UNIVERSITÉ FRANÇOIS - RABELAIS DE TOURS

ÉCOLE DOCTORALE Santé, Sciences et Techniques

INSERM U930 ÉQUIPE 4

THÈSE présentée par :

Anthony LAUGERAY

soutenue le : **30 Novembre 2010**

pour obtenir le grade de : **Docteur de l'université François - Rabelais**

Discipline/ Spécialité : Sciences de la vie & Santé - Neurosciences

Étude du rôle de la voie de la kynurénine dans un modèle animal de dépression : le stress chronique imprédictible

*****

Approches biochimique et comportementale

*****

THÈSE dirigée par :

Catherine BELZUNG	Professeur des universités, Université François Rabelais (Tours)

THÈSE co-encadrée par :

Pascal BARONE	Maître de conférences, Université François Rabelais (Tours)

RAPPORTEURS :

Michel BOURIN	Professeur des Universités (PU-PH), Université de Nantes
Francis CHAOULOFF	Directeur de recherche, Université de Bordeaux 2

JURY :

Pascal BARONE	Maître de conférences, Université François Rabelais (Tours)
Catherine BELZUNG	Professeur des Universités, Université François Rabelais (Tours)
Michel BOURIN	Professeur des Universités Praticien Hospitalier, Université de Nantes ; C.H.R.U. Hôtel Dieu
Vincent CAMUS	Professeur des Universités Praticien Hospitalier, Université François - Rabelais ; CHRU de Tours
Francis CHAOULOFF	Directeur de recherche, Université de Bordeaux 2
Gilles GUILLEMIN	Directeur de recherche, Université de New South Wales
Jean-Marie LAUNAY	Professeur des universités Praticien Hospitalier, Université Paris 5 ; Hôpital Lariboisière

Je dédie ce travail à mes parents, mon frère et à Laurie,
qui tout au long de ces années m'ont soutenu et encouragé.
Qu'ils sachent combien je les aime.

Remerciements

Cette thèse qui s'achève est pour moi l'occasion de remercier toutes les personnes qui ont contribué au bon déroulement de ce travail.

Tout d'abord, je tiens à exprimer toute ma gratitude au Docteur Francis Chaouloff et au Professeur Michel Bourin pour avoir accepté d'être les rapporteurs de cette thèse et d'avoir jugé ce travail.

Je tiens également à exprimer de sincères remerciements :

À Monsieur le Professeur Vincent Camus pour avoir accepté de présider ce jury de thèse.

À Monsieur le Professeur Jean-Marie Launay pour avoir accepté de faire partie de ce jury de thèse. Je tiens également à lui montrer toute ma reconnaissance pour avoir réalisé les dosages des métabolites de la kynurénine. Il est certain que sans sa collaboration, cette thèse n'aurait pas pu voir le jour.

À Monsieur le Professeur Jacques Callebert pour sa collaboration et pour avoir pris du temps pour réaliser une partie des dosages.

À Monsieur le Docteur Gilles Guillemin pour m'avoir fait l'honneur de participer à ce jury de thèse. Je suis très heureux de l'avoir rencontré un jour de Novembre 2009, lors d'un meeting de psychoneuroimmunologie à Gunzberg en Allemagne.
Je le remercie non seulement pour la sympathie et la sincérité dont il a fait preuve dès notre première rencontre, mais aussi pour toute l'aide qu'il m'a apporté lors de la fin de ma thèse. Je suis très heureux d'avoir fait sa connaissance.

Je remercie également le Professeur Catherine Belzung pour m'avoir accueilli dans son laboratoire, il y a plus de 6 ans maintenant à l'occasion d'un stage de Licence. Je lui suis très reconnaissant de m'avoir permis de réaliser cette thèse sans financement et de m'avoir fait confiance durant ces années.

Je tiens également à exprimer toute ma gratitude et ma reconnaissance au Docteur Pascal Barone, auprès de qui j'ai réalisé tous mes stages de Licence, Maîtrise, Master ainsi que l'ensemble de ce travail de thèse.
Je le remercie pour sa bienveillante attention, pour son soutien dans les moments difficiles, pour la patience dont il a fait preuve durant toutes ces années, pour toutes les discussions que nous avons eu, mais surtout pour avoir supporté, toujours avec calme et sérénité, mon entêtement parfois un peu exagéré.
Qu'il veuille bien trouver dans ces quelques mots le témoignage de mon attachement et de ma très profonde reconnaisance pour ses précieux conseils et le soutien constant qu'il a manifesté lors de l'encadrement de cette thèse.

Je souhaiterais aussi remercier l'ensemble des membres de l'équipe 4 de l'U930 pour leur accueil au sein de l'équipe, ainsi que l'ensemble des thésards, Arnaud, Mathieu et surtout Elsa et Julien avec qui j'ai débuté ma thèse.
Je les remercie pour les discussions et l'aide qu'ils m'ont fournie durant la réalisation de mes expériences. Merci aussi pour les moments de « décompression » passés dans les colloques et après nos journées de travail.
Je remercie aussi Alexandre pour ses précieux conseils et pour m'avoir enseigné l'art de la microdissection.

Merci aussi à Anne-Marie, Maryse, Séverine, Bruno pour leur sympathie et leur aide dans diverses tâches techniques.

Enfin, je tiens vraiment à exprimer toute ma gratitude et mon amour à mes proches : mes parents et mon frère qui m'ont toujours soutenu, tant financièrement qu'émotionnellement tout au long de mes études. Pour cela, je leur serai reconnaissant toute ma vie. Je remercie aussi tout particulièrement Laurie, ma compagne, pour la patience, l'amour et le soutien dont elle a fait preuve durant ces années.
Que ces quelques mots témoignent de l'immense gratitude que j'éprouve à leur égard.
Merci aussi à tous mes amis qui m'ont permis de tenir bon durant ces années en m'offrant des moments de détente

Résumé

Malgré les avancées considérables réalisées ces dernières années dans la compréhension de la physiopathologie de la dépression, l'origine et la neurobiologie de cette pathologie demeurent encore mal connues, en partie à cause de son étiologie multifactorielle. Des décennies de travaux ont permis de mettre en évidence un certain nombre d'altérations neurobiologiques au niveau des systèmes de neurotransmission (5-HT, DA, NA, glutamate), des systèmes de réponse au stress (axe HPA= Hypothalamic-Pituitary-Adrenal axis ; axe SAM = axe Sympatho-Adréno-Médullaire) et du système immunitaire. L'ensemble de ces perturbations induit des changements de la neuroplasticité ainsi qu'un déséquilibre entre processus neurotoxiques et neuroprotecteurs, vraisemblablement à l'origine de l'apparition de symptômes dépressifs. Même si l'on sait que la perturbation de l'un de ces systèmes physiologiques a des répercussions sur les autres, on comprend encore assez mal comment ces altérations sont liées les unes aux autres. Dans ce contexte, le métabolisme du tryptophane (TRP), en particulier la voie de synthèse de la kynurénine (KYN) - principale voie d'utilisation du TRP dans l'organisme - semble constituer un candidat intéressant, capable d'interagir avec l'ensemble de ces systèmes et ainsi participer activement à la physiopathologie des troubles dépressifs. En effet, cette voie est activée par le cortisol et les cytokines pro-inflammatoires dont les taux circulants sont augmentés chez les patients dépressifs. Les voies KYN et 5-HT ayant le même précurseur, l'activation de la première peut diminuer la quantité de TRP nécessaire à la synthèse de 5-HT et ainsi contribuer à perturber la neurotransmission sérotoninergique – autre caractéristique souvent reportée chez les dépressifs. Une fois produite, la KYN est métabolisée en divers composés, certains induisant du stress oxydant via la génération de composés réactifs de l'oxygène, alors que d'autres sont capables de moduler les neurotransmissions glutamatergique et cholinergique. Ainsi, l'accumulation de ces composés dans l'organisme peut conduire à perturber le fonctionnement cellulaire, induisant ainsi des altérations de la neuroplasticité ainsi qu'un déséquilibre entre processus neurotoxiques et neuroprotecteurs.

Dans ce travail de thèse, nous nous sommes intéressés à mieux comprendre le rôle du métabolisme du tryptophane (TRP), et en particulier de la voie KYN, dans la physiopathologie des troubles dépressifs en utilisant un modèle murin de dépression - le stress chronique imprédictible modéré (Unpredictable Chronic Mild Stress = UCMS) - qui présente l'avantage de reproduire le rôle des stresseurs socio-environnementaux dans l'apparition d'un épisode dépressif, d'entraîner des altérations neurobiologiques comparables à celles observées chez les patients dépressifs majeurs, et aussi de restituer le délai d'action des antidépresseurs.

La première partie de la thèse a consisté à évaluer l'effet de l'UCMS sur le métabolisme de la KYN. Pour cela, nous avons confronté des souris BALB/c mâles à un protocole d'UCMS de 6 semaines et avons ensuite observé les conséquences biochimiques à la fois au niveau du système nerveux central (SNC) (dans 4 structures cérébrales fortement impliquées dans la régulation de l'humeur et des comportements anxio-dépressifs : le cortex cingulaire, l'hippocampe, l'amygdale et le striatum) mais aussi au niveau périphérique. Nous avons ainsi pu montrer que l'UCMS affecte de façon différentielle le métabolisme de la KYN selon qu'il se déroule en périphérie ou dans le SNC. En effet, en périphérie, la synthèse de KYN est augmentée alors que ce n'est pas le cas dans le SNC (ARTICLE 1 et 3). De plus, l'UCMS semble induire l'accumulation de composés toxiques en périphérie alors que dans le cerveau, l'effet est structure-dépendant (ARTICLE 1 et 3). De façon intéressante, nous également mis en évidence la présence d'une corrélation inverse très robuste ($p<10^{-6}$) entre le taux de 5-HT et le taux de KYN dans toutes les structures cérébrales étudiées indiquant une régulation très étroite entre les deux voies du métabolisme du TRP (ARTICLE 1).

La seconde partie de la thèse, a consisté à vérifier dans quelle mesure la voie de la KYN est liée à l'expression de comportements anxio-dépressifs chez les souris UCMS, un lien étroit ayant été observé en clinique entre l'intensité des symptômes dépressifs et l'activation périphérique de la voie KYN. Nous avons ainsi observé, chez les animaux UCMS uniquement, une corrélation positive entre l'état d'activation de la voie KYN périphérique (mesurée par le ratio KYN/TRP) et l'expression de comportements de type anxio-dépressifs dans les paradigmes de la croix surélevée et du FST (forced swim test) (ARTICLE 2).

Dans la dernière partie de la thèse, nous nous sommes interrogés sur les propriétés thérapeutiques potentielles d'un inhibiteur de la voie KYN – le 1-méthyl-tryptophane (1MT) – en tant qu'antidépresseur. Pour cela, nous avons comparé les effets bio-comportementaux d'une administration chronique de 1-MT aux effets d'un inhibiteur de la recapture de sérotonine (fluoxétine) chez des souris préalablement soumises à l'UCMS. En plus de répliquer nos premiers résultats, nous avons non seulement observé que le traitement à la fluoxétine permet de reverser les changements comportementaux et les altérations de la voie KYN induits par l'UCMS, mais aussi que le traitement au 1-MT a les mêmes effets comportementaux que le traitement à la fluoxétine et est donc aussi efficace en tant qu'antidépresseur (ARTICLE 3). Par ces études, nous confirmons donc les données issues de la clinique impliquant le métabolisme de la KYN dans la physiopathologie de la dépression. Nous mettons également en avant l'intérêt du modèle UCMS pour étudier le rôle du métabolisme de la KYN dans la physiopathologie des troubles dépressifs liés au stress. De plus, nos données suggèrent que le rétablissement du métabolisme de la KYN constitue un élément important dans la stratégie thérapeutique des antidépresseurs de type IRSS. Enfin, nous montrons pour la première fois que le blocage de cette voie métabolique constitue une nouvelle piste thérapeutique permettant de diminuer l'intensité des symptômes dépressifs.

Mots-clé : Dépression, stress chronique imprédictible modéré, tryptophane, kynurénine, antidépresseurs, souris.

Abstract

Despite decades of research that have contributed to a better understanding of the pathophysiology of depressive disorders, the etiology of these neuropsychiatric diseases remain not well known mainly because of its multiple etiology. The large number of studies performed in this realm has put in evidence some neurobiological alterations at the level of neurotransmission systems (5-HT, DA, NA, glutamate), at the level of stress response systems ((hypothalamic-pituitary-adrenal axis = HPA axis ; sympathetic adrenal medullary axis = SAM axis) and at the level of the immune system. Altogether, these abnormalities can lead to disturbances in neuroplasticity and to imbalances between neurotoxic/neuroprotective processes.

Even if we know that these dysfunctions are likely to be linked to one another, it is an old objective for neuroscience research to find a common substratum linking these disturbances. In support of this, the major route of tryptophan (TRP) metabolism – the so-called kynurenine pathway (KP) – seems to be a relevant target for several reasons. First, it is activated by cortisol and proinflammatory cytokines, the concentration of which is increased in depressed patients. Given that the synthesis of kynurenine (KYN) occurs parallel to that of serotonin, an activation of the KP may reduce the availability of TRP for the synthesis of 5-HT in the central nervous system (CNS) and, therefore may contribute to serotonin-depletion-related disorders such as depression. Moreover, KYN is further metabolized in several neuroactive compounds, some of which are able to increase oxidative stress by generating free radicals while others are able to modulate the cerebral level of glutamate. Therefore, the peripheral and/or cerebral accumulation of such metabolites may lead to cellular disturbances underlying abnormal neuroplastic processes and imbalances between neurotoxic/neuroprotective processes.

In this work, we sought to understand the of the KP in the pathophysiology of depressive states by using an animal model of depression, the Unpredictable Chronic Mild Stress (UCMS), based on subjecting mice to a period of mild socio-environmental stressors. This procedure has the advantage to replicate several depression-related behavioural and physical impairments observed in depressed patients which can be reversed by chronic, but not acute, antidepressant treatments. Therefore, in a first study, we have confronted mice to a 6-week UCMS procedure and we have determined the biochemical consequences both at the peripheral and cerebral levels (in four structures importantly involved in the regulation of mood and anxio-depressive behaviours (cingulate cortex, hippocampus, amygdala, striatum). We were able to show that the KP is differentially affected by the UCMS depending on whether we consider the periphery or the CNS. Indeed, in the periphery, the KP is not only activated but also diverted towards the synthesis of toxic compounds while, in the CNS, the effect is structure-dependent. Interestingly, we have found a robust inverse correlation between 5-HT and KYN contents in all the cerebral structures studied which suggests a very close regulation between these two metabolic pathways of TRP metabolism (ARTICLE 1&3).

In a second time, we have explored to which extent the activation of the KP could be related to behavioural and biochemical alterations in UCMS mice, given that clinical studies have reported a positive correlation between the intensity of depressive symptoms and the level of activation of the peripheral KP. We have observed, in UCMS only, that the up-regulation of the peripheral KP is actually positively correlated to the expression of both anxiety-like and depressive-like behaviours (ARTICLE 2).

In a our last experiment, we were curious to assess the efficacy of the IDO-inhibitor 1-methyltryptophan (1MT) on both behavioural and biochemical alterations induced by UCMS. With this aim, we have compared the effect of a chronic treatment with 1MT to that of a chronic treatment with the classical antidepressant fluoxetine (Flx; a selective serotonin reuptake

inhibitor=SSRI). In addition to replicate our first results (ARTICLE 1), we have found that Flx is not only able to prevent behavioural alterations induced by UCMS but also to reverse peripheral and cerebral alterations of the KP (ARTICLE 3). More importantly, we have shown that the chronic treatment with 1MT is as efficient as that with Flx to block bio-behavioural alterations induced by UCMS (ARTICLE 3).

Thanks to these studies, we confirm clinical data showing that the both the peripheral and cerebral KP is involved in the pathophysiology of depressive states. Moreover, our findings suggest that the recovery of this metabolic pathway constitute a key mechanism in the therapeutic effect of SSRIs. Finally, we were able to show that blocking the activation of the KP could be of therapeutic value by alleviating depressive symptoms.

Keywords: Depression, unpredictable chronic mild stress, tryptophan, kynurenine, antidepressants, mice.

Table des matières

Remerciements **3**
Résumé **4**
Abstract **6**
Table des matières **8**
Liste des tableaux **13**
Liste des figures **13**
Liste des annexes **14**
Liste des abréviations **15**
Cursus scientifique **16**
Liste des communications **18**
INTRODUCTION **19**
I. LE TROUBLE DÉPRESSIF MAJEUR **20**
1. Historique et sémiologie 20
2. Epidémiologie 24
3. Hypothèses étiologiques 25
A. VULNERABILITE GENETIQUE 25
B. VULNERABILITE EPIGENETIQUE/ENVIRONNEMENTALE 26
4. Régions cérébrales impliquées dans la physiopathologie de la dépression 29
5. Neurobiologie et traitement 32
A. HYPOTHESE MONOAMINERGIQUE 32
B. ALTERATIONS DE L'AXE CORTICOTROPE 35
C. MODIFICATIONS NEUROIMMUNES 36
D. HYPOTHESE DE LA NEUROPLASTICITE 38
E. ROLE DU GLUTAMATE 39
F. AUTRES HYPOTHESES 42
a. Les neurokinines 42
b. Le système opioïdergique 42
c. Les endocannabinoïdes 43
6. Modèles animaux de dépression 44
A. TESTS D'EVALUATION DU PHENOTYPE DEPRESSIF 46
a. Test de la nage forcée 46
b. Test de suspension caudale 47

c. Test de préférence au sucrose 48
d. Autres tests d'évaluation du phénotype dépressif 49
B. LES MODELES LIES A L'ETIOLOGIE DE LA DEPRESSION 50
a. Les modèles basés sur la vulnérabilité génétique 51
b. Les modèles basés sur la vulnérabilité développementale 51
c. Les modèles basés sur la vulnérabilité environnementale 53
C. LES AUTRES MODELES 55
II. LE SYSTEME DE REPONSE AU STRESS 56
1. Définition du concept de stress 56
2. Anatomie et physiologie de la réponse au stress 58
3. Comment s'organise la réponse au stress ? 60
A. L'ACTIVATION NEURALE 60
B. L'ACTIVATION NEUROENDOCRINIENNE 61
C. L'ACTIVATION ENDOCRINIENNE 61
D. REGULATION NEURALE DE LA REPONSE AU STRESS 64
a. Rôle de l'hippocampe 65
b. Rôle de l'amygdale 66
a. Rôle du cortex préfrontal 68
4. Implication du système immunitaire 69
A. QUELQUES RAPPELS SUR L'ORGANISATION ET LE ROLE DU SYSTEME IMMUNITAIRE 69
a. Reconnaissance du « non-soi » par le système immunitaire. 70
b. Les cytokines comme régulateurs de la réponse immunitaire. 71
B. COMMUNICATION ENTRE SYSTEME NERVEUX CENTRAL ET SYSTEME IMMUNITAIRE 72
a. Influence du système nerveux central sur le système immunitaire 72
b. Influence du système immunitaire sur le système nerveux central : rôle des cytokines 73
C. EFFETS DU STRESS SUR LE SYSTEME IMMUNITAIRE 75
a. Le stress augmente la production de cytokines inflammatoires en réponse à une stimulation immune 75
b. Le stress induit un état de résistance aux glucocorticoïdes 75
c. Redistribution spatiale des leucocytes 76
d. Augmentation de l'immunité acquise au niveau des muqueuses 77
e. Le stress induit la libération systémique de cytokines inflammatoires d'origine non-immune 78
5. Altérations de la réponse au stress chez les dépressifs 79

