signalisation pathways:**

- Wnt <sup>77</sup>
- Frizzled 6 <sup>67</sup>
- b-catenin <sup>77</sup>
- Rab-4/5/7/11 <sup>95</sup>
- Patched <sup>94</sup>

**Transcription factors:**

- cFos <sup>76</sup>
- Erg1 <sup>76</sup>

**Vesicle coating:**

- Flotilin-1 <sup>95</sup>
- Caveolin-1 <sup>95</sup>
- Clathrin <sup>95</sup>
- Synaptophysine <sup>48</sup>
- Synapsin I, II, III <sup>170</sup>
- SNAP29 <sup>170</sup>

**Other functions:**

- DARPP32<sup>99</sup>
- MMP2/9 <sup>171</sup>
- Tamalin <sup>118</sup>
- GFRa1/2 <sup>82</sup>
- tPa <sup>172</sup>

Down-regulation

**Signaling pathways:**

- Smoothened <sup>94</sup>

**Vesicle coating:**

- Synaptogamin III <sup>170</sup>

Protein phosphorylation:

Up-phosphorylation

**Signalisation pathways:**

- JNK <sup>75</sup>
- SEK1. <sup>75</sup>
- p38 <sup>75</sup>
- MKK3 and MMK6 <sup>75</sup>
- ERK1/2 <sup>73</sup>

- MEK1/2<sup>73</sup>
- Akt <sup>73</sup>
- GSK-3b <sup>173</sup>
- PDK1 <sup>73</sup>

**Transcription factors:**

- CREB <sup>78</sup>

**Neurotransmitters receptors:**

- GluRA <sup>174</sup>
- NR2B <sup>174</sup>

**Dendritic membrane protein:**

- MARCKS <sup>175</sup>
- GAP43 <sup>175</sup>
- Neurogranine <sup>175</sup>

**Table 3**

	mRNA	protein
over-expression	Rev-erb $\alpha$ <sup>(1)</sup>	Rev-erb $\alpha$ , Cry2
down-expression	Ror $\alpha$ <sup>(1)</sup> , Bmal1 <sup>(1)</sup> , Per1 <sup>(1)</sup> , Cry1 and Cry2 <sup>(2)</sup>	Ror $\alpha$ , Bmal1, Per1, and Clock
no effect	Clock, Per2 <sup>(1)</sup>	Cry1 and Per2

Table 4






Specie	Sex	Electrode localization		Stimulation frequency	Biological material	cECS effects	References
		Stimulation	Recording				
Rats	Males	Schaffer collateral pathway	Stratum radiatum of the CA1	100Hz	Hippocampal slices	Reverse the UCMS-induced  in EPSP slope	Li et al, 2012
		White matter between cortex and striatum	Striatum medium spiny neurons		Coronal cortex and striatum slices	 in long-term depression for EPSP	De Murtas et al, 2004 <sup>176</sup>
		Perforant path of the DG	Hilus of the DG	400Hz	Alive anaesthetized rats	 EPSP slope	Reid and Stewart, 1997 Stewart and Reid, 1993 Stewart and Reid, 1994
rt	Males and Females	Dentate granule cell layer	Molecular layer of the hippocampus	100Hz	Transverse hippocampal slices	 LTP	Yanpallewar et al, 2012
	Males		Stratum lucidum of the CA3	0.05HZ			 EPSP on newborn cell membrane

Table 5

Afin de mieux appréhender l'intérêt des ECT comme traitement antidépresseur et de déterminer les potentiels mécanismes impliqués dans ces mêmes effets, l'équipe a étudié l'effet des ECS, équivalent expérimental des ECT dans les modèles *in vivo*, dans le modèle pharmacologique d'anxiété/dépression par absorption de corticostérone, et plus précisément chez les animaux ne répondant pas à la fluoxétine. Cette étude a ainsi permis d'identifier des altérations dans l'expression protéique d'une trentaine de gènes dans les cellules circulantes mononucléées du sang (PBMC) (Lebeau, Mendez-David et al. 2022). Ces protéines constituent de potentiels biomarqueurs de l'utilisation des ECT.



## OPEN ACCESS

## EDITED BY

Katarzyna Stachowicz,  
Maj Institute of Pharmacology (PAS),  
Poland

## REVIEWED BY

Bruno Pierre Guiard,  
Université de Toulouse, France  
David S. Middlemas,  
A. T. Still University, United States

## \*CORRESPONDENCE

Jean-Philippe Guilloux,  
jean-philippe.guilloux@universite-paris-  
saclay.fr

<sup>†</sup>These authors have contributed equally  
to this work and share last authorship

## SPECIALTY SECTION

This article was submitted to  
Neuropharmacology,  
a section of the journal  
Frontiers in Pharmacology

RECEIVED 13 July 2022

ACCEPTED 05 October 2022

PUBLISHED 31 October 2022

## CITATION

Lebeau RH, Mendez-David I,  
Kucynski-Noyau L, Henry C, Attali D,  
Plaze M, Colle R, Corruble E, Gardier AM,  
Gaillard R, Guilloux J-P and David DJ  
(2022), Peripheral proteomic changes  
after electroconvulsive seizures in a  
rodent model of non-response to  
chronic fluoxetine.  
*Front. Pharmacol.* 13:993449.  
doi: 10.3389/fphar.2022.993449

## COPYRIGHT

© 2022 Lebeau, Mendez-David,  
Kucynski-Noyau, Henry, Attali, Plaze,  
Colle, Corruble, Gardier, Gaillard,  
Guilloux and David. This is an open-  
access article distributed under the  
terms of the [Creative Commons  
Attribution License \(CC BY\)](https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/). The use,  
distribution or reproduction in other  
forums is permitted, provided the  
original author(s) and the copyright  
owner(s) are credited and that the  
original publication in this journal is  
cited, in accordance with accepted  
academic practice. No use, distribution  
or reproduction is permitted which does  
not comply with these terms.

# Peripheral proteomic changes after electroconvulsive seizures in a rodent model of non-response to chronic fluoxetine

Rodolphe H. Lebeau<sup>1</sup>, Indira Mendez-David<sup>1</sup>,  
Laura Kucynski-Noyau<sup>1</sup>, Céline Henry<sup>2</sup>, David Attali<sup>3</sup>,  
Marion Plaze<sup>3</sup>, Romain Colle<sup>4,5</sup>, Emmanuelle Corruble<sup>4,5</sup>,  
Alain M. Gardier<sup>1</sup>, Raphaël Gaillard<sup>3</sup>, Jean-Philippe Guilloux<sup>1\*†</sup>  
and Denis J. David<sup>1†</sup>

<sup>1</sup>Batiment Henri Moissan, CESP-Inserm, MOODS Team, Université Paris-Saclay, Orsay, France, <sup>2</sup>PAPPSO, Micalis Institute, INRAE, AgroParisTech, Université Paris-Saclay, Jouy-en-Josas, France, <sup>3</sup>Centre Hospitalier Sainte Anne, Service Hospitalo-Universitaire, Paris, France, <sup>4</sup>Université Paris-Saclay, Faculté de Médecine, CESP-Inserm, MOODS Team, Le Kremlin Bicêtre, France, <sup>5</sup>Service Hospitalo-Universitaire de Psychiatrie de Bicêtre, Hôpitaux Universitaires Paris-Saclay, Assistance Publique-Hôpitaux de Paris, Hôpital de Bicêtre, Le Kremlin Bicêtre, France

Major depressive disorder (MDD) is the psychiatric disorder with the highest prevalence in the world. Pharmacological antidepressant treatment (AD), such as selective serotonin reuptake inhibitors [SSRI, i.e., fluoxetine (Flx)] is the first line of treatment for MDD. Despite its efficacy, lack of AD response occurs in numerous patients characterizing Difficult-to-treat Depression. Electroconvulsive Therapy (ECT) is a highly effective treatment inducing rapid improvement in depressive symptoms and high remission rates of ~50–63% in patients with pharmaco-resistant depression. Nevertheless, the need to develop reliable treatment response predictors to guide personalized AD strategies and supplement clinical observation is becoming a pressing clinical objective. Here, we propose to establish a proteomic peripheral biomarkers signature of ECT response in an anxiety/depressive animal model of non-response to AD. Using an emotionality score based on the analysis complementary behavioral tests of anxiety/depression (Elevated Plus Maze, Novelty Suppressed Feeding, Splash Test), we showed that a 4-week corticosterone treatment (35 µg/ml, Cort model) in C57BL/6JRj male mice induced an anxiety/depressive-like behavior. A 28-day chronic fluoxetine treatment (Flx, 18 mg/kg/day) reduced corticosterone-induced increase in emotional behavior. A 50% decrease in emotionality score threshold before and after Flx, was used to separate Flx-responding mice (Flx-R,  $n = 18$ ), or Flx non-responder mice (Flx-NR,  $n = 7$ ). Then, Flx-NR mice received seven sessions of electroconvulsive seizure (ECS, equivalent to ECT in humans) and blood was collected before and after ECS treatment. Chronic ECS normalized the elevated emotionality observed in Flx-NR mice. Then, proteins were extracted from peripheral blood mononuclear cells (PBMCs) and isolated for proteomic analysis using a high-resolution MS Orbitrap. Data are available via

ProteomeXchange with identifier PXD037392. The proteomic analysis revealed a signature of 33 peripheral proteins associated with response to ECS (7 down and 26 upregulated). These proteins were previously associated with mental disorders and involved in regulating pathways which participate to the depressive disorder etiology.

#### KEYWORDS

electroconvulsive therapy, fluoxetine, non-response, peripheral biomarkers, major depressive disorder, difficult to treat depression

## 1 Introduction

Major depressive disorder (MDD) is the psychiatric disorder with the highest prevalence in the world according to World Health Organization (Liu et al., 2020). MDD can lead to significant mortality, morbidity, reductions in quality of life, and have considerable costs for the society (American Psychiatric Association 2013). The main treatments for moderate to severe MDD are based on antidepressant drugs (AD), such as selective serotonin reuptake inhibitor (SSRI). However, the pharmacotherapeutic strategy is partially efficient. Indeed, the STAR\*D study (Rush et al., 2006; Trivedi et al., 2006) revealed that the remission is obtained only in one-third of treated patients with a first antidepressant family and this rate can be increased up to 70% using various pharmacotherapeutic approaches. Non-response and/or resistance occurs in a large subset of patients, constituting difficult-to treat depression, that can lead to Treatment Resistant Depression (TRD).

In order to treat these patients, many strategies have been investigated, including fast-acting therapy such as esketamine nasal spray (Bahji et al., 2021) or brain stimulation therapies (Voineskos et al., 2020). Electroconvulsive therapy (ECT), a therapeutic protocol known since 1930s for treat psychiatric disorders (Pagnin et al., 2004), is the most used and the most effective approach with a remission rate  $\approx$ 80% (Group 2003) and can be applied as a second line of treatment (Milev et al., 2016).

The potential of peripheral proteome (the panel of detectable proteins) for monitoring health and disease states was investigated for brain diseases (Htike et al., 2019) including mood disorders (Preece et al., 2018). Moreover, detecting peripheral mRNA or proteins whose expression is specifically regulated by a treatment allow the identification of potential biomarkers of response to treatment that can have a predictive value (Guilloux et al., 2015; Mendez-David et al., 2017).

Several clinical studies tried to identify novel biomarkers predicting ECT outcomes and responses to targeted treatments [for review, (Maffioletti et al., 2021)]. Thus, ECT modulates the expression of 10 and  $\approx$ 40 proteins in the blood of patients after either acute or chronic ECT, respectively (Stelzhammer et al., 2013). Moreover, AD treatment adjuncts with chronic ECT changes proteins profile compared to patients receiving only ECT. However, most of the studies are concentrated on one or few markers and many studies are relatively old, with small sample sizes and methodological biases (Maffioletti et al., 2021).

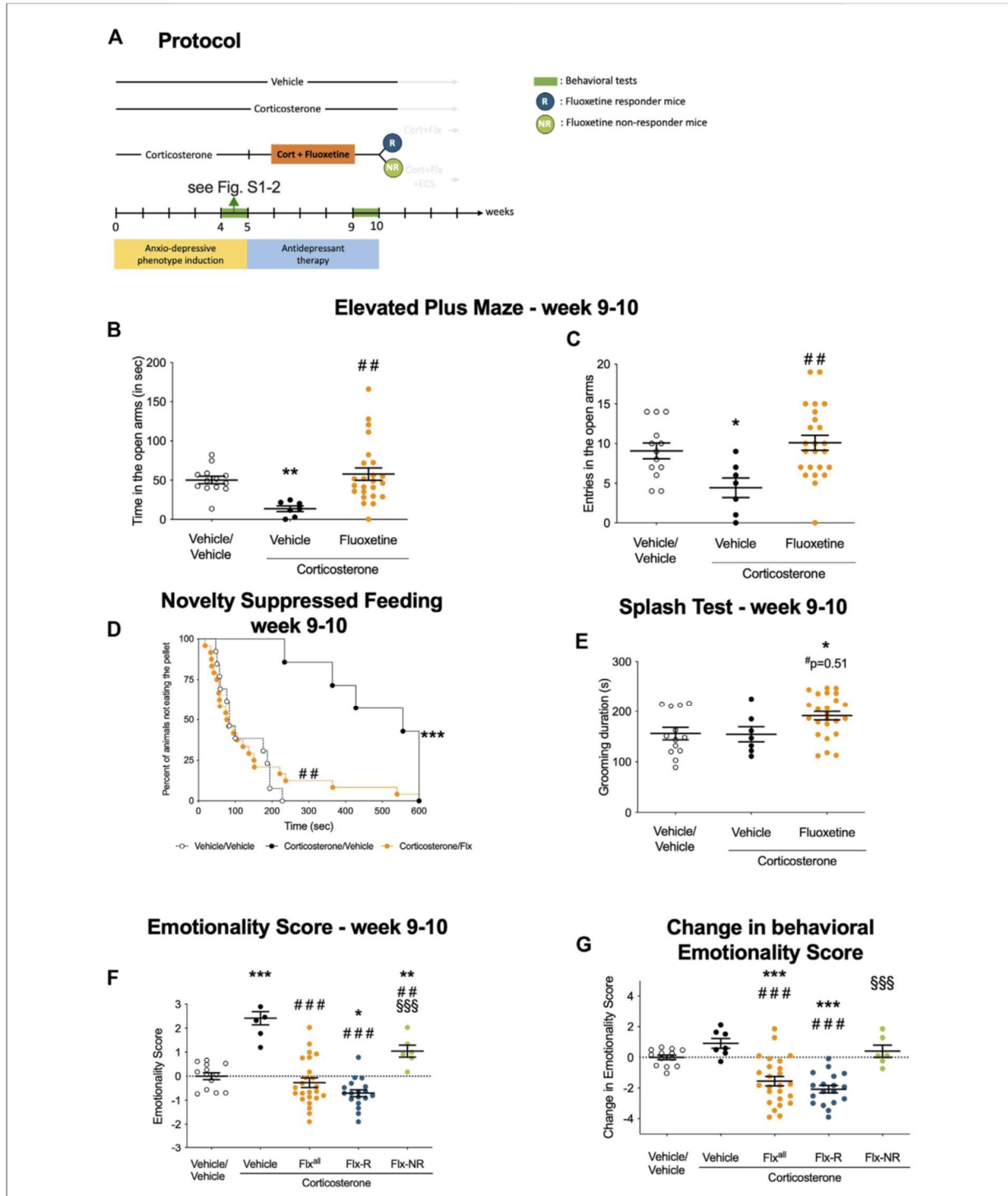
Many studies led during the last 30 years have shown that electroconvulsive seizure (ECS), the preclinical version of ECT, induces the expression modulation of a large variety of genes in a tissue-dependent manner (Sakaida et al., 2013; Kobayashi and Segi-Nishida 2019; Rimmerman et al., 2021). However, very few studies looked at the protein expression modulating effect of ECS. Some studies have described protein changes in the brain parenchyma (Pinna et al., 2018) or in naïve animals (Glaviano et al., 2014), which limits the use of these proteins as biomarkers of ECS and their translational utility. Thus, it will be of interest to study the effects of ECS on peripheral proteome as a surrogate for assessing treatment efficacy in a mouse model of AD non-response.

The purpose of our study will be to identify proteome variations induced by ECS in the peripheral blood mononuclear cells (PBMC), in the context of non-response to an antidepressant drug in an animal model of anxiety-depressive disorders. To model the pathology, we used a pharmacological-induced model of depressive-like behavior previously developed by our team (David et al., 2009; Mendez-David et al., 2017). Concretely, mice were treated first with corticosterone (Cort) to induce a depressive-like phenotype, then with a combination of Cort and fluoxetine (Flx) for 4 weeks. After each step of treatment, an emotionality score (equivalent to clinical scores assessing the severity of depression) was established (Guilloux et al., 2011) to evaluate changes in emotional behavior and treatment response. After Flx treatment, mice that failed to recover a score similar to non-depressed mice receive a 2-weeks ECS treatment. A blood draw was performed in animals before and after ECS treatment for proteomic analysis, revealing a signature of 33 peripheral proteins associated with response to ECS (7 down- and 26 upregulated), with one priorly found to be associated to antidepressant response (Mendez-David et al., 2017).

## 2 Materials and methods

### 2.1 Animals

Adult C57BL/6J male mice were purchased from Janvier Farms (Le Genest St Isle, France). All mice were 7–8 weeks old, weighed 23–25 g at the beginning of the treatment and were



**FIGURE 1** Chronic fluoxetine treatment produces reversed anxiety and depression-like phenotype in a mouse model of anxiety/depression. (A) Timeline of experiments: In place of normal drinking water, grouped-housed male C57BL/6J mice were presented during 10 weeks with vehicle (0.45% hydroxypropyl-β-cyclodextrin) or corticosterone (35 μg/ml) in the presence or absence of an antidepressant (fluoxetine, 18 mg/kg/day) during the last 5 weeks of the corticosterone regimen. Emotionality z-score was calculated after each behavioral session. Then, we investigated whether the behavioral changes induced after chronic corticosterone (week 4–5, see Supplementary Figure S2) were reversed by fluoxetine treatment (week 9–10, Figures 1B–G). The same animal was successively tested in the Elevated Plus Maze (EPM), the Novelty Suppressed Feeding (NSF), the Splash Test (Continued)

**FIGURE 1 (Continued)**

Test (ST) during both behavioral sessions (B–C) Effects of corticosterone (35 µg/ml, Cort) regimen given alone or in combination with fluoxetine (18 mg/kg/day) on anxiety behaviors measured at Week 9–10 in the Elevated Plus Maze (EPM). Anxiety, measured for various parameters is expressed as mean total time in seconds (B) or entries (C) in open arms of EPM paradigm. (D) Effects of 4 weeks of corticosterone regimen (35 µg/ml) alone or in combination with fluoxetine (18 mg/kg/day) on anxiety- and depression related behaviors measured at Week 9–10 in the Novelty Suppressed Feeding paradigm. Results are expressed as cumulative survival with percentage of animals that have not eaten over 10-min. (E) Effects of 4 weeks of corticosterone regimen (35 µg/ml) alone or in combination with fluoxetine (18 mg/kg/day) on depression related behaviors in the Splash Test (ST) measured at Week 9–10. Results are expressed as mean of grooming duration (in seconds). (F–G) Effects of 4 weeks of corticosterone regimen (35 µg/ml, Cort) alone or in combination with fluoxetine (18 mg/kg/day) on anxiety/depression-like behaviors on the emotionality score measured at Week 9–10. Test Z-values (elevated plus maze, novelty-suppressed feeding and splash test) are calculated by averaging individual Z-scores to obtain emotionality Z-scores (F). Change in behavioral emotionality score between W4 and W10 (G). Values plotted are mean ± SEM ( $n = 7–21$  animals for vehicle (VEH, open circle), corticosterone (Cort, black dot), corticosterone-fluoxetine mice (Fluoxetine or Flx<sup>all</sup>, orange dot) corticosterone-fluoxetine responding mice (Flx-R, blue circles), corticosterone-fluoxetine non-responding mice with ECS treatment (Flx-NR ECS, green circles)). One way ANOVA with post-hoc tests or Kaplan–Meier survival analysis followed by Mantel–Cox log-rank test were applied (\* $p < 0.05$ , \*\* $p < 0.01$  versus Vehicle/vehicle group, # $p < 0.05$ , # $p < 0.01$  versus Cort/vehicle group, § $p < 0.05$ , §§ $p < 0.01$  versus Flx-R mice).

maintained on a 12L:12 D schedule (lights on at 06:00). Mice were housed in groups of five. Food and water were provided *ad libitum*. The protocols involving animals and their care were conducted in conformity with the institutional guidelines in compliance with national and international laws and policies (Council directive #87–848, 19 October 1987, Ministère de l’Agriculture et de la Forêt, Service Vétérinaire de la Santé et de la Protection Animale, permissions # 92–256B to DJD) and in compliance with protocols approved by the Institutional Animal Care and Use Committee (CEE26 authorization #4747).