A. AU NIVEAU DE L'AXE HPA 80
a. Implication du CRF 81
b. Implication de la vasopressine 81
B. AU NIVEAU DU SYSTEME NERVEUX AUTONOME 82
6. L'individualité dans la réponse au stress 83
A. SOURCES DE VARIABILITE EN REPONSE AU STRESS 83
a. Différences liées à la nature du stress 83
b. Les différences liées à l'individu 86
B. ORIGINES DE L'INDIVIDUALITE 90
a. Différences génétiques 90
b. Rôle de l'épigénétique 91
c. Quelles conséquences sur l'expression d'un *pattern* comportemental ? 95
III. LE MÉTABOLISME DU TRYPTOPHANE 96
1. Organisation du métabolisme : absorption et utilisation du TRP dans l'organisme 96
2. Sérotonine, stress et dépression 99
A. BIOSYNTHESE ET DEGRADATION DE LA SEROTONINE 101
B. INFLUENCE DU TRYPTOPHANE SUR LA PRODUCTION DE 5-HT 102
C. MODIFICATIONS DU SYSTEME 5-HT AU COURS DU STRESS 102
a. Effets d'un stress aigu 103
b. Effets d'un stress chronique 104
D. MODIFICATIONS SEROTONINERGIQUES CHEZ LES DEPRESSIFS 105
3. La voie de la kynurénine : une voie alternative à la synthèse de 5-HT 107
A. UN PEU D'HISTOIRE 107
B. PRESENTATION DU METABOLISME 108
a. Initiation du métabolisme 108
b. Les deux voies du métabolisme 111
c. Mécanismes d'action des métabolites de la kynurénine 114
d. Voie KYN et métabolisme énergétique 118
C. Quel rôle de la voie KYN en pathologie ? 119
a. La maladie de Huntington 119
b. La maladie d'Alzheimer 120
c. La maladie de Parkinson 121
d. Démence associée au SIDA 121

e. Ischémie cérébrale 122
D. ÉQUILIBRE ENTRE LES DEUX VOIES DANS LE SNC 123
E. VOIE KYN EN REPONSE AU STRESS 125
F. VOIE KYN DANS LA DEPRESSION 126
4. Rôle hypothétique de la voie de la kynurénine dans la dépression .. 128
OBJECTIFS DE LA THÈSE 131
RÉSULTATS ET DISCUSSIONS INTERMÉDIAIRES 136
I. LA VOIE DE LA KYNURÉNINE EST-ELLE AFFECTÉE PAR L'UCMS ? 137
1. Introduction de l'étude 137
2. Article 1 138
3. Résultats complémentaires 147
A. DOSAGES DE L'ACIDE QUINOLINIQUE (QUIN) 147
4. Discussion 147
A. QUELS SONT LES MECANISMES RESPONSABLES DE L'ACTIVATION PERIPHERIQUE DE LA VOIE KYN PAR L'UCMS ? 149
B. IMPLICATION DE L'IDO OU DE LA TDO ? 150
C. L'ACTIVATION DE LA VOIE KYN ENTRAINE-T-ELLE UNE DEPLETION EN TRP, ET PAR CONSEQUENT UNE DEPLETION EN 5-HT, DANS LE SNC ? 151
D. QUEL EFFET DE L'UCMS SUR LE METABOLISME PERIPHERIQUE DE LA KYN ? 152
E. QUE SE PASSE-T-IL ALORS DANS LE SNC ? 154
F. QU'APPREND-ON SUR L'EQUILIBRE ENTRE LES VOIES 5-HT ET KYN DANS LE SNC ? 158
II. VOIE KYN ET MODULATION DU COMPORTEMENT 160
1. Introduction de l'étude 160
2. Article 2 161
3. Résultats complémentaires 181
A. EFFETS COMPORTEMENTAUX DE L'UCMS 181
4. Discussion 181
A. LES MODIFICATIONS COMPORTEMENTALES INDUITES PAR L'UCMS 181
B. VOIE KYN ET EXPRESSION DE COMPORTEMENTS ANXIODEPRESSIFS 182
C. EST-CE PERTINENT PAR RAPPORT A LA CLINIQUE ? 183
D. QUELS POURRAIENT ETRE LES MECANISMES SOUS-JACENTS ? 184
III. EFFETS D'UN ANTIDÉPRESSEUR ET D'UN INHIBITEUR DE L'IDO SUR LES ALTÉRATIONS DE LA VOIE KYN INDUITES PAR L'UCMS. 186
1. Introduction de l'étude 186
2. Article 3 187

3. Discussion 220
A. REPRODUCTIBILITE DES EFFETS DE L'UCMS 221
B. RESTORATION DU METABOLISME DE LA KYN : UN NOUVEAU MECANISME D'ACTION DE LA FLUOXETINE? 222
C. INHIBITEURS DE LA VOIE KYN : NOUVEAUX ANTIDEPRESSEURS? 224
DISCUSSION GÉNÉRALE 226
I. RÉFLEXION SUR LE MODÈLE UCMS 227
1. Altérations chez l'Homme = altérations dans le modèle animal ? 228
2. Quelles critiques du modèle UCMSpeut-on formuler ? 230
3. Que peut-il être fait pour améliorer ce modèle ? 232
II. ACTIVATION PERIPHERIQUE DE LA VOIE KYN : IMPLICATIONS PHYSIOPATHOLOGIQUES 233
1. Pourquoi le TRP n'est pas un bon antidépresseur 233
2. Voie KYN, dépression et dysfonctionnements cardio-vasculaires 236
III. CERVEAU ET TROUBLES DE L'HUMEUR : QUELS RÔLES POUR LA VOIE KYN ? 237
1. Modulation des systèmes de neurotransmission 238
2. Dépression, KYN et cellules gliales 240
3. La dépression : une maladie inflammatoire ? 241
4. Le métabolisme de la KYN : un lien entre stress, dépression, et démence ? 242
CONCLUSION ET PERSPECTIVES 245
ANNEXES 289

Liste des tableaux

Tableau 1 : Effets de l'activation du système sympatho-adréno-médullaire.....p56
Tableau 2 : Effets de l'activation de l'axe HPA.....p59
Tableau 3 : Aspects neuroendocriniens de la communication entre le système nerveux central et le système immunitaire.....p68
Tableau 4 : Profils de réactivité chez le rat.....p85

Liste des figures

Figure 1: Les fondements historiques du concept de dépression.....p17
Figure 2 : Facteurs intervenant dans l'étiologie de la dépression.....p23
Figure 3 : Organisation du « cerveau émotionnel ».....p25
Figure 4 : Distribution des neurones à monoamines et leurs projections dans le cerveau humain.....p29
Figure 5 : Évolution des concentrations salivaires en cortisol au réveil.....p31
Figure 6 : Schéma de la synapse glutamatergique et des cibles d'antidépresseurs potentiels.....p36
Figure 7 : Test de Porsolt = test de la nage forcée (Force Swim Test: FST).....p41
Figure 8 : Test de suspension caudale (Tail Suspension Test : TST).....p43
Figure 9 : Test de préférence au sucrose.....p43
Figure 10 : Le « Novelty Suppression of Feeding » (NSF) test.....p44
Figure 11: Relation entre le niveau de stress et le bien-être.....p52
Figure 12 : Les deux branches du Système Nerveux Autonome.....p54
Figure 13 : Organisation de l'axe HPA.....p58
Figure 14 : Projections indirectes majeures du système limbique sur le PVN.....p61
Figure 15 : Voie de communication nerveuse entre le système immunitaire et le SNC.....p69
Figure 16 : Sources de variabilité dans la réponse au stress.....p80
Figure 17 : Exemple de répartition intra-utérine des fœtus chez les rongeurs.....p82
Figure 18 : Les deux composantes du code génétique.....p88
Figure 19 : L'origine épigénétique de la variabilité phénotypique.....p89
Figure 20 : Les différents niveaux d'organisation du vivant.....p90
Figure 21 : Vue synthétique du métabolisme du tryptophane dans le système nerveux central.....p93
Figure 22 : L'organisation des systèmes sérotoninergiques central et périphérique chez la souris.....p95
Figure 23 : Le métabolisme de la sérotonine dans l'organisme.....p96
Figure 24 : Le métabolisme de la kynurénine dans l'organisme.....p108
Figure 25 : Le métabolisme de la kynurénine dans le système nerveux central.....p120
Figure 26 : Schéma de synthèse reliant le métabolisme du TRP à la physiopathologie de la dépression.....p127
Figure 27 : Schéma évolutif des effets de l'UCMS sur le métabolisme de la kynurénine.....p145
Figure 28 : Synthèse des connaissances sur les altérations de la voie KYN au cours du syndrome dépressif.....p145
Figure 29 : Mécanismes d'activation possibles de la voie KYN par l'UCMS.....p146
Figure 30 : Altérations de la libération de corticostérone induites par 7 semaines d'UCMS et effet d'un traitement chronique à la fluoxétine.....p147
Figure 31 : L'UCMS dévie le métabolisme périphérique de la KYN.....p150
Figure 32 : L'UCMS dévie le métabolisme de la KYN de façon structure-dépendante dans le SNC.....p152
Figure 33 : Voies de synthèse de l'acide quinolinique.....p153
Figure 34 : Lien entre NO, KYN et 5-HT.....p156
Figure 35 : Effets de l'UCMS sur différentes variables comportementales mesurées dans le test de la croix surélevée et le test de la nage forcée.....p179
Figure 36 : Hypothèse sur les processus de modulation d'un comportement par deux médiateurs distincts dans deux conditions différentes.....p181
Figure 37 : Réplication des effets de l'UCMS sur les métabolismes périphérique et central de la KYN.....p219

Figure 38 : Effets d'un traitement chronique à la fluoxétine sur les altérations périphériques et centrales du métabolisme de la KYN induites par l'UCMS.....p221
Figure 39 : Effets d'un traitement chronique au 1MT sur les altérations périphériques et centrales du métabolisme de la KYN induites par l'UCMS.....p223
Figure 40 : Influence du nombre de stresseurs par semaine sur un indice d'anhédonie : le pourcentage de préférence à la saccharine.....p230
Figure 41 : Détournement périphérique et central du métabolisme du tryptophane chez les patients dépressifs.....p254

Liste des annexes

Annexe 1 : Effects of neuronal and inducible NOS inhibitor 1-[2-(trifluoromethyl) phenyl] imidazole (TRIM) in unpredictable chronic mild stress procedure in mice.....p298
Annexe 2 : Antidepressants recruit new neurons to improve stress response regulation.....p305
Annexe 3 : Role of kynurenine pathway metabolites in the pathophysiology of depression: focus on oxidative stress.....p326

Liste des abréviations

DSM IV : *Diagnosis and Statistical Manual of Mental Disorders*
IRDES: Institut de recherche et Documentation en Économie de la Santé
5-HT : sérotonine
5-HTP : 5-hydroxytryptophane
5-HIAA : acide 5-hydroxyindoleacétique
TPH : tryptophane hydroxylase
SERT :transporteur spécifique de la sérotonine
TRP : tryptophane
LAT-1: transporteur des acides aminés de type L
KYN : kynurénine
IDO : indoleamine-2,3-dioxygénase
TDO: tryptophan-2,3-dioxygénase
3HK: 3-hydroxykynurénine
KMO: kynurénine hydroxylase = kynurénine monooxygénase
KASE: kynuréninase
KAT: kynurénine aminotransférase
KYNA: acide kynurénique
QUIN: acide quinolinique
QPRT : quinolinic acid phosphoribosyltransferase
3HA: acide 3-hydroxyanthranilique
3HAO : 3-hydroxyanthranilic acid oxygenase
5-HA : acide 5-hydroxyanthranilique
ANTHRA : acide anthranilique
PIC : acide picolinique
NO : nitric oxide
NOS : nitric oxide synthase
GRE : glucocorticoid-responsive elements
ADN : acide désoxyribonucléique
CpG : paire de nucleotides C et G
BDNF : Brain Derived Neurotrophic Factor
AVP : arginine-vasopressine
HPA : Hypothalamic-Pituitary-Adrenal
TEP: Tomography par Émission de Positons
IRM : Imagerie par Résonance Magnétique
IMAO : inhibiteur de la monoamine oxydase
MAO : monoamine oxydase
DA : dopamine
NA : noradrénaline
ISRS : inhibiteur sélectif de la recapture de sérotonine
ISRN : inhibiteur sélectif de la recapture de noradrénaline
TrkB : Tropomyosine-Related Kinase B
GC : glucocorticoïdes
CRF : corticotrophin releasing factor
ACTH: adreno-corticotropic hormone
ARNm: acide ribonucléique messager
V1b: récepteur de type 1 à la vasopressine
IL : interleukine
TNF : tumor necrosis factor
IFN: interferon
PGE: prostaglandines
SNC: système nerveux central
SNP : système nerveux périphérique
SNS : système nerveux somatique
SNA : système nerveux autonome
SAM : système sympatho-adréno-médullaire
ROS : reactive oxygen species
GLU : glutamate
HDRS: Hamilton Depressive Rating Scale
MADRS: Montgomery and Asberg Depressive Rating Scale
LCR: Liquide céphalorachidien
NMDA: N-methyl-D-aspartate
NR : sous-unité des récepteurs NMDA
MGluR : récepteurs métabotropiques du glutamate
VGLUT : transporteur vésiculaire du glutamate
EAAT : Excitatory Amino Acids Transporter
AMPA : α-amino-3-hydroxy-5-methyl-4-isoxazole propionic acid
NK1, 2, 3: récepteurs à la neurokinine
ECB: endocannabinoïdes
CB : récepteurs aux cannabinoïdes
AEA : anandamide
2-AG : 2-arachidonoylglycerol
KO : knock out
FST : forced swim test
TST: tail suspension test
NSF: novelty suppression of feeding
RIT: resident intruder test
GABA: acide γ-aminobutyrique
UCMS: unpredictable chronic mild stress
CVS: chronic variable stress
PVN: noyau paraventriculiare de l'hypothalamus
PKA: protein kinase A
Ca: calcium
MR: minéralocorticoïdes
GR: glucocorticoïdes
vSUB: subiculum ventral
PAO : aire péoptique médiane
DMH : 'hypothalamus dorsomédian
BST: noyau de la strie terminale
NTS : noyau du tractus solitaire
BLA : noyau basolatéral de l'amygdale
MeA : noyau médian de l'amygdale
CeA : noyau central de l'amygdale
CMH : complexe majeur d'histocompatibilité
PAMP : Pathogen-Associated Molecular Patterns
LPS : lipopolysaccharide
APC : antigen presenting cell
Th: lymphocytes T helper
BHE: barrière hématoencéphalique
NF-κB : nuclear factor κB
DTH : delayed type hypersensitivity
HTT : huntingtine
MA : maladie d'Alzheimer
AD : Alzheimer's disease

Cursus scientifique

FORMATION SCIENTIFIQUE

Oct. 2006 – Nov 2010 Thèse de doctorat en Neurosciences (Tours)(Soutenance le 30 Nov. 2010).

Sept. 2004 – Juin 2006 Master Sciences de la Vie et de la Santé mention Physiologie, Biochimie, Santé et Neurosciences Spécialité Cognition et Développement (Tours).

Sept. 2003 – Juin 2004 Maîtrise de Biologie Cellulaire et Physiologie Animale option Neurosciences (Tours).

Sept. 2002 – Join 2003 Licence de Biologie Cellulaire et Physiologie Animale option Psychobiologie (Tours).

Sept. 2000 – Juin 2002 D.U.T. Génie Biologique option Analyses Biologiques et Biochimiques (Laval).

Juin 2000 Baccalauréat Scientifique option Sciences de la Vie et de la Terre (La Ferté-Bernard).

ACTIVITÉS D'ENSEIGNEMENT

Sept. 2006 – Juin 2007 TP L3 Psychologie
Semestre 1 : EC 21.3 Psychobiologie 3 - CNU 69 (26h)
Semestre 2 : EC 26.2 Psychobiologie 4 - CNU 69 (70h)

Sept. 2007 – Juin 2008 TD L1 Sciences de la Vie
Semestre 2 : UE $_{2\text{-}3}$ Écologie-Éthologie – CNU 69 (16h)
Titre du TD : « Éthologie et recherche biomédicale »

ACTIVITÉS D'ENCADREMENT

2007 GOUYER Yoan MASTER 1 – Psychologie, Cognition et Développement ; stage de 3-4 mois d'initiation à la recherche.

2008 THUAIRE Flavien MASTER 1 – Psychologie, Cognition et Développement ; stage de 3-4 mois d'initiation à la recherche.

ACTIVITÉS DE RECHERCHE

2006 – 2010 Doctorat en Neurosciences ; Équipe INSERM U930 : équipe 4 - Troubles affectifs : des neurosciences fondamentales à la clinique.

Titre : **Étude de l'implication du métabolisme de la kynurénine dans la physiopathologie des troubles dépressifs.**
But : Explorer les mécanismes résultant du dysfonctionnement du métabolisme de la kynurénine dans un modèle « d'état dépressif » murin : le stress chronique imprédictible modéré.

– –

Sept. 2006 – Juin 2007 Élaboration d'un projet de recherche + recherche de financements (U930 ;C. Belzung et UMR CNRS 8612 ; P. Couvreur).

Juillet 2007 Présentation du projet à l'École Doctorale ***« Innovation Thérapeutique »*** de la faculté de pharmacie de Châtenay-Malabry.

Titre : **Nanoparticules adressées pour le traitement des maladies cérébrales : application à la dépression.**
But : Développer un nouveau type de nanoparticules permettant de vectoriser des molécules dans le cerveau. L'idée était d'enfermer du tryptophane dans ces nanoparticules de façon à augmenter son apport cérébral et donc la synthèse de 5-HT.

– –

Janvier – Juin 2006 Stage de Master 2 ; Laboratoire de Psychobiologie des Émotions (EA3248 ; Tours).

Titre : **Perfusion intracérébrale, dans le noyau du raphé dorsal, d'un agoniste inverse 5-HT_{1A} chez la souris SWISS : le spiropéridol.**
But : Confirmer les résultats obtenus l'année précédente et établir une courbe effet-dose avec des effectifs plus importants.

– –

Février – Juin 2005 Stage de Master 1 ; Laboratoire de Psychobiologie des Émotions (EA3248 ; Tours).

Titre : **Perfusion intracérébrale, dans le noyau du raphé dorsal, d'un agoniste inverse 5-HT_{1A} chez la souris SWISS : le spiroépridol (étude pilote).**
But : Confirmer l'hypothèse sérotoninergique de la modulation de l'anxiété : montrer qu'une augmentation de la libération de sérotonine dans les aires post-synaptiques entraîne une hausse des comportements anxieux chez la souris dans des modèles animaux d'anxiété aigüe.

– –

Février – Juin 2004 Stage de Maîtrise ; Laboratoire de Psychobiologie des Émotions (EA3248 ; Tours).

Titre : **Effet d'un traitement chronique oral à la nicotine et du sevrage sur la réactivité émotionnelle des souris SWISS : rôle des récepteurs 5-HT_{1A} sérotoninergiques.**
But : Montrer que l'effet anxiogène du sevrage nicotinique résulte d'une hypersensibilisation des récepteurs 5-HT_{1A}.

Liste des communications

PUBLICATIONS

- **Laugeray A, Launay JM, Callebert J, Surget A, Belzung C, Barone PR.** (2010). Peripheral and cerebral metabolic abnormalities of the tryptophan-kynurenine pathway in a murine model of major depression. ***Behav Brain Res 210***(1): 84-91.
- **Laugeray A, Launay JM, Callebert J, Surget A, Belzung C, Barone PR.** Evidence for a key role of the peripheral kynurenine pathway in the modulation of anxiety- and depression-like behaviours in mice: focus on individual differences. ***Soumis à Pharmacology, Biochemistry and Behavior.***.
- **Laugeray A, Launay JM, Callebert J, Célestine J, Belzung C, Barone PR.** Effects of the antidepressant fluoxetine on neurochemical alterations of the kynurenine pathway induced by UCMS in mice: comparison with the IDO inhibitor 1-methyl-tryptohane. ***En préparation***.
- **Mutlu O, Ulak G, Laugeray A, Belzung C.** (2009). "Effects of neuronal and inducible NOS inhibitor 1-[2-(trifluoromethyl) phenyl] imidazole (TRIM) in unpredictable chronic mild stress procedure in mice." ***Pharmacol Biochem Behav 92***(1): 82-7.
- **Surget A, Ibarguen-Vargas Y, Leonardo ED, Laugeray A, Rainer Q, Touma C, Palme R, Griebel G, Hen R and Belzung C**. Antidepressants recruit new neurons to regulate stress systems. ***Soumis à Molecular Psychiatry***.

COMMUNICATIONS

Liste des travaux exposés lors de colloques nationaux et internationaux présentés par la personne soulignée.

POSTERS :

- **Laugeray A**, Barone P, Belzung C. (2008). *Cell death in development and aging*, PARIS.
- **Laugeray A**, Launay JM, Callebert J, Surget A, Belzung C, Barone PR. (2008). *6th FENS forum of European Neuroscience*, GENÈVE.
- **Laugeray A**, Barone P, Belzung C. (2008). *6th FENS forum of European Neuroscience*, GENÈVE.
- Laugeray A, Launay JM, Callebert J, Surget A, Belzung C, **Barone PR**. (2009). *10th World Congress of Biological Psychiatry*, PARIS.
- Laugeray A, Launay JM, Callebert J, Surget A, Belzung C, **Barone PR** (2009). *Summer meeting of the British Association for Psychopharmacology*, OXFORD.
- **Laugeray A**, Launay JM, Callebert J, Surget A, Belzung C, Barone PR (2009). *10th Psychoimmunology Expert Meeting*, GUNZBURG.
  Résumé publié dans Neurology, Psychiatry and Brain Research
- **Laugeray A**, Launay JM, Callebert J, Surget A, Belzung C, Barone PR (2009). *9ème colloque de la société des Neurosciences*, BORDEAUX.
- **Laugeray A**, Launay JM, Callebert J, Célestine J, Belzung C, Barone PR (2010). *7th FENS forum of European Neuroscience*, AMSTERDAM.

PRÉSENTATIONS ORALES :

- **Laugeray A**, Launay JM, Callebert J, Surget A, Belzung C, Barone PR (2009). *13ème Forum de l'École Doctorale SST*. TOURS.

*****

INTRODUCTION

*****

« L'observation scientifique est toujours une observation polémique, elle confirme ou infirme une thèse antérieure, un schéma préalable, un plan d'observation. »
Gaston Bachelard

I. LE TROUBLE DÉPRESSIF MAJEUR

1. Historique et sémiologie

Sur le plan étymologique, « *depressere* » signifie en latin « rabaisser », « tirer vers le bas ». Ce terme prend tout son sens en médecine où le concept de dépression fait référence à un syndrome que l'on peut définir comme un état psychique associant une baisse de l'humeur à un ralentissement intellectuel et psychomoteur (Dictionnaire de Médecine de Flammarion – 1998). Le concept de « dépression » regroupe en réalité un ensemble de troubles pouvant avoir des manifestations variées, allant du simple trouble dysthymique à une forme grave, la mélancolie. La notion de dépression telle qu'on la connait aujourd'hui est apparue au cours du XIXème siècle dans le jargon médical (**Fig. 1** ci-après). Cependant, la symptomatologie caractérisant cette affection est décrite depuis longtemps. Un papyrus égyptien découvert en 1500 avant J.C, appelé papyrus d'Eber, du nom de l'archéologue qui l'a découvert, fait déjà référence à la dépression qui n'était bien entendu pas dénommée ainsi. L'Ancien Testament de la Bible y fait également référence en relatant l'histoire du roi Saül, le premier roi des Israélites en terre d'Israël, sujet à de profondes crises de mélancolie, traité par musicothérapie. Ensuite, durant l'antiquité, Hippocrate a été l'un des premiers auteurs à étudier médicalement cette pathologie. Pour lui, il s'agissait d'un déséquilibre des fluides du corps qu'il attribuait à un excès de bile noire, d'où son nom: la mélancolie - « melas » (noire) ; « Kholé » (bile). Par la suite, au Moyen Age, l'approche médicale d'Hippocrate a été éclipsée par la diabolisation de la dépression et du suicide par l'église. En 1621, Robert Burton publie l'« *Anatomie de la mélancolie* ». Il en analyse les causes et les effets et recherche des remèdes. Il distinguera par exemple une « mélancolie religieuse ». Son œuvre constitue une importante somme de toutes les théories, connaissances concernant la mélancolie, que Burton lie au deuil. Le XIX^{e} siècle a été LE siècle de la caractérisation de ce mal qu'est la mélancolie, souvent décrite comme une « neurasthénie ». En littérature, Alfred de Musset parle de « mal du siècle », Chateaubriand de « maladie morale abominable ». Elle prend chez Flaubert la forme de l'ennui et chez Baudelaire celle du « spleen ».

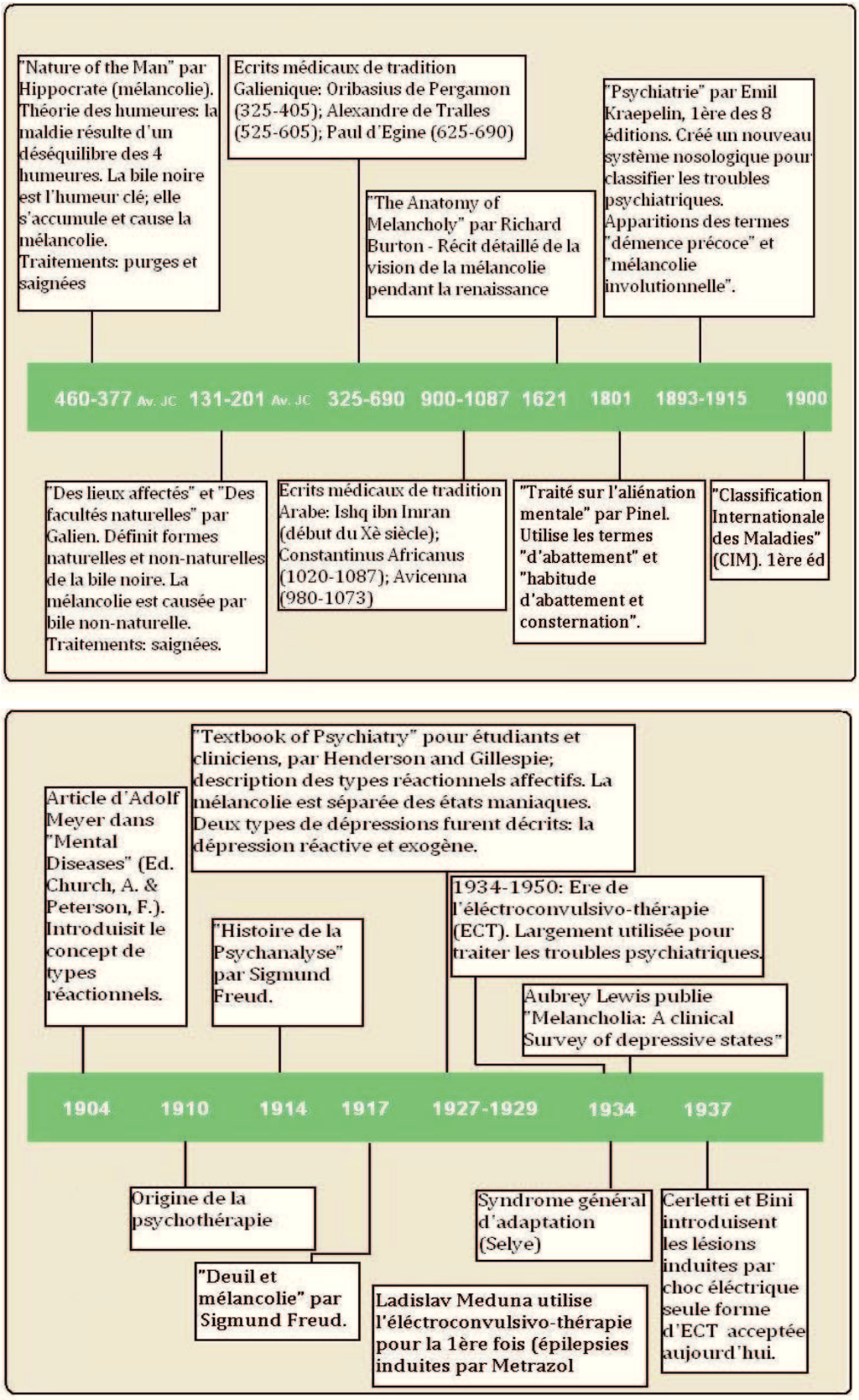
Au début du XXème siècle et de l'émergence de la psychanalyse, la dépression a été considérée comme un trouble provoqué par les circonstances de l'environnement ou plutôt l'incapacité de l'individu à faire face aux problèmes courants. Plus tard, l'intérêt s'est porté sur la classification des troubles psychiatriques. L'une des premières contributions dans ce domaine est un article d'Emil Kraepelin, paru en 1921 et intitulé « *Maniac depressive insannity and paranoia* ». Bien que ne mentionnant pas explicitement la dépression, il s'agit d'un premier pas vers la classification de ces désordres en entités nosologiques distinctes (**Fig. 1** ci-après).

Ces travaux allaient aboutir à des outils diagnostiques comme ceux proposés par l'Organisation Mondiale de la Santé ou par l'Association Américaine de Psychiatrie dont le principal instrument est le *Diagnosis and Statistical Manual of Mental Disorders IV* (DSM-IV). D'après ces outils, un épisode

dépressif majeur doit durer au moins deux semaines et se caractérise par plusieurs modifications importantes de l'humeur et altérations psychophysiologiques dont la prégnance relative est très variable d'un patient à l'autre : un état dysphorique (humeur dépressive), une diminution de l'intérêt et du plaisir (anhédonie), une perte ou un gain de poids ou d'appétit, une insomnie ou une hypersomnie, une agitation ou un ralentissement psychomoteur, un sentiment de dévalorisation ou une culpabilité excessive, des troubles de la concentration et des pensées morbides ou suicidaires récurrentes. Selon le DSM-IV, le diagnostic de dépression majeure est établi par la présence d'au moins cinq de ces symptômes parmi lesquels doit figurer au moins un état dysphorique ou anhédonique. De plus, il convient d'ajouter à cette liste de nombreux symptômes associés, plus ou moins liés aux précédents et de fréquence variable, tel que l'anxiété, le retrait social, la perte motivationnelle, des troubles cognitifs, la perturbation de l'activité sexuelle. Cet état pathologique est diagnostiqué grâce à l'utilisation de diverses échelles permettant d'évaluer l'intensité des symptômes : les plus communément utilisées sont les échelles de Hamilton, de Beck ou de Montgomery et Asberg (Demyttenaere and De Fruyt 2003). Une faible partie des patients a connu ou connaîtra également des phases maniaques consistant en la présence d'hyperactivité, d'euphorie et d'une recherche inconsidérée de plaisir. Bien que plusieurs mécanismes étiopathogéniques soient communs avec la dépression majeure, ce trouble maniaco-dépressif représente une entité pathologique distincte appelée trouble bipolaire en opposition au trouble dépressif majeur (ou unipolaire) selon le DSM-IV.

Le DSM-IV répertorie différents sous-types de dépression majeure. En particulier, il distingue deux syndromes dépressifs qui semblent chacun être l'antithèse de l'autre : la dépression mélancolique et la dépression atypique (Levitan, Lesage *et coll.* 1997). Cette distinction est basée sur un ensemble de symptômes psychologiques et neurovégétatifs, et est indépendante de la différence unipolaire-bipolaire (Gold and Chrousos 1999).

Fig. 1 : ***Les fondements historiques du concept de dépression.***
Adapté de Wong et Licinio (2001).



La forme mélancolique de la dépression majeure est largement reconnue et est caractérisée par la présence d'une anhédonie, d'une humeur dépressive (culminant le matin), d'insomnie, d'appétit réduit ou de perte de poids, et d'agitation psychomotrice. Cette forme semble contredire le terme de dépression en ce qu'elle correspond à un état d'excitation, bien que cette excitation soit négative. Une anxiété intense est souvent concentrée sur soi et prend la forme d'un fort sentiment de dévalorisation, de résignation et de pensées persistantes des échecs passés. On trouve fréquemment une dissociation entre les faits réels, l'estimation personnelle et la mémoire émotionnelle ressentie par les patients. Ces sentiments d'infériorité affectent sensiblement les pensées et l'humeur.

La dépression atypique est elle aussi associée à une anhédonie et un état dysphorique (culminant en fin de journée). Pour le reste, cette forme présente des symptômes antinomiques à la forme mélancolique. Au niveau psychophysiologique, ce sous-type dépressif est associé à une forte fatigue, une hypersomnie, un ralentissement psychomoteur et une augmentation de l'appétit ou du poids. De plus, le patient dépressif atypique présente fréquemment une attitude de détachement et de désintérêt pour son environnement. Il peut déplorer une certaine lassitude mentale, une déficience cognitive et éviter les contacts sociaux, ces derniers pouvant paraître trop contraignants et anxiogènes.

Environ 25% à 30% des patients souffrant de dépression majeure développent une forme mélancolique stricte alors que ce pourcentage est estimé entre 15% et 30% pour ceux qui présentent la forme atypique stricte (Gold and Chrousos 2002). Néanmoins, il convient de souligner que la plupart des patients ont en général un mélange d'altérations cognitives, affectives et physiologiques qui ne correspondent pas précisément à la distinction entre forme mélancolique et forme atypique. Y compris à l'intérieur de ces sous-types, chaque cas ne ressemble pas conformément à un autre.

2. Epidémiologie

Sur la vie entière, la dépression majeure affecte entre 8% et 12% des Hommes et entre 15% et 20% des femmes (Kessler, Berglund *et coll.* 2003). Selon une étude de l'IRDES (Institut de Recherche et Documentation en Économie de la Santé) publiée en 1999, le taux de dépressifs dans la population française est de 14,9%, dont près d'un tiers n'est pas pris en charge médicalement. Sa prévalence a été multipliée par 6 depuis 1970. Ces chiffres sont assez éloquents sur l'ampleur de sa distribution ; néanmoins il faut savoir que la dépression, au sens large du terme, est probablement un phénomène continu sans démarcation précise entre normalité (la petite déprime) et pathologie (troubles affectifs graves). La fixation du seuil pathologique est donc quelque peu arbitraire si bien que les tableaux cliniques publiés peuvent parfois être très divers. Il n'en reste pas moins que la dépression majeure est une pathologie sévère et grave qui revêt un aspect récurrent sur toute la vie pour plus de 75% des patients, en général caractérisé par une succession de phases de rémission et de rechute (Frank and Thase 1999). Les patients rétablis à la suite d'un premier épisode dépressif présentent un risque de récidive dans les 6 mois évalué à 50% en cas d'arrêt du traitement (Frank, Kupfer *et coll.* 1990). Plus grave, il a été établi qu'en l'absence de traitement 15% des patients succombent à la suite d'un suicide et qu'entre 60% et 80% des suicides (entre 10000 et 15000 par an en France) sont le fait d'individus fortement dépressifs (Mann 2003).

En plus de causer une grande détresse psychologique, la dépression majeure affecte également un nombre conséquent de processus biologiques perturbant diverses fonctions telles que le sommeil, l'appétit, le métabolisme, le système nerveux autonome et le système neuroendocrinien (Gold, Goodwin *et coll.* 1988; Gold, Goodwin *et coll.* 1988; Frank and Thase 1999). Ces altérations peuvent contribuer à l'apparition de différents troubles organiques et systémiques tels qu'une augmentation des risques de troubles cardiovasculaires (Barefoot and Schroll 1996; Penninx, Geerlings *et coll.* 1999) ou une ostéoporose précoce (Pratt, Ford *et coll.* 1996) et être ainsi responsable d'un accroissement du taux de mortalité à âge égal chez les dépressifs indépendamment du suicide, du tabagisme ou de l'alcoolisme (Barefoot and Schroll 1996; Michelson, Stratakis *et coll.* 1996).

Ainsi, l'invalidité sociale et professionnelle, les problèmes de santé, la mort prématurée associés entraînent un coût substantiel à la société tant moral qu'économique, il n'est donc pas étonnant que le trouble dépressif majeur ait été identifié par la *Global Burden of Disease Study* dans les causes principales d'invalidité mondiale et comme la maladie représentant le deuxième plus sérieux problème de santé à l'avenir (Murray and Lopez 1997).

En bref

Le concept de dépression tel qu'il est défini de nos jours est assez récent. Cependant, la caractérisation de la symptomatologie dépressive est bien antérieure. La dépression altère à la fois la sphère affective, la sphère émotionnelle et la sphère cognitive, ce qui en fait l'un des plus importants fléaux de l'ère contemporaine.

3. *Hypothèses étiologiques*

La dépression majeure est une pathologie hétérogène avec de fortes disparités dans la durée et le nombre récurrent d'épisodes, mais aussi dans le *pattern* d'altérations induit, les mécanismes neurobiologiques impliqués et la réponse au traitement. Ces observations suggèrent qu'il s'agit plutôt d'une famille de troubles qui partagent un certain nombre de manifestations mais dont les causes et les mécanismes sous-jacents pourraient diverger notoirement. Ainsi, bien que de nombreuses hypothèses aient été proposées, l'étiologie et la pathophysiologie sont multiples et encore aujourd'hui mal définies. Une certitude est que l'étiologie est multifactorielle (génétique, développementale, environnementale et interaction entre ces différents facteurs), chacun de ces facteurs ayant la caractéristique morbide d'augmenter la vulnérabilité des personnes face à la maladie.

A. VULNERABILITE GENETIQUE

Des études comparant les taux de concordance entre des jumeaux monozygotes et dizygotes suggèrent une héritabilité comprise entre 30% et 35% (Fava and Kendler 2000), ce qui est relativement faible comparativement à la plupart des autres troubles psychiatriques tels que le trouble bipolaire et la schizophrénie ; cette contribution génétique est plus importante chez les femmes que chez les Hommes (Sullivan, Neale *et coll.* 2000; Wurtman 2005). Il est également intéressant de noter que les dépressions précoces, sévères et récurrentes (Fava and Kendler 2000; Gilbertson, Shenton *et coll.* 2002) mais aussi les formes mélancoliques et atypiques ont une héritabilité plus importante que des syndromes mixtes ou moins sévères (Kendler, Eaves *et coll.* 1996). Certains traits de la personnalité connus pour être des facteurs de risque pour la dépression comme l'évitement de la douleur, l'anxiété, le pessimisme et le neuroticisme ont également un taux d'héritabilité important (Prescott, Aggen *et coll.* 1999; Wurtman 2005). Néanmoins, il est clair aujourd'hui que la dépression majeure n'est pas causée par des gènes individuels mais que

l'apparition de ce trouble peut être influencée par plusieurs réseaux de gènes interdépendants participant à des fonctions plus ou moins liées (monoamines, plasticité, neuropeptides, neuroendocrines). Malgré quelques contradictions, plusieurs études ont d'ailleurs identifié différentes régions chromosomiques associées à la dépression majeure (Holmans, Weissman *et coll.* 2007; Levinson, Evgrafov *et coll.* 2007).

Ces données indiquent un lien entre le patrimoine génétique et la susceptibilité à la dépression majeure. On peut donc estimer que le phénotype causé par certaines variations dans le patrimoine génétique peut rester silencieux ne générant aucun signe d'apparition d'un trouble dépressif majeur jusqu'à ce que le sujet se retrouve confronté à certaines circonstances comme une expérience émotionnellement forte ou traumatisante, ou encore une exposition répétée à un environnement aversif, anxiogène ou déstabilisant (stress chronique). C'est donc dans l'interaction avec l'environnement que l'implication de gènes dans les troubles dépressifs majeurs a été le plus clairement établie. Une démonstration de ces interactions a été réalisée dans une étude épidémiologique prospective (Caspi, Sugden *et coll.* 2003). Dans cette étude, les auteurs ont analysé le génotype des sujets pour le polymorphisme du transporteur de la 5-HT. Quelques études précédentes avaient déjà indiqué que ce polymorphisme pouvait conférer une prédisposition pour la dépression mais aussi pour le neuroticisme et l'anxiété lesquels sont également des facteurs de risque pour la dépression (Lesch, Bengel *et coll.* 1996; Greenberg, Li *et coll.* 2000; Foster and MacQueen 2008). Caspi *et coll* (2003) ont alors démontré que les sujets porteurs de l'allèle « *s* » *(*pour *« short »)* du transporteur de la 5HT présentaient un accroissement significatif de l'apparition d'épisodes dépressifs en association avec le nombre d'évènements stressants vécus par rapport aux sujets porteurs de l'allèle « *l* » *(*pour *« long »)*. En outre, des données d'imagerie cérébrale ont également révélé des différences fonctionnelles induites par ce même polymorphisme dans des aires cérébrales impliquées dans le traitement émotionnel de l'information et dans la dépression, *i.e.* le cortex cingulaire et l'amygdale (Canli, Omura *et coll.* 2005; Pezawas, Meyer-Lindenberg *et coll.* 2005).