## 2.2 Treatments

Corticosterone (4-pregnen-11b-DIOL-3 20-DIONE 21-hemisuccinate from Sigma (Sigma-Aldrich Saint-Quentin Fallavier, France) was dissolved in vehicle (0.45% hydroxypropyl- $\beta$ -cyclodextrin, Sigma-Aldrich Saint-Quentin Fallavier, France). Fluoxetine hydrochloride (18 mg/kg per day in the drinking water) was purchased from Anawa Trading (Zurich, Switzerland).

## 2.3 Protocol

The dose and duration of corticosterone treatment were selected based on previous study [Cort model (David et al., 2009; Mendez-David et al., 2013; Mendez-David et al., 2014)]. Corticosterone (35 µg/ml, equivalent to about 5 mg/kg/day,  $n = 31$ ) or vehicle (0.45%  $\beta$ -cyclodextrine,  $\beta$ -CD,  $n = 13$ ) were available *ad libitum* in the drinking water during the first 4 weeks of the protocol (Supplementary Figure S2A).

Chronic corticosterone consumption in mice dramatically inhibit the HPA axis function and response to stress with a resulting low concentration of serum corticosterone (See Supplementary Figure S3E, David et al., 2009) During the following 4 weeks of the protocol, corticosterone was delivered alone ( $n = 7$  animals) or in the presence of fluoxetine (18 mg/kg/day,  $n = 24$  animals, Figure 1A).

Treatments were maintained until the end of the experiments. Behavioral sessions to assess anxiety/depression-like phenotype, the antidepressant response to fluoxetine and to chronic ECS occurred on week 5, 10, and 12, respectively. Thus, each animal underwent three behavioral sessions aiming at evaluating emotional behavior.

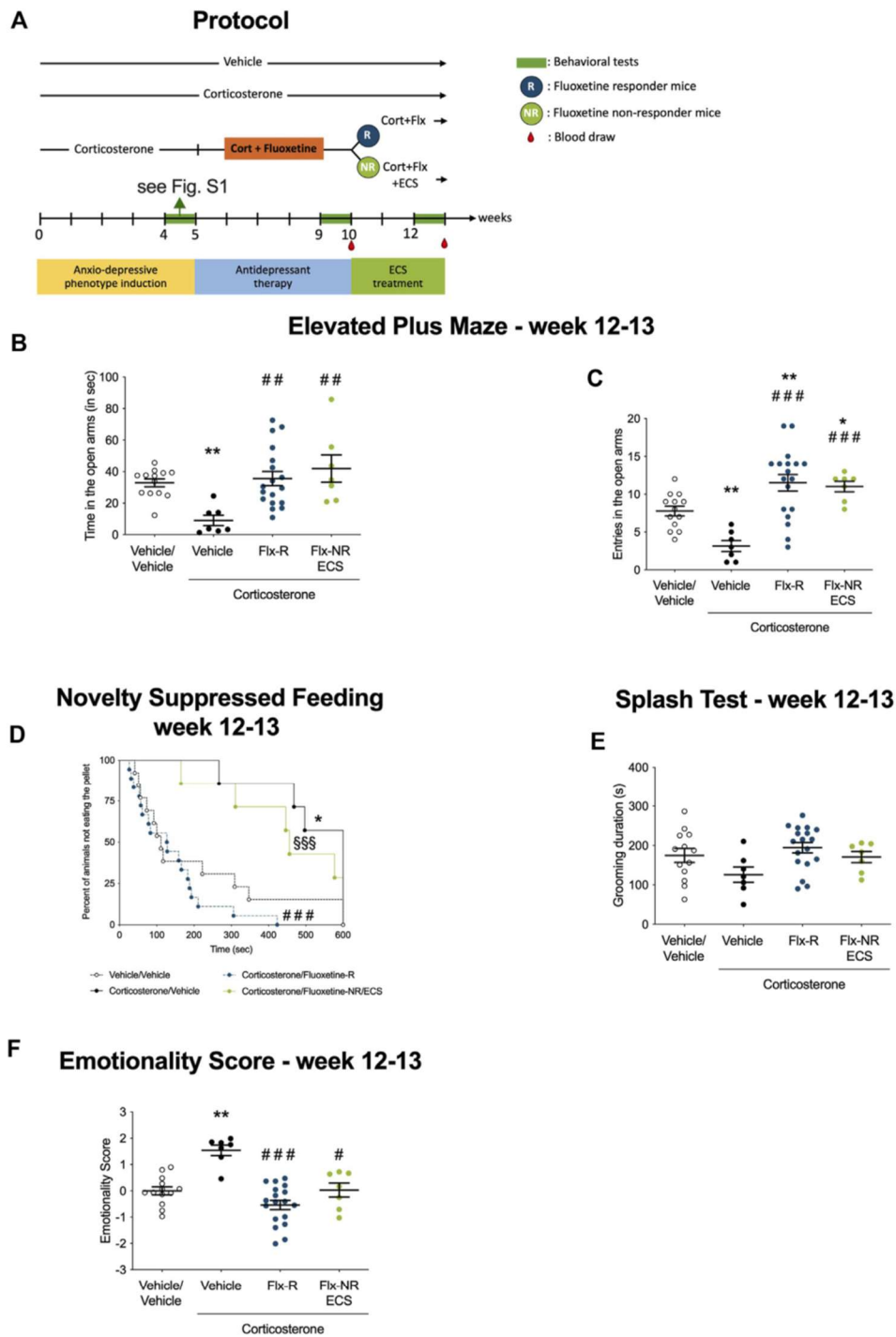
## 2.4 Electroconvulsive seizure

The ECS paradigm consisted of seven ECS sessions across a 15-days period (once every 2 days, Figure 2A) delivered with an Ugo Basile pulse generator (model #57800–001, shock parameters: 100 pulse/s frequency, 3 ms pulse width, 1 s shock duration and 50 mA current). Mice were administered inhaled isoflurane anesthesia (2%) prior to ECS sessions, and they remained anesthetized throughout the procedure. The stimulation parameters were chosen because they reliably induced tonic-clonic convulsions (Schloesser et al., 2015). Fluoxetine treatment was still administered during the 2 weeks of ECS treatment.

## 2.5 Behavioral experiment evaluation

### 2.5.1 Elevated maze plus

The elevated plus maze (EPM) is a widely used behavioral assay for rodents and it has been validated to assess the anti-anxiety effects of pharmacological agents [for review (Walf and Frye 2007)]. This test was performed as described previously (Mendez-David et al., 2014). The maze is a plus-cross-shaped apparatus, with two open arms and two arms closed by walls linked by a central platform 50 cm above the floor. Mice were individually put in the center of the maze facing an open arm and were allowed to explore the maze for a duration of 5 min. The time spent in and the numbers of entries into the open arms were used as an anxiety index. All parameters were measured using a videotracker (EPM3C, Bioseb, Vitrolles, France).



**FIGURE 2**

Fluoxetine non-responding mice emotional behavior was rescued after chronic electroconvulsive seizures (ECS administration). (A) Timeline of experiments: Following protocol presented in Figure 1A, Responders and non-responders animals were selected and Peripheral Blood Mononuclear Cells were isolated from whole blood after W10. Chronic ECS treatment was applied in NR-mice while R underwent sham treatment. Emotional behavior was tested at W12 after ECS administration and PBMC extracted from whole blood. (B–C) Effects of chronic ECS on anxiety behaviors in the Elevated Plus Maze (EPM) in Flx-NR mice. Anxiety, measured for various parameters is expressed as mean total time in seconds (B) or entries (C) in open arms of EPM paradigm. (D) Effects of chronic ECS on anxiety- and depression related behaviors in the Novelty Suppressed Feeding paradigm (Continued)

**FIGURE 2 (Continued)**

in Flx-NR mice. Results are expressed as cumulative survival with percentage of animals that have not eaten over 10-min. (E) Effects of 4 weeks of chronic ECS on depression related behaviors in the Splash Test (ST). Results are expressed as mean of grooming duration (in seconds). (F) Effects of 4 weeks of chronic ECS on the emotionality score. Test Z-values (elevated plus maze, novelty-suppressed feeding and splash test) are calculated by averaging individual Z-scores to obtain emotionality Z-scores (F). Values plotted are mean  $\pm$  SEM [ $n = 7-21$  animals for vehicle (VEH, open circle), corticosterone (Cort, black dot), corticosterone-fluoxetine responding mice (FLX-R, blue dots), corticosterone-fluoxetine non-responding mice with ECS treatment (FLX-NR ECS, green dots)]. One way ANOVA with post-hoc tests or Kaplan–Meier survival analysis followed by Mantel–Cox log-rank test were applied (\* $p < 0.05$ , \*\* $p < 0.01$  versus Vehicle/vehicle group, # $p < 0.05$ , ## $p < 0.01$  versus Cort/vehicle group, § $p < 0.05$ , §§ $p < 0.01$  versus Flx-R mice).

## 2.5.2 Novelty suppressed feeding test

The NSF is a conflict test that elicits competing motivations: the drive to eat and the fear of venturing into the center of a brightly lit arena. The latency to begin eating is used as an index of anxiety/depression-like behavior, because classical anxiolytic drugs as well as chronic antidepressants decrease this measure. The NSF test was carried out during a 10 min period as previously described (David et al., 2009). Briefly, the testing apparatus consisted of a plastic box (50  $\times$  40  $\times$  20 cm), the floor of which was covered with approximately 2 cm of wooden bedding. 24 h prior to behavioral testing, all food was removed from the home cage. At the time of testing, a single pellet of food (regular chow) was placed on a white paper platform positioned in the center of the box. Each animal was placed in a corner of the box, and a stopwatch was immediately started. The latency to eat (defined as the mouse sitting on its haunches and biting the pellet with the use of forepaws) was timed. Immediately afterwards, the animal was transferred to its home cage, and the amount of food consumed by the mouse in the subsequent 5 min was measured serving as a control for change in appetite as a possible confounding factor.

## 2.5.3 Splash test

This test consisted of squirting a 10% sucrose solution on the mouse's snout. This procedure induces grooming behaviors, due to the viscosity and palatability of the sucrose. The grooming behavior is sensitive to chronic stress or chronic Cort exposure and antidepressant treatment (Mendez-David et al., 2014). The total time spent in different grooming behaviors (i.e., face, paws, hindquarter, and shoulders) was directly recorded for 5 min in the home cage of the animals.

## 2.5.4 Behavioral emotionality measurement

Three behavioral tests (i.e., EPM, NSF and ST) were used to measure components of animal behavioral emotionality. Z-score methodology was used to investigate the potential of combining results within and across the different behavior tests for depressive/anxious-like behaviors and investigate the treatment effects in the Cort model. The emotionality-related data was normalized as previously described (Guilloux et al., 2011; Mekiri et al., 2017). Briefly, z scores are standardized scores (by the group mean and group standard deviation). They indicate

how many standard deviations ( $\sigma$ ) an observation ( $x$ ) is above or below the mean of a control group ( $\mu$ ).

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

Z scores for behavioral measures were first averaged within the test, and then across the test for equal weighting of the three tests comprising the final emotionality score. The increased behavioral emotionality was defined as decreased activity in the open arms in the EPM, increased NSF latency and decreased grooming in the splash test compared with control group means. The vehicle group was defined as the control. Emotionality score was calculated after each behavioral round.

## 2.6 Isolation of mouse peripheral blood mononuclear cells

To determine a biological signature of response to ECS, representative animals of each group were used for proteomics analysis. The procedure was performed in unanesthetized mice as previously described (Mendez-David et al., 2013). In compliance with the laboratory animal care guidelines, about 0.4 ml of blood per mice was collected in K<sub>3</sub>EDTA tubes using the submandibular bleeding method. The punctures were performed with 5 mm point size sterile lancets (MediPoint, Mineola, NY) where the orbital vein and the submandibular vein join to form the jugular vein (Joslin 2009). A light pressure with dry gauze was applied to the punctured area for hemostasis. Separation and extractions of PBMCs were done using the iodixanol mixer technique (Ford and Rickwood 1990). Separations of mouse PBMCs were purified of mouse whole blood through density centrifugation (1,000 rpm at 20°C for 30 min) using solution B with the OptiPrep™ gradient solution (Sigma-Aldrich Saint-Quentin Fallavier, France). After centrifugation, OptiPrep™ gradient solution separated layers of blood, with PBMCs under a layer of plasma. The PBMCs layers were carefully removed from the tube and transferred to a new 50 ml conical tube and were washed twice with solution B. After centrifugations (1,200 rpm at 20°C for 7 min) and several washing steps, mouse PBMCs were recovered with a last centrifugation (3,000 rpm at 4°C for 5 min) and stored at 80°C before subsequent assay.

## 2.7 Proteomics analysis

### 2.7.1 Protein separation

Protein extracts from PBMCs were homogenized in solution solubilization (Urea 7M, Thiourea 2M, CHAPS 3%, Nonidet P-40 1%, DTT 1%). Protein concentration was measured using 2D-Quant kit (GE Healthcare, France) and 15 µg of proteins were loaded and separated by 12% SDS-PAGE. A short migration was then performed (7 min, 80 V, 25 W followed by 4 min, 200 V, 25 W) and gels were stained with Coomassie colloidal blue (EZblue, Sigma-Aldrich, France).

### 2.7.2 Protein in-gel digestion

Portions of gel that contain all proteins were cut and digested as followed: pieces of gel were successively washed and de-stained with water, acetonitrile (ACN) and 25 mM ammonium bicarbonate (NH<sub>4</sub>HCO<sub>3</sub>). A reduction/alkylation step was performed with dithiothreitol (DTT) 10 mM and iodoacetamide 55 mM. Gels were dehydrated with acetonitrile and rehydrated at 4 °C in 12 ng/µl sequencing grade modified trypsin (Promega, France) solubilized in 25 mM NH<sub>4</sub>HCO<sub>3</sub> in 1 h and then digested at 37°C overnight. After tryptic digestion, peptides were extracted by incubating gel pieces in extraction solvent (0.5% trifluoroacetic acid (TFA)/50% ACN) for 15 min and in ACN for 15 min at room temperature. Supernatants were vacuum dried. The dried extract peptides were dissolved in 50 µl of loading buffer (0.08% TFA/2% ACN) just before mass spectrometry analysis.

### 2.7.3 Mass spectrometry analysis

Four microliters of sample were loaded on the nano-UPLC Ultimate 3000 RSLCnano (Thermo). Sample was loaded at 20 µL/min on the pre-column cartridge (PepMap 100 C18, 5 µm; 300 µm i.d., 5 mm, Thermo Scientific) and peptides were then separated with a gradient of acetonitrile on the reverse phase column PepMap 100 C18 (stationary phase: C18, 3 µm; column: 75 µm i.d., 500 mm; nanoViper, Thermo Scientific, France). Buffers were 0.1% formic acid in 2% acetonitrile (A) and 0.1% formic acid in 80% acetonitrile (B). The peptide separation was realized during 64 min at 300 nL/min with a linear gradient from 0 to 45% B for 55 min followed by a gradient from 45% to 98% B for 5 min. Eluted peptides were analyzed on-line with a high resolution mass spectrometer Orbitrap Fusion Lumos Tribrid (Thermo Scientific, France) using a nanoelectrospray interface in positive polarity mode, on PAPPISO platform (<http://pappiso.inra.fr>). Peptide ions were analyzed using Xcalibur 3.0 (Thermo Scientific, France) with following data-dependent acquisition steps: 1) full MS scan in orbitrap (mass-to-charge ratio [*m/z*] = 400–1500; mass tolerance, ± 10 ppm) and 2) MS/MS in Ion Trap with CID activation (collision energy, 35%; activation time, 30 ms; centroid mode). Dynamic exclusion time was set to 60 s.

## 2.8 Statistical analysis

### 2.8.1 Behavioral analysis

To assess the behavioral consequences of a chronic corticosterone treatment in the EPM, NSF, and ST tests or emotionality scores, results were expressed as mean ± SEM values. Normality of data were checked using a Shapiro-Wilk normality test. Depending on the normality of the data, the parametric or non-parametric procedure was performed using a Student *t*-test or a Mann and Whitney test for two groups' comparison. For analysis with >2 groups, a one-way ANOVAs or a Kruskal–Wallis test were applied to the data as appropriate. Significant main effects were followed by Fisher's *post-hoc* or Dunn's multiple comparison tests. Regarding the NSF test, we used the Kaplan–Meier survival analysis owing to the lack of normal distribution of the data. Mantel–Cox log rank test was used to evaluate differences between experimental groups. Statistical significance was set at *p* < 0.05. Data were analyzed using Prism 8.4.3 software (GraphPad, La Jolla, United States).

### 2.8.2 Data processing and bioinformatics analysis

Peak lists were generated as mzXML files using the converter MSConvert (ProteoWizard). A database search was performed using X!TandemPipeline software developed by PAPPISO facility (version 3.4.3; <http://pappiso.inra.fr/bioinfo/xtandempipeline/.3>; <http://pappiso.inra.fr/bioinfo/xtandempipeline/>) (Langella et al., 2017) with search parameters as followed: enzymatic cleavage by trypsin digestion with one possible miscleavage, fixed carbamidomethylation modification on cysteine and variable oxidation on methionine; precursor mass tolerance of ± 10 ppm and fragment mass tolerance of 0.5 Da. Several databases were used: the Uniprot KB/SwissProt Mus musculus database (24,977 entries, version January 2017) and a homemade contaminant database (trypsin, keratine, etc.). The identified proteins were filtered with a minimum of two different peptides required with a peptide *E-value* < 0.01, and a protein *E-value* (product of unique peptide *E values*) < 10<sup>-4</sup>. Combine analysis mode with all samples was performed and results were grouping proteins: proteins which have at least one peptide in common. This allowed to group proteins with similar functions. Within each group, proteins with at least one specific peptide relatively to other members of the group were reported as subgroups. One subgroup represents one specific protein. Proteins are characterized with their spectral number. Label free quantification of proteins were achieved with spectral counting approach (SC), which is a strategy to determine a relative quantification of proteins from their number of spectra obtained with tryptic peptides in MS. This quantification relies on the more of a particular protein is present in a sample, the more MS spectra are detected for peptides of that protein. Statistical analysis was performed using MassChroqR package developed by PAPPISO team (<http://pappiso.inra.fr/bioinfo/masschroq/>) (R version 3.3.2). A generalized linear mixed

model (GLM) with a Poisson distribution was applied. This model suits in the case of a counting like SC. The principal component analysis was obtained by simulating the kernel densities from group's means and variances assuming bivariate normal distributions. This distribution was generated using protein abundances as variables. Hierarchical bivariate clustering was performed using Euclidean distances and unweighted pair group averages as the aggregation method. All data analyses and graphical representations were performed using the R package MassChroq. Significant changes in protein abundance was determined by analysis of variance (ANOVA) using a Chi-square test. Treatment effect was considered with an adjusted  $p$  value for multiple testing by a Benjamini–Hochberg procedure (Benjamini and Hochberg 1995). Student  $t$  tests were performed to identify proteins which showed significant differences expressed between groups with the following criteria:  $p$ -value was set at  $<0.05$ . The resulting exploratory list may carry a higher rate of false positives at the protein level but allowed investigation of cumulative effects over larger sets of proteins and pathways.

### 2.8.3 Ingenuity pathway analysis

Selected proteins were overlaid on the global molecular network of Ingenuity Pathway Analysis (Ingenuity® Systems, [www.ingenuity.com](http://www.ingenuity.com)) allowing for a generation of gene networks based on their connectivity. Their score takes into account the relative numbers of network eligible molecules, of molecules analyzed and the total number of molecules in Ingenuity's knowledge base. Disease links are generated on the literature-based association with illness by IPA.

## 3 Results

Detailed statistical results are provided in [Supplementary Table S1](#).