B. VULNERABILITE EPIGENETIQUE/ENVIRONNEMENTALE

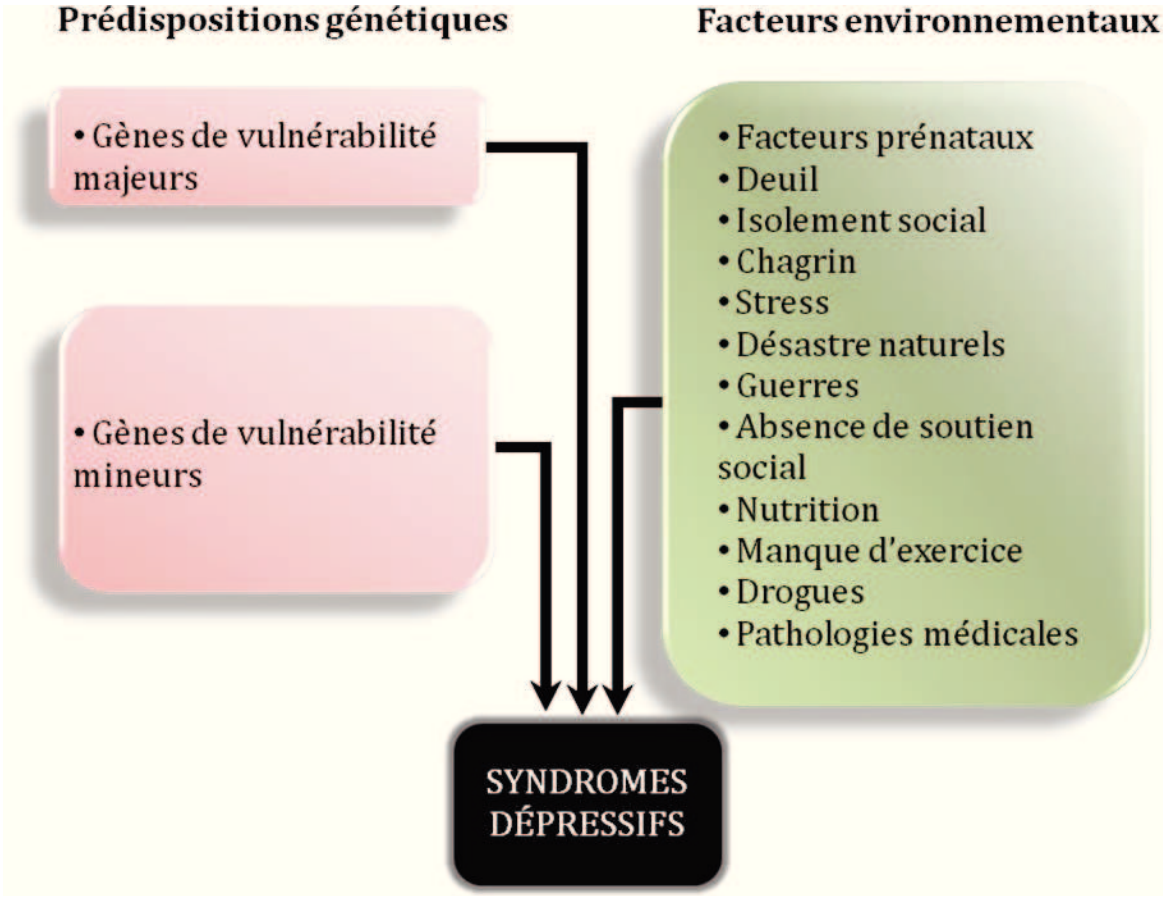
L'identification des facteurs génétiques dans l'étiologie des troubles complexes, tels que les troubles dépressifs, est également compliquée par l'influence de l'environnement, qui modifie le lien entre phénotype et génotype : à génotype égal, le sujet va exprimer le trouble ou ne pas l'exprimer en fonction de l'environnement qu'il va rencontrer durant sa vie. Les mécanismes de ces interactions gène-environnement reposent en partie sur une modification de l'ADN chromosomique (Mill and Petronis 2007). Il est ainsi possible de modifier l'expression des gènes, non pas en modifiant la séquence des modules de base de l'ADN (acides nucléiques) mais en modifiant certains résidus. C'est le cas avec le phénomène de méthylation qui ajoute des résidus

méthyl sur les îlots CpG (=dinucléotides cytosine/guanine). Des modifications de certaines protéines peuvent également aboutir à des variations de l'expression d'un phénotype. Les histones par exemple, principales protéines composant les complexes dans lesquels les molécules d'ADN sont incluses (=nucléosomes), peuvent être régulées par les différents phénomènes détaillés dans la partie II.6.B.b de cette introduction, et ainsi contribuer activement à modifier l'expression des gènes. L'ensemble de ces modifications est appelé l'épigénome.

Ainsi, différents facteurs développementaux et environnementaux peuvent conférer une susceptibilité pour la dépression en affectant le génome d'une manière épigénétique. Par exemple, il a été montré qu'un comportement maternel caractérisé par les soins apportés aux jeunes chez les rongeurs induit des changements épigénétiques dans la région promotrice du gène du récepteur aux glucocorticoïdes qui pourraient être bénéfiques contre l'apparition d'un état « dépressif-like » (Weaver, Cervoni *et coll.* 2004). De même, Tsankova *et coll* (2006) ont démontré qu'un protocole de stress chronique basé sur la défaite sociale chez la souris est capable d'induire des changements épigénétiques (méthylations, acétylations d'histones) produisant une inhibition de l'expression du gène BDNF (*Brain-Derived Neurotrophic Factor*), alors qu'un traitement chronique par un antidépresseur (l'imipramine) contrecarre ces effets par de nouveaux changements épigénétiques sur le même gène mais sur des sites différents (Tsankova, Berton *et coll.* 2006). Plus récemment, il a été montré que le stress post-natal engendre des altérations épigénétiques responsables d'une hausse de la sécrétion d'arginine-vasopressine (AVP), neuropeptide sécrété au niveau de l'hypothalamus dont la libération entraîne une activation de l'axe HPA, principal système de réponse au stress (Murgatroyd, Patchev *et coll.* 2009). L'expression de l'héritabilité de la dépression est aussi influencée par l'environnement familial. Par exemple, un comportement parental distant et inadapté d'un point de vue affectif peut induire une augmentation de 38% du risque de développer un épisode dépressif (Kendler 2001).

Le stress est aujourd'hui considéré comme le facteur environnemental majeur pouvant précipiter un épisode dépressif et influencer sa sévérité, sa durée et sa récurrence (McEwen 1998; McEwen 2004). En effet, plusieurs troubles neuropsychiatriques sont liés à l'apparition de stress. Le nombre de traumas de l'enfance augmente le risque de développer une dépression à l'âge adulte. Chez l'adulte, les facteurs de stress environnementaux peuvent contribuer à l'émergence d'un épisode dépressif, lequel est renforcé lorsque ceux-ci revêtent un caractère chronique ou traumatique (Kendler, Kessler *et coll.* 1995). Les différents facteurs impliqués dans l'étiologie dépressive sont récapitulés en **Figure 2**.

Fig. 2 : ***Facteurs intervenant dans l'étiologie de la dépression.*** *Adapté de Wong et Licinio, 2001.*



Finalement, toutes ces observations ont donné naissance au modèle de stress-diathèse de la dépression. Ce modèle implique qu'une prédisposition, *i.e.* une vulnérabilité génétique ou biologique (la diathèse), interagit avec l'environnement et les évènements de la vie, particulièrement le stress, afin de déclencher un épisode dépressif (**Fig. 2** ci-dessus). Ainsi, plus la vulnérabilité intrinsèque de l'individu est importante au départ, moins il sera nécessaire de subir des évènements stressants pour observer l'apparition de troubles dépressifs. À l'inverse, une personne faiblement prédisposée nécessitera une exposition plus importante à des situations stressantes avant l'apparition de troubles similaires. Toutefois, si une personne présente une forte prédisposition, cela ne signifie pas forcément qu'elle développera plus tard dans sa vie des troubles dépressifs. Les résultats de l'étude de Caspi *et coll.* (2003), évoqués un peu plus tôt (allèles « s » et « l » du transporteur de la 5-HT) sont d'ailleurs un bon exemple témoignant de la validité de ce modèle.

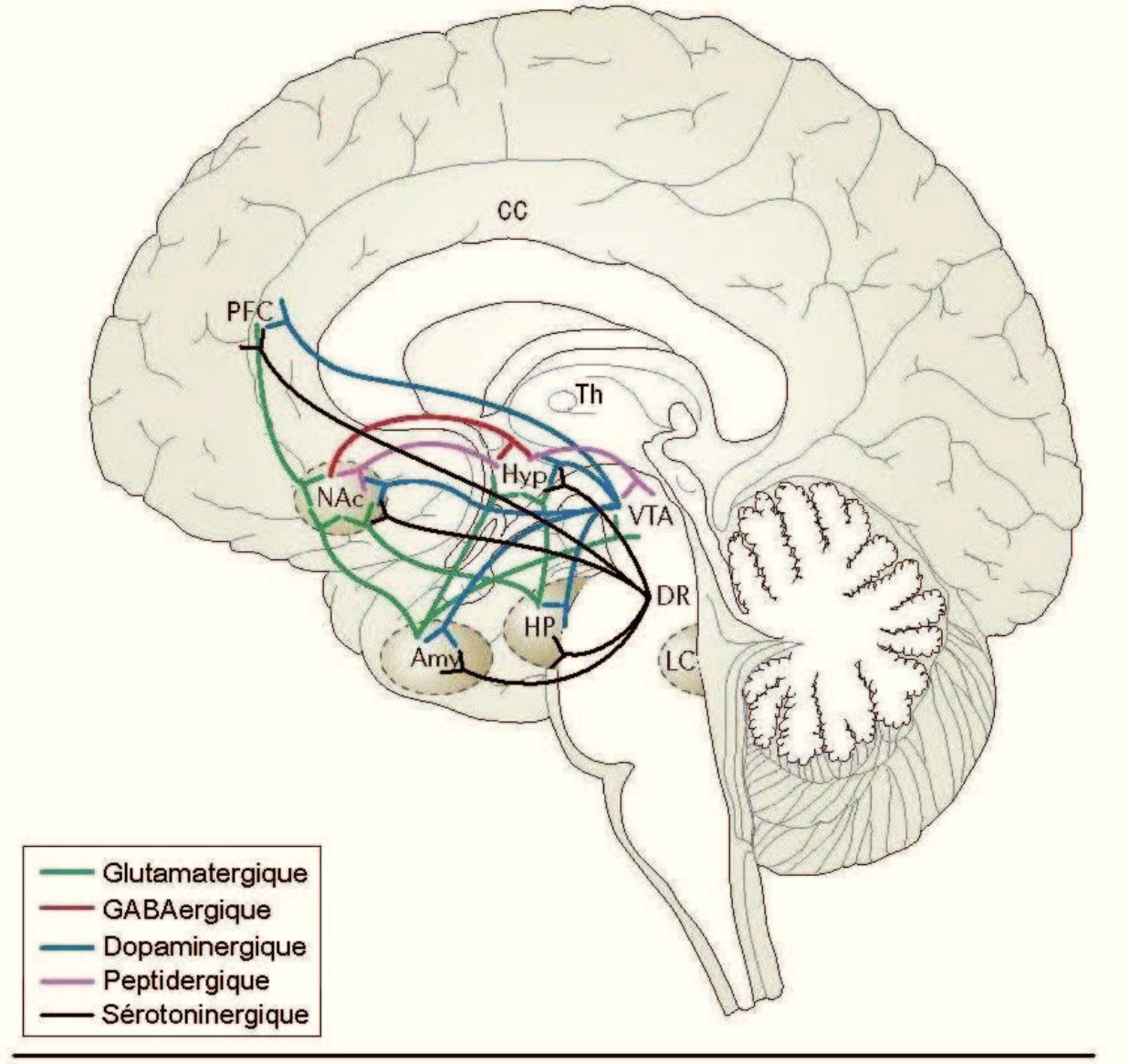
En bref

L'étiologie de la dépression demeure encore à ce jour mal connue. Cependant, il semblerait que l'installation de la maladie résulte de l'accumulation d'un certain nombre de facteurs de prédisposition: on parle de vulnérabilités génétiques, développementales et environnementales.

4. *Régions cérébrales impliquées dans la physiopathologie de la dépression*

Grâce aux nouvelles techniques d'exploration cérébrale comme la Tomographie par Emission de Positons (TEP) ou l'Imagerie par Résonance Magnétique (IRM) on connait de mieux en mieux les structures anatomiques impliquées dans la dépression. Il s'agit, en particulier, des structures limbiques du cerveau « émotionnel » (voir **Fig. 3** ci-après) : un ensemble de structures corticales et sous-corticales impliquées dans les phénomènes de mémorisation et de régulation des émotions (Soares and Mann 1997; Drevets 2000). Le système limbique joue un rôle d'interface entre l'activité mentale spontanée, l'action dirigée vers un but et les émotions associées. L'atteinte de la boucle limbique est de nature à entraîner une dissociation entre les circuits cognitifs générant l'activité mentale spontanée et les circuits moteurs effecteurs de l'action volontaire.

Fig. 3 : ***Représentation schématique de l'organisation du « cerveau émotionnel ».*** *Adapté de Berton et Nestler (2002).*



Amy = Amygdale
HP = Hippocampe
LC = Locus coeruleus
VTA = Aire Tegmentale Ventrale
DR = Dorsal Raphe
Hyp = Hypothalamus
NAc = Noyau accumbens
FC = Cortex pré-frontal
CC = Cortex cingulaire
Th = Thalamus

L'altération la plus robuste observée chez les patients dépressifs est la diminution du volume du lobe frontal ou de certaines de ses sous-divisions (Krishnan, McDonald *et coll.* 1992; Coffey, Wilkinson *et coll.* 1993; Lai, Payne *et coll.* 2000). Cette diminution serait dépendante de l'âge du patient et de la durée de sa maladie (Elkis, Friedman *et coll.* 1996). Ces observations sont renforcées par une étude de Royall *et coll*. montrant que des patients ayant subi des dommages cérébraux au niveau du lobe frontal présentent des symptômes négatifs comme l'apathie et l'inhibition, compatibles avec ceux observés dans le cadre d'un état dépressif (Royall 1999).

Une réduction de la taille de l'hippocampe chez des patients dépressifs a été décrite à plusieurs reprises [Voir pour revue (Macqueen and Frodl 2010)]. En effet, des travaux montrent que la diminution de la taille de cette structure est reliée à l'intensité des symptômes dépressifs (Vakili, Pillay *et coll.* 2000; Saylam, Ucerler *et coll.* 2006), à la précocité d'apparition du premier épisode dépressif (Lloyd, Ferrier *et coll.* 2004; Hickie, Naismith *et coll.* 2005; Taylor, Steffens *et coll.* 2005), à la résistance aux traitements pharmacologiques (Hsieh, McQuoid *et coll.* 2002; Frodl, Meisenzahl *et coll.* 2004), à la durée totale d'un épisode dépressif (MacQueen, Campbell *et coll.* 2003; Sheline, Gado *et coll.* 2003), ou encore au niveau d'anxiété associé aux troubles dépressifs (Rusch, Abercrombie *et coll.* 2001; MacMillan, Szeszko *et coll.* 2003). Dans des modèles animaux de dépression, une diminution du volume de l'hippocampe a été retrouvée (1) chez des musaraignes soumises à un stress social chronique causé par un conflit de subordination (Czeh, Michaelis *et coll.* 2001), (2) chez des rats soumis à un stress chronique d'immobilisation (Lee, Jarome *et coll.* 2009), ou encore (3) chez des souris subissant une immobilisation forcée 6 jours par semaine durant 4 semaines (Yun, Koike *et coll.* 2010). Enfin, une diminution du volume du noyau caudé, du putamen et de l'amygdale, bien que fréquemment retrouvée, reste controversée (Husain, McDonald *et coll.* 1991; Krishnan, McDonald *et coll.* 1992; Dupont, Jernigan *et coll.* 1995; Bremner, Narayan *et coll.* 2000).

En imagerie fonctionnelle, les anomalies décrites au niveau du système limbique des patients dépressifs sont plus controversées. En effet, une étude de Drevets *et coll*. (Drevets and Raichle 1992) a décrit une augmentation significative du débit sanguin dans une zone s'étendant depuis le cortex préfrontal ventro-latéral gauche jusqu'à la surface du cortex préfrontal médial ainsi que de l'amygdale gauche, chez des patients présentant une dépression familiale. D'autres études ont rapporté une diminution du métabolisme du cortex préfrontal, des ganglions de la base et du gyrus cingulaire antérieur chez des patients dépressifs majeurs (Hurwitz, Clark *et coll.* 1990; Martinot, Hardy *et coll.* 1990; Kumar, Newberg *et coll.* 1993; Ito, Kawashima *et coll.* 1996; Videbech 2000). Cette diminution du métabolisme cérébral semble cependant représenter un marqueur d'état dans la mesure où ces anomalies disparaissent chez les patients répondant aux traitements médicamenteux (Brody, Saxena *et coll.* 1999). De même, Drevets *et coll.* a décrit une augmentation du métabolisme cérébral dans l'hippocampe (Drevets and Raichle 1992).

De l'ensemble de la littérature se dégage un modèle neuroanatomique des troubles de l'humeur, impliquant des atteintes du cortex préfrontal, des ganglions de la base, du thalamus, de l'hypothalamus, de l'hippocampe et de l'amygdale (Drevets 1999; Mayberg 2003). Ces structures sont reliées par deux circuits différents : d'une part, le circuit limbique-thalamique-cortical, qui concerne l'amygdale, le thalamus médio-dorsal et une partie du cortex préfrontal médial et ventral, et d'autre part, le circuit limbique-striatal-pallidal-thalamique qui comprend le striatum, le pallidum ventral, le noyau médiodorsal du thalamus et l'amygdale.

En bref

La dépression se caractérise par un certain nombre d'altérations cérébrales, révélées grâce aux différentes techniques d'imagerie cérébrales, touchant essentiellement « le cerveau émotionnel », c'est-à-dire l'hypothalamus, l'amygdale, l'hippocampe, le striatum et le cortex préfrontal. Ces altérations sont vraisemblablement à l'origine de la majeure partie des symptômes psychiques et somatiques observés lors d'un épisode dépressif.

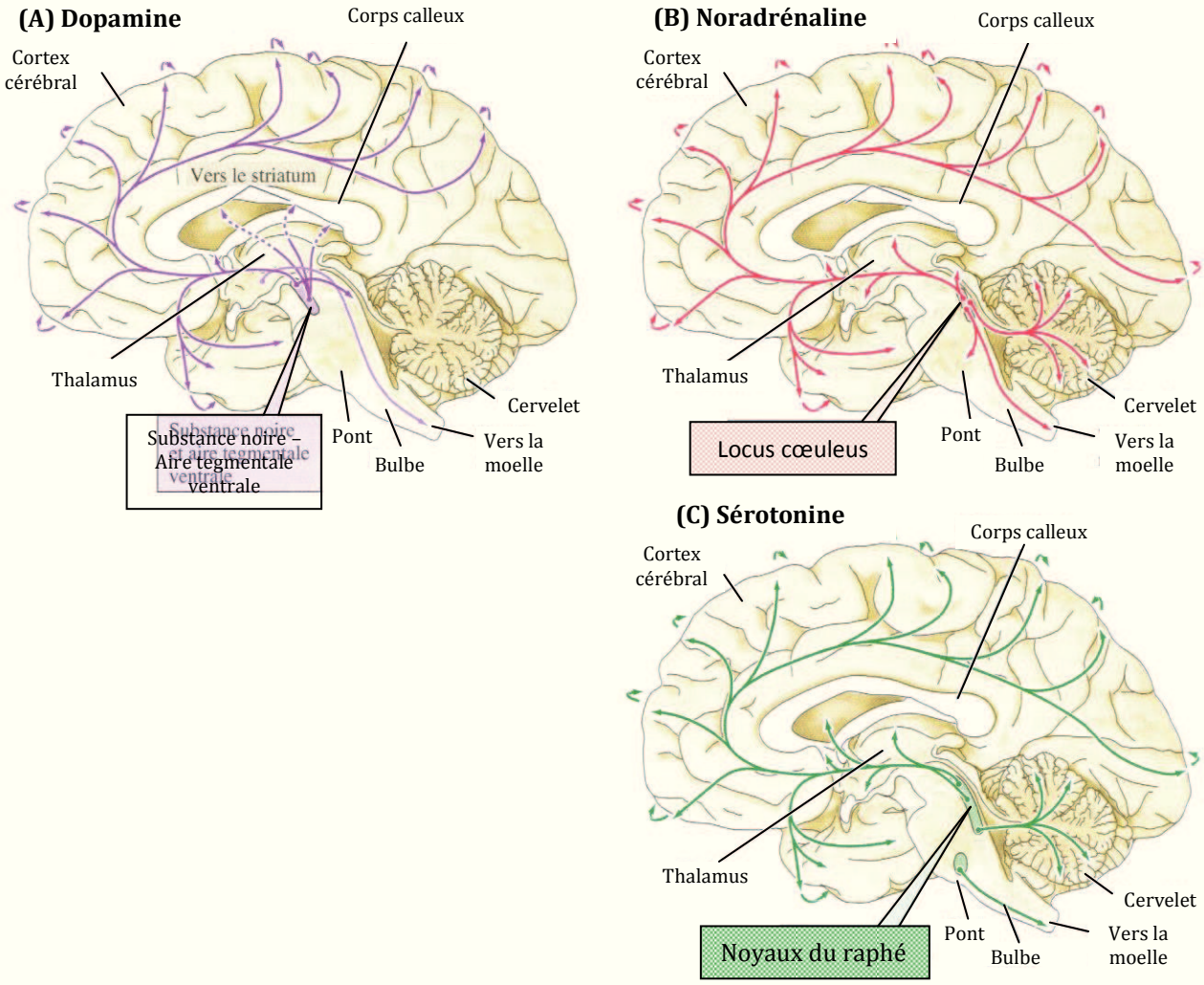
5. Neurobiologie et traitement

A. HYPOTHESE MONOAMINERGIQUE

L'explication de l'étiopathogenèse du trouble dépressif a commencé au milieu du XXème siècle grâce à l'utilisation de la réserpine, un alcaloïde utilisé dans le traitement de l'hypertension artérielle. En effet, l'administration de cette substance produisait une altération de l'humeur et des symptômes dépressifs chez 15% des patients traités, associée à une déplétion de la neurotransmission monoaminergique cérébrale. Ces observations ont abouti à l'hypothèse qu'un déficit monoaminergique pouvait être à l'origine de la dépression. Cette hypothèse allait recevoir un crédit supplémentaire avec la mise en évidence dans les années 1950 des propriétés antidépressives d'inhibiteurs de la monoamine oxydase (IMAO) comme celle de l'isoniazide, un traitement antituberculeux. En effet, les IMAO agissent en réprimant la dégradation oxydative de neurotransmetteurs monoaminergiques comme la 5-HT, la NA et la dopamine (DA). Les effets de ces substances ont d'abord été testés chez des patients atteints de tuberculose, et ont ensuite été étudiés chez des dépressifs non tuberculeux, aboutissant à l'observation que cette substance était efficace dans le traitement de la dépression. A la même époque, une autre molécule s'est révélée capable d'améliorer l'humeur de patients dépressifs. Il s'agissait de l'imipramine, un composé tricyclique capable d'inhiber l'activité des transporteurs de la 5-HT et de la NA suspendant leur

recapture. Puis, au fil des années, l'amélioration de la spécificité des molécules synthétisées a conduit à l'apparition des IMAO sélectifs et réversibles, ainsi qu'à celles des inhibiteurs sélectifs de la recapture de la 5-HT (ISRS) et/ou de la NA (ISRN). Étant donné que les antidépresseurs exercent leurs premiers effets biochimiques en régulant les concentrations extracellulaires en 5-HT, DA et en NA, il a été proposé une neurobiologie propre de la dépression basée sur les systèmes monoaminergiques (Hoes 1982; Leonard 2001). Les corps cellulaires des neurones sérotoninergiques, noradrénergiques et dopaminergiques sont situés très majoritairement au niveau du tronc cérébral respectivement dans les noyaux du raphé, dans le locus cœrelus et dans la substance noire/l'aire tegmentale ventrale (**Fig. 4** ci-après); ils innervent, à partir de leurs fibres ascendantes, une grande partie des structures cérébrales dont les réseaux du circuit limbique, du striatum, et du cortex préfrontal, suggérant qu'ils supportent, au moins en partie, les manifestations comportementales et viscérales des troubles affectifs (Drevets, Frank *et coll.* 2000; Drevets, Thase *et coll.* 2007). Puisque la plupart des antidépresseurs augmentent le niveau des monoamines, en particulier la 5-HT et la NA, au niveau des terminaisons synaptiques notamment par une désensibilisation des autorécepteurs somatodendritiques (Blier and de Montigny 1980; Chaput, de Montigny *et coll.* 1991; Haddjeri, Blier *et coll.* 1998; Haddjeri, de Montigny *et coll.* 1999), un déséquilibre de ces systèmes pourrait effectivement être à la base de l'étiopathogenèse des troubles affectifs alors que la réponse antidépressive serait permise par une augmentation des transmissions monoaminergiques (Haddjeri, Blier *et coll.* 1995). Cependant, la principale « faille » de cette hypothèse est le délai nécessaire aux antidépresseurs ciblant les systèmes monoaminergiques pour reverser efficacement les symptômes dépressifs (de l'ordre de 3 à 4 semaines). En effet, celui-ci indique que ces molécules agissent vraisemblablement par des mécanismes d'adaptation cellulaires et moléculaires nécessitant un délai plus long, comme par exemple l'augmentation de l'expression des récepteurs TrkB du BDNF (Nibuya, Morinobu *et coll.* 1995) ou encore de l'expression des récepteurs aux glucocorticoïdes (Peiffer, Veilleux *et coll.* 1991), plutôt que par un simple mécanisme d'élévation des niveaux de monoamines.

Fig. 4 : ***Distribution des neurones contenant des monoamines (encadrés) et leurs projections (flèches) dans le cerveau humain.*** *D'après Purves (2004).*



B. ALTERATIONS DE L'AXE CORTICOTROPE

Le lien entre dépression et stress sera plus largement détaillé un peu plus loin dans cette introduction. Ici, seront simplement résumées quelques données suggérant que la dépression est fréquemment associée à des altérations neuroendocriniennes, en particulier à une hyperactivité de l'axe HPA et un déficit de son rétrocontrôle négatif (Arborelius *et coll* 1999; Holsboer 2000; Nemeroff 1996; Pariante & Miller 2001). Le niveau des médiateurs de ce système est significativement augmenté dans la dépression, en particulier les glucocorticoïdes (GC). C'est aussi le cas, semble-t-il, du facteur corticotrophe (corticotropin-releasing factor = CRF) synthétisé par l'hypothalamus dont les taux élevés ont été mesurés dans le liquide céphalo-rachidien de patients dépressifs (Nemeroff, Widerlov *et coll.* 1984). D'autres études *post-mortem* renforcent cette hypothèse en montrant que le taux d'ARNm du CRF est augmenté dans le noyau paraventriculaire de l'hypothalamus de patients dépressifs (Raadsheer, van Heerikhuize *et coll.* 1995) ou encore que le nombre de neurones à CRF est y accru (Raadsheer, Hoogendijk *et coll.* 1994). Alors que l'hyperactivité du système corticotrope pourrait tout à fait expliquer les taux élevés de GC plasmatiques, il semblerait qu'un autre mécanisme soit majoritairement impliqué dans ce dysfonctionnement, à savoir la diminution de l'efficacité des mécanismes de contrôle de la synthèse de GC. C'est d'ailleurs une des perturbations biologiques les mieux répliquées dans la dépression : la réduction du rétrocontrôle négatif qu'induisent les GC sur les différentes structures qui constituent l'axe HPA, et donc sur leur propre sécrétion (Zunszain, Anacker *et coll.* 2010).

Il a alors été proposé qu'un dérèglement de l'axe HPA (et plus généralement des circuits impliqués dans la réponse au stress) puisse être à l'origine de la dépression majeure ou tout du moins sous-tendre plusieurs altérations physiologiques et symptômes cliniques (McEwen 1998b; McEwen 2001; Sapolsky 2000; Sapolsky 2003). D'ailleurs, la normalisation de l'axe HPA semble être une condition nécessaire à la rémission clinique. Cependant plusieurs études montrent que ce processus de normalisation n'est pas suffisant pour aboutir à une rémission complète. En effet, Bhagwagar *et coll* ont mesuré le taux de cortisol salivaire chez des patients dépressifs en rémission complète à différents « time points » à partir du réveil (0, 15, 30, 45 et 60 minutes après le réveil) (Bhagwagar, Hafizi *et coll.* 2003). Leurs résultats montrent que la sécrétion de cortisol est plus élevée chez les patients dépressifs en rémission complète que chez des patients témoins non-dépressifs (**Fig. 5** ci-après).

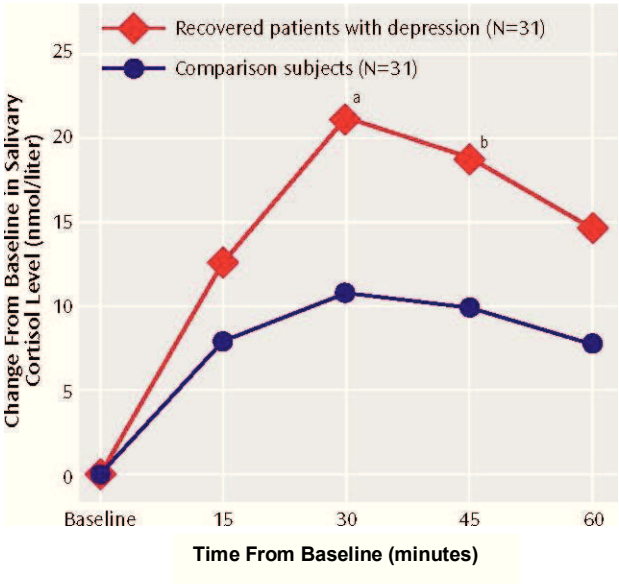


Fig. 5 : Evolution des concentrations salivaires en cortisol au réveil. *D'après Bhagwagar et coll. (2003)*

Ceci suggère que même après rémission, des altérations dans la régulation de l'axe HPA demeurent. Certains auteurs considèrent ainsi que le maintien de ces perturbations est associé à un risque élevé de rechute ou de résistance aux traitements (Hoelsboer 2000). Il semble bien que la perturbation de l'axe HPA soit un mécanisme clé dans l'établissement d'un état dépressif. Plusieurs études chez l'animal ont d'ailleurs confirmé cette hypothèse. Il a en effet été montré que le stress chronique, souvent utilisé dans la modélisation des états dépressifs chez l'animal, atténue le rétrocontrôle négatif que les glucocorticoïdes exercent sur l'activation de l'axe HPA (Mizoguchi, Yuzurihara *et coll.* 2001; Mizoguchi, Ishige *et coll.* 2003). Enfin, des souris déficientes en certains éléments constitutifs de l'axe HPA, comme les récepteurs aux GC, sont parfois utilisés dans l'étude de comportements « dépressive-like » (Tronche, Kellendonk *et coll.* 1999; Gass, Reichardt *et coll.* 2001; Kellendonk, Tronche *et coll.* 2002). En conséquence, cette hypothèse a été à l'origine du développement de nouvelles molécules qui ciblent notamment les neuropeptides de l'axe HPA, comme par exemple des antagonistes des récepteurs au CRF de type 1 (CRF_1) ou ceux de la vasopressine de type 1b (V_{1b}) (Griebel, Simiand *et coll.* 2002; Griebel, Simiand *et coll.* 2002).

C. MODIFICATIONS NEUROIMMUNES

En plus des modifications neuroendocriniennes et neurochimiques reportées chez les patients dépressifs, il semblerait que des altérations des fonctions neuroimmunes aient également un rôle central dans l'étiologie et la physiopathologie des troubles dépressifs. Les principaux arguments en faveur d'une telle hypothèse viennent de la multitude d'études menés chez les patients dépressifs montrant, tout d'abord *in vitro*, que la prolifération lymphocytaire de type B et T, tout comme l'activité des cellules *Natural Killer* (NK) est réduite (Kronfol, Silva *et coll.* 1983; Irwin, Smith *et coll.* 1987). *In vivo*, on observe chez ces patients une activation de la réponse immunitaire à médiation cellulaire associée à une augmentation des concentrations plasmatiques en cytokines inflammatoires : l'IL-1, l'IL-2, le TNF-α et l'IL-6 libérés par les macrophages activés et l'IFN-γ par les

lymphocytes T (Maes 1995; Seidel, Arolt *et coll.* 1995; Frommberger, Bauer *et coll.* 1997; Levine, Barak *et coll.* 1999). Il a également été noté que l'augmentation de la libération de cytokines est corrélée avec la sévérité des symptômes psychiatriques (Maes 1995; Maes 1999). Il semblerait que les caractéristiques de cette activation immune soient sous-tendues par une augmentation du nombre des cellules phagocytaires (Reiche, Morimoto *et coll.* 2005) et par un accroissement des indicateurs sériques d'une activation des cellules immunitaires (PGE, récepteurs de l'IL-2 soluble etc) (Berczi, Bertok *et coll.* 2000). Au niveau cérébral, on observe aussi une augmentation des concentrations en cytokines inflammatoires (IL-1 et IL-6) dans le liquide céphalorachidien des patients (Levine, Barak *et coll.* 1999). Les troubles dépressifs majeurs sont donc caractérisés par des altérations à la fois périphériques et centrales du système immunitaire et plus particulièrement des facteurs régulant les processus d'inflammation.

Un autre ensemble de données cliniques vient étayer le lien entre dépression et altérations neuroimmunes : il s'agit de l'étude des patients atteints de maladies chroniques traités de façon récurrente par des cytokines proinflammatoires de façon à augmenter leurs défenses naturelles contre la maladie. En effet, au début des années 80, des patients atteints de cancer ou d'hépatites furent traités par une immunothérapie qui consistait en des injections de cytokines purifiées (IL-2 et IFN-α). De nombreuses observations ont ensuite fait le lien entre ce type de traitement et l'apparition de pathologies psychiatriques comme la dépression majeure ou des psychoses aigües (Capuron and Ravaud 1999). Ces symptômes dépressifs furent considérés comme la conséquence de ce type de traitement et non pas comme un effet secondaire résultant de la difficulté des patients à faire face à ce type de maladie. En effet, les patients atteints de cancer et traités avec des thérapies non immuno-activatrices (type chimiothérapie ou rayons) ne développaient pas ce type de pathologies psychiatriques. De même, des patients atteints de maladies auto-immunes comme la sclérose en plaque ou la polyarthrite rhumatoïde ont une propension supérieure à développer des épisodes dépressifs (Minden and Schiffer 1990; Marshall 1993).

Ceci est également cohérent avec ce qui est observé chez l'animal. En effet, les modifications neuroendocriniennes et neurochimiques induites par l'action des cytokines sur le SNC sont responsables de la mise en place du « comportement de maladie » dont les symptômes caractéristiques ne sont pas sans rappeler ceux observés communément chez les patients dépressifs, à savoir un retrait social, une diminution de l'appétit, une perte de poids, une baisse de l'activité locomotrice, des troubles de l'apprentissage et de la mémorisation ou encore une perte de la capacité à éprouver du plaisir (anhédonie) (Dunn, Swiergiel *et coll.* 2005). L'ensemble de ces données montre que l'activation du système immunitaire est un marqueur biologique non négligeable de la symptomatologie dépressive et va dans le sens d'une **hypothèse cytokinergique** de la dépression. C'est d'ailleurs ce qu'a proposé Smith en 1991 : une relation de cause à effet entre

l'activation du système immunitaire et la mise en place des troubles dépressifs, qu'il appela « *The Macrophage Theory of Depression* » (Smith 1991).

Toutes ces études montrent que la relation entre cytokines et dépression est complexe et que le lien qui existe entre l'activation du SI et les troubles dépressifs est loin d'être complètement éclairci. D'autres hypothèses ont été émises, et visent à expliquer la relation entre cytokines et dépression au travers de mécanismes biologiques conjoints.

D. HYPOTHESE DE LA NEUROPLASTICITE

La neuroplasticité peut être définie comme l'ensemble des changements organisationnels et structurels des réseaux de neurones dont la principale conséquence est la modification ou la modulation de leur fonction. Nous avons évoqué un peu plus tôt dans cette introduction les différentes anomalies structurales et anatomiques rencontrées dans le cerveau des patients dépressifs. L'idée sous-jacente à l'hypothèse de la neuroplasticité est que ces changements seraient dus à une réorganisation des réseaux de neurones résultant de différents déséquilibres cellulaires et moléculaires. En fait, l'intégrité des réseaux de neurones peut être altérée soit par une diminution du nombre de neurones soit par une baisse de l'arborisation dendritique. De nombreux mécanismes interviennent dans la régulation de ces phénomènes, les plus importants sont la naissance de nouveaux neurones (neurogenèse) et de nouvelles synapses (synaptogenèse), la survie de ces nouveaux neurones et de ces nouvelles connexions, et enfin leur élimination par différents processus de mort cellulaire. Ainsi, l'intégrité des réseaux neuronaux dépendrait de la balance entre tous ces mécanismes. Il existe une multitude de médiateurs impliqués dans la régulation de ces phénomènes de neuroplasticité, tels que les facteurs trophiques (dont le chef de file est le *Brain Derived Neurotrophic Factor* = BDNF) qui favorisent la croissance et la survie des neurones ou encore les composés réactifs de l'oxygène (ROS = *Reactive Oxygen Species*), générateurs de stress oxydant capable de fragiliser le fonctionnement des neurones voire d'induire leur mort par apoptose/nécrose. Ainsi, plusieurs altérations de la neuroplasticité ont pu être mises en évidence dans le cerveau des patients dépressifs tels qu'une diminution de la concentration en BDNF dans l'hippocampe (Chen, Dowlatshahi *et coll.* 2001; Dwivedi, Rizavi *et coll.* 2003; Karege, Bondolfi *et coll.* 2005), ou encore une hausse de l'activité pro-oxydante au niveau du cortex préfrontal (Michel, Frangou *et coll.* 2007; Wang, Shao *et coll.* 2009). Des études précliniques utilisant des modèles animaux de dépression ont également montré qu'un stress chronique pouvait provoquer une réduction de la neurogenèse hippocampique (Gould, Tanapat *et coll.* 1998; Ferragud, Haro *et coll.* 2010), une diminution des projections dendritiques (Magarinos, McEwen *et coll.* 1996) ainsi qu'une réduction de la concentration en BDNF dans l'hippocampe et le cortex frontal (McEwen 1999). Par ailleurs, un traitement par éléctroconvulsivo-thérapie ou un traitement chronique par antidépresseurs ont tous deux démontré leur efficacité à augmenter la

neurogenèse, les concentrations en BDNF ainsi que celles de l'ARNm codant pour son récepteur, le TrkB, dans l'hippocampe (Nibuya, Morinobu *et coll.* 1995; Nibuya, Nestler *et coll.* 1996; Surget, Saxe *et coll.* 2008).

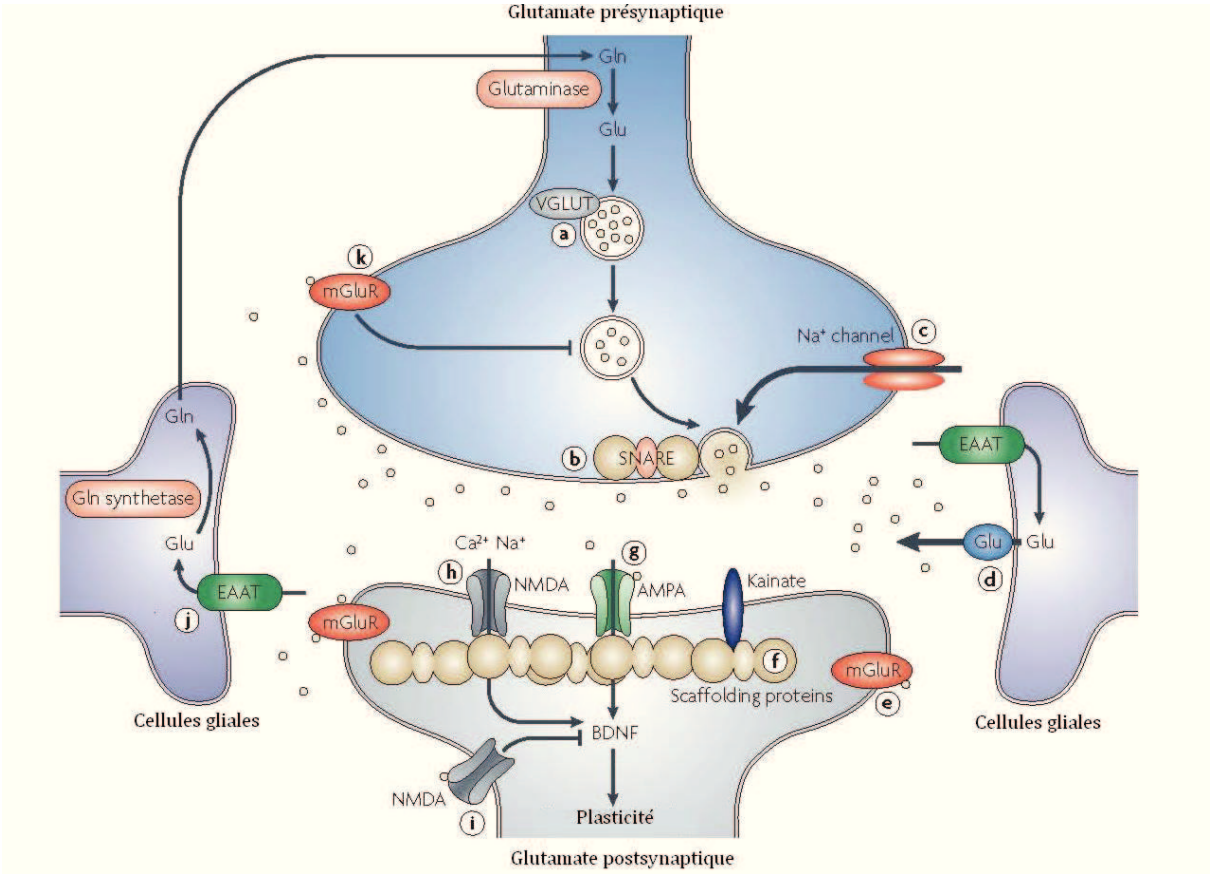
E. ROLE DU GLUTAMATE

Le glutamate (GLU) est le principal acide aminé excitateur du système nerveux central. Il joue un rôle majeur dans le développement cérébral, les processus de migration des neurones, leur différenciation mais aussi dans les mécanismes de survie et de mort neuronale (Hashimoto 2009) (voir **Fig. 6** pour un schéma de la synapse glutamatergique). Un certain nombre de travaux indique que la neurotransmission glutamatergique est perturbée chez les patients dépressifs. Pour être plus précis, il semblerait que la concentration sérique/plasmatique en GLU soit plus élevée chez les patients dépressifs (Kim, Schmid-Burgk *et coll.* 1982; Altamura, Mauri *et coll.* 1993). Plus récemment, des études ont confirmé ces premiers résultats (Mauri, Ferrara *et coll.* 1998; Mitani, Shirayama *et coll.* 2006) et ont également mis en évidence une corrélation positive entre les titres plasmatiques en GLU et la sévérité des symptômes dépressifs mesurée par l'échelle de Hamilton (*Hamilton Depression Rating Scale*) (Mitani, Shirayama *et coll.* 2006). En accord avec ceci, Levine *et coll* (2002) ont montré que les concentrations en GLU du liquide céphalo-rachidien (LCR) des patients dépressifs étaient également augmentées (Levine, Panchalingam *et coll.* 2000). L'ensemble de ces observations suggère ainsi qu'une hyperactivité glutamatergique pourrait constituer un élément important de la physiopathologie des troubles dépressifs. Cette hypothèse semble être confortée par des études menées chez l'Homme en *post mortem* montrant des taux élevés de GLU dans le cortex frontal des patients dépressifs (Hashimoto, Sawa *et coll.* 2007). Cependant, une analyse plus précise montre que les choses ne sont pas aussi simples. En effet, plusieurs études rapportent, au contraire, une diminution des concentrations en GLU dans certaines structures cérébrales en particulier dans le cortex cingulaire antérieur (Auer, Putz *et coll.* 2000; Mirza, Tang *et coll.* 2004; Rosenberg, Mirza *et coll.* 2004; Rosenberg, Macmaster *et coll.* 2005).