### 3.1 Physiological response to treatments

As previously observed (David et al., 2009), a 4-week treatment with Cort increased mouse body weight in comparison to controls ([Supplementary Figure S1A](#),  $p < 0.01$ ). Chronic Flx treatment decreased weight gain compared to Cort or vehicle-treated mice ([Supplementary Figure S1B](#),  $p < 0.001$  and  $p < 0.01$ , respectively). At the end of the protocol (W12), the weight gain in the Vehicle/Vehicle mice was bigger than that in Cort/Vehicle and Cort + Flx-R mice ([Supplementary Figure S1C](#),  $p < 0.05$  and  $p < 0.01$  respectively). Flx-NR mice treated with ECS showed a greater weight gain compared to Cort/Veh and Cort/Flx-R mice ( $p < 0.05$  and  $p < 0.01$  respectively).

### 3.2 Chronic corticosterone induced higher emotionality

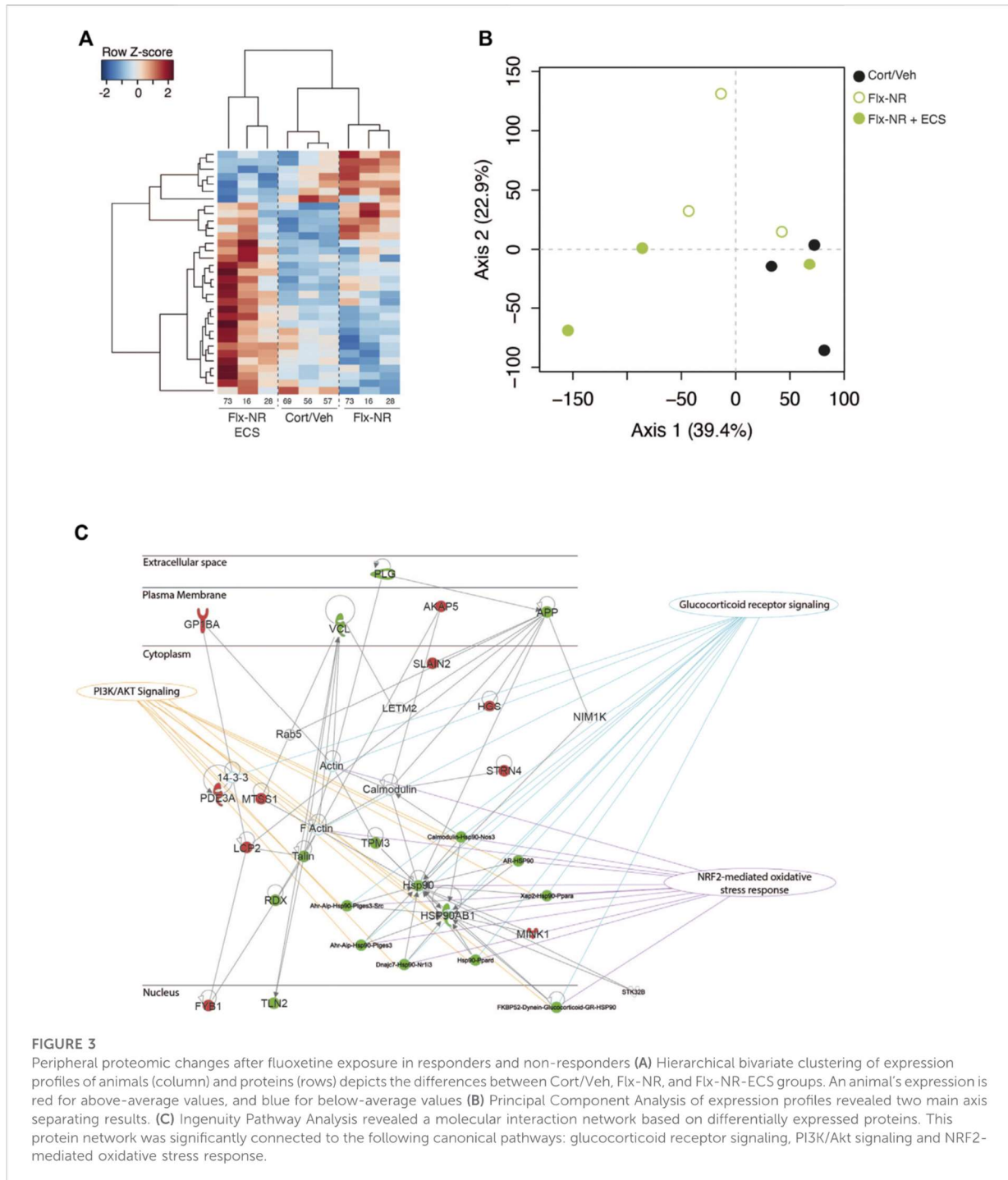
A 4-week treatment with Cort ([Supplementary Figure S2A](#)) induced an anxiety/depression-like phenotype in C57BL/6JRj mice as previously shown: we confirm here that the higher emotionality induced by chronic corticosterone administration is stable over time throughout the entire protocol and allow for longitudinal studies (David et al., 2009; Mendez-David et al., 2014; Siopi et al., 2016; Mendez-David et al., 2017; Cabeza et al., 2021). In the EPM, Cort-treated mice displayed a decrease in the time spent and number of entries in the open arms ([Supplementary Figures S2B–C](#),  $p < 0.01$ ). In the NSF tests, a decrease in latency to feed was observed after chronic Cort treatment ([Supplementary Figure S2D](#),  $p < 0.0001$ ) that was not correlated with food consumption in the homecage ([Supplementary Table S1](#)), as previously described (David et al., 2009; Mendez-David et al., 2017; Pinna et al., 2018). No significant effect was observed in the Splash test ([Supplementary Figure S2E](#)), but the behavioral emotionality score was significantly increased after chronic Cort treatment ([Supplementary Figure S2F](#),  $p < 0.0001$ ) compared to the Vehicle/Vehicle treatment.

### 3.3 Selection of responders/non-responders to chronic fluoxetine treatment

A 4-week treatment with fluoxetine (18 mg/kg/d, protocol in [Figure 1A](#)) or vehicle was administered to Cort-treated mice and antidepressant response was monitored with the same battery of tests as in [Supplementary Figure S2](#).

In the EPM, Cort/Flx mice showed an increase in the time spent ([Figure 1B](#),  $p < 0.01$ ) and the number of entries in the open arms of the EPM ([Figure 1C](#),  $p < 0.01$ ) compared to Cort/Veh mice. In the NSF, a 4-week Flx treatment reduced the increase in the latency to feed after Cort ([Figure 1D](#),  $p < 0.01$ ). A non-significant ( $p = 0.51$ ) increase in grooming duration was observed in Cort/Flx *versus* Cort/Veh mice in the splash test ([Figure 1E](#)). Applying  $z$ -normalization across tests after the second round of behavior showed that chronic Flx decreased Cort-induced emotionality score ([Figure 1F](#),  $p < 0.0001$  *versus* Veh/Veh group;  $p < 0.0001$  *versus* Cort/Veh group). Thus, chronic Flx decreased anxiety/depression-like phenotype in Cort-treated mice, confirming prior observations (Guilloux et al., 2011; Mendez-David et al., 2015). Overall, chronic Flx treatment significantly reduced behavioral emotionality in Cort-treated mice, as shown in measuring the change in emotionality score value between Week 10 and Week 5 ([Figure 1G](#),  $p < 0.001$ ).

As previously shown (Mendez-David et al., 2017), phenotypic variability was observed after chronic Flx



**FIGURE 3**

Peripheral proteomic changes after fluoxetine exposure in responders and non-responders (A) Hierarchical bivariate clustering of expression profiles of animals (column) and proteins (rows) depicts the differences between Cort/Veh, Flx-NR, and Flx-NR-ECS groups. An animal's expression is red for above-average values, and blue for below-average values (B) Principal Component Analysis of expression profiles revealed two main axis separating results. (C) Ingenuity Pathway Analysis revealed a molecular interaction network based on differentially expressed proteins. This protein network was significantly connected to the following canonical pathways: glucocorticoid receptor signaling, PI3K/Akt signaling and NRF2-mediated oxidative stress response.

administration. Two subgroups of mice could be defined based on the reduction of their emotionality score: a 50% decrease in emotionality score threshold was used to separate Flx-responding mice (Flx-R,  $n = 18$ ), or Flx non-responders mice (Flx-NR,  $n = 7$ ).

The 50% threshold was defined for each animal individually, by comparing their individual score at W10 vs. the score obtained at W5. This threshold was based on the clinical human criterion (Nierenberg and DeCecco 2001) and previously used in

TABLE 1 Ingenuity pathway analysis results.

Top Networks		Score
1) Cell Morphology, Hematological System Development and Function, Inflammatory Response		43
2) Cellular Development, Cellular Growth and Proliferation, Hematological System Development and Function		31
3) Cancer, Cell Morphology, Cellular Movement		3
Top diseases and Disorders	# Molecules	<i>p</i> -value
Inflammatory Response	13	4.01E-03 - 4.55E-08
Cardiovascular Disease	8	4.01E-03 - 6.15E-07
Hematological Disease	18	4.01E-03 - 6.15E-07
Organismal Injury and abnormalities	29	4.01E-03 - 6.15E-07
Connective Tissue Disorders	13	4.01E-03 - 1.26E-05
Top canonical pathways	$-\log(p\text{-value})$	Ratio
Fc Receptor-mediated Phagocytosis in Macrophages and Monocytes	3.6	0.032 (3/94)
Neuroprotective Role of THOP1 in Alzheimer's Disease	3.3	0.025 (3/118)
Leukocyte Extravasation Signaling	2.7	0.016 (3/193)
Remodeling of Epithelial Adherens Junctions	2.4	0.029 (2/68)
Actin Cytoskeleton Signaling	2.4	0.012 (3/245)

Results show top biological networks, diseases and disorders and canonical pathways obtained by Ingenuity Pathway Analysis (IPA). Network scores represent negative log-values of right-tailed Fisher's Exact Tests for network consistency. Pathways and disease *p*-values represent significance of over-representation of candidate proteins within respective protein groups. *p*-value ranges indicate values for various disease sub-classifications.

preclinical studies (Mendez-David et al., 2017). These two groups displayed a significant difference in behavioral emotionality levels (Figure 1G,  $p < 0.0001$ ).

### 3.4 Effect of chronic electroconvulsive seizures treatment in fluoxetine non-responding mice

We tested the effects of chronic ECS in Flx-NR mice who received seven sessions of ECS over 14 days, while Flx treatment was maintained in the two groups of Flx-treated mice (R and NR) as described in the protocol (Figure 2A).

In the EPM, ECS in Flx-NR mice increased time spent and number of entries in open arms compared to Cort/Veh mice (Figures 2B,C,  $p < 0.01$  and  $p < 0.001$ , respectively). By contrast, EPM parameters in Flx-NR mice treated with ECS were not significantly different from those measured in Flx-R mice (Figures 2B,C,  $p = 0.387$  and  $p = 0.742$ , respectively). In the NSF test, chronic Flx treatment in responder animals was still effective in comparison to Cort/Veh mice (Figure 2D,  $p < 0.0001$ ). Non significant decrease in the latency to feed in the NSF and increase the grooming behavior in the splash test were observed in the Cort/Flx-ECS group in comparison to the Cort/Veh group (Figure 2D,  $p = 0.26$ ; Figure 2E,  $p = 0.14$ ). Overall, we observed that ECS reduced the emotionality score in Flx-NR mice as indicated by its significant decreased value compared to Cort/Veh (Figure 2F,  $p < 0.05$ ). Moreover, no relevant difference between the Flx-R and Flx-NR-ECS groups was observed (Figure 2F,  $p = 0.14$ ).

### 3.5 Protein changes in Flx-NR mice after chronic electroconvulsive seizures treatment

Using a high resolution mass spectrometry analysis by X! TandemPipeline, specific proteins in PBMCs ( $n = 3$  samples per group) were detected (Supplementary Tables S2). Characterized proteins with less than two peptides were excluded. Hierarchical clustering of the expressed proteins distinguished Cort/Veh treated mice from Cort/Flx-NR and Cort/Flx-ECS mice (Figure 3A) and revealed 33 proteins showing differential changes. This aggregate behavior of this large-scale systemic response was quantified with Principal Components Analysis (PCA, Figure 3B), which confirmed hierarchical clustering analysis. According to PCA, proteins' abundance separated Cort/Veh, Cort/Flx-NR and Cort/Flx-ECS mice.

A group effect was observed for 33 proteins ( $p < 0.05$ , Supplementary Table S2). The levels of expression of 14 proteins were significantly modified by chronic fluoxetine treatment in Cort/Flx-NR mice, and 17 proteins in Cort/Flx-ECS mice compared to Cort/Veh mice ( $p < 0.05$ , Figure 3A and Supplementary Table S2). ECS induced significant changes in expression of 18 proteins (7 down-regulated and 11 upregulated).

Ingenuity Pathway analysis revealed three main networks associated with the 33 differentially expressed proteins (Figure 3C; Table 1), which relates to broad diseases and disorders such as "Inflammatory response," "Cardiovascular or Hematological Diseases." Canonical pathways linked to these DE proteins evidently relates to circulating components or process found in blood.

## 4 Discussion

### 4.1 Electroconvulsive seizures corrected anxiety/depression phenotype in Flx-NR

Lack of treatment response is one of the major limits of current antidepressant treatment, which can be circumvented using pharmacological combination or treatment. Novel pharmacological approaches including ketamine are also gaining attention, however they yet did not present a superiority of effect compared to electroconvulsive therapy (Veraart et al., 2021). Despite the frequent and widespread use of ECT, possible cognitive impairments and other adverse effects were described and its molecular mechanisms underlying its efficacy remains largely unclear [for review (Maffioletti et al., 2021)]. Thus, before engaging into ECT treatment, the search for predictors of ECT response in animal models of anxiety/depression would benefit to patients with MDD.

This work was performed in a different and new cohort of mice compared to our previous report on peripheral markers associated with non-response to Flx (Mendez-David et al., 2017). Here, we confirmed our previous report showing non-response to chronic fluoxetine (Flx-NR) treatment in a pharmacological model of anxiety/depression (Mendez-David et al., 2017). We found a  $\approx 72\%$  response rate to chronic fluoxetine (18 responders out of 25 Flx-treated mice). This response rate is very similar to our prior work (65%, Mendez-David et al., 2017), performed with the same experimental protocol, with similar behavioral evaluation and threshold for defining treatment response. These preclinical results are also in line with clinical observation from the STAR\*D study (Rush et al., 2006; Trivedi et al., 2006) showing ineffective antidepressant drug treatment despite a mean of several weeks of SSRI therapy.

Interestingly, we reveal that chronic ECS treatment in Flx-NR mice rescued the behavioral emotionality score. While numerous studies explored the effect of chronic effects of ECS in naïve rodents (Duman and Vaidya 1998), few of them explored its benefits and its mechanism of action in animal model of anxiety/depression (Schloesser et al., 2015; Jonckheere et al., 2018). To our knowledge, the present study is the first examining ECS effects in the context of non-response to an antidepressant drug treatment. Prior works in the Cort model of depressive disorder showed that chronic ECS reverses Cort-induced depressive-like phenotype (Schloesser et al., 2015), an effect that may be supported by both rescuing Cort-induced deficit in dendritic spine morphology and increasing expression of *Bdnf* activity-dependent exons 1 and 6 (Maynard et al., 2018). Recently, increased synaptic connectivity and extended neuronal survival were confirmed as key factors for ECS efficacy in a genetic animal model relevant to some aspects of depression (Jonckheere et al., 2018). Here, a 14-day protocol of ECS alleviated the non-response to chronic fluoxetine treatment in a neuroendocrine-based rodent model of MDD and

antidepressant treatment resistance. Our preclinical ECS results confirm that the use of ECT in the context of non-response to classic antidepressant treatment could benefit to patients with MDD.

### 4.2 Peripheral proteomic changes after electroconvulsive seizures

According to a recent review on molecular biomarkers of ECT effects, most of the studies are concentrated on one or few markers. Expression studies on gene transcripts and microRNAs are rare and genetic studies are sparse. To date, no conclusive evidence regarding ECT molecular markers of clinical response has been reached (Maffioletti et al., 2021).

Our study is also the first report of ECS-induced proteome variations in the blood, and most especially in peripheral blood mononuclear cells (PBMC), samples easy to transpose into future clinical trials. The identification of protein biomarkers indicates that these proteins are involved in cell adhesion/motility (FYB1, TLN2), cell structure and cytoskeleton (CRAD, MTSS1, and SMTN), coagulation (F11R, PLG) and immune system (LCP2 and PPP6R3), signaling pathway (AKAP5, MINK1, and TMP3), vesicle trafficking (i.e., SH3GLB2, CC2D1B, and CAVIN1) or in cell metabolism (ADSS, GK, HSP90AB1, and HSG) and cell cycle (FYB1 and PPP6R3). At a single molecular level, some of these proteins have been prior associated with mental health. For example, ADSS polymorphism or increased blood levels of ADSS were associated with schizophrenia and bipolar disorder (Zhang et al., 2008a; Zhang et al., 2008b) and (Tsuang et al., 2005), respectively.

The scaffolding protein AKAP5 (also called AKAP150 in rodent species and AKAP79 on human) have a dual role in depression. Indeed, genetic blockade of AKAP5 expression in the basolateral nuclei of the amygdala prevents chronic stress-induced depressive like disorders in mice (Zhou et al., 2019). Conversely, the disruption of AKAP5 in E18 embryonic cortical neurons (Mari et al., 2015) (Mari et al., 2015) negatively affect the inhibition of ASIC1a -a ion channel known to be involved in neuropathologies including depression and whose pharmacologic inhibition has antidepressant-like effects (Coryell et al., 2009). These opposite roles in the biological processes of depression could be explain by the protein partner bound by AKAP5: the complex of AKAP5 with calcineurin inhibit the ASIC1a functions (Mari et al., 2015) while the association with PKA promote ASIC1a activity (Chai et al., 2007).

Overexpression of APP in mice has been associated with anxious and depressive-like phenotype in APP knock-in mice (Locci et al., 2021). However, conflicting reports in mouse models (Sakakibara et al., 2018; Latif-Hernandez et al., 2019) suggest a dynamic emotional response depending on the test performed (Pervolaraki et al., 2019), the age of the animal but independent

of the A $\beta$  plaque load. This last, formed by the cleavage of APP, was identified recently in cerebrospinal fluid, with other protein biomarkers, as an hypothetic biomarker of the ECT efficacy (Kranaster et al., 2019).

CC2D1B participate in a dual repressor element with Freud2, both molecules acting as strong repressors of the expression of serotonin 1A receptor, a key receptor involved in pathophysiology of depression and antidepressant drug response (Samuels et al., 2016).

While no direct link between plasminogen (PLMN) and depression has been observed, its activation into plasmin is controlled by tissue-type plasminogen activator (tPA) which cleave PLMN into plasmin. One of the role of plasmin is to convert pro-BDNF into mature BDNF in the brain, and thus this pathway has been implicated in depression and treatment response (Tsai 2017). Here, we found a reduction in PLMN levels after ECS treatment: this result correlates with prior observations showing an increase in tPa expression after ECS exposure (Segawa et al., 2013) suggesting an increase in plasminogen cleavage and increase in plasmin levels.

Prolyl endopeptidase (PPCE or PREP) peripheral levels have been observed decreased in MDD subjects (Maes et al., 1994), and antidepressant treatment has been shown to increase PREP serum level (Maes et al., 1995). Interestingly, here ECS treatment reduced PPCE levels in fluoxetine non-responding mice.

Finally, TALIN2, a protein involved in the cytoskeleton and the adhesion as well as in signaling pathway (by production of PIP2) increased in the serum of MDD patients (Al-Hakeim et al., 2020). Interestingly, we prior found TALIN2 to be downregulated in animals that respond to chronic fluoxetine vs. non-responding mice (Mendez-David et al., 2017). We confirmed here this association as ECS reduced TALIN2 expression compared in Flx-NR mice.