D'autres arguments étayent l'hypothèse glutamatergique de la dépression. En effet, de multiples travaux ont mis en évidence des altérations au niveau des différents récepteurs au GLU dans le cerveau des patients dépressifs. C'est notamment le cas pour le récepteur NMDA - tétramère constitué de 2 sous-unités NR_1 et deux sous-unités NR_2 (NR_{2A}, NR_{2B}, NR_{2C} ou NR_{2D}) qui spécifient leurs propriétés éléctrophysiologiques. En effet, il a été montré que les niveaux de sous-unités NR_{2A} et NR_{2B} étaient réduits dans le cortex préfrontal des patients dépressifs majeurs (Feyissa, Chandran *et coll.* 2009) alors que dans l'amygdale, le niveau de NR_{2A} semble être augmenté (Karolewicz, Szebeni *et coll.* 2009). De la même manière, une augmentation de l'expression des récepteurs $mGluR_2$ et $mGluR_3$ a été observée, en *post mortem*, dans le cortex préfrontal de patients dépressifs (Feyissa, Woolverton *et coll.* 2010). D'autres auteurs se sont intéressés aux altérations des

mécanismes de recapture du glutamate - principalement réalisé par les transporteurs astrocytaires EAAT-1 et EAAT-2 (= *Excitatory Amino Acids Transporter*) - chez les patients dépressifs. Ainsi, il a été observé une réduction de l'expression des transporteurs EAAT-1 et EAAT-2 au niveau du cortex préfrontal (Choudary, Molnar *et coll.* 2005). Compte tenu du nombre important d'arguments en faveur de l'implication centrale de la neurotransmission glutamatergique dans la physiopathologie des troubles dépressifs, de nombreuses molécules ciblant les récepteurs métabotropiques/ionotropiques ou encore le transporteur EAAT-2 ont été synthétisées dans le but d'améliorer le traitement des états dépressifs et semblent très prometteuses (voir pour revue Hashimoto et al., 2009).

Fig. 6 : ***Schéma de la synapse glutamatergique et des cibles d'antidépresseurs potentiels.*** *Adapté de Sanacora et coll (2008).*



La neurotransmission glutamatergique est régulée par différents mécanismes. La glutamine (Gln) est convertie en glutamate (GLU) par la glutaminase. GLU est contenu dans des vésicules présynaptiques par le transporteur vésiculaire du Glu (VGLUT) et est relargué dans la fente synaptique via des interactions avec les protéines du système SNARE (*N-ethylmaleimide-sensitive- factor attachment receptor*). GLU est extrait de l'espace extracellulaire par des transporteurs aux acides aminés excitateurs (EAATs = *excitatory amino-acid transporters*), majoritairement présent au niveau des cellules gliales dans lesquelles Glu est transformé en Gln par la Gln synthetase. Plusieurs récepteurs au Glu sont présents tant aux niveaux pré- et post-synaptiques qu'au niveau des cellules gliales. Ceux-ci incluent les récepteurs AMPA (*α-amino-3-hydroxy-5-methyl-4-isoxazole propionic acid*), les récepteurs au NMDA (*N-methyl-D-aspartate*) et au kaïnate, ainsi que les récepteurs métabotropiques mGluRs. L'effet de Glu est déterminé par le sous-type de récepteur auquel il se fixe, la localisation et l'interaction avec des protéines de soutien (*scaffolding proteins*). Les cibles potentielles pour le développement de traitements antidépresseurs sont indiquées en **(a)** modulation de la « charge » des vésicules présynaptiques en GLU, **(b)** modulation de la libération présynaptique de GLU, **(c)** modulation des canaux Na+ qui régulent la libération de GLU, **(d)** modulation de la libération extra-synaptique de GLU, **(e)** modulation au niveau des récepteurs mGluR du groupe 1, **(f)** action au niveau des protéines de soutien, **(g)** modulation au niveau des récepteurs AMPA, **(h)** au niveau des récepteurs NMDA, **(i)** modulation des récepteurs NMDA extra-synaptiques, **(j)** facilitation de la recapture de GLU par les EAATs, **(k)** antagonismes des récepteurs mGluR2/mGluR3. BDNF = *brain-derived neurotrophic factor*.

F. AUTRES HYPOTHESES

a. Les neurokinines

Parmi les autres systèmes physiologiques impliqués dans la neurobiologie de la dépression, on trouve le système neurokininergique. Les neurokinines, appelées aussi tachykynines, comprennent la substance P, la neurokinine A (substance K) et la neurokinine B et agissent respectivement sur les récepteurs NK1, NK2 et NK3. Elles sont présentes dans différentes aires cérébrales riches en monoamines, suggérant un rôle de régulation de ces neuropeptides sur les neurotransmissions monoaminergiques. Le rôle de la substance P comme agent dépressogène a été suggéré par le fait que l'administration chronique d'un antidépresseur réduit les concentrations en substance P dans le striatum, la substance noire et l'amygdale (Shirayama, Mitsushio *et coll.* 1996). Il semblerait que la cible thérapeutique des antagonistes des récepteurs NK1 se situe majoritairement dans l'amygdale, siège important de la régulation de l'humeur (Boyce, Smith *et coll.* 2001). Chez l'Homme, le L-733060, un antagoniste des récepteurs NK1, a une action antidépressive chez des patients atteints de dépression majeure (Kramer, Cutler *et coll.* 1998). Cette activité antidépressive du L-733060 a été retrouvée lors d'une étude préclinique utilisant un paradigme expériemental prédictif de l'efficacité clinique des antidépresseurs, le test de suspension caudale chez la souris (*TST = Tail Suspension Test*) (Varty, Cohen-Williams *et coll.* 2003). Dans la même étude, d'autres antagonistes NK1 ont également montré une activité antidépressive : c'est le cas du L-74294, du CP-99994, du CP-122721 et du MK-869. De plus, il a été récemment démontré, chez des souris n'exprimant pas de manière constitutive le récepteur NK1 (souris KO NK1-/-), que les autorécepteurs 5-HT_{1A} étaient désensibilisés comme après un traitement chronique par ISRS (Froger, Gardier *et coll.* 2001; Santarelli, Gobbi *et coll.* 2001). D'autres composés ciblant les récepteurs NK2 et NK3 (antagonistes) ont été développés et semblent être particulièrement efficaces pour diminuer les symptômes liés au stress dans des modèles animaux d'anxiété et de dépression (Salome, Stemmelin *et coll.* 2006; Louis, Stemmelin *et coll.* 2008; Micale, Tamburella *et coll.* 2008).

b. Le système opioïdergique

Le système des opioïdes endogènes est un important médiateur des réponses émotionnelles et comportementales émises en réponse au stress (Knoll and Carlezon 2010). Il comprend trois familles de neuropeptides : les endorphines, les enképhalines et les dynorphines, qui agissent par l'intermédiaire de trois récepteurs distincts : μ (mu), δ (delta) et κ (kappa), très largement distribués dans le cerveau. L'activation des récepteurs μ et δ a plutôt une action positive sur l'humeur (Filliol, Ghozland *et coll.* 2000; Shippenberg, LeFevour *et coll.* 2008) alors que l'activation

des récepteurs κ a l'effet inverse : elle entraîne une dysphorie chez l'Homme (Pfeiffer, Brantl *et coll.* 1986; Wadenberg 2003) et augmente l'expression de comportements de type dépressif chez l'animal (Bals-Kubik, Ableitner *et coll.* 1993; Mague, Pliakas *et coll.* 2003; Carlezon, Beguin *et coll.* 2006). Chez le rongeur, il a été montré que les agonistes κ induisaient, en particulier, une anhédonie médiée par une diminution de la neurotransmission dopaminergique mésocorticolimbique (Svingos, Colago *et coll.* 1999), avec pour conséquence une baisse d'activité du système de récompense, une altération communément associée à l'anhédonie chez les patients dépressifs (Martin-Soelch 2009). De plus, il a été montré que des rongeurs confrontés à une situation aversive de laquelle ils ne peuvent s'extirper (learned helplessness) présentaient des concentrations élevées en dynorphines (agoniste des récepteurs κ) dans le noyau accumbens (striatum ventral) et dans l'hippocampe (Shirayama, Ishida *et coll.* 2004) et que l'administration intracérébrale d'antagonistes des récepteurs κ permettait de réverser les altérations comportementales induites par ce paradigme (Newton, Thome *et coll.* 2002; Shirayama, Ishida *et coll.* 2004).

c. Les endocannabinoïdes

L'implication du système endocannabinoïde (ECB) dans la neurobiologie des troubles de l'humeur tels que la dépression n'a été mise en évidence qu'assez récemment (Hill and Gorzalka 2005). On compte deux types de récepteurs aux cannabinoïdes (CB) : les CB1 et CB2 dont les ligands endogènes les plus connus, appelés endocannabinoïdes, sont le N-arachidonoylethanolamide (=anandamide, AEA) et le 2-arachidonoylglycerol (=2-AG). Tout comme les récepteurs aux neurokinines, les récepteurs aux CB sont fortement exprimés dans des structures cérébrales dont l'implication dans la régulation des processus cognitifs et émotionnels n'est plus à remettre en question (hippocampe, amygdale, cortex frontal). Ceci suggère d'ores et déjà le rôle potentiel de ce système dans la modulation des états anxieux et dépressifs. Chez l'Homme, l'activation de ce système est connue depuis longtemps pour sa capacité à améliorer l'humeur. Cependant il fallu attendre les années 2000 pour voir émerger un lien direct entre dépression et système ECB (Hill and Gorzalka 2005). Les données les plus démonstratives viennent des travaux réalisés sur des souris KO CB1. En effet, il a été observé que ces souris, lorsqu'elles étaient confrontées à un stress chronique, devenaient anhédonique plus rapidement que leurs congénères non mutantes (Martin, Ledent *et coll.* 2002). Ceci montrait donc que ces animaux étaient plus vulnérables aux effets du stress suggérant ainsi que des altérations du système ECB pouvaient constituer un facteur prédisposant à la survenue d'un épisode dépressif. Ces souris présentaient également des altérations comportementales : elles étaient significativement moins motivées à s'extraire d'une situation aversive (Aso, Ozaita *et coll.* 2008; Steiner, Wanisch *et coll.* 2008). De plus, ces souris KO CB1 présentaient des concentrations plasmatiques en corticostérone plus élevées traduisant une hyperactivité de l'axe HPA, qui est une des principales caractéristiques

des patients dépressifs (Uriguen, Perez-Rial *et coll.* 2004). D'autres travaux ont permis de répliquer ces résultats et ont également observé que ces souris présentaient des déficits cognitifs (Rubino, Vigano *et coll.* 2008) – autre symptôme rencontré chez les patients dépressifs. Toutes ces données ont donc contribué à suggérer une implication du système ECB dans la physiopathologie des troubles dépressifs. Ceci a été confirmé par des travaux précliniques montrant que l'administration systémique aigue d'antagonistes CB1 avait un effet antidépresseur similaire à celui observé avec des antidépresseurs classiques (Griebel, Stemmelin *et coll.* 2005; Takahashi, Katayama *et coll.* 2008). D'autres arguments en faveur de cette hypothèse ont été mis en évidence, tant chez l'Homme que chez l'animal de laboratoire [voir pour revue (Parolaro, Realini *et coll.* 2010)].

En bref

La dépression est une pathologie multifactorielle dont la symptomatologie est associée à des perturbations biologiques telles qu'une activation de l'axe HPA, une dérégulation des systèmes monoaminergiques, des modifications neuroplastiques, des concentrations élevées en cytokines pro-inflammatoires aux niveaux périphérique et central. D'autres systèmes physiologiques semblent également être impliqués de façon importante dans la physiopathologie des troubles dépressifs telles que les transmissions glutamatergique et endocannabinnoide ou encore certains systèmes neuropeptidergiques.

6. *Modèles animaux de dépression*

Il est évident que le concept de dépression tel qu'on le connait correspond à un état pathologique typiquement humain affectant à la fois les sphères affective, émotionnelle et cognitive. La cognition peut être définie comme l'ensemble des processus mentaux permettant d'acquérir, de stocker, de transformer et de recouvrer des informations. La complexité de ces processus mentaux est fonction de la structure et de l'activité biologique du système nerveux central. L'architecture du cerveau varie fortement selon les espèces, le traitement cognitif de l'information peut donc être très différent, en particulier pour les processus dits « supérieurs » que l'on observe de façon spécifique chez l'Homme en raison d'un développement plus important des aires corticales associatives en comparaison aux espèces utilisées en laboratoire pour modéliser les pathologies humaines, à savoir les rongeurs. Ces différences impliquent, par conséquent, qu'à altérations semblables la symptomatologie d'un trouble pourra être différente. Il est donc

important de connaître les processus cognitivo-émotionnels mis en œuvre, tant chez l'Homme que chez l'animal, afin de pouvoir établir un bon modèle de pathologie humaine. Ainsi, il paraît évident que des symptômes tels que le ressassement d'idées noires, l'omniprésence d'un sentiment de culpabilité ou encore l'autodépréciation ne peuvent être modélisés de quelque manière que ce soit chez l'animal. Il ne peut, par conséquent, exister de modèle parfait de dépression. Cependant, l'Homme et l'animal possèdent des caractéristiques bio-comportementales phylogénétiques similaires permettant de mieux appréhender un symptôme, voire un ensemble de symptômes, constituant le syndrome dépressif. Un modèle animal est une situation expérimentale dans laquelle un système simple représente un autre système, plus complexe et moins accessible à la connaissance, impliquant de ce fait un compromis réductionniste. Le modèle animal idéal devrait non seulement avoir les mêmes causes que la pathologie humaine, devrait en reproduire tous les symptômes mais devrait aussi être prédictif de l'activité thérapeutique des médicaments. Ainsi, les modèles animaux doivent obéir si possible à trois critères de validité : un critère de ***validité de construction*** *(« construct validity »*= est-ce que l'étiologie de la pathologie est semblable chez l'Homme et chez l'animal ?*),* une ***validité descriptive*** (« *face validity* » = est-ce que les comportements induits ont des similarités avec la pathologie humaine ? et est-ce que le modèle animal permet d'identifier les mécanismes neurochimiques sous-jacents ?) et enfin une ***validité prédictive*** (« *predictive validity* » = est-ce que le modèle animal permet d'identifier correctement les traitements utilisés, sans faux-positifs, ni faux-négatifs ?) (Willner 1984). Les différents modèles animaux de pathologies humaines peuvent ainsi être classés en fonction du respect de ces trois critères, le but étant bien évidemment d'en respecter le maximum. Cependant, dans le cas de pathologies dont l'étiologie exacte n'est pas complètement élucidée, comme c'est le cas pour la dépression, le respect du critère de validité de construction est difficile.

De façon générale, les modèles animaux peuvent être divisés en plusieurs catégories :

Modèles naturels/spontanés. Symptômes ou conditions présentes naturellement chez les animaux, identiques à des maladies ou affections humaines. Le diabète, l'hypertension, l'arthrite et les déficits immunitaires en sont quelques exemples. Des centaines de souches de rats et de souris été caractérisés et conservés en fonction de certaines caractéristiques héréditaires. Le laboratoire Jackson détient l'une des plus grandes collections de ces modèles animaux chez la souris (http://www.jax.org). On peut également ranger dans cette catégorie les modèles issus d'animaux naturellement résistants à une infection ou une pathologie donnée. En étudiant les causes de cet état, on peut trouver des indices sur les fondements biologiques sous-tendant cette résistance.

Modèles expérimentaux/induits. Modèles chez lesquels les scientifiques induisent expérimentalement une affection ou une maladie. Par exemple, la streptozotocine est une substance chimique qui permet de provoquer le diabète en endommageant les cellules productrices d'insuline du pancréas; il est également possible de produire un certain type de

cancer à l'aide d'un cancérogène chimique ou de déclencher un accident vasculaire cérébral chirurgicalement.

Modèles génétiquement modifiés. Groupe particulier de modèles expérimentaux dont on a manipulé le code génétique pour provoquer la maladie à étudier. Un ADN étranger est inséré dans le génome des animaux, ou bien certains gènes ont été remplacés ou neutralisés (modèles knock-out). Ces modèles permettent l'étude du fondement génétique de certaines maladies, la susceptibilité ou la résistance à celles-ci, etc.

En ce qui concerne les modèles de dépression, il est important de distinguer deux types de modèles. Le premier, pour lequel il est même difficile de parler de « modèle », a plus trait à l'évaluation du phénotype dépressif de l'animal et est d'ailleurs plus utilisé pour des tests de screening de molécules potentiellement antidépressives. Ainsi, on parlera alors plutôt de « test » que de modèle. Ci-dessous, est détaillé le principe des principaux tests utilisés.

A. TESTS D'EVALUATION DU PHENOTYPE DEPRESSIF

a. Test de la nage forcée

Le test de la nage forcée (*forced swim test* = FST) est aussi appelé test de Porsolt, du nom du scientifique qui l'a découvert. Le principe de ce test réside dans sa relation supposée avec un comportement de résignation. Il est mené à la fois chez le rat et chez la souris mais il existe des différences de procédure selon l'espèce utilisée. C'est un test comportemental surtout utilisé pour prédire l'efficacité d'un traitement antidépresseur (Porsolt, Bertin *et coll.* 1977).