A preclinical study looking at a proteomic peripheral profile of ECS effects in naïve male Sprague-Dawley rats found a biosignature that differs from what we obtained here (Glaviano et al., 2014). These discrepancies could be due to a difference in the experimental models used (naïve vs. animal model of non-response to SSRI), but also difference in the peripheral tissue studied (plasma vs. PBMC). Whether these changes observed in PBMC can correlate to similar changes in the brain remains to be tested. However, some studies shown similar expression changes between in PBMCs and the hippocampus after stress in mice (van Heerden et al., 2009), and convergent signaling pathways between amygdala and blood (Daskalakis et al., 2014). More recently, Hervé et al. (2017) have shown peripheral gene expression changes allowing for the identification of biomarkers predictive of treatment response in mice and depressed subjects. While correlation in proteomic expression between selective brain regions and PBMC has yet not been explored using high-throughput techniques, however the use of PBMCs as a surrogate for

proteomic studies in psychiatric disorders has been proposed (Rahmoune and Guest 2017).

At the single molecule level, prior association of these different markers have been mentioned in the literature. However, MDD and treatment response cannot be resumed by individual factors. Thus, only association study of protein network would benefit to patients with MDD. Here, we described a main protein network based on 33 proteins involved in three regulatory pathways known to participate in the etiology of mood disorders: glucocorticoid receptor signaling (Cattaneo and Riva 2016; McEwen and Akil 2020), PI3K/Akt signaling (Fujiki et al., 2010; Matsuda et al., 2019) and NRF2-mediated oxidative stress response (Bakunina et al., 2015; Mendez-David et al., 2015). A recent review underlined biological systems related to neurotrophic and inflammatory/immune systems in the effects of ECT (Maffioletti et al., 2021), the involvement of this last system being also observed and assess in the cerebrospinal fluid in patients (Kranaster et al., 2019).

## 5 Limitations and conclusion

One of the strengths of this study is that ECS were applied in mice that did not respond to chronic fluoxetine administration. Whether this biosignature, specific to non-response to fluoxetine vs other antidepressant drug treatment, remains to be further tested. Indeed, MDD is more prevalent in women (Albert 2015). Our study was performed in male mice because we previously showed that chronic corticosterone administration in female C57BL/6 mice did not affect the emotionality score (Mekiri et al., 2017). It could be interesting to confirm whether such a biosignature could be reproduced in another animal model of anxiety/depression, e.g., chronic social defeat stress model or chronic mild stress.

Here, we tested the effects of ECS in Flx-NR animals while Flx treatment was maintained. Thus, an interaction of ECS with Flx cannot be ruled out and the effects of ECS alone -without Flx treatment-has not be tested. However, as some clinical studies suggest, concomitant pharmacotherapy may increase ECT efficacy and decrease the risk of relapse (Sackeim et al., 2009; Haskett and Loo 2010). Similarly, we did not test whether the changes in proteins expression are state-dependent and would be similar in naïve mice, as electroconvulsive treatment are of interest in a pathological situation.

While the present study was performed in a low number of animals, we believe that its longitudinal trajectory with proteomic profiling within the same animal before and after ECS strengthen its scientific validity. This study paves the way for a greater definition of peripheral biomarkers related to antidepressant treatment response, with the goal of a better prediction and translational validation of these methods. Yet, whether or not these proteomic changes observed in PBMCs from mice mirror biological changes in brain tissues remains to be tested.

## Data availability statement

The mass spectrometry proteomics data have been deposited to the ProteomeXchange Consortium via the PRIDE (Perez-Riverol et al., 2022) partner repository with the dataset identifier PXD037392.

## Ethics statement

The animal study was reviewed and approved by The Institutional Animal Care and Use Committee (CEE26 authorization 4747).

## Author contributions

RL, IM-D, LK-N, CH, DD, and J-PG designed and performed research, drew figures, and analyzed the data. All authors contributed to the writing of the manuscript.

## Funding

This work was supported by a grant from the Fondation de France, Programme de Recherche sur les Maladies Psychiatriques—Eng 00081237/2017 and by the Ministère de l'Éducation Nationale, de l'Enseignement Supérieur et de la Recherche (MENESR, Paris, France) Fellowship (RL.).

## References

- Al-Hakeim, H. K., Al-Issa, A. A. R., and Maes, M. (2020). Serum agrin and talin are increased in major depression while agrin and creatine phosphokinase are associated with chronic fatigue and fibromyalgia symptoms in depression. *Metab. Brain Dis.* 35 (1), 225–235. doi:10.1007/s11011-019-00506-0
- Albert, P. R. (2015). Why is depression more prevalent in women? *J. Psychiatry Neurosci.* 40 (4), 219–221. doi:10.1503/jpn.150205
- American Psychiatric Association, D.-T. F. (2013). *Diagnostic and statistical manual of mental disorders: DSM-5*. Washington, D.C.: American Psychiatric Association.
- Bahji, A., Vazquez, G. H., and Zarate, C. A., Jr. (2021). Comparative efficacy of racemic ketamine and esketamine for depression: A systematic review and meta-analysis. *J. Affect. Disord.* 278, 542–555. doi:10.1016/j.jad.2020.09.071
- Bakunina, N., Pariante, C. M., and Zunszain, P. A. (2015). Immune mechanisms linked to depression via oxidative stress and neuroprogression. *Immunology* 144 (3), 365–373. doi:10.1111/imm.12443
- Benjamini, Y., and Hochberg, Y. (1995). Controlling the false discovery rate: A practical and powerful approach to multiple testing. *J. R. Stat. Soc. Ser. B* 57, 289–300. doi:10.1111/j.2517-6161.1995.tb02031.x
- Cabeza, L., Ramadan, B., Giustiniani, J., Houdayer, C., Pellequer, Y., Gabriel, D., et al. (2021). Chronic exposure to glucocorticoids induces suboptimal decision-making in mice. *Eur. Neuropsychopharmacol.* 46, 56–67. doi:10.1016/j.euroneuro.2021.01.094
- Cattaneo, A., and Riva, M. A. (2016). Stress-induced mechanisms in mental illness: A role for glucocorticoid signalling. *J. Steroid Biochem. Mol. Biol.* 160, 169–174. doi:10.1016/j.jsbmb.2015.07.021
- Chai, S., Li, M., Lan, J., Xiong, Z. G., Saugstad, J. A., and Simon, R. P. (2007). A kinase-anchoring protein 150 and calcineurin are involved in regulation of acid-sensing ion channels ASIC1a and ASIC2a. *J. Biol. Chem.* 282 (31), 22668–22677. doi:10.1074/jbc.M703624200

## Acknowledgments

We greatly acknowledge V. Domergue and the staff of the animal care facility [Plateforme AnimEx, UMS-IPSIT (Ingénierie et Plateformes au Service de l'Innovation Thérapeutique), Univ. Paris-Saclay, Châtenay-Malabry, France] for their technical support.

## Conflict of interest

The authors declare that the research was conducted in the absence of any commercial or financial relationships that could be construed as a potential conflict of interest.

## Publisher's note

All claims expressed in this article are solely those of the authors and do not necessarily represent those of their affiliated organizations, or those of the publisher, the editors and the reviewers. Any product that may be evaluated in this article, or claim that may be made by its manufacturer, is not guaranteed or endorsed by the publisher.

## Supplementary material

The Supplementary Material for this article can be found online at: <https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fphar.2022.993449/full#supplementary-material>

- Coryell, M. W., Wunsch, A. M., Haeflner, J. M., Allen, J. E., Schnizler, M., Ziemann, A. E., et al. (2009). Acid-sensing ion channel-1a in the amygdala, a novel therapeutic target in depression-related behavior. *J. Neurosci.* 29 (17), 5381–5388. doi:10.1523/JNEUROSCI.0360-09.2009
- Daskalakis, N. P., Cohen, H., Cai, G., Buxbaum, J. D., and Yehuda, R. (2014). Expression profiling associates blood and brain glucocorticoid receptor signaling with trauma-related individual differences in both sexes. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 111 (37), 13529–13534. doi:10.1073/pnas.1401660111
- David, D. J., Samuels, B. A., Rainer, Q., Wang, J. W., Marsteller, D., Mendez, I., et al. (2009). Neurogenesis-dependent and -independent effects of fluoxetine in an animal model of anxiety/depression. *Neuron* 62 (4), 479–493. doi:10.1016/j.neuron.2009.04.017
- Duman, R. S., and Vaidya, V. A. (1998). Molecular and cellular actions of chronic electroconvulsive seizures. *J. ECT* 14 (3), 181–193. doi:10.1097/00124509-199809000-00004
- Ford, T. C., and Rickwood, D. (1990). A new one-step method for the isolation of human mononuclear cells. *J. Immunol. Methods* 134 (2), 237–241. doi:10.1016/0022-1759(90)90385-9
- Fujiki, M., Abe, E., Nagai, Y., Shiqi, K., Kubo, T., Ishii, K., et al. (2010). Electroconvulsive seizure-induced VEGF is correlated with neuroprotective effects against cerebral infarction: Involvement of the phosphatidylinositol-3 kinase/Akt pathway. *Exp. Neurol.* 225 (2), 377–383. doi:10.1016/j.expneurol.2010.07.010
- Glaviano, A., O'Donovan, S. M., Ryan, K., O'Mara, S., Dunn, M. J., and McLoughlin, D. M. (2014). Acute phase plasma proteins are altered by electroconvulsive stimulation. *J. Psychopharmacol.* 28 (12), 1125–1134. doi:10.1177/0269881114552742

- Group, U. E. R. (2003). Efficacy and safety of electroconvulsive therapy in depressive disorders: A systematic review and meta-analysis. *Lancet* 361 (9360), 799–808. doi:10.1016/S0140-6736(03)12705-5
- Guilloux, J. P., Bassi, S., Ding, Y., Walsh, C., Turecki, G., Tseng, G., et al. (2015). Testing the predictive value of peripheral gene expression for nonremission following citalopram treatment for major depression. *Neuropsychopharmacology* 40 (3), 701–710. doi:10.1038/npp.2014.226
- Guilloux, J. P., Seney, M., Edgar, N., and Sibille, E. (2011). Integrated behavioral z-scoring increases the sensitivity and reliability of behavioral phenotyping in mice: Relevance to emotionality and sex. *J. Neurosci. Methods* 197 (1), 21–31. doi:10.1016/j.jneumeth.2011.01.019
- Haskett, R. F., and Loo, C. (2010). Adjunctive psychotropic medications during electroconvulsive therapy in the treatment of depression, mania, and schizophrenia. *J. ECT* 26 (3), 196–201. doi:10.1097/YCT.0b013e3181eeec13f
- Herve, M., Bergon, A., Le Guisquet, A. M., Leman, S., Consoloni, J. L., Fernandez-Nunez, N., et al. (2017). Translational identification of transcriptional signatures of major depression and antidepressant response. *Front. Mol. Neurosci.* 10, 248. doi:10.3389/fnmol.2017.00248
- Htike, T. T., Mishra, S., Kumar, S., Padmanabhan, P., and Gulyas, B. (2019). Peripheral biomarkers for early detection of alzheimer's and Parkinson's diseases. *Mol. Neurobiol.* 56 (3), 2256–2277. doi:10.1007/s12035-018-1151-4
- Jonckheere, J., Deloulme, J. C., Dall'igna, G., Chauliac, N., Pelluet, A., Nguon, A. S., et al. (2018). Short- and long-term efficacy of electroconvulsive stimulation in animal models of depression: The essential role of neuronal survival. *Brain Stimul.* 11 (6), 1336–1347. doi:10.1016/j.brs.2018.08.001
- Joslin, J. O. (2009). Blood collection techniques in exotic small mammals. *J. Exot. Pet Med.* 18 (2), 117–139. doi:10.1053/j.jepm.2009.04.002
- Kobayashi, Y., and Segi-Nishida, E. (2019). Search for factors contributing to resistance to the electroconvulsive seizure treatment model using adrenocorticotrophic hormone-treated mice. *Pharmacol. Biochem. Behav.* 186, 172767. doi:10.1016/j.pbb.2019.172767
- Kranaster, L., Hoyer, C., Aksay, S. S., Bumb, J. M., Muller, N., Zill, P., et al. (2019). Biomarkers for antidepressant efficacy of electroconvulsive therapy: An exploratory cerebrospinal fluid study. *Neuropsychobiology* 77 (1), 13–22. doi:10.1159/000491401
- Langella, O., Valot, B., Balliau, T., Blein-Nicolas, M., Bonhomme, L., and Zivy, M. (2017). X!Tandem Pipeline: A tool to manage sequence redundancy for protein inference and phosphosite identification. *J. Proteome Res.* 16 (2), 494–503. doi:10.1021/acs.jproteome.6b00632
- Latif-Hernandez, A., Shah, D., Craessaerts, K., Saido, T., Saito, T., De Strooper, B., et al. (2019). Subtle behavioral changes and increased prefrontal-hippocampal network synchronicity in APP(NL-G-F) mice before prominent plaque deposition. *Behav. Brain Res.* 364, 431–441. doi:10.1016/j.bbr.2017.11.017
- Liu, Q., He, H., Yang, J., Feng, X., Zhao, F., and Lyu, J. (2020). Changes in the global burden of depression from 1990 to 2017: Findings from the global burden of disease study. *J. Psychiatr. Res.* 126, 134–140. doi:10.1016/j.jpsychires.2019.08.002
- Locci, A., Orellana, H., Rodriguez, G., Gottliebson, M., McClarty, B., Dominguez, S., et al. (2021). Comparison of memory, affective behavior, and neuropathology in APP(NLGF) knock-in mice to 5xFAD and APP/PS1 mice. *Behav. Brain Res.* 404, 113192. doi:10.1016/j.bbr.2021.113192
- Maes, M., Goossens, F., Scharpe, S., Calabrese, J., Desnyder, R., and Meltzer, H. Y. (1995). Alterations in plasma prolyl endopeptidase activity in depression, mania, and schizophrenia: Effects of antidepressants, mood stabilizers, and antipsychotic drugs. *Psychiatry Res.* 58 (3), 217–225. doi:10.1016/0165-1781(95)02698-v
- Maes, M., Goossens, F., Scharpe, S., Meltzer, H. Y., D'Hondt, P., and Cosyns, P. (1994). Lower serum prolyl endopeptidase enzyme activity in major depression: Further evidence that peptidases play a role in the pathophysiology of depression. *Biol. Psychiatry* 35 (8), 545–552. doi:10.1016/0006-3223(94)90101-5
- Maffioletti, E., Carvalho Silva, R., Bortolomasi, M., Baune, B. T., Gennarelli, M., and Minelli, A. (2021). Molecular biomarkers of electroconvulsive therapy effects and clinical response: Understanding the present to shape the future. *Brain Sci.* 11 (9), 1120. doi:10.3390/brainsci11091120
- Mari, Y., Katnik, C., and Cuevas, J. (2015).  $\sigma$ -1 receptor inhibition of ASIC1a channels is dependent on a pertussis toxin-sensitive G-protein and an akap150/calciurein complex. *Neurochem. Res.* 40 (10), 2055–2067. doi:10.1007/s11064-014-1324-0
- Matsuda, S., Ikeda, Y., Murakami, M., Nakagawa, Y., Tsuji, A., and Kitagishi, Y. (2019). Roles of PI3K/AKT/GSK3 pathway involved in psychiatric illnesses. *Diseases* 7 (1), E22. doi:10.3390/diseases7010022
- Maynard, K. R., Hobbs, J. W., Rajpurohit, S. K., and Martinowich, K. (2018). Electroconvulsive seizures influence dendritic spine morphology and BDNF expression in a neuroendocrine model of depression. *Brain Stimul.* 11 (4), 856–859. doi:10.1016/j.brs.2018.04.003
- McEwen, B. S., and Akil, H. (2020). Revisiting the stress concept: Implications for affective disorders. *J. Neurosci.* 40 (1), 12–21. doi:10.1523/JNEUROSCI.0733-19.2019
- Mekiri, M., Gardier, A. M., David, D. J., and Guilloux, J. P. (2017). Chronic corticosterone administration effects on behavioral emotionality in female c57bl6 mice. *Exp. Clin. Psychopharmacol.* 25 (2), 94–104. doi:10.1037/pha0000112
- Mendez-David, I., Boursier, C., Domergue, V., Colle, R., Falissard, B., Corruble, E., et al. (2017). Differential peripheral proteomic biosignature of fluoxetine response in a mouse model of anxiety/depression. *Front. Cell. Neurosci.* 11, 237. doi:10.3389/fncel.2017.00237
- Mendez-David, I., David, D. J., Darcet, F., Wu, M. V., Kerdine-Romer, S., Gardier, A. M., et al. (2014). Rapid anxiolytic effects of a 5-HT<sub>1A</sub> receptor agonist are mediated by a neurogenesis-independent mechanism. *Neuropsychopharmacology* 39 (6), 1366–1378. doi:10.1038/npp.2013.332
- Mendez-David, I., El-Ali, Z., Hen, R., Falissard, B., Corruble, E., Gardier, A. M., et al. (2013). A method for biomarker measurements in peripheral blood mononuclear cells isolated from anxious and depressed mice: Beta-arrestin 1 protein levels in depression and treatment. *Front. Pharmacol.* 4, 124. doi:10.3389/fphar.2013.00124
- Mendez-David, I., Tritschler, L., Ali, Z. E., Damiens, M. H., Pallardy, M., David, D. J., et al. (2015). Nrf2-signaling and BDNF: A new target for the antidepressant-like activity of chronic fluoxetine treatment in a mouse model of anxiety/depression. *Neurosci. Lett.* 597, 121–126. doi:10.1016/j.neulet.2015.04.036
- Milev, R. V., Giacobbe, P., Kennedy, S. H., Blumberg, D. M., Daskalakis, Z. J., Downar, J., et al. (2016). Canadian network for mood and anxiety treatments (CANMAT) 2016 clinical guidelines for the management of adults with major depressive disorder: Section 4. Neurostimulation treatments. *Can. J. Psychiatry* 61 (9), 561–575. doi:10.1177/0706743716660033
- Nierenberg, A. A., and DeCecco, L. M. (2001). Definitions of antidepressant treatment response, remission, nonresponse, partial response, and other relevant outcomes: A focus on treatment-resistant depression. *J. Clin. Psychiatry* 62 (16), 5
- Pagnin, D., de Queiroz, V., Pini, S., and Cassano, G. B. (2004). Efficacy of ECT in depression: A meta-analytic review. *J. ECT* 20 (1), 13–20. doi:10.1097/00124509-200403000-00004
- Perez-Riverol, Y., Bai, J., Bandla, C., Hewapathirana, S., Garcia-Seisdedos, D., Kamatchinathan, S., et al. (2022). The PRIDE database resources in 2022: A Hub for mass spectrometry-based proteomics evidences. *Nucleic. Acids. Res.* 50 (D1), D543–D552.
- Pervolaraki, E., Hall, S. P., Foresteire, D., Saito, T., Saido, T. C., Whittington, M. A., et al. (2019). Insoluble A $\beta$  overexpression in an App knock-in mouse model alters microstructure and gamma oscillations in the prefrontal cortex, affecting anxiety-related behaviours. *Dis. Model. Mech.* 12 (9), dmm040550. doi:10.1242/dmm.040550
- Pinna, M., Manchia, M., Oppo, R., Scano, F., Pillai, G., Loche, A. P., et al. (2018). Clinical and biological predictors of response to electroconvulsive therapy (ECT): A review. *Neurosci. Lett.* 669, 32–42. doi:10.1016/j.neulet.2016.10.047
- Preece, R. L., Han, S. Y. S., and Bahn, S. (2018). Proteomic approaches to identify blood-based biomarkers for depression and bipolar disorders. *Expert Rev. Proteomics* 15 (4), 325–340. doi:10.1080/14789450.2018.1444483
- Rahmoune, H., and Guest, P. C. (2017). Preparation of peripheral blood mononuclear cells (PBMCs) as a model for proteomic studies of psychiatric disorders. *Adv. Exp. Med. Biol.* 974, 299–303. doi:10.1007/978-3-319-52479-5\_28
- Rimmerman, N., Verdiger, H., Goldenberg, H., Naggan, L., Robinson, E., Kozela, E., et al. (2021). Microglia and their LAG3 checkpoint underlie the antidepressant and neurogenesis-enhancing effects of electroconvulsive stimulation. *Mol. Psychiatry* 27, 1120–1135. doi:10.1038/s41380-021-01338-0
- Rush, A. J., Trivedi, M. H., Wisniewski, S. R., Nierenberg, A. A., Stewart, J. W., Warden, D., et al. (2006). Acute and longer-term outcomes in depressed outpatients requiring one or several treatment steps: A STAR\*D report. *Am. J. Psychiatry* 163 (11), 1905–1917. doi:10.1176/appi.2006.163.11.1905
- Sackeim, H. A., Dillingham, E. M., Prudic, J., Cooper, T., McCall, W. V., Rosenquist, P., et al. (2009). Effect of concomitant pharmacotherapy on electroconvulsive therapy outcomes: Short-term efficacy and adverse effects. *Arch. Gen. Psychiatry* 66 (7), 729–737. doi:10.1001/archgenpsychiatry.2009.75
- Sakaida, M., Sukeno, M., Imoto, Y., Tsuchiya, S., Sugimoto, Y., Okuno, Y., et al. (2013). Electroconvulsive seizure-induced changes in gene expression in the mouse hypothalamic paraventricular nucleus. *J. Psychopharmacol.* 27 (11), 1058–1069. doi:10.1177/0269881113497612
- Sakakibara, Y., Sekiya, M., Saito, T., Saido, T. C., and Iijima, K. M. (2018). Cognitive and emotional alterations in App knock-in mouse models of A $\beta$  amyloidosis. *BMC Neurosci.* 19 (1), 46. doi:10.1186/s12868-018-0446-8
- Samuels, B. A., Mendez-David, I., Faye, C., David, S. A., Pierz, K. A., Gardier, A. M., et al. (2016). Serotonin 1A and serotonin 4 receptors: Essential mediators of the

- neurogenic and behavioral actions of antidepressants. *Neuroscientist* 22 (1), 26–45. doi:10.1177/1073858414561303
- Schloesser, R. J., Orvoen, S., Jimenez, D. V., Hardy, N. F., Maynard, K. R., Sukumar, M., et al. (2015). Antidepressant-like effects of electroconvulsive seizures require adult neurogenesis in a neuroendocrine model of depression. *Brain Stimul.* 8 (5), 862–867. doi:10.1016/j.brs.2015.05.011
- Segawa, M., Morinobu, S., Matsumoto, T., Fuchikami, M., and Yamawaki, S. (2013). Electroconvulsive seizure, but not imipramine, rapidly up-regulates pro-BDNF and t-PA, leading to mature BDNF production, in the rat hippocampus. *Int. J. Neuropsychopharmacol.* 16 (2), 339–350. doi:10.1017/S1461145712000053
- Siopi, E., Denizet, M., Gabellec, M. M., de Chaumont, F., Olivo-Marin, J. C., Guilloux, J. P., et al. (2016). Anxiety- and depression-like states lead to pronounced olfactory deficits and impaired adult neurogenesis in mice. *J. Neurosci.* 36 (2), 518–531. doi:10.1523/JNEUROSCI.2817-15.2016
- Stelzhammer, V., Guest, P. C., Rothermundt, M., Sondermann, C., Michael, N., Schwarz, E., et al. (2013). Electroconvulsive therapy exerts mainly acute molecular changes in serum of major depressive disorder patients. *Eur. Neuropsychopharmacol.* 23 (10), 1199–1207. doi:10.1016/j.euroneuro.2012.10.012
- Trivedi, M. H., Fava, M., Wisniewski, S. R., Thase, M. E., Quitkin, F., Warden, D., et al. (2006). Medication augmentation after the failure of SSRIs for depression. *N. Engl. J. Med.* 354 (12), 1243–1252. doi:10.1056/NEJMoa052964
- Tsai, S. J. (2017). Role of tissue-type plasminogen activator and plasminogen activator inhibitor-1 in psychological stress and depression. *Oncotarget* 8 (68), 113258–113268. doi:10.18632/oncotarget.19935
- Tsuang, M. T., Nossova, N., Yager, T., Tsuang, M. M., Guo, S. C., Shyu, K. G., et al. (2005). Assessing the validity of blood-based gene expression profiles for the classification of schizophrenia and bipolar disorder: A preliminary report. *Am. J. Med. Genet. B Neuropsychiatr. Genet.* 133B (1), 1–5. doi:10.1002/ajmg.b.30161
- van Heerden, J. H., Conesa, A., Stein, D. J., Montaner, D., Russell, V., and Illing, N. (2009). Parallel changes in gene expression in peripheral blood mononuclear cells and the brain after maternal separation in the mouse. *BMC Res. Notes* 2, 195. doi:10.1186/1756-0500-2-195
- Veraart, J. K. E., Smith-Apeldoorn, S. Y., Spaans, H. P., Kamphuis, J., and Schoevers, R. A. (2021). Is ketamine an appropriate alternative to ECT for patients with treatment resistant depression? A systematic review. *J. Affect. Disord.* 281, 82–89. doi:10.1016/j.jad.2020.11.123
- Voineskos, D., Daskalakis, Z. J., and Blumberger, D. M. (2020). Management of treatment-resistant depression: Challenges and strategies. *Neuropsychiatr. Dis. Treat.* 16, 221–234. doi:10.2147/NDT.S198774
- Walf, A. A., and Frye, C. A. (2007). The use of the elevated plus maze as an assay of anxiety-related behavior in rodents. *Nat. Protoc.* 2 (2), 322–328. doi:10.1038/nprot.2007.44
- Zhang, F., Sham, P. C., Fan, H., Xu, Y., Huang, X., So, H., et al. (2008a). An association study of ADSS gene polymorphisms with schizophrenia. *Behav. Brain Funct.* 4, 39. doi:10.1186/1744-9081-4-39
- Zhang, F., Xu, Y., Liu, P., Fan, H., Huang, X., Sun, G., et al. (2008b). Association analyses of the interaction between the ADSS and ATM genes with schizophrenia in a Chinese population. *BMC Med. Genet.* 9, 119. doi:10.1186/1471-2350-9-119
- Zhou, H. Y., He, J. G., Hu, Z. L., Xue, S. G., Xu, J. F., Cui, Q. Q., et al. (2019). A-Kinase anchoring protein 150 and protein kinase A complex in the basolateral amygdala contributes to depressive-like behaviors induced by chronic restraint stress. *Biol. Psychiatry* 86 (2), 131–142. doi:10.1016/j.biopsych.2019.03.967

Les résultats obtenus précédemment dans le laboratoire s'intéressaient ainsi à déterminer les changements induits au niveau périphérique par un traitement chronique aux ECS. Toutefois, dans ces expériences, aucune différenciation n'a été réalisée entre les animaux qui répondaient et ceux qui ne répondaient pas aux ECS. De plus, l'analyse protéomique a été réalisée sur un très faible panel d'animaux pour chaque groupe (soit  $n = 3/\text{groupe}$ ).

La suite de ce projet a donc consisté à caractériser la variation de l'expression des gènes précédemment identifiés suite à un traitement chronique aux ECS en considérant le paramètre de réponse et de non-réponse aux ECS. Pour répondre à cette nouvelle problématique, il fut utilisé le même schéma expérimental que celui précédemment usité.

## 2. Matériel et méthodes

---

### 2.1. Modèle animal expérimental

#### 2.1.1. Souche de souris et condition d'élevage

Des souris mâles C57Bl/6JRj adultes (Janvier Labs, Le Genest Saint Isle, France), âgées de 7 à 8 semaines et pesant 23 à 25g ont été utilisées pour ce projet. Les animaux sont hébergés au sein du Service Commun de l'Animalerie de la Faculté (plateforme IPSIT - Animex) dans des cages d'élevage standard sur un portoir ventilé, avec un accès *ad libitum* à l'eau et à la nourriture (cycle jour/nuit : 12h/12h non inversé). La température des pièces était maintenue à un niveau constant de  $22 \pm 1^\circ\text{C}$ . Les animaux sont hébergés par groupe 5 par cage.

#### 2.1.2. Modèle animal d'anxiété-“dépression”

##### a. Choix du modèle

Afin de comprendre la dynamique et les mécanismes de la pathologie humaine du TDC, mais aussi d'identifier et d'étudier les mécanismes sous-jacents impliqués dans la non-réponse au traitement, il est nécessaire de recourir à des modèles animaux fiables et adaptés. Il a ainsi été développés différents modèles d'anxiété-“dépression” basés sur différentes approches expérimentales : génétique, pharmacologique, comportementale (UCMS ou CSD le plus souvent) ou par lésion. Si les modèles comportementaux s'avèrent pertinent pour l'étude de la physiopathologie, ils ont pour principal défaut une importante proportion d'individus présentant une résilience au stress et ne développant pas le phénotype comportemental adéquat.

Le modèle pharmacologique par consommation chronique de corticostérone (CORT), aussi nommé modèle CORT, se caractérise par le développement d'un phénotype anxieux-“dépressif” chez plus de 90% des animaux traités de manière chronique CORT (David, Samuels

et al. 2009). De plus, les travaux ayant permis l'élaboration de ce modèle ont mis en évidence l'existence de deux sous-populations d'animaux en fonction de leur réponse ou non à un antidépresseur de la famille des ISRS, la fluoxétine : environ 70% des souris répondent à la fluoxétine tandis que 30% approximativement n'y répondent pas (David, Samuels et al. 2009) ; ce modèle apparaît donc comme le plus approprié dans le cadre de l'étude des mécanismes de la non-réponse et de la résistance aux traitements antidépresseurs.

#### b. Traitement et protocole expérimental

Les animaux sont soumis à un traitement chronique par CORT ou par véhicule de 4 semaines (groupe contrôle) tel que présenté précédemment (cf §2.2 et §2.3 de (Lebeau, Mendez-David et al. 2022)), leur comportement émotionnel étant évalué à la fin de ces 4 semaines au travers de 3 tests, l'EPM, le NSF et le *Splash Test* qui permettent de calculer le score d'émotionnalité, comme décrit précédemment (cf §2.5 de (Lebeau, Mendez-David et al. 2022)). Dans les 4 semaines suivant les tests comportementaux, les animaux reçoivent toujours un traitement chronique à la CORT mais associé avec de la fluoxétine. A la fin de ces 4 semaines, le score d'émotionnalité est déterminé de la même manière que précédemment, permettant ainsi de distinguer les animaux répondant de ceux ne répondant pas à la fluoxétine.

#### 2.1.3. Traitement par ECS

Les animaux qui ne répondent pas à la fluoxétine sont soumis à un traitement chronique par ECS tel que décrit précédemment (cf §2.4 de (Lebeau, Mendez-David et al. 2022)). A la fin du traitement par ECS, les animaux traités par ECS sont soumis une troisième fois à la série de tests comportementaux, en vue de distinguer les animaux répondant de ceux ne répondant pas aux ECS.

En vue de déterminer les niveaux d'expression de gènes cibles au niveau périphérique, des prélèvements sanguins sont effectués chez les animaux avant le début et à la fin du traitement par ECS (cf §2.6 de (Lebeau, Mendez-David et al. 2022)).

## 2.2. Détermination de l'activité transcriptomique des gènes cibles après traitement par ECS

### 2.2.1. Extraction des ARNm à partir du sang total

L'extraction des ARN totaux à partir du sang total est réalisée grâce au kit **GeneJET Stabilized and Fresh Whole Blood RNA** (référence K0871, Thermo Scientific, Massachusetts, États-Unis), dont la fiche protocole est présentée ci-après.

La quantité d'ARN total et leur qualité est déterminée pour chaque échantillon grâce au Nanodrop et le Bioanalyzer, telles que décrits dans la section Matériel et Méthodes du projet principal (cf §6.2.2).

## Extraction des ARN à partir d'échantillons sanguins

### Matériel :

#### Appareils :

- centrifugeuse

#### Solutions et poudres :

- Ethanol 100%
- eau distillée (nucléase-free)

#### Consommable :

- kit d'extraction ARN **GeneJET** (K0871)

### A/ Préparation des solutions :

1. Diluer les solutions de tampon de lavage 1 et 2 par 64mL et 100mL d'éthanol 100% respectivement.
2. Préparation du tampon de lyse : ajouter 20µL d'une solution de DTT à 2M par mL de tampon de lyse.
3. Préparation du DNase I Master Mix (pour 100µL soit 1 échantillon) :
  - 50µL de tampon 2X DNase I,
  - 8µL de DNase I reconstituée,
  - 10µL de solution de chlorure de manganèse (MnCl),
  - 32µL d'eau nucléase-free.

### B/ Extraction des ARN totaux :

1. Inverser plusieurs fois les tubes pour homogénéiser les échantillons
2. Centrifuger à 5.000g pendant 10 min à température ambiante afin de « précipiter » les ARN.
3. Jeter le surnageant et reprendre le culot dans 1mL d'eau nucléase-free. Vortexer 20 à 30 secondes et récupérer le culot par centrifugation à 5.000g pendant 10 min.
4. Jeter le surnageant et ajouter 100µL d'eau nucléase-free avant de vortexer pendant 10 à 20 secondes pour resuspendre le précipité.
5. Ajouter 400µL de tampon de lyse (additionné de DTT) et mélanger par vortex. Incuber à température ambiante 5 minutes en vortexant brièvement plusieurs fois.
6. Ajouter 250µL d'éthanol (96 à 100%) et mélanger par pipetage ou vortex.
7. Transférer 750µL du lysat dans la colonne de filtration insérée dans un tube de collecte. Centrifuger la colonne 30s à 12.000g. Jeter le surnageant et changer le tube de collecte.
8. Ajouter 700µL du tampon de lavage 1 et centrifuger 30s à 12.000g. Jeter le surnageant et changer le tube de collecte.
9. Ajouter 700µL de tampon de lavage 2 et centrifuger **1 min** à 12.000g ; vider le tube de collecte.
10. Ajouter 100µL de DNase I Master Mix préparé et incuber à température ambiante 15 min.
11. Ajouter 500µL de tampon de lavage 1 et centrifuger 30s à 12.000g ; vider le tube de collecte.
12. Ajouter 700µL de tampon de lavage 2 et centrifuger 30s à 12.000g ; vider le tube de collecte.
13. Ajouter 500µL de tampon de lavage 2 et centrifuger 1 min à 12.000g ; remplacer le tube de collecte et centrifuger 1 min à la vitesse maximale (de préférence >20.000g).
14. Placer la colonne filtrante dans un tube *Eppendorf* ; ajouter 50µL d'eau nucléase-free et centrifuger 1 min à 12.000g.

remarque : l'échantillon d'ARN doit être utilisé immédiatement ou conserver à -20°C (utilisation proche) ou -80°C (utilisation à long-terme).

**Fiche protocole** : protocole d'utilisation du kit GeneJET pour extraire les ARN à partir du sang total.

### 2.2.2. Quantification des ARNm cibles par amplification PCR

Après extraction des ARN, les ADN complémentaires de ces ARN sont synthétisés par rétro-transcription (cf section Matériel et Méthodes, §6.2.3) avant de réaliser la PCR quantitative, permettant ainsi de déterminer les niveaux relatifs en ARNm avant et après le traitement chronique par ECS, que cela soit pour les animaux répondant comme ceux ne répondant pas aux ECS.

## 2.3. Statistiques

Les résultats sont présentés sous la forme de moyenne  $\pm$  erreur standard à la moyenne (SEM).

Les données obtenues sont dans un premier temps traitées sur Excel afin de calculer les valeurs finales qui sont ensuite utilisées pour les tests statistiques. Les données sont ensuite analysées à l'aide du logiciel de statistique GraphPad Prism 9. La normalité des groupes est testée par un test de Shapiro-Wilk. Lorsque les deux groupes suivent une loi Normale, un test de Student (t-test) est réalisé pour comparer les deux groupes ; dans le cas contraire (autrement dit si au moins un des deux groupes ne respecte pas la loi normale), les deux groupes sont comparés grâce à un test non-paramétrique de Wilcoxon-Mann-Whitney.

Le seuil de significativité statistique est fixé à  $p < 0,05$ .

## 3. Résultats et discussion

A partir des 33 protéines dont le profil d'expression dans les PBMC était affecté par un traitement chronique aux ECS, les gènes codant 26 de ces protéines ont été sélectionnés pour étudier la différence d'expression induite par les ECS chroniques chez les répondeurs et les non-répondeurs aux ECS en chronique. Les protéines issues de ces gènes sont associées à 4 grandes fonctions cellulaires différentes : les voies de signalisation (5 gènes), le métabolisme cellulaire (6 gènes), la structure cellulaire (cytosquelette et trafic vésiculaire, 12 gènes) et l'immunité/coagulation (3 gènes).

Le tableau qui suit présente les résultats de comparaison des niveaux d'expression des gènes entre avant et après les ECS pour les répondeurs au traitement d'une part et les non-répondeurs au traitement d'autre part, mais aussi la comparaison de ces différences entre les répondeurs et les non-répondeurs aux ECS chroniques.

L'analyse statistique des résultats obtenus par RT-qPCR montre que l'expression de 18 gènes au total est impactée par un traitement chronique aux ECS. Parmi ces 18 gènes, 9 (Adss, F11r, Fyb1, Cavin1, Cc1d2b, Gp1ba, Lcp2, MTSS1 Tmem40) sont retrouvés modifiés dans le même sens dans les deux groupes (répondeurs et non-répondeurs), tandis que 3 sont spécifiquement réduits en expression chez les répondeurs (HGS, SMTN et SRGN) tandis que 5 sont sous-exprimés (Mink1, RPL15, Sh3glb2, PTPN6 et VCL) et 1 surexprimé chez les non-répondeurs (Akap5).

Comme il vient d'être évoqué juste ci-dessus, le niveau d'expression de 9 gènes est modulé dans le même sens après traitement aux ECS chez les répondeurs et les non-répondeurs au traitement. Il est permis de supposer que cette modification d'expression serait une réponse physiologique de l'organisme aux ECS en chronique, sans préjuger de la réponse ou non-réponse. Inversement, la réponse et l'absence de réponse (peut-on parler de résistance au traitement ?) aux ECS chroniques impliquent l'intervention de mécanismes et de voies de signalisations différentes.

De manière surprenante, sur les 26 gènes étudiés et pour lesquels le niveau d'expression protéique était modifié par un traitement aux ECS (Lebeau, Mendez-David et al. 2022), le tiers de ces gènes n'est pas affecté au niveau transcriptomique dans la présente étude. Toutefois, il est important de remarquer que l'étude protéomique avait été réalisée exclusivement sur les PBMC alors que les ARNm étudiés l'ont été à partir de sang total, les niveaux en ARNm déterminés ici étant par conséquent un reflet de l'activité transcriptomique dans l'ensemble des cellules sanguines. De plus, dans l'analyse protéomique, aucune différenciation entre animaux répondeur et animaux non-répondeurs aux ECS n'avait été faite, contrairement aux résultats ci-dessous : il est alors possible que les résultats protéomiques précédemment obtenus combine les effets moléculaires périphériques chez les répondeurs et les non-répondeurs.

Toutefois, le fait que les niveaux d'ARNm soient modifiés en réponse aux ECS, l'adaptation des niveaux en protéines n'a pas été clairement confirmé dans des extraits de sang total. De plus, il serait pertinent de poursuivre en déterminant, tant d'un point de vue transcriptomique que protéomique, l'implication de chaque composant cellulaire du sang dans les modifications d'expressions observés.

Pour conclure, les résultats obtenus au cours de ce projet a permis d'identifier de potentiels biomarqueurs permettant de discriminer les sujets traiter par ECS qui y répondent de ceux qui ne répondent pas à ce traitement.