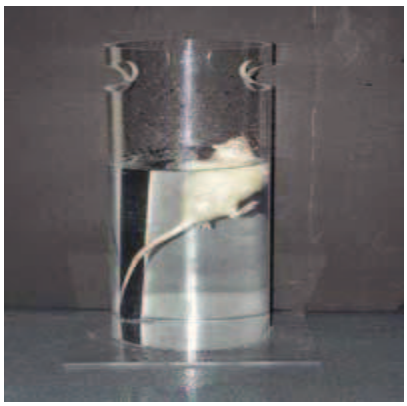


Fig. 7 : ***Test de Porsolt = test de la nage forcée (Force Swim Test: FST).***

Il consiste à placer individuellement des souris dans un récipient circulaire (hauteur = 25 cm, diamètre = 10 cm) contenant 10 cm d'eau maintenue entre 23 et 25°C et à les y laisser durant 6 minutes (voir **Fig. 7**). Après une phase d'activité vigoureuse de deux minutes, l'animal cesse de nager et se fige, adoptant un comportement qualifié de « désespoir ». On considère que la souris est immobile lorsqu'elle flotte en position horizontale et ne réalise que des mouvements de faible

amplitude lui permettant de maintenir sa tête hors de l'eau. Les antidépresseurs administrés 30 minutes avant le début du test diminuent la durée d'immobilité, qui est comptabilisée pendant les 4 dernières minutes. Chez le rat, la procédure de FST diffère de celle décrite ci-dessus. Cette différence vient simplement du fait que l'eau est beaucoup moins aversive pour un rat que pour une souris, puisque faisant partie de son environnement naturel. Ainsi le traitement cognitif de la tâche – et par conséquent, les réponses comportementales exprimées – pourront être différentes chez ces deux espèces de rongeurs. En effet, chez le rat, le test se déroule en deux phases : le pré-test et le test, séparés de 24h. Lors du pré-test, le rat est placé dans un cylindre rempli d'eau durant 15 minutes. À la fin de la session, l'animal, comprenant qu'il n'y a aucune issue possible, adopte un comportement d'immobilité. Le jour suivant, l'animal est replongé dans le cylindre pendant seulement 5 minutes, période durant laquelle la durée de l'immobilité est relevée. Un traitement antidépresseur efficace diminuera le temps d'immobilité lors de la phase de test (Porsolt, Anton *et coll.* 1978; Porsolt, Deniel *et coll.* 1979). Plus tard, des améliorations furent apportées à ce test grâce à la mesure de plusieurs patterns comportementaux émis par l'animal au cours du test. Il s'agit des comportements de nage (*swimming*) et d'escalade (*climbing*), directement impliqués dans la diminution de l'immobilité observée après administration d'un traitement antidépresseur. Au moyen de ces nouvelles procédures, il a été montré que les inhibiteurs de recapture de la NA réduisaient l'immobilité en augmentant l'expression du *climbing* alors que les inhibiteurs de recapture de la 5-HT la réduisent en augmentant le comportement de *swimming* (Detke, Rickels *et coll.* 1995). Ainsi, le test de Porsolt a une bonne validité prédictive (cependant limitée car l'efficacité des antidépresseurs est démontrée après une administration aigue du produit ce qui n'est pas le cas chez l'Homme), une faible validité descriptive et une faible validité de construction.

b. Test de suspension caudale

Le test de suspension caudale – *tail suspension test* (TST) – est semblable au FST. Dans ce test, l'animal (rat ou souris), suspendu par la queue, tente activement de s'extraire de la situation aversive jusqu'à ce qu'il adopte un comportement d'immobilité qualifié de « comportement de résignation » (voir **Fig. 8**). Tout comme le FST, le TST dure 6 minutes, mais l'évaluation de la durée d'immobilité, qui est le seul paramètre utilisé dans ce test, n'est mesurée que lors des 4 dernières minutes de test (Steru, Chermat *et coll.* 1985). L'avantage de ce test par rapport au FST vient du fait que l'immobilité peut être mesurée objectivement grâce à des versions automatisées du test qui relèvent à la fois la durée de l'immobilité mais aussi la puissance des mouvements de l'animal (Steru, Chermat *et coll.* 1987). Certains auteurs s'accordent à préférer ce paradigme car il serait moins « stressant » en comparaison au stress généré par le FST chez la souris. Tout comme le FST il possède une bonne validité prédictive mais limitée pour les mêmes raisons que celles mentionnées ci-dessus, une faible validité descriptive et une faible validité de construction.



Fig. 8 : ***Test de suspension caudale (tail suspension test: TST)***

c. Test de préférence au sucrose

Un symptôme caractéristique des troubles dépressifs est l'incapacité, ou tout du moins la diminution de la capacité, à éprouver du plaisir dans des situations ordinaires. Il semble donc important, dans l'objectif de modéliser la dépression, de pouvoir reproduire ce symptôme chez le rongeur. C'est ce qu'a réalisé Paul Willner en validant ce test comme « détecteur » d'un comportement mimant la dépression chez le rat. Le principe est assez simple et est basé sur la préférence qu'ont les rongeurs, tout comme les Hommes, à préférer les aliments/boissons ayant un goût sucré.



Fig. 9 : ***Test de préférence au sucrose.***

Dans leurs cages, les animaux peuvent accéder à deux bouteilles contenant de l'eau pour l'une et pour la seconde une solution sucrée (saccharose) (**Fig. 9**). Willner *et coll.* montre ainsi qu'après un stress chronique, la consommation de solution sucrée diminue significativement et en déduit donc qu'il s'agit là d'une baisse de la préférence au sucrose (Papp, Willner *et coll.* 1991; Willner, Muscat *et coll.* 1992). Ce test a une meilleure validité prédictive que les deux tests précédents car

l'administration chronique, mais pas aiguë, d'antidépresseurs permet de reverser la baisse de consommation induite par le stress. Cependant, il peut se révéler conceptuellement délicat dans son interprétation et sa mise en place (Weiss 1997). De plus, sa réplication semble problématique et surtout la consommation totale de saccharose plutôt que la préférence semble être la mesure la plus fiable ce qui pose problème en tant que mesure d'anhédonie. Un autre problème de taille est que la réduction de cette consommation lors d'un stress chronique pourrait être associée à un effet aigu et non spécifique des stresseurs individuels plutôt qu'à un état « dépression-like » étant donné que cette consommation revient à des niveaux normaux dès la fin de la procédure de stress chronique (Pothion, Bizot *et coll.* 2004). De plus, l'utilisation du saccharose en tant que composé appétant est fortement remise en question compte tenu de sa valeur calorique susceptible d'interférer avec la valence hédonique liée à son goût (de Araujo, Oliveira-Maia *et coll.* 2008).

d. Autres tests d'évaluation du phénotype dépressif

D'autres tests sont couramment utilisés pour évaluer le phénotype dépressif chez les animaux de laboratoire. L'idée est d'évaluer différents *patterns* comportementaux tels que l'anxiété liée à la nouveauté, les relations sociales entre individus (réactions d'agression ; exploration du congénère) ou encore l'évolution des comportements autocentrés. Il est maintenant clairement admis que la symptomatologie des états dépressifs peut varier en fonction de leur étiologie mais aussi en fonction des individus : certaines formes induiront majoritairement des perturbations émotionnelles de type anxiété alors que d'autres affecteront de façon plus importante d'autres aspects du comportement. C'est pourquoi il est nécessaire d'avoir à disposition des tests évaluant ces différents aspects pathologiques des troubles dépressifs.

Le « Novelty Suppression of Feeding » (NSF) test.

Dans ce test, l'animal est préalablement privé de nourriture et placé dans un dispositif de type open-field carré, au milieu duquel est placée une croquette (**Fig. 10**). Ce test est basé sur un conflit motivationnel entre l'envie de manger la nourriture et la peur de la nouveauté ainsi que sur la peur de s'aventurer au centre de l'arène. La latence mise à consommer la croquette est enregistrée au cours des 3 minutes suivantes. Ce test a d'abord été développé comme test d'anxiété (Soubrie et coll 1975), les anxiolytiques peuvent d'ailleurs induire un changement dans le comportement des rongeurs dans ce test. Toutefois, il a été montré que ce paradigme permettait de mettre en évidence les effets d'un traitement chronique, mais pas aigu, par un antidépresseur (Merali, Levac *et coll.* 2003). C'est pourquoi il est fréquemment utilisé dans l'évaluation des propriétés antidépressives de molécules. Il s'agit pourtant plus probablement de l'effet anxiolytique des antidépresseurs. Un exemple de dispositif est présenté ci-après (**Fig. 10**).



Fig. 10 : ***Le « Novelty Suppression of Feeding » (NSF) test.***

Le resident/intruder test (RIT)

L'irritabilité semble constituer un facteur de risque pour la survenue d'épisodes dépressifs (Nespor and Scheansova 2008). Elle fait également partie de la symptomatologie dépressive (Riley, Treiber *et coll.* 1989; Perlis, Fraguas *et coll.* 2005; Keilp, Gorlyn *et coll.* 2006; Fraguas, Iosifescu *et coll.* 2007). L'étude des comportements agressifs chez l'animal pourrait, par conséquent, permettre de modéliser ces altérations cliniques et ainsi permettre d'évaluer l'effet antidépresseur de molécules. C'est dans ce but qu'a été utilisé le « *Resident-Intruder Test* ». Par nature, les souris mâles sont des animaux hautement territoriaux. Face à un intrus, elles vont répondre de façon agressive pour défendre leur territoire (Miczek, Maxson *et coll.* 2001; Malkesman, Pine *et coll.* 2009). Le principe du test est donc de placer un animal (l'intrus) dans la cage d'un autre individu (le résident). Sont ensuite relevés différents paramètres permettant de caractériser l'état d'agressivité du résident : la latence, la durée et la fréquence d'attaque. Ainsi, il a été montré, non seulement que le stress chronique imprédictible – un modèle de dépression induite par le stress chronique - augmentait l'agressivité des résidents mais aussi que les antidépresseurs tels l'imipramine et la fluoxétine étaient capables de réverser ces altérations comportementales (Yalcin, Coubard *et coll.* 2008; Ibarguen-Vargas, Surget *et coll.* 2009; Mutlu, Ulak *et coll.* 2009). D'autres travaux précliniques ont montré que l'effet « antidépresseur » de certaines molécules pouvait être mis en évidence chez des individus non-stressés grâce à ce test (Rosenzweig-Lipson, Sabb *et coll.* 2007; Beyer, Lin *et coll.* 2009).

B. LES MODELES LIES A L'ETIOLOGIE DE LA DEPRESSION

Comme nous l'avons exposé un peu plus tôt dans l'introduction, l'étiologie des troubles dépressifs est multifactorielle : elle résulte vraisemblablement de la combinaison de plusieurs facteurs de prédisposition : génétiques, développementaux et environnementaux. Sur la base d'une implication plus ou moins importante de ces facteurs étiologiques, divers paradigmes ont été développés dans le but de modéliser la dépression chez l'animal.

a. Les modèles basés sur la vulnérabilité génétique

L'expression d'un comportement peut être expliquée, en partie tout du moins, par les gènes. Ainsi, il a été proposé que la modification d'un ou plusieurs gènes puisse permettre de mieux comprendre les bases neurales des comportements dépressifs. C'est dans ce but qu'ont été développés plus de 80 lignées de souris génétiquement modifiées constituants chacune un « modèle » de trouble dépressif. Bien souvent, ces lignées mutantes sont créées à partir des données existant dans la littérature qui mettent en évidence l'implication d'un récepteur particulier ou bien d'une protéine dans la physiopathologie du trouble étudié. Par exemple, il a été montré que des souris dont le gène du transporteur de la NA a été inactivé (souris NETKO) sont résistantes aux altérations comportementales et biochimiques induites par le stress chronique (Xu, Gainetdinov *et coll.* 2000; Haenisch, Bilkei-Gorzo *et coll.* 2009). Avoir recours à ce genre de « modèles » est donc d'un intérêt particulier pour mieux comprendre quels sont les facteurs génétiques d'importance intervenant dans la survenue des troubles dépressifs. Ces techniques d'invalidation/modification de gènes jouent également un rôle central dans le développement de nouveaux traitements thérapeutiques. En effet, l'induction de plusieurs mutations ponctuelles au niveau des gènes codant pour des sous-unités du récepteur $GABA_A$ a permis de développer de nouvelles molécules anxiolytiques ciblant spécifiquement certaines sous-unités, permettant ainsi de réduire les effets secondaires du traitement (Rudolph and Mohler 2004).

b. Les modèles basés sur la vulnérabilité développementale

Il semble qu'il y ait, au cours du développement cérébral, des périodes spécifiques durant lesquelles les conséquences d'une exposition répétée à des facteurs de stress revêtent une importance particulière pour le développement normal. C'est le cas en particulier pour les périodes pré- et post-natales. En effet, des facteurs non-génétiques peuvent agir dès la période fœtale et ainsi modifier de façon permanente l'organisation des systèmes physiologiques, en particulier des systèmes de réponse au stress. C'est ce qu'on appelle la « programmation prénatale » (Barker, Gluckman *et coll.* 1993). Ainsi, des contraintes environnementales agissant sur la mère, telles qu'une malnutrition, une exposition chronique aux glucocorticoïdes ou encore une hyperinsulinémie résultant d'un diabète de grossesse sont susceptibles d'engendrer chez le fœtus des modifications biochimiques, métaboliques et comportementales à plus ou moins long terme avec pour conséquence une propension plus élevée à développer des troubles cardio-vasculaires, métaboliques ou neuropsychiatriques (Heim and Nemeroff 1999; Seckl and Holmes 2007; O'Regan, Kenyon *et coll.* 2008; Van Lieshout and Voruganti 2008). Ces altérations sont modélisées chez l'animal en confrontant des mères gestantes (rates/souris) à différents types de stresseurs tels que des chocs électriques répétés (Takahashi and Kalin 1991), des bruits (Fride and Weinstock 1984),

des injections répétées de NaCl (Peters 1982) ou encore une immobilisation répétée (Ward and Weisz 1984). On retrouve chez les animaux ayant été confrontés au stress prénatal des altérations biochimiques couramment observées chez les patients dépressifs telles qu'une hypercortisolémie (Koehl, Barbazanges *et coll.* 1997; Vallee, MacCari *et coll.* 1999), une altération du rétrocontrôle négatif régulant la libération de cortisol (Maccari, Piazza *et coll.* 1995), une perturbation du cycle circadien (Koehl, Darnaudery *et coll.* 1999) ainsi qu'une augmentation de l'activité des systèmes de réponse au stress (Weinstock, Poltyrev *et coll.* 1998). Une administration chronique d'imipramine, de fluoxétine, de mirtazapine et de tianeptine semble contrecarrer la plupart des effets bio-comportementaux induits par le stress prénatal (Morley-Fletcher, Darnaudery *et coll.* 2004; Szymanska, Budziszewska *et coll.* 2009).

L'environnement post-natal semble tout aussi important en termes de « programmation affective » puisqu'il a été montré à plusieurs reprises que des traumatismes vécus durant l'enfance (malnutrition, perte d'un parent, abus physiques ou sexuels etc) augmentent significativement le risque de développer des désordres neuropsychiatriques à l'âge adulte (McCauley, Kern *et coll.* 1997; Agid, Shapira *et coll.* 1999; Kendler, Kuhn *et coll.* 2004). Sur la base de ces observations, plusieurs modèles précliniques ont été mis en place afin de pouvoir évaluer de façon plus détaillée les mécanismes impliqués dans l'étiologie et la physiopathologie des troubles dépressifs. Ainsi, un des modèles largement utilisés est le modèle de « séparation maternelle » dont le but est de diminuer les soins apportés par la mère aux nouveau-nés. De cette façon, il a été montré chez le rat que ce paradigme entraîne des changements neurobiologiques importants chez les nouveau-nés, en particulier au niveau des systèmes de réponse au stress avec des concentrations plasmatiques élevées d'ACTH et de corticostérone (Lippmann, Bress *et coll.* 2007) mais aussi au niveau du système immunitaire avec une hausse des concentrations circulantes en TNFα et IFNγ (O'Mahony, Marchesi *et coll.* 2009). De la même manière il a été montré qu'une exposition prolongée au stress (simulée par l'administration intracérébrale de CRH) durant la période post-natale entraînait des altérations bio-comportementales reversées par l'administration chronique, à l'âge adulte, d'imipramine (Kolber, Boyle *et coll.* 2010). D'autres travaux ont également montré la capacité de ce modèle à induire l'expression de comportements de type anxio-dépressifs chez l'animal (Aisa, Tordera *et coll.* 2008; Marco, Adriani *et coll.* 2009).

Le fait que les altérations biochimiques et comportementales observées chez les animaux confrontés à ces paradigmes soient également observées chez les patients dépressifs confère aux modèles de stress pré- et post-natal une validité descriptive et de construction beaucoup plus importante que les modèles présentés précédemment, car ils donnent des indices sur les facteurs étiologiques ou, tout du moins, prédisposant à l'apparition du syndrome dépressif.

c. Les modèles basés sur la vulnérabilité environnementale

La résignation acquise (learned helplessness)

Ce test fait référence à un concept introduit par Martin Seligman dans les années 70 désignant la passivité inappropriée et la réduction des efforts déployés pour échapper à une situation aversive. Initialement, Seligman et ses collaborateurs ont observé que les chiens ayant reçu dans une situation des chocs électriques qu'ils ne pouvaient éviter ou fuir, transféraient leur état de résignation à une deuxième situation où les chocs étaient évitables (Overmier and Seligman 1967). Seligman explique ce phénomène de « résignation acquise » par un phénomène d'apprentissage : l'animal apprend que son comportement ne modifie pas l'issue de la situation. Le fait de s'attendre à ce que les événements soient indépendants de la réaction de l'organisme a alors des incidences motivationnelles, cognitives et affectives : (1) les événements incontrôlables diminuent la motivation de l'organisme et l'empêchent de manifester d'autres comportements susceptibles d'agir sur les événements en question. (2) En raison de l'inévitabilité des événements précédents, l'organisme éprouve de la difficulté à apprendre que son comportement peut avoir un effet sur d'autres événements. (3) Les expériences répétées de ces événements incontrôlables provoquent finalement un état affectif semblable à celui de la dépression chez l'être humain. En 1975, ce test a été adapté chez le rat (Seligman, Rosellini *et coll.* 1975) et plus tard chez la souris (Anisman, Irwin *et coll.* 1979; Chourbaji, Zacher *et coll.* 2005; Chourbaji, Pfeiffer *et coll.* 2010) avec des résultats aussi probants que chez le chien. Les études menées chez les rongeurs ont montré qu'un traitement chronique ou sub-chronique avec différents antidépresseurs est capable de réverser les déficits comportementaux induits par ce paradigme (Martin, Soubrie *et coll.* 1990), conférant ainsi à ce modèle une assez bonne validité prédictive. Cependant, certains anxiolytiques se sont avérés être tout aussi efficaces à réverser les altérations induites (Cryan and Mombereau 2004). Ce qui rend ce paradigme particulièrement intéressant, c'est le fait que l'altération principale résultant de l'installation de l'état de résignation est intimement lié au concept de motivation. Or la perte de motivation et d'intérêt pour le monde environnant est un des symptômes clés définissant les pathologies dépressives. Cependant, contrairement à la perte de motivation « chronique » observée chez les dépressifs, le déficit motivationnel induit dans ce modèle a tendance à s'estomper après l'arrêt du stress.

Le stress chronique léger imprédictible (UCMS=Unpredictable Chronic Mild Stress)

Comme nous avons pu le constater précédemment, le stress constitue un important facteur étiologique, prédisposant à la survenue d'épisodes dépressifs. Nous avons vu que l'on pouvait modéliser certains symptômes dépressifs chez l'animal en confrontant des animaux à des situations « stressantes » au cours du développement. Il en est de même à l'âge adulte. En effet, chez l'Homme, plusieurs études ont mis en évidence un lien entre l'exposition plus ou moins

chronique au stress à l'âge adulte et l'apparition des troubles dépressifs. En effet, Kendler *et coll*. a montré que le nombre d'événements stressants vécus par un individu est positivement corrélé à la survenue d'un épisode dépressif (Kendler, Kessler *et coll.* 1995). Sans même parler de pathologie dépressive, une exposition prolongée au stress peut entraîner un certain nombre de désordres psychoaffectifs, cognitifs et psychomoteurs couramment observés au cours des troubles dépressifs.

Ainsi, le modèle UCMS tente de reproduire dans un modèle animal les effets du stress dans l'apparition des troubles dépressifs. L'utilisation chronique pendant plusieurs semaines de stresseurs psychosociaux et environnementaux d'intensité faible, et le fait que l'efficacité du modèle dépende plus de la chronicité et de l'imprédictibilité des stresseurs que de leurs caractéristiques individuelles, confèrent à l'UCMS une forte validité de construction. L'UCMS induit des altérations comportementales, neuroplastiques, neuroendocrines, neurochimiques et moléculaires persistantes qui ressemblent à celles observées chez les sujets dépressifs. De plus, ces altérations peuvent être reversées par un traitement chronique aux antidépresseurs (Willner, Muscat *et coll.* 1992; Willner 1997). Ces observations sont capitales car elles soulignent l'idée que ce modèle induit un état « dépression-like » avec un large *pattern* d'altérations alors que la plupart des autres paradigmes n'utilisent en général qu'une seule mesure. L'UCMS, et plus généralement les modèles de stress chronique, sont donc des modèles vraisemblablement plus appropriés quand il s'agit d'étudier précisément les mécanismes neurobiologiques liés à la pathophysiologie et au traitement de la dépression.

Par contre, ce modèle possède aussi quelques inconvénients. Tout d'abord, il s'agit d'une procédure lourde et contraignante, difficile à mettre en place dans un laboratoire. Ensuite, les résultats divergent parfois d'un laboratoire à un autre, voire même d'un protocole à l'autre. Néanmoins, bien que l'origine de ces différences ne soit pas très bien comprise, les procédures d'UCMS varient souvent en terme de durée, de stresseurs et de leur combinaison, de l'imprédictibilité, de l'espèce et des lignées utilisées, des traitements et des mesures, ce qui pourrait rendre compte des différences observées au moins en partie. Ainsi, une meilleure standardisation de la procédure pourrait probablement atténuer ces variations. En tout cas, en dépit de ces inconvénients, les caractéristiques uniques de l'UCMS lui permettent de résoudre des questions qui ne seraient pas accessibles par d'autres approches.

Enfin, il faut savoir que d'autres modèles ont une base conceptuelle proche de l'UCMS et partagent quelques caractéristiques essentielles (chronicité, type de stresseurs) comme par exemple le modèle psychosocial basé sur la défaite sociale chez la souris (Berton, McClung *et coll.* 2006) ou chez le toupaye commun (*Tupaia glis* = sorte d'écureuil) (Fuchs and Flugge 2002). Néanmoins, ils sont souvent basés sur une seule mesure qui est l'évitement du congénère.