Gène	répondeur aux ECS		non répondeur aux ECS		répondeurs vs non-répondeurs	
	d $\Delta$ Ct <sub>après-avant</sub>	p-value	d $\Delta$ Ct <sub>après-avant</sub>	p-value	d $\Delta$ Ct <sub>R-NR</sub>	p-value
<b>Voies de signalisation</b>						
akap5	-0,40	NS	-2,19	*	1,79	*
fyb1	2,37	0,053	4,71	*	-2,34	NS
lcp2	1,62	0,07	3,51	*	-1,89	NS
mink1	1,25	NS	4,68	0,07	-3,43	NS
ppp6r3	-0,27	NS	1,72	NS	-1,99	NS
<b>Métabolisme cellulaire</b>						
adss	2,63	*	3,16	*	-0,53	NS
hgs	0,81	*	0,76	NS	0,05	NS
hsp90ab1	0,77	NS	1,39	NS	-0,62	NS
prep	0,97	NS	1,61	NS	3,02	NS
rpl15	0,90	NS	4,14	*	-3,24	0,08
strn4	-0,22	NS	1,80	NS	-2,01	NS
<b>Structure cellulaire (cytosquelette et trafic vésiculaire)</b>						
cavin1	1,73	*	1,87	0,07	-0,14	NS
cc1d2b	1,83	0,07	2,89	0,06	-1,06	NS
mtss1	1,63	0,09	3,62	0,06	-1,98	NS
sh3glb2	0,65	NS	4,60	*	-3,96	0,06
slain2	-0,95	NS	-3,07	NS	5,25	NS
smtn	1,98	*	0,58	NS	1,40	NS
srgn	3,34	*	-0,02	NS	6,42	NS
tcb1d5	0,19	NS	1,40	NS	1,80	NS
tln2	0,39	NS	-12,39	NS	13,44	NS
tmem40	-1,26	*	-1,28	0,051	0,02	NS
tpm3	1,08	NS	-5,87	NS	13,36	NS
vcl	0,35	NS	4,41	*	-4,06	*
<b>Immunité et coagulation</b>						
fl1r	0,73	**	0,84	0,07	-0,10	NS
gp1ba	2,73	*	5,14	*	-2,41	NS
ptpn6	0,87	NS	3,81	*	-2,93	*

**Tableau 16 :** Différence d'expression des gènes ciblés chez les répondeurs et les non-répondeurs aux ECS avant et après le traitement par ECS chronique



---

# Annexes

---





## Annexe 1 : Statistiques des études biochimiques, comportementales et de la *Zero-Net Flux*

				Effet du	
				p-value	
Expérimentation	Test statistique	Variable statistique	p-value	Effet du sexe	Effet du génotype
Surexpression					
Biochimie					
Expression de la hMAO-A					
niveau ARNm hMAO-A	Student	t(7) = 2,66	0,03		
niveau protéine hMAO-A	Student	t(14) = 2,52	0,02	0,81	0,03
activité enzymatique MAO-A	Student	t(14) = 2,05	0,03		
Effet sur l'expression d'autres gènes					
5Htr1b (mPFC)	Student	t(10) = 2,43	0,04		
5Htr2a (mPFC)	Student	t(10) = 1,93	0,08		
DBH (mPFC)	Student	t(10) = 2,83	0,02		
CYP2D11 (mPFC)	Student	t(10) = 1,94	0,04		
DBH (noyaux du raphé)	Student	t(11) = 3,15	0,01		
SCL6A2 (noyaux du raphé)	Mann-Whitney	U = 3	8.10 <sup>-3</sup>		
Microdialyse (Zero-Net Flux)					
valeur du <i>Zero-Net Flux</i>	Student	t(14) = 3,23	6,1.10 <sup>-3</sup>		
[5-HT] basale	Mann-Whitney	U = 17	2,5.10 <sup>-2</sup>		
pente de la régression linéaire (activité de SERT)	Student	t(13) = 0,62	0,55		
Comportement					
OF - temps dans la zone centrale	Student	t(26) = 0,79	0,44	0,21	0,79
OF - nombre d'entrée dans la zone centrale	Mann-Whitney	U = 90	0,73	0,46	0,72
EPM - temps dans les bras ouverts	Student	t(26) = 1,51	0,14	0,91	0,16
EPM - ratio bras ouvert/tous les bras	Student	t(26) = 1,33	0,2	0,55	0,28
NSF - latence pour manger	Mantel-Cox	$\chi^2(1) = 8.10^{-3}$	0,7		
NSF - latence pour manger (mâles)	Mantel-Cox	$\chi^2(1) = 0,84$	0,36		
NSF - latence pour manger (femelles)	Mantel-Cox	$\chi^2(1) = 1,65$	0,2		
ST - temps de toilettage	Mann-Whitney	U = 39,5	6.10 <sup>-3</sup>	1,4.10 <sup>-2</sup>	2,6.10 <sup>-3</sup>
Score d'émotionnalité	Student	t(26) = 0,89	0,38	0,15	0,84
SPT - consommation de sucrose (GFP vs hMAO-A)	Student	t(14) = 31,06	< 10 <sup>-4</sup>		
SPT - consommation de sucrose (GFP)	Student	T(16) = 32,6	< 10 <sup>-4</sup>		
SPT - consommation de sucrose (hMAO-A)	Student	t(15) = 0,09	0,93		
Surexpression					
Comportement					
OF - temps dans la zone centrale	Mann-Whitney	U = 30,5	0,62	0,23	0,63
OF - nombre d'entrée dans la zone centrale	Student	t(15) = 1,42	0,17	0,25	0,21
EPM - temps dans les bras ouverts	Student	t(15) = 6,16	10 <sup>-4</sup>	0,72	< 10 <sup>-4</sup>
EPM - ratio bras ouvert/tous les bras	Student	t(15) = 2,89	0,01	0,48	0,0502
NSF - latence pour manger	Mantel-Cox	$\chi^2(1) = 0,19$	0,67		
NSF - latence pour manger (mâles)	Mantel-Cox	$\chi^2(1) = 0,52$	0,47		
NSF - latence pour manger (femelles)	Mantel-Cox	$\chi^2(1) = 0,14$	0,71		
ST - temps de toilettage	Student	t(15) = 0,82	0,43	0,77	0,69
Score d'émotionnalité	Student	t(15) = 3,42	4.10 <sup>-3</sup>	0,66	0,03
SPT - consommation de sucrose (GFP vs hMAO-A)	Mann-Whitney	U = 34	0,88		
SPT - consommation de sucrose (GFP)	Student	t(16) = 2,94	0,01		
SPT - consommation de sucrose (hMAO-A)	Mann-Whitney	< 10 <sup>-4</sup>			



## Annexe 2: Statistiques des études de microdialyse avec injection d'un antidépresseur

		Evolution temporelle ( <i>Mixed-effects model</i> )									
Expérimentation	Test statistique	NaCl vs Basal		Traitement vs Basal		NaCl vs Traitement		Effet du temps		Effet du génotype	
		Variable statistique	p-value	Variable statistique	p-value	Variable statistique	p-value	Variable statistique	p-value	Variable statistique	p-value
<b>Surexpression neuronale</b>											
<b>fluoxétine</b>											
5HT - niveaux extracellulaires								F <sub>(3, 22)</sub> = 1,91	0,16	F <sub>(1, 9)</sub> = 16,2	3.10 <sup>-3</sup>
5HT - AUC (GFP)	ANOVA	q <sub>(15)</sub> = 1,0	0,76	q <sub>(15)</sub> = 4,51	1,6.10 <sup>-2</sup>	q <sub>(15)</sub> = 5,51	3,8.10 <sup>-3</sup>				
5HT - AUC (hMAO-A)	ANOVA	q <sub>(11)</sub> = 1,0	0,76	q <sub>(11)</sub> = 1,2	0,68	q <sub>(11)</sub> = 2,15	0,32				
DA - niveaux extracellulaires								F <sub>(4, 39)</sub> = 2,83	0,04	F <sub>(1, 12)</sub> = 0,89	0,36
DA - AUC (GFP)	ANOVA	q <sub>(9)</sub> = 0,58	0,91	q <sub>(9)</sub> = 5,1	1,4.10 <sup>-2</sup>	q <sub>(9)</sub> = 5,69	7,6.10 <sup>-3</sup>				
DA - AUC (hMAO-A)	ANOVA	q <sub>(26)</sub> = 0,78	0,84	q <sub>(26)</sub> = 2,01	0,32	q <sub>(26)</sub> = 1,23	0,66				
Glu - niveaux extracellulaires								F <sub>(2, 22)</sub> = 4,06	2,8.10 <sup>-2</sup>	F <sub>(1, 10)</sub> = 0,17	0,69
Glu - AUC (GFP)	ANOVA	q <sub>(12)</sub> = 2,31	0,27	q <sub>(12)</sub> = 2,69	0,18	q <sub>(12)</sub> = 0,39	0,96				
Glu - AUC (hMAO-A)	Kruskal-Wallis	Z = 0,9	> 0,99	Z = 0,94	> 0,99	Z = 0,04	> 0,99				
GABA - niveaux extracellulaires								F <sub>(2, 12)</sub> = 1,61	0,24	F <sub>(1, 7)</sub> = 6,28	0,04
GABA - AUC (GFP)	ANOVA	q <sub>(12)</sub> = 0,75	0,86	q <sub>(12)</sub> = 2,99	0,13	q <sub>(12)</sub> = 2,25	0,29				
GABA - AUC (hMAO-A)	ANOVA	q <sub>(9)</sub> = 0,72	0,87	q <sub>(9)</sub> = 1,17	0,69	q <sub>(9)</sub> = 1,9	0,41				
ratio Glu/GABA								F <sub>(3, 16)</sub> = 1, 64	0,22	F <sub>(1, 7)</sub> = 6,41	0,04
<b>Kétamine</b>											
5HT - niveaux extracellulaires								F <sub>(4, 32)</sub> = 1,08	0,38	F <sub>(1, 10)</sub> = 1,0	0,34
5HT - AUC (GFP)	ANOVA	q <sub>(12)</sub> = 2,94	0,14	q <sub>(12)</sub> = 3,24	0,09	q <sub>(12)</sub> = 6,18	2,4.10 <sup>-3</sup>				
5HT - AUC (hMAO-A)	ANOVA	q <sub>(18)</sub> = 0,27	0,98	q <sub>(18)</sub> = 0,09	0,99	q <sub>(18)</sub> = 0,36	0,96				
DA - niveaux extracellulaires								F <sub>(1, 4)</sub> = 1,18	0,38	F <sub>(1, 3)</sub> = 0,08	0,8
DA - AUC (GFP)	ANOVA	q <sub>(12)</sub> = 0,38	0,96	q <sub>(12)</sub> = 0,55	0,92	q <sub>(12)</sub> = 0,17	0,99				
DA - AUC (hMAO-A)	ANOVA	q <sub>(16)</sub> = 0,26	0,98	q <sub>(16)</sub> = 0,57	0,91	q <sub>(16)</sub> = 0,26	0,98				
Glu- niveaux extracellulaires								F <sub>(3, 31)</sub> = 4,69	7.10 <sup>-3</sup>	F <sub>(1, 11)</sub> = 3,55	0,08
Glu - AUC (GFP)	ANOVA	q <sub>(12)</sub> = 2,25	0,29	q <sub>(12)</sub> = 2,65	0,19	q <sub>(12)</sub> = 0,4	0,96				
Glu - AUC (hMAO-A)	Kruskal-Wallis	Z = 1,14	0,76	Z = 1,62	0,31	Z = 0,48	> 0,99				
GABA - niveaux extracellulaires								F <sub>(3, 33)</sub> = 1,78	0,16	F <sub>(1, 11)</sub> = 0,53	0,48
GABA - AUC (GFP)	ANOVA	q <sub>(12)</sub> = 0,9	0,8	q <sub>(12)</sub> = 0,86	0,81	q <sub>(12)</sub> = 0,04	0,99				
GABA - AUC (hMAO-A)	ANOVA	q <sub>(18)</sub> = 2,5	0,2	q <sub>(18)</sub> = 1,21	0,67	q <sub>(18)</sub> = 1,3	0,64				

ratio Glu/GABA									$F_{(1,13)} = 1,36$	0,28	$F_{(1,11)} = 20,84$	$8.10^{-4}$
Surexpression astrocytaire												
fluoxétine												
5HT - niveaux extracellulaires									$F_{(5,92)} = 2,87$	$1,9.10^{-2}$	$F_{(1,19)} = 5,02$	$3,7.10^{-2}$
5HT - AUC (GFP)	Kruskal-Wallis	Z = 0,47	> 0,99	Z = 3,06	$6,6.10^{-3}$	Z = 3,53	$1,2.10^{-3}$					
5HT - AUC (hMAO-A)	Kruskal-Wallis	Z = 2,36	$5,5.10^{-2}$	Z = 0,61	> 0,99	Z = 1,75	0,24					
DA - niveaux extracellulaires									$F_{(3,50)} = 1,22$	0,31	$F_{(1,21)} = 0,73$	0,4
DA - AUC (GFP)	Kruskal-Wallis	Z = 0,31	> 0,99	Z = 0,31	> 0,99	Z = 0,62	> 0,99					
DA - AUC (hMAO-A)	Kruskal-Wallis	Z = 0,28	> 0,99	Z = 1,77	0,23	Z = 1,49	0,41					
Kétamine												
5HT - niveaux extracellulaires									$F_{(5,72)} = 0,32$	0,91	$F_{(1,14)} = 1,97$	0,18
5HT - AUC (GFP)	Kruskal-Wallis	Z = 0,76	> 0,99	Z = 0,02	> 0,99	Z = 0,79	> 0,99					
5HT - AUC (hMAO-A)	ANOVA	$q_{(14)} = 2,11$	0,33	$q_{(14)} = 1,49$	0,56	$q_{(14)} = 3,5$	$6,5.10^{-2}$					
DA - niveaux extracellulaires									$F_{(3,40)} = 2,2$	$9,8.10^{-2}$	$F_{(1,15)} = 3,6.10^{-1}$	0,85
DA - AUC (GFP)	ANOVA	$q_{(24)} = 1,53$	0,53	$q_{(24)} = 4,2$	$1,8.10^{-2}$	$q_{(24)} = 5,73$	$1,3.10^{-3}$					
DA - AUC (hMAO-A)	ANOVA	$q_{(24)} = 1,21$	0,67	$q_{(24)} = 2,23$	0,27	$q_{(24)} = 3,44$	$5,8.10^{-2}$					
Glu - niveaux extracellulaires									$F_{(1,12)} = 25,8$	$3.10^{-4}$	$F_{(1,13)} = 13,65$	$2,7.10^{-3}$
Glu - AUC (GFP)	ANOVA	$q_{(21)} = 2,53$	0,2	$q_{(21)} = 9,32$	$<10^{-4}$	$q_{(21)} = 6,79$	$3.10^{-4}$					
Glu - AUC (hMAO-A)	ANOVA	$q_{(21)} = 0,14$	0,99	$q_{(21)} = 4,22$	$1,9.10^{-2}$	$q_{(21)} = 4,01$	$2,6.10^{-2}$					
GABA - niveaux extracellulaires									$F_{(4,46)} = 1,12$	0,36	$F_{(1,13)} = 1,03$	
GABA - AUC (GFP)	ANOVA	$q_{(21)} = 2,15$	0,3	$q_{(21)} = 1,68$	0,47	$q_{(21)} = 0,47$	0,94					
GABA - AUC (hMAO-A)	ANOVA	$q_{(21)} = 1,18$	0,69	$q_{(21)} = 3,92$	$2,9.10^{-2}$	$q_{(21)} = 4,71$	$8,6.10^{-3}$					
ratio Glu/GABA									$F_{(3,30)} = 1,72$	0,19	$F_{(1,13)} = 1,29$	0,28



---

# Références

---



American Psychiatric Association (2013). Diagnostic and Statistical Manual of Mental Disorders - Fifth edition. Arlington County, American Psychiatric Publishing,.

Bach, A. W., N. C. Lan, D. L. Johnson, C. W. Abell, M. E. Bembenek, S. W. Kwan, P. H. Seeburg and J. C. Shih (1988). "cDNA cloning of human liver monoamine oxidase A and B: molecular basis of differences in enzymatic properties." Proc Natl Acad Sci U S A **85**(13): 4934-4938.

Banasr, M., G. M. Chowdhury, R. Terwilliger, S. S. Newton, R. S. Duman, K. L. Behar and G. Sanacora (2010). "Glial pathology in an animal model of depression: reversal of stress-induced cellular, metabolic and behavioral deficits by the glutamate-modulating drug riluzole." Mol Psychiatry **15**(5): 501-511.

Banasr, M. and R. S. Duman (2008). "Glial loss in the prefrontal cortex is sufficient to induce depressive-like behaviors." Biol Psychiatry **64**(10): 863-870.

Boku, S., S. Nakagawa, H. Toda and A. Hishimoto (2018). "Neural basis of major depressive disorder: Beyond monoamine hypothesis." Psychiatry Clin Neurosci **72**(1): 3-12.

Bortolato, M., K. Chen, S. C. Godar, G. Chen, W. Wu, I. Rebrin, M. R. Farrell, A. L. Scott, C. L. Wellman and J. C. Shih (2011). "Social deficits and perseverative behaviors, but not overt aggression, in MAO-A hypomorphic mice." Neuropsychopharmacology **36**(13): 2674-2688.

Boyarskikh, U. A., N. P. Bondar, M. L. Filipenko and N. N. Kudryavtseva (2013). "Downregulation of serotonergic gene expression in the Raphe nuclei of the midbrain under chronic social defeat stress in male mice." Mol Neurobiol **48**(1): 13-21.

Brunner, H. G. (1996). "MAOA deficiency and abnormal behaviour: perspectives on an association." Ciba Found Symp **194**: 155-164; discussion 164-157.

Brunner, H. G., M. Nelen, X. O. Breakefield, H. H. Ropers and B. A. van Oost (1993). "Abnormal behavior associated with a point mutation in the structural gene for monoamine oxidase A." Science **262**(5133): 578-580.

Bymaster, F. P., W. Zhang, P. A. Carter, J. Shaw, E. Chernet, L. Phebus, D. T. Wong and K. W. Perry (2002). "Fluoxetine, but not other selective serotonin uptake inhibitors, increases norepinephrine and dopamine extracellular levels in prefrontal cortex." Psychopharmacology (Berl) **160**(4): 353-361.

Caligioni, C. S. (2009). "Assessing reproductive status/stages in mice." Curr Protoc Neurosci **Appendix 4**: Appendix 4I.

Campbell, I. G., M. J. Guinan and J. M. Horowitz (2002). "Sleep deprivation impairs long-term potentiation in rat hippocampal slices." J Neurophysiol **88**(2): 1073-1076.

Carrel, L. and H. F. Willard (2005). "X-inactivation profile reveals extensive variability in X-linked gene expression in females." Nature **434**(7031): 400-404.

Cases, O., I. Seif, J. Grimsby, P. Gaspar, K. Chen, S. Pournin, U. Muller, M. Aguet, C. Babinet, J. C. Shih and et al. (1995). "Aggressive behavior and altered amounts of brain serotonin and norepinephrine in mice lacking MAOA." Science **268**(5218): 1763-1766.

Cervera-Juanes, R., L. J. Wilhem, B. Park, R. Lee, J. Locke, C. Helms, S. Gonzales, G. Wand, S. R. Jones, K. A. Grant and B. Ferguson (2016). "MAOA expression predicts vulnerability for alcohol use." Mol Psychiatry **21**(4): 472-479.

Chappell, K., R. Colle, J. Bouligand, S. Trabado, B. Feve, L. Becquemont, E. Corruble and C. Verstuyft (2022). "The MAOA rs979605 Genetic Polymorphism Is Differentially Associated

with Clinical Improvement Following Antidepressant Treatment between Male and Female Depressed Patients." *Int J Mol Sci* **24**(1).

Checknita, D., G. Maussion, B. Labonte, S. Comai, R. E. Tremblay, F. Vitaro, N. Turecki, A. Bertazzo, G. Gobbi, G. Cote and G. Turecki (2015). "Monoamine oxidase A gene promoter methylation and transcriptional downregulation in an offender population with antisocial personality disorder." *Br J Psychiatry* **206**(3): 216-222.

Chefer, V. I., A. C. Thompson, A. Zapata and T. S. Shippenberg (2009). "Overview of brain microdialysis." *Curr Protoc Neurosci* **Chapter 7**: Unit7 1.

Chen, K., O. Cases, I. Rebrin, W. Wu, T. K. Gallaher, I. Seif and J. C. Shih (2007). "Forebrain-specific expression of monoamine oxidase A reduces neurotransmitter levels, restores the brain structure, and rescues aggressive behavior in monoamine oxidase A-deficient mice." *J Biol Chem* **282**(1): 115-123.

Chen, K., D. P. Holschneider, W. Wu, I. Rebrin and J. C. Shih (2004). "A spontaneous point mutation produces monoamine oxidase A/B knock-out mice with greatly elevated monoamines and anxiety-like behavior." *J Biol Chem* **279**(38): 39645-39652.

Chen, L., L. Guo, Z. Sun, G. Yang, J. Guo, K. Chen, R. Xiao, X. Yang and L. Sheng (2020). "Monoamine Oxidase A is a Major Mediator of Mitochondrial Homeostasis and Glycolysis in Gastric Cancer Progression." *Cancer Manag Res* **12**: 8023-8035.

Chenu, F., D. J. David, I. Leroux-Nicollet, E. Le Maitre, A. M. Gardier and M. Bourin (2008). "Serotonin1B heteroreceptor activation induces an antidepressant-like effect in mice with an alteration of the serotonergic system." *J Psychiatry Neurosci* **33**(6): 541-550.

Chhillar, R. and D. Dhingra (2013). "Antidepressant-like activity of gallic acid in mice subjected to unpredictable chronic mild stress." *Fundam Clin Pharmacol* **27**(4): 409-418.

Chiuccariello, L., S. Houle, L. Miler, R. G. Cooke, P. M. Rusjan, G. Rajkowska, R. D. Levitan, S. J. Kish, N. J. Kolla, X. Ou, A. A. Wilson and J. H. Meyer (2014). "Elevated monoamine oxidase a binding during major depressive episodes is associated with greater severity and reversed neurovegetative symptoms." *Neuropsychopharmacology* **39**(4): 973-980.

Cipriani, A., T. A. Furukawa, G. Salanti, A. Chaimani, L. Z. Atkinson, Y. Ogawa, S. Leucht, H. G. Ruhe, E. H. Turner, J. P. T. Higgins, M. Egger, N. Takeshima, Y. Hayasaka, H. Imai, K. Shinohara, A. Tajika, J. P. A. Ioannidis and J. R. Geddes (2018). "Comparative efficacy and acceptability of 21 antidepressant drugs for the acute treatment of adults with major depressive disorder: a systematic review and network meta-analysis." *Lancet* **391**(10128): 1357-1366.

Clow, A., S. Patel, M. Najafi, P. D. Evans and F. Hucklebridge (1997). "The cortisol response to psychological challenge is preceded by a transient rise in endogenous inhibitor of monoamine oxidase." *Life Sci* **61**(5): 567-575.

Cohen, G. and N. Kesler (1999). "Monoamine oxidase and mitochondrial respiration." *J Neurochem* **73**(6): 2310-2315.

Daravinejad, H. "Quantification of Western Blot with ImageJ." from <https://www.yorku.ca/yisheng/Internal/Protocols/ImageJ.pdf>.

David, D. J., B. A. Samuels, Q. Rainer, J. W. Wang, D. Marsteller, I. Mendez, M. Drew, D. A. Craig, B. P. Guiard, J. P. Guilloux, R. P. Artymyshyn, A. M. Gardier, C. Gerald, I. A. Antonijeivic, E. D. Leonardo and R. Hen (2009). "Neurogenesis-dependent and -independent effects of fluoxetine in an animal model of anxiety/depression." *Neuron* **62**(4): 479-493.

De Colibus, L., M. Li, C. Binda, A. Lustig, D. E. Edmondson and A. Mattevi (2005). "Three-dimensional structure of human monoamine oxidase A (MAO A): relation to the structures of rat MAO A and human MAO B." Proc Natl Acad Sci U S A **102**(36): 12684-12689.

Deckert, J., M. Catalano, Y. V. Syagailo, M. Bosi, O. Okladnova, D. Di Bella, M. M. Nothen, P. Maffei, P. Franke, J. Fritze, W. Maier, P. Propping, H. Beckmann, L. Bellodi and K. P. Lesch (1999). "Excess of high activity monoamine oxidase A gene promoter alleles in female patients with panic disorder." Hum Mol Genet **8**(4): 621-624.

Delgado, J. M., F. V. DeFeudis, R. H. Roth, D. K. Ryugo and B. M. Mitruka (1972). "Dialytrode for long term intracerebral perfusion in awake monkeys." Arch Int Pharmacodyn Ther **198**(1): 9-21.

Delgado, P. L. (2000). "Depression: the case for a monoamine deficiency." J Clin Psychiatry **61 Suppl 6**: 7-11.

Dhingra, D. and A. Bhankher (2014). "Behavioral and biochemical evidences for antidepressant-like activity of palmatine in mice subjected to chronic unpredictable mild stress." Pharmacol Rep **66**(1): 1-9.

Domschke, K., C. Hohoff, L. S. Mortensen, T. Roehrs, J. Deckert, V. Arolt and B. T. Baune (2008). "Monoamine oxidase A variant influences antidepressant treatment response in female patients with Major Depression." Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry **32**(1): 224-228.

Domschke, K., N. Tidow, K. Schwarte, C. Ziegler, K. P. Lesch, J. Deckert, V. Arolt, P. Zwanzger and B. T. Baune (2015). "Pharmacoepigenetics of depression: no major influence of MAO-A DNA methylation on treatment response." J Neural Transm (Vienna) **122**(1): 99-108.

Doron, R., Z. Versano, O. Burstein, M. Franko, A. Shamir, R. Toledano, A. Handelsman and M. Rehavi (2019). "Cerebral MAO Activity Is Not Altered by a Novel Herbal Antidepressant Treatment." J Mol Neurosci **69**(3): 371-379.

Du, L., G. Faludi, M. Palkovits, P. Sotonyi, D. Bakish and P. D. Hrdina (2002). "High activity-related allele of MAO-A gene associated with depressed suicide in males." Neuroreport **13**(9): 1195-1198.

Duncan, J., S. Johnson and X. M. Ou (2012). "Monoamine oxidases in major depressive disorder and alcoholism." Drug Discov Ther **6**(3): 112-122.

Edmondson, D. E., L. DeColibus, C. Binda, M. Li and A. Mattevi (2007). "New insights into the structures and functions of human monoamine oxidases A and B." J Neural Transm (Vienna) **114**(6): 703-705.

Engel, D. F., J. de Oliveira, J. B. Lopes, D. B. Santos, E. L. G. Moreira, M. Farina, A. L. S. Rodrigues, P. de Souza Brocardo and A. F. de Bem (2016). "Is there an association between hypercholesterolemia and depression? Behavioral evidence from the LDLr(-/-) mouse experimental model." Behav Brain Res **311**: 31-38.

Fagerberg, L., B. M. Hallstrom, P. Oksvold, C. Kampf, D. Djureinovic, J. Odeberg, M. Habuka, S. Tahmasebpour, A. Danielsson, K. Edlund, A. Asplund, E. Sjostedt, E. Lundberg, C. A. Szigartyo, M. Skogs, J. O. Takanen, H. Berling, H. Tegel, J. Mulder, P. Nilsson, J. M. Schwenk, C. Lindskog, F. Danielsson, A. Mardinoglu, A. Sivertsson, K. von Feilitzen, M. Forsberg, M. Zwahlen, I. Olsson, S. Navani, M. Huss, J. Nielsen, F. Ponten and M. Uhlen (2014). "Analysis of the human tissue-specific expression by genome-wide integration of transcriptomics and antibody-based proteomics." Mol Cell Proteomics **13**(2): 397-406.

Filipenko, M. L., A. G. Beilina, O. V. Alekseyenko, V. V. Dolgov and N. N. Kudryavtseva (2002). "Increase in expression of brain serotonin transporter and monoamine oxidase genes

induced by repeated experience of social defeats in male mice." Biochemistry (Mosc) **67**(4): 451-455.

Filipenko, M. L., A. G. Beilina, O. V. Alekseyenko, V. V. Dolgov and N. N. Kudryavtseva (2002). "Repeated experience of social defeats increases serotonin transporter and monoamine oxidase A mRNA levels in raphe nuclei of male mice." Neurosci Lett **321**(1-2): 25-28.

Finkel, T. (1999). "Signal transduction by reactive oxygen species in non-phagocytic cells." J Leukoc Biol **65**(3): 337-340.

Finsterwald, C. and C. M. Alberini (2014). "Stress and glucocorticoid receptor-dependent mechanisms in long-term memory: from adaptive responses to psychopathologies." Neurobiol Learn Mem **112**: 17-29.

Fitzgerald, J. C., C. Ufer, L. A. De Girolamo, H. Kuhn and E. E. Billett (2007). "Monoamine oxidase-A modulates apoptotic cell death induced by staurosporine in human neuroblastoma cells." J Neurochem **103**(6): 2189-2199.

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

Fried, E. I. and R. M. Nesse (2015). "Depression is not a consistent syndrome: An investigation of unique symptom patterns in the STAR\*D study." J Affect Disord **172**: 96-102.

Garrick, N. A. and D. L. Murphy (1980). "Species differences in the deamination of dopamine and other substrates for monoamine oxidase in brain." Psychopharmacology (Berl) **72**(1): 27-33.

Gawryluk, J. W., J. F. Wang, A. C. Andreazza, L. Shao and L. T. Young (2011). "Decreased levels of glutathione, the major brain antioxidant, in post-mortem prefrontal cortex from patients with psychiatric disorders." Int J Neuropsychopharmacol **14**(1): 123-130.

Geeaerts, T., J. Duranteau and B. Vigué (2008). "Microdialyse cérébrale : méthodologie et applications cliniques." Réanimation **Volume 17, Issue 7**: 702-707.

Geha, R. M., I. Rebrin, K. Chen and J. C. Shih (2001). "Substrate and inhibitor specificities for human monoamine oxidase A and B are influenced by a single amino acid." J Biol Chem **276**(13): 9877-9882.

Godar, S. C., M. Bortolato, R. Frau, M. Dousti, K. Chen and J. C. Shih (2011). "Maladaptive defensive behaviours in monoamine oxidase A-deficient mice." Int J Neuropsychopharmacol **14**(9): 1195-1207.

Goldman, J. M., A. S. Murr and R. L. Cooper (2007). "The rodent estrous cycle: characterization of vaginal cytology and its utility in toxicological studies." Birth Defects Res B Dev Reprod Toxicol **80**(2): 84-97.

Goncalves Peter, A., M. Lopez Molina, T. de Azevedo Cardoso, T. Campos Mondin, R. Azevedo da Silva, K. Jansen, M. M. Dornellas de Barros, E. Nobre Dos Santos, K. Rodrigues de Aguiar and L. Dias de Mattos Souza (2020). "Incidence and Risk Factors for Suicide Attempts in Patients Diagnosed with Major Depressive Disorder." Psychol Res Behav Manag **13**: 1147-1157.

Graves, S. M., Z. Xie, K. A. Stout, E. Zampese, L. F. Burbulla, J. C. Shih, J. Kondapalli, T. Patriarchi, L. Tian, L. Brichta, P. Greengard, D. Krainc, P. T. Schumacker and D. J. Surmeier (2020). "Dopamine metabolism by a monoamine oxidase mitochondrial shuttle activates the electron transport chain." Nat Neurosci **23**(1): 15-20.

Grippo, A. J., N. R. Sullivan, K. J. Damjanoska, J. W. Crane, G. A. Carrasco, J. Shi, Z. Chen, F. Garcia, N. A. Muma and L. D. Van de Kar (2005). "Chronic mild stress induces behavioral and physiological changes, and may alter serotonin 1A receptor function, in male and cycling female rats." Psychopharmacology (Berl) **179**(4): 769-780.

Grunewald, M., S. Johnson, D. Lu, Z. Wang, G. Lomberk, P. R. Albert, C. A. Stockmeier, J. H. Meyer, R. Urrutia, K. A. Miczek, M. C. Austin, J. Wang, I. A. Paul, W. L. Woolverton, S. Seo, D. B. Sittman and X. M. Ou (2012). "Mechanistic role for a novel glucocorticoid-KLF11 (TIEG2) protein pathway in stress-induced monoamine oxidase A expression." J Biol Chem **287**(29): 24195-24206.

Guilloux, J. P., M. Seney, N. Edgar and E. Sibille (2011). "Integrated behavioral z-scoring increases the sensitivity and reliability of behavioral phenotyping in mice: relevance to emotionality and sex." J Neurosci Methods **197**(1): 21-31.

Haduch, A., E. Bromek, W. Kuban and W. A. Daniel (2023). "The Engagement of Cytochrome P450 Enzymes in Tryptophan Metabolism." Metabolites **13**(5).

Haduch, A., M. Rysz, M. Papp and W. A. Daniel (2018). "The activity of brain and liver cytochrome P450 2D (CYP2D) is differently affected by antidepressants in the chronic mild stress (CMS) model of depression in the rat." Biochem Pharmacol **156**: 398-405.

Hampp, G., J. A. Ripperger, T. Houben, I. Schmutz, C. Blex, S. Perreau-Lenz, I. Brunk, R. Spanagel, G. Ahnert-Hilger, J. H. Meijer and U. Albrecht (2008). "Regulation of monoamine oxidase A by circadian-clock components implies clock influence on mood." Curr Biol **18**(9): 678-683.

Harris, S., S. Johnson, J. W. Duncan, C. Udemgba, J. H. Meyer, P. R. Albert, G. Lomberk, R. Urrutia, X. M. Ou, C. A. Stockmeier and J. M. Wang (2015). "Evidence revealing deregulation of the KLF11-MAO A pathway in association with chronic stress and depressive disorders." Neuropsychopharmacology **40**(6): 1373-1382.

Hiro, I., Y. Tsugeno, I. Hirashiki, F. Ogata and A. Ito (1996). "Characterization of rat monoamine oxidase A with noncovalently-bound FAD expressed in yeast cells." J Biochem **120**(4): 759-765.

Hirschfeld, R. M. (2000). "History and evolution of the monoamine hypothesis of depression." J Clin Psychiatry **61 Suppl 6**: 4-6.

Hollon, S. D., R. C. Shelton, S. Wisniewski, D. Warden, M. M. Biggs, E. S. Friedman, M. Husain, D. J. Kupfer, A. A. Nierenberg, T. J. Petersen, K. Shores-Wilson and A. J. Rush (2006). "Presenting characteristics of depressed outpatients as a function of recurrence: preliminary findings from the STAR\*D clinical trial." J Psychiatr Res **40**(1): 59-69.

Hotamisligil, G. S. and X. O. Breakefield (1991). "Human monoamine oxidase A gene determines levels of enzyme activity." Am J Hum Genet **49**(2): 383-392.

Jansson, M., S. McCarthy, P. F. Sullivan, P. Dickman, B. Andersson, L. Oreland, M. Schalling and N. L. Pedersen (2005). "MAOA haplotypes associated with thrombocyte-MAO activity." BMC Genet **6**: 46.

Jia, C., C. Cheng, T. Li, X. Chen, Y. Yang, X. Liu, S. Li and W. Le (2021). "alpha-Synuclein Up-regulates Monoamine Oxidase A Expression and Activity via Trans-Acting Transcription Factor 1." Front Aging Neurosci **13**: 653379.

John, C. S., K. L. Smith, A. Van't Veer, H. S. Gompf, W. A. Carlezon, Jr., B. M. Cohen, D. Ongur and A. J. Bechtholt-Gompf (2012). "Blockade of astrocytic glutamate uptake in the prefrontal cortex induces anhedonia." Neuropsychopharmacology **37**(11): 2467-2475.

Johnson, S., C. A. Stockmeier, J. H. Meyer, M. C. Austin, P. R. Albert, J. Wang, W. L. May, G. Rajkowska, J. C. Overholser, G. Jurjus, L. Dieter, C. Johnson, D. B. Sittman and X. M. Ou (2011). "The reduction of R1, a novel repressor protein for monoamine oxidase A, in major depressive disorder." Neuropsychopharmacology **36**(10): 2139-2148.

Jones, D. N. and M. A. Raghanti (2021). "The role of monoamine oxidase enzymes in the pathophysiology of neurological disorders." J Chem Neuroanat **114**: 101957.

Kearney, E. B., J. I. Salach, W. H. Walker, R. L. Seng, W. Kenney, E. Zeszotek and T. P. Singer (1971). "The covalently-bound flavin of hepatic monoamine oxidase. 1. Isolation and sequence of a flavin peptide and evidence for binding at the 8alpha position." Eur J Biochem **24**(2): 321-327.

Kersting, A., K. Kroker, J. Horstmann, B. T. Baune, C. Hohoff, L. S. Mortensen, L. C. Neumann, V. Arolt and K. Domschke (2007). "Association of MAO-A variant with complicated grief in major depression." Neuropsychobiology **56**(4): 191-196.

Kessler, R. C. (2003). "Epidemiology of women and depression." J Affect Disord **74**(1): 5-13.

Kessler, R. C., P. Berglund, O. Demler, R. Jin, D. Koretz, K. R. Merikangas, A. J. Rush, E. E. Walters, P. S. Wang and R. National Comorbidity Survey (2003). "The epidemiology of major depressive disorder: results from the National Comorbidity Survey Replication (NCS-R)." JAMA **289**(23): 3095-3105.

Koch, S., K. W. Perry, D. L. Nelson, R. G. Conway, P. G. Threlkeld and F. P. Bymaster (2002). "R-fluoxetine increases extracellular DA, NE, as well as 5-HT in rat prefrontal cortex and hypothalamus: an in vivo microdialysis and receptor binding study." Neuropsychopharmacology **27**(6): 949-959.

Lebeau, R. H., I. Mendez-David, L. Kucynski-Noyau, C. Henry, D. Attali, M. Plaze, R. Colle, E. Corruble, A. M. Gardier, R. Gaillard, J. P. Guilloux and D. J. David (2022). "Peripheral proteomic changes after electroconvulsive seizures in a rodent model of non-response to chronic fluoxetine." Front Pharmacol **13**: 993449.

Lee, H. Y., G. H. Lee, A. Marahatta, S. M. Lin, M. R. Lee, K. Y. Jang, K. M. Kim, H. J. Lee, J. W. Lee, T. R. Bagalkot, Y. C. Chung, Y. C. Lee, H. R. Kim and H. J. Chae (2013). "The protective role of Bax inhibitor-1 against chronic mild stress through the inhibition of monoamine oxidase A." Sci Rep **3**: 3398.

Lenders, J. W., H. G. Brunner, D. L. Murphy and G. Eisenhofer (1998). "Genetic deficiencies of monoamine oxidase enzymes: a key to understanding the function of the enzymes in humans." Adv Pharmacol **42**: 297-301.

Leuchter, A. F., J. T. McCracken, A. M. Hunter, I. A. Cook and J. E. Alpert (2009). "Monoamine oxidase a and catechol-o-methyltransferase functional polymorphisms and the placebo response in major depressive disorder." J Clin Psychopharmacol **29**(4): 372-377.

Libert, S., K. Pointer, E. L. Bell, A. Das, D. E. Cohen, J. M. Asara, K. Kapur, S. Bergmann, M. Preisig, T. Otowa, K. S. Kendler, X. Chen, J. M. Hetta, E. J. van den Oord, J. P. Rubio and L. Guarente (2011). "SIRT1 activates MAO-A in the brain to mediate anxiety and exploratory drive." Cell **147**(7): 1459-1472.

Lin, Y. H., A. H. Liu, Y. Xu, L. Tie, H. M. Yu and X. J. Li (2005). "Effect of chronic unpredictable mild stress on brain-pancreas relative protein in rat brain and pancreas." Behav Brain Res **165**(1): 63-71.

Lindfors, N., S. Barati and W. T. O'Connor (1997). "Differential effects of single and repeated ketamine administration on dopamine, serotonin and GABA transmission in rat medial prefrontal cortex." Brain Res **759**(2): 205-212.

Lopez-Gil, X., L. Jimenez-Sanchez, L. Campa, E. Castro, C. Frago and A. Adell (2019). "Role of Serotonin and Noradrenaline in the Rapid Antidepressant Action of Ketamine." ACS Chem Neurosci **10**(7): 3318-3326.

Lopez-Munoz, F. and C. Alamo (2009). "Monoaminergic neurotransmission: the history of the discovery of antidepressants from 1950s until today." Curr Pharm Des **15**(14): 1563-1586.

Manca, M., V. Pessoa, A. I. Lopez, P. T. Harrison, F. Miyajima, H. Sharp, A. Pickles, J. Hill, C. Murgatroyd, V. J. Bubb and J. P. Quinn (2018). "The Regulation of Monoamine Oxidase A Gene Expression by Distinct Variable Number Tandem Repeats." J Mol Neurosci **64**(3): 459-470.

Manca, M., V. Pessoa, P. Myers, A. Pickles, J. Hill, H. Sharp, C. Murgatroyd, V. J. Bubb and J. P. Quinn (2019). "Distinct chromatin structures at the monoamine oxidase-A promoter correlate with allele-specific expression in SH-SY5Y cells." Genes Brain Behav **18**(6): e12483.

Martins, J. and S. Brijesh (2020). "Anti-depressant activity of Erythrina variegata bark extract and regulation of monoamine oxidase activities in mice." J Ethnopharmacol **248**: 112280.

Matthews, B. A., J. Tong, S. Attwells, X. Xu, A. Le, S. J. Kish and J. H. Meyer (2018). "Elevated monoamine oxidase A activity and protein levels in rodent brain during acute withdrawal after chronic intermittent ethanol vapor exposure." Drug Alcohol Depend **185**: 398-405.

Maura, G., P. Versace and P. Paudice (1978). "Chronic environmental stress on the development of MAO and COMT in discrete brain region." Pharmacol Res Commun **10**(3): 235-241.

Melas, P. A. and Y. Forsell (2015). "Hypomethylation of MAOA's first exon region in depression: a replication study." Psychiatry Res **226**(1): 389-391.

Melas, P. A., Y. Wei, C. C. Wong, L. K. Sjolholm, E. Aberg, J. Mill, M. Schalling, Y. Forsell and C. Lavebratt (2013). "Genetic and epigenetic associations of MAOA and NR3C1 with depression and childhood adversities." Int J Neuropsychopharmacol **16**(7): 1513-1528.

Meyer, J. H., N. Ginovart, A. Boovariwala, S. Sagrati, D. Hussey, A. Garcia, T. Young, N. Praschak-Rieder, A. A. Wilson and S. Houle (2006). "Elevated monoamine oxidase a levels in the brain: an explanation for the monoamine imbalance of major depression." Arch Gen Psychiatry **63**(11): 1209-1216.

Meyer, J. H., A. A. Wilson, S. Sagrati, L. Miler, P. Rusjan, P. M. Bloomfield, M. Clark, J. Sacher, A. N. Voineskos and S. Houle (2009). "Brain monoamine oxidase A binding in major depressive disorder: relationship to selective serotonin reuptake inhibitor treatment, recovery, and recurrence." Arch Gen Psychiatry **66**(12): 1304-1312.

Mialet-Perez, J., Y. Santin and A. Parini (2018). "Monoamine oxidase-A, serotonin and norepinephrine: synergistic players in cardiac physiology and pathology." J Neural Transm (Vienna) **125**(11): 1627-1634.

Molendijk, M. L. and E. R. de Kloet (2022). "Forced swim stressor: Trends in usage and mechanistic consideration." Eur J Neurosci **55**(9-10): 2813-2831.

Moncrieff, J., R. E. Cooper, T. Stockmann, S. Amendola, M. P. Hengartner and M. A. Horowitz (2023). "The serotonin theory of depression: a systematic umbrella review of the evidence." Mol Psychiatry **28**(8): 3243-3256.

Nandigama, R. K. and D. E. Edmondson (2000). "Influence of FAD structure on its binding and activity with the C406A mutant of recombinant human liver monoamine oxidase A." J Biol Chem **275**(27): 20527-20532.

Nautiyal, K. M., L. Tritschler, S. E. Ahmari, D. J. David, A. M. Gardier and R. Hen (2016). "A Lack of Serotonin 1B Autoreceptors Results in Decreased Anxiety and Depression-Related Behaviors." Neuropsychopharmacology **41**(12): 2941-2950.

Neumeister, A., A. C. Nugent, T. Waldeck, M. Geraci, M. Schwarz, O. Bonne, E. E. Bain, D. A. Luckenbaugh, P. Herscovitch, D. S. Charney and W. C. Drevets (2004). "Neural and behavioral responses to tryptophan depletion in unmedicated patients with remitted major depressive disorder and controls." Arch Gen Psychiatry **61**(8): 765-773.

Nguyen, T. M. L., C. Defaix, I. Mendez-David, L. Tritschler, I. Etting, J. C. Alvarez, W. Choucha, R. Colle, E. Corruble, D. J. David and A. M. Gardier (2023). "Intranasal (R, S)-ketamine delivery induces sustained antidepressant effects associated with changes in cortical balance of excitatory/inhibitory synaptic activity." Neuropharmacology **225**: 109357.

Nishitani, N., K. Nagayasu, N. Asaoka, M. Yamashiro, H. Shirakawa, T. Nakagawa and S. Kaneko (2014). "Raphe AMPA receptors and nicotinic acetylcholine receptors mediate ketamine-induced serotonin release in the rat prefrontal cortex." Int J Neuropsychopharmacol **17**(8): 1321-1326.

Ou, X. M., K. Chen and J. C. Shih (2006). "Glucocorticoid and androgen activation of monoamine oxidase A is regulated differently by R1 and Sp1." J Biol Chem **281**(30): 21512-21525.

Paclt, I., J. Koudelova, D. Pacltova and M. Kopeckova (2009). "Dopamine beta hydroxylase (DBH) plasma activity in childhood mental disorders." Neuro Endocrinol Lett **30**(5): 604-609.

Parsons, L. H. and J. B. Justice, Jr. (1994). "Quantitative approaches to in vivo brain microdialysis." Crit Rev Neurobiol **8**(3): 189-220.

Peng, Z. W., F. Xue, C. H. Zhou, R. G. Zhang, Y. Wang, L. Liu, H. F. Sang, H. N. Wang and Q. R. Tan (2018). "Repetitive transcranial magnetic stimulation inhibits Sirt1/MAO-A signaling in the prefrontal cortex in a rat model of depression and cortex-derived astrocytes." Mol Cell Biochem **442**(1-2): 59-72.

Pham, T. H., I. Mendez-David, C. Defaix, B. P. Guiard, L. Tritschler, D. J. David and A. M. Gardier (2017). "Ketamine treatment involves medial prefrontal cortex serotonin to induce a rapid antidepressant-like activity in BALB/cJ mice." Neuropharmacology **112**(Pt A): 198-209.

Philibert, R. A., P. Wernett, J. Plume, H. Packer, G. H. Brody and S. R. Beach (2011). "Gene environment interactions with a novel variable Monoamine Oxidase A transcriptional enhancer are associated with antisocial personality disorder." Biol Psychol **87**(3): 366-371.

Popova, N. K., Y. A. Skriskaya, T. G. Amstislavskaya, G. B. Vishnivetskaya, I. Seif and E. de Meier (2001). "Behavioral characteristics of mice with genetic knockout of monoamine oxidase type A." Neurosci Behav Physiol **31**(6): 597-602.

Porsolt, R. D., A. Bertin and M. Jalfre (1977). "Behavioral despair in mice: a primary screening test for antidepressants." Arch Int Pharmacodyn Ther **229**(2): 327-336.

Puzynski, S., A. Rode and M. Zaluska (1983). "Studies on biogenic amine metabolizing enzymes (DBH, COMT, MAO) and pathogenesis of affective illness. I. Plasma dopamine-beta-hydroxylase activity in endogenous depression." Acta Psychiatr Scand **67**(2): 89-95.

Qiu, H. M., J. X. Yang, X. H. Jiang, H. Z. Fei, D. Liu, X. Y. Hu and Q. X. Zhou (2014). "Upregulating serotonin transporter expression and downregulating monoamine oxidase-A and indoleamine 2, 3-dioxygenase expression involved in the antidepressant effect of sodium valproate in a rat model." Neuroreport **25**(17): 1338-1343.

Raitsin, S., J. Tong, S. Kish, X. Xu, L. Magomedova, C. Cummins, A. C. Andreazza, G. Scola, G. Baker and J. H. Meyer (2017). "Subchronic glucocorticoids, glutathione depletion and a postpartum model elevate monoamine oxidase a activity in the prefrontal cortex of rats." Brain Res **1666**: 1-10.

Rechtschaffen, A., M. A. Gilliland, B. M. Bergmann and J. B. Winter (1983). "Physiological correlates of prolonged sleep deprivation in rats." Science **221**(4606): 182-184.

Ringman, J. M., C. Diaz-Olavarrieta, Y. Rodriguez, M. Chavez, F. Paz, J. Murrell, M. A. Macias, M. Hill and C. Kawas (2004). "Female preclinical presenilin-1 mutation carriers unaware of their genetic status have higher levels of depression than their non-mutation carrying kin." J Neurol Neurosurg Psychiatry **75**(3): 500-502.

Ruhe, H. G., N. S. Mason and A. H. Schene (2007). "Mood is indirectly related to serotonin, norepinephrine and dopamine levels in humans: a meta-analysis of monoamine depletion studies." Mol Psychiatry **12**(4): 331-359.

Rush, A. J., M. H. Trivedi, S. R. Wisniewski, A. A. Nierenberg, J. W. Stewart, D. Warden, G. Niederehe, M. E. Thase, P. W. Lavori, B. D. Lebowitz, P. J. McGrath, J. F. Rosenbaum, H. A. Sackeim, D. J. Kupfer, J. Luther and M. Fava (2006). "Acute and longer-term outcomes in depressed outpatients requiring one or several treatment steps: a STAR\*D report." Am J Psychiatry **163**(11): 1905-1917.

Sabol, S. Z., S. Hu and D. Hamer (1998). "A functional polymorphism in the monoamine oxidase A gene promoter." Hum Genet **103**(3): 273-279.

Sacher, J., A. A. Wilson, S. Houle, P. Rusjan, S. Hassan, P. M. Bloomfield, D. E. Stewart and J. H. Meyer (2010). "Elevated brain monoamine oxidase A binding in the early postpartum period." Arch Gen Psychiatry **67**(5): 468-474.

Schiele, M. A., C. Ziegler, L. Kollert, A. Katzorke, C. Schartner, Y. Busch, D. Gromer, A. Reif, P. Pauli, J. Deckert, M. J. Herrmann and K. Domschke (2018). "Plasticity of Functional MAOA Gene Methylation in Acrophobia." Int J Neuropsychopharmacol **21**(9): 822-827.

Schulze, T. G., D. J. Muller, H. Krauss, H. Scherk, S. Ohlraun, Y. V. Syagailo, C. Windemuth, H. Neidt, M. Grassle, A. Papassotiropoulos, R. Heun, M. M. Nothen, W. Maier, K. P. Lesch and M. Rietschel (2000). "Association between a functional polymorphism in the monoamine oxidase A gene promoter and major depressive disorder." Am J Med Genet **96**(6): 801-803.

Shih, J. C., J. Grimsby, K. Chen and Q. S. Zhu (1993). "Structure and promoter organization of the human monoamine oxidase A and B genes." J Psychiatry Neurosci **18**(1): 25-32.

Shumay, E. and J. S. Fowler (2010). "Identification and characterization of putative methylation targets in the MAOA locus using bioinformatic approaches." Epigenetics **5**(4): 325-342.

Shumay, E., J. Logan, N. D. Volkow and J. S. Fowler (2012). "Evidence that the methylation state of the monoamine oxidase A (MAOA) gene predicts brain activity of MAO A enzyme in healthy men." Epigenetics **7**(10): 1151-1160.

Sibille, E., Z. Sarnyai, D. Benjamin, J. Gal, H. Baker and M. Toth (1997). "Antisense inhibition of 5-hydroxytryptamine<sub>2a</sub> receptor induces an antidepressant-like effect in mice." Mol Pharmacol **52**(6): 1056-1063.

Soliman, A., C. Udemgba, I. Fan, X. Xu, L. Miler, P. Rusjan, S. Houle, A. A. Wilson, J. Pruessner, X. M. Ou and J. H. Meyer (2012). "Convergent effects of acute stress and glucocorticoid exposure upon MAO-A in humans." J Neurosci **32**(48): 17120-17127.

Solomon, D. A., M. B. Keller, A. C. Leon, T. I. Mueller, P. W. Lavori, M. T. Shea, W. Coryell, M. Warshaw, C. Turvey, J. D. Maser and J. Endicott (2000). "Multiple recurrences of major depressive disorder." Am J Psychiatry **157**(2): 229-233.

Stabellini, R., L. R. Vasques, J. C. de Mello, L. M. Hernandez and L. V. Pereira (2009). "MAOA and GYG2 are submitted to X chromosome inactivation in human fibroblasts." Epigenetics **4**(6): 388-393.

Stefanovic, B., N. Spasojevic, P. Jovanovic, N. Jasic, J. Djordjevic and S. Dronjak (2016). "Melatonin mediated antidepressant-like effect in the hippocampus of chronic stress-induced depression rats: Regulating vesicular monoamine transporter 2 and monoamine oxidase A levels." Eur Neuropsychopharmacol **26**(10): 1629-1637.

Szklo-Coxe, M., T. Young, P. E. Peppard, L. A. Finn and R. M. Benca (2010). "Prospective associations of insomnia markers and symptoms with depression." Am J Epidemiol **171**(6): 709-720.

Tatton, W. G. and C. W. Olanow (1999). "Apoptosis in neurodegenerative diseases: the role of mitochondria." Biochim Biophys Acta **1410**(2): 195-213.

ter Horst, J. P., E. R. de Kloet, H. Schachinger and M. S. Oitzl (2012). "Relevance of stress and female sex hormones for emotion and cognition." Cell Mol Neurobiol **32**(5): 725-735.

Ungerstedt, U. (1991). "Microdialysis--principles and applications for studies in animals and man." J Intern Med **230**(4): 365-373.

Uzbekov, M. G. (2021). "Monoamine Oxidase as a Potential Biomarker of the Efficacy of Treatment of Mental Disorders." Biochemistry (Mosc) **86**(6): 773-783.

Uzbekov, M. G., E. Y. Misionzhnik, N. M. Maximova and O. P. Vertogradova (2006). "Biochemical profile in patients with anxious depression under the treatment with serotonergic antidepressants with different mechanisms of action." Hum Psychopharmacol **21**(2): 109-115.

Vitalis, T., C. Fouquet, C. Alvarez, I. Seif, D. Price, P. Gaspar and O. Cases (2002). "Developmental expression of monoamine oxidases A and B in the central and peripheral nervous systems of the mouse." J Comp Neurol **442**(4): 331-347.

Wang, J. and D. E. Edmondson (2007). "Do monomeric vs dimeric forms of MAO-A make a difference? A direct comparison of the catalytic properties of rat and human MAO-A's." J Neural Transm (Vienna) **114**(6): 721-724.

Wang, Z., L. Chen, X. Rong and X. Wang (2017). "Upregulation of MAOA in the hippocampus results in delayed depressive-like behaviors in burn mice." Burns.

Wang, Z., L. Chen, L. Zhang and X. Wang (2017). "Paradoxical sleep deprivation modulates depressive-like behaviors by regulating the MAOA levels in the amygdala and hippocampus." Brain Res **1664**: 17-24.

Wei, Z., G. G. Gabriel, L. Rui, X. Cao, P. R. Pennington, J. Chlan-Fourney, A. J. Nazarali, G. B. Baker and D. D. Mousseau (2012). "Monoamine oxidase-A physically interacts with presenilin-1(M146V) in the mouse cortex." J Alzheimers Dis **28**(2): 403-422.

Wei, Z., T. Satram-Maharaj, B. Chaharyn, K. Kuski, P. R. Pennington, X. Cao, J. Chlan and D. D. Mousseau (2012). "Aspartic acid substitutions in monoamine oxidase-A reveal both catalytic-dependent and -independent influences on cell viability and proliferation." J Neural Transm (Vienna) **119**(11): 1285-1294.

World Health Organization. (2022, 8 June 2022). "Mental disorders." Retrieved June 8, 2022, from <https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/mental-disorders>.

Wu, J. B., K. Chen, Y. Li, Y. F. Lau and J. C. Shih (2009). "Regulation of monoamine oxidase A by the SRY gene on the Y chromosome." FASEB J **23**(11): 4029-4038.

Yang, W. and H. Wang (2018). "5,7-Dimethoxycoumarin prevents chronic mild stress induced depression in rats through increase in the expression of heat shock protein-70 and inhibition of monoamine oxidase-A levels." Saudi J Biol Sci **25**(2): 253-258.

Yoon, S. O., C. H. Yun and A. S. Chung (2002). "Dose effect of oxidative stress on signal transduction in aging." Mech Ageing Dev **123**(12): 1597-1604.

Youdim, M. B., D. Edmondson and K. F. Tipton (2006). "The therapeutic potential of monoamine oxidase inhibitors." Nat Rev Neurosci **7**(4): 295-309.

Yu, Y., R. Wang, C. Chen, X. Du, L. Ruan, J. Sun, J. Li, L. Zhang, J. M. O'Donnell, J. Pan and Y. Xu (2013). "Antidepressant-like effect of trans-resveratrol in chronic stress model: behavioral and neurochemical evidences." J Psychiatr Res **47**(3): 315-322.

Yu, Y. W., C. W. Yang, H. C. Wu, S. J. Tsai, C. J. Hong, M. C. Chen and T. J. Chen (2005). "Association study of a functional MAOA-uVNTR gene polymorphism and personality traits in Chinese young females." Neuropsychobiology **52**(3): 118-121.

Zanderigo, F., A. E. D'Agostino, N. Joshi, M. Schain, D. Kumar, R. V. Parsey, C. DeLorenzo and J. J. Mann (2018). "[<sup>11</sup>C]Harmine Binding to Brain Monoamine Oxidase A: Test-Retest Properties and Noninvasive Quantification." Mol Imaging Biol **20**(4): 667-681.





**Titre :** Surexpression de la MAO-A : caractérisation biologique, neurochimique et comportementale

**Mots clés :** Monoamine Oxydase A, Sérotonine, Dépression, Dépression résistante

**Résumé :** La dépression, trouble psychiatrique le plus fréquent et première cause d'invalidité dans le monde, se caractérise entre autres par une diminution des niveaux extracellulaires en neurotransmetteurs monoaminergiques. Des études cliniques par imagerie ont révélées que l'expression et l'activité d'une enzyme, la monoamine oxydase A (MAO-A) qui est impliquée dans la dégradation de ces monoamines, était augmentée ; cette surexpression est confirmée dans les modèles murins d'étude de la maladie. Toutefois, le rôle exact de cette hausse d'activité n'est pas clairement établi. Afin de caractériser les effets d'une élévation de l'expression et de l'activité de la MAO-A, un vecteur viral permettant une expression constitutive du gène de la MAO-A est injecté dans le cortex préfrontal médian (mPFC) de souris afin d'induire une surexpression.

La dépression, trouble psychiatrique le plus fréquent et première cause d'invalidité dans le monde, se caractérise entre autres par une diminution des niveaux extracellulaires en neurotransmetteurs monoaminergiques. Des études cliniques par imagerie ont révélées que l'expression et l'activité d'une enzyme, la monoamine oxydase A (MAO-A) qui est impliquée dans la dégradation de ces monoamines, était augmentée ; cette surexpression est confirmée dans les modèles murins d'étude de la maladie. Toutefois, le rôle exact de cette hausse d'activité n'est pas clairement établi. Afin de caractériser les effets d'une élévation de l'expression et de l'activité de la MAO-A, un vecteur viral permettant une expression constitutive du gène de la MAO-A est injecté dans le cortex préfrontal médian (mPFC) de souris afin d'induire une surexpression.

**Title:** Biological, neurochemical and behavioral effects of increased expression of MAO-A

**Keywords:** Monoamine oxidase A, Serotonin, Depression, Resistant depression

**Abstract:** Depression, the most prevalent psychiatric disease and first cause of disability in the world, is characterized by a decrease in the monoaminergic neurotransmitters levels, such as serotonin (5-HT) in the brain regions involved in the mood regulation. Clinical PET scan imagery and post-mortem studies showed an increase in the monoamine oxidase A (MAO-A) expression and activity; this increase is also observed in preclinical rodent models of the disease. However, if a correlation between pathology and MAO-A level was established, no causal link was determined. To decipher the role of the MAO-A level elevation in the depression, a viral vector which induces the constitutive expression of MAO-A gene is injected in the prefrontal cortex (mPFC) of mice to induce an overexpression of the enzyme in a cell- and regio-specific manner.

Depression, the most prevalent psychiatric disease and first cause of disability in the world, is characterized by a decrease in the monoaminergic neurotransmitters levels, such as serotonin (5-HT) in the brain regions involved in the mood regulation. Clinical PET scan imagery and post-mortem studies showed an increase in the monoamine oxidase A (MAO-A) expression and activity; this increase is also observed in preclinical rodent models of the disease. However, if a correlation between pathology and MAO-A level was established, no causal link was determined. To decipher the role of the MAO-A level elevation in the depression, a viral vector which induces the constitutive expression of MAO-A gene is injected in the prefrontal cortex (mPFC) of mice to induce an overexpression of the enzyme in a cell- and regio-specific manner.