C. LES AUTRES MODELES

Parmi les autres modèles de dépression, l'on trouve des modèles « pharmacologiques » tels que l'antagonisme des effets réserpiniques qui fut l'un des premiers à être découvert (Costa, Garattini *et coll.* 1960). Ce modèle était basé sur le fait que la réserpine (2,5 mg/kg ; i.p.) est capable d'induire un syndrome dépressif chez l'Homme (Goodwin and Bunney 1971). Chez l'animal, la principale altération est une hypomobilité. La réserpine déplète les stocks de 5-HT, NA et DA en se fixant au niveau des vésicules de stockage des différents neurotransmetteurs, mimant le déficit monoaminergique couramment rencontré chez les patients dépressifs. Les antidépresseurs semblent atténuer les symptômes induits par la réserpine, cependant, l'absence de spécificité du test et, de surcroît, la présence de faux positifs ont fait qu'il a été abandonné (Willner 1984).

Un autre modèle (déficit induit par lésion) consiste à léser le bulbe olfactif de rongeurs : c'est le modèle de bulbectomie olfactive. L'anosmie qui en résulte entraîne des modifications comportementales telles qu'une hyperactivité, une augmentation des taux de corticostérone circulants, une diminution de l'apprentissage d'un évitement passif, ou encore de l'agressivité (Cairncross, Cox *et coll.* 1977; Cairncross, Wren *et coll.* 1977). Ces comportements sont assimilés à des comportements de type dépressif et reversés par un traitement antidépresseur (Cairncross, Cox *et coll.* 1977).

En bref

Il existe de nombreux modèles animaux de pathologies humaines dont certains permettent d'étudier l'étiologie et la physiopathologie des troubles alors que d'autres sont plutôt destinés à évaluer l'efficacité des traitements. Ces modèles doivent remplir certains critères de validité. En ce qui concerne les troubles dépressifs, il ne peut exister de modèle idéal compte tenu de l'importante part subjective des symptômes. Le stress constituant un des principaux facteurs précipitant l'apparition des troubles, il semble que les modèles basés sur l'exposition récurrente à des stresseurs soient les plus adaptés à l'étude et à la compréhension des altérations bio-comportementales sous-jacentes aux troubles dépressifs.

II. LE SYSTEME DE REPONSE AU STRESS

1. *Définition du concept de stress*

Le terme « *stress* » a été introduit en premier lieu par Hans Selye en 1926. Lors de ses études médicales à l'université de Prague, il remarqua que les individus qui souffraient de maladies diverses et variées semblaient présenter un certain nombre de symptômes communs incluant la perte d'appétit, une diminution de la force musculaire, une pression artérielle élevée, et une diminution de la motivation (Selye 1974). Le fait que ces symptômes apparaissaient indépendamment de la nature du trouble somatique poussa Selye à appeler cette condition « l'état de maladie » (« *the syndrome of just being sick* ») (Selye 1956). Par la suite, il utilisa le terme « stress » pour décrire de façon simple « l'usure » de l'organisme causée par l'ensemble des processus physiologiques et psychologiques mis en œuvre pour s'adapter à un événement donné. En ces termes, le « stress » est perçu comme une réponse, alors que dans son utilisation originelle (en sciences physiques), le mot « stress » fait référence à un stimulus. Selye utilisa alors le terme « stresseur » en tant qu'élément causal et le terme « stress » en tant que réponse. Dans la suite du manuscrit, le terme « stress » sera utilisé en tant que référence au phénomène nécessitant une mobilisation des ressources de l'organisme permettant l'adaptation. Le terme « stresseur » sera alors utilisé pour évoquer les facteurs qui engendrent la réponse au stress. Ceux-ci peuvent être rangés en deux catégories : les stresseurs psychogéniques et biogéniques.

Les premiers englobent l'ensemble des événements environnementaux, réels ou imaginaires, capables d'induire le système de réponse au stress non pas de façon directe (biologique) mais par l'intermédiaire d'une appréciation cognitivo-affective. Ainsi, les conséquences de la confrontation à un stresseur psychogénique seront différentes d'un individu à l'autre puisque l'interprétation cognitive et la valence émotionnelle donnée à la situation varieront d'un individu à l'autre. Ces processus d'interprétation font intervenir des éléments tels que la personnalité ou encore le statut social.

Les stresseurs biogéniques, au contraire, initient de façon directe la réponse au stress car ils ne requièrent pas d'évaluation cognitive ou émotionnelle pour déterminer l'importance du stresseur : c'est le cas par exemple de certaines substances comme la caféine, l'amphétamine, la cocaïne, la nicotine, la théobromine, la yohimbine etc. Il s'agit d'une initiation « biologique » du système de réponse au stress aboutissant à une élévation de l'éveil comportemental médiée par l'activation de la branche sympathique du système nerveux autonome.

Ainsi, d'après la tradition « Selyéenne », le stress est donc la réponse physiologique mise en place par l'organisme pour répondre aux demandes de l'environnement dans un but ultime : s'y adapter. D'autres auteurs comme George Everly ont étendu ce concept à un mécanisme de médiation physiologique faisant le lien entre un stresseur et ses effets sur des organes cibles

(Everly 1985). La réponse au stress en tant que telle peut être caractérisée par une constellation de mécanismes physiologiques que l'on peut regrouper en 3 catégories : les réponses neurologique, neuroendocrinienne, et endocrinienne, dont les mécanismes seront détaillés dans les paragraphes suivants. La plupart du temps le mot « stress » a plutôt une connotation négative. Cependant, il est important de garder à l'esprit qu'initialement, la réponse au stress est une réponse physiologique qui permet l'adaptation faisant intervenir des mécanismes de préservation innés qui, au regard de l'évolution, permettent aux organismes d'endurer les challenges environnementaux afin de survivre. Selye utilisa le mot « eustress » (du grec « eu » signifiant « bon ») pour caractériser ce concept. A l'inverse, ce que Selye appela « distress » correspond à une réponse excessive et donc inadaptée, susceptible de mener à diverses pathologies. Ainsi, le lien entre stress et bien-être peut être modélisé par une courbe en cloche : le stress étant positivement corrélé au bien-être dans un premier temps (eustress), puis s'il devient excessif, la corrélation s'inverse et a tendance à plonger l'individu dans la pathologie (distress) (**Fig. 11** ci-dessous).

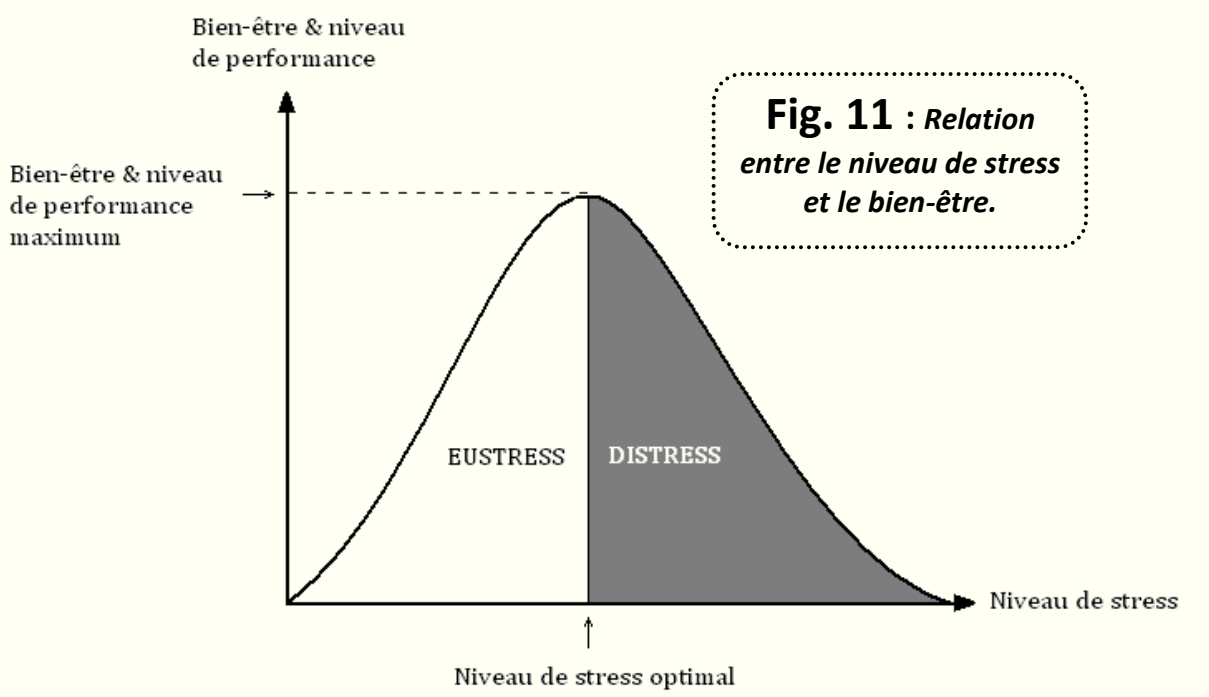


Fig. 11 : ***Relation entre le niveau de stress et le bien-être.***

Le niveau optimal de stress varie en fonction des individus et dépend des caractéristiques génétiques, biologiques, mais aussi de facteurs physiologiques et comportementaux acquis au cours du développement et de la vie adulte. L'ensemble de ces paramètres va faire qu'un individu sera vulnérable ou au contraire résilient à développer une pathologie somatique, qui concerne le corps, ou bien psychiatrique.

En bref

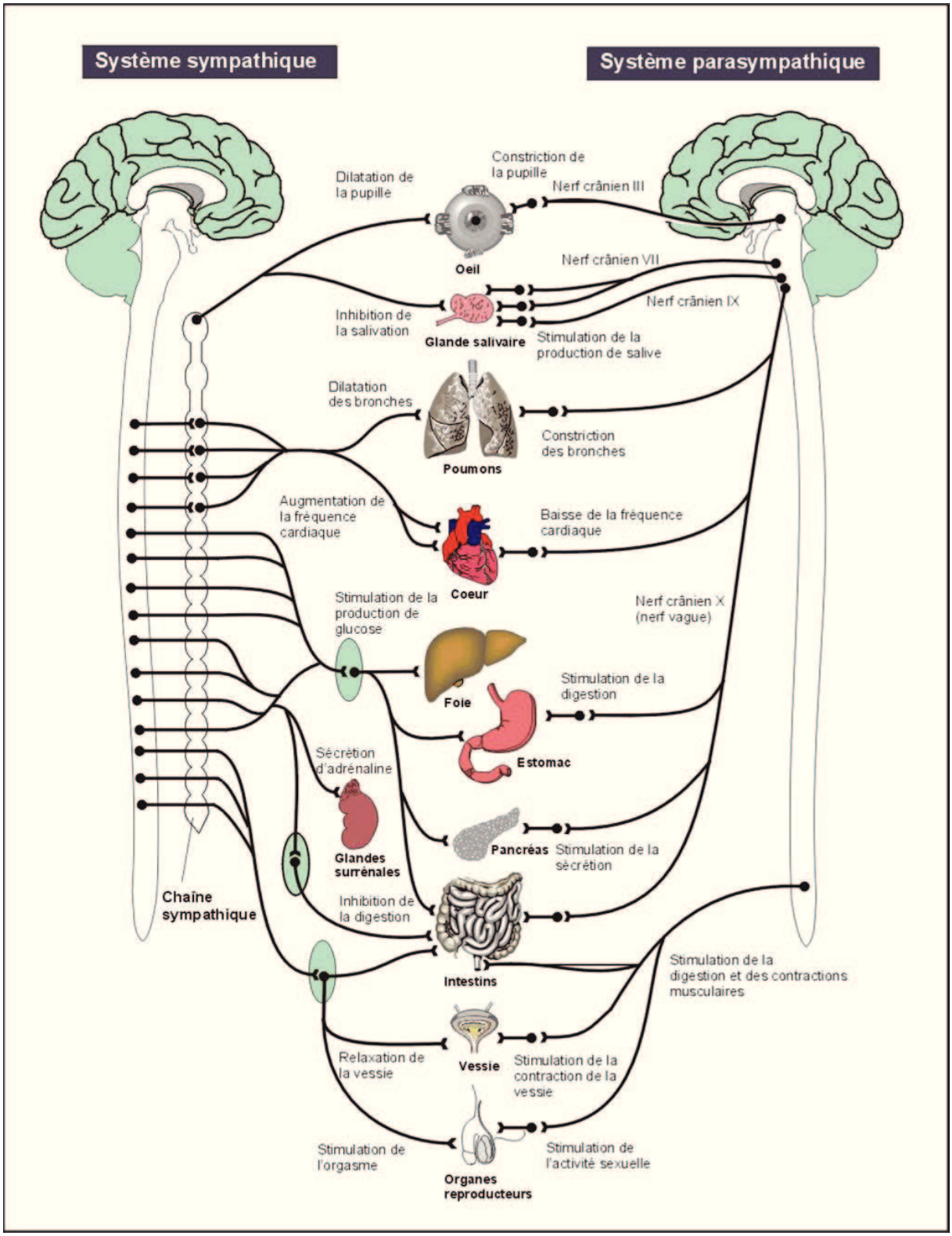
La réponse au stress est initiée par l'ensemble des stimuli, qu'ils soient de nature biologique ou psychologique, capables d'altérer l'intégrité physiologique et anatomique d'un organisme et qui ont la faculté d'activer les mêmes mécanismes psycho-neuroendocriniens. Même s'il est souvent associé à des conséquences négatives, le stress n'en reste pas moins un élément clé permettant l'adaptation des organismes et donc leur survie.

2. Anatomie et physiologie de la réponse au stress

La réponse au stress fait intervenir à la fois le SNC et le système nerveux périphérique (SNP). L'acteur principal au niveau du SNC est le système limbique en raison de son implication majeure dans la régulation des processus affectifs et émotionnels (voir **Fig. 3**). Comme je l'ai évoqué auparavant, la réponse au stress possède une composante cognitive qui va permettre l'interprétation des stimuli. Celle-ci nécessite donc l'implication des structures du néocortex (en particulier de sa partie frontale) qui sont spécialisées dans l'intégration des informations endogènes et exogènes.

Le SNP, quant à lui, joue un rôle primordial en tant que relai entre les informations qui arrivent au cerveau et l' envoie des consignes permettant l'adaptation de l'organisme. Il est composé du système nerveux somatique (SNS) et du système nerveux autonome (SNA). Les signaux sensoriels et moteurs sont véhiculés vers le cerveau par l'intermédiaire du SNS qui innerve l'ensemble des organes et des muscles squelettiques. Le SNA véhicule les informations corporelles internes ainsi que les informations liées au maintien de l'homéostasie. Il innerve entre autres le cœur, les muscles lisses et les différentes glandes de l'organisme (**Fig. 12**). Le SNA peut être subdivisé en deux branches : la branche sympathique (ou orthosympathique) qui a plutôt un rôle activateur : elle augmente l'éveil et prépare l'organisme à l'action, et la branche parasympathique qui va plutôt jouer le rôle de frein et ainsi participer au « retour à la normale » de l'organisme.

Fig. 12 : *Les deux branches du Système Nerveux Autonome*. *Source : http://www.tpe.walrey.fr/cerveau/foncgen/foncsys.html*



3. *Comment s'organise la réponse au stress ?*

La réponse au stress est multiaxiale en ce sens qu'elle fait intervenir plusieurs mécanismes qui peuvent être regroupés en trois axes : **l'activation neurale**, **l'activation neuroendocrinienne** et **l'activation endocrinienne**. Comme je l'ai mentionné précédemment, avant que la réponse au stress ne soit initiée, il faut d'abord que l'organisme intègre l'apparition d'un stresseur. A ce niveau, c'est le SNS qui intervient en acheminant un ensemble d'influx sensoriels au cerveau. Après un certain nombre de relais, les influx arrivent au niveau du néocortex (en particulier au niveau du cortex préfrontal) qui va intégrer l'ensemble des informations et permettre « l'appréciation cognitive » du stimulus. Si ce mécanisme d'évaluation du stimulus se traduit par la perception d'un danger, alors le processus de réponse au stress est enclenché. Il semblerait que cette étape soit initiée par un complexe de structures qui semble constituer l'épicentre anatomique des réponses somatiques et viscérales engendrées par le stresseur.

A. L'ACTIVATION NEURALE

L'activation neurale mise en place en réponse au stress fait intervenir principalement les 2 branches du système nerveux autonome : le système nerveux sympathique, le système nerveux parasympathique. Même si ces systèmes font partie intégrante de l'étape d'activation neuroendocrinienne, détaillée dans la partie suivante, il n'en reste pas moins que leur activation neurale a des conséquences directes sur l'ensemble des organes qu'ils innervent. Ces voies sont les premières à être activées en réponse au stress. Après les processus complexes d'évaluation cognitivo-affective, l'influx transite vers l'hypothalamus pour ensuite rejoindre les organes cibles via la moëlle épinière. La première étape de la réponse va se traduire par l'activation du système nerveux sympathique qui va mettre l'organisme en état d'utiliser au maximum ses ressources afin de s'adapter au stresseur. Ainsi, lorsque l'activité sympathique augmente, les pupilles se dilatent et les paupières se rétractent (laissant entrer davantage de lumière et facilitant les mouvements oculaires), les vaisseaux de la peau et des intestins se resserrent, (redirigeant le sang vers les muscles), les bronches se dilatent et accroissent l'oxygénation, la fréquence cardiaque s'accélère et la force des contractions augmente (entraînant une irrigation maximale des muscles squelettiques et du cerveau), la digestion et les autres fonctions végétatives se mettent au repos diminuant ainsi les activités momentanément inutiles. Sous l'influence de cette activation sympathique les glandes médullosurrénales vont libérer de l'adrénaline (A) et de la NA de façon à ce que cet état transitoire d'alarme puisse être maintenu : c'est l'activation neuroendocrinienne.

B. L'ACTIVATION NEUROENDOCRINIENNE

En 1926, la même année au cours de laquelle Selye décrivit son célèbre « syndrome of just being sick », le physiologiste Walter Cannon définissait le concept d'homéostasie qui correspond à l'effort adaptatif produit par l'organisme pour maintenir ses constantes en équilibre. A ce titre il communiqua de façon importante sur un aspect particulier du rôle du SNA dans la réponse au stress : l'activation neuroendocrinienne. C'est à ce moment qu'il instaura le concept de « fight or flight » qui correspond à la préparation de l'organisme, via la mobilisation de ses ressources, à initier une activité physique en réponse à un danger perçu. Ce mécanisme permet à l'organisme soit de combattre le danger soit de le fuir (Cannon 1953). Le complexe amygdalien dorso-médian apparaît comme le point d'origine de la réponse de type « fight or flight » (Roldan, Alvarez-Pelaez *et coll.* 1974). De là, les informations passent par les régions hypothalamiques latéro-postérieures pour ensuite transiter via la moëlle épinière jusqu'au ganglion céliaque qui innerve, au final, les glandes médullosurrénales. A ce niveau, les cellules libèrent dans la circulation sanguine de la NA et de l'A dont les effets viennent s'ajouter aux effets de la NA sécrétée au niveau du SNC et du SNS. Concrètement, les effets sur l'organisme sont les mêmes que ceux décrits ci-dessus (résultant de l'activation sympathique neurale) excepté que les catécholamines surrénaliennes ont un délai d'action compris entre 20 et 30s et qu'elles engendrent une durée d'action 10 fois supérieure (Usdin, Kretnansky *et coll.* 1976).

Par la suite, la réponse de type « fight or flight » a été reformulée par certains auteurs qui voyaient ce mécanisme comme un système de *coping* actif : le système sympatho-adréno-médullaire (SAM). Les effets physiologiques de l'activation de ce système sont détaillés de façon non exhaustive dans le tableau 1.

Tableau 1. Effets de l'activation du système sympatho-adréno-médullaire

Augmentation de la pression artérielle
Augmentation de l'apport sanguin au cerveau
Augmentation de la fréquence cardiaque et de la force de contraction
Augmentation de la stimulation des muscles squelettiques
Augmentation des taux plasmatiques d'acides gras, de triglycérides et de cholestérol
Augmentation de la sécrétion d'opioïdes endogènes
Diminution du flux sanguin au niveau des reins, des intestins et de la peau
Augmentation du rythme respiratoire et dilatation des bronches
Dilatation des pupilles

C. L'ACTIVATION ENDOCRINIENNE

Le système de réponse activé en dernier lieu est l'axe endocrinien (Mason 1968). Son activation requiert une stimulation d'intensité plus importante (Levi 1997). Bien que la réponse endocrinienne au stress puisse affecter plusieurs systèmes (axes thyréotrope, somatotrope,

gonadotrope, lactotrope et corticotrope), seul le fonctionnement de l'axe corticotrope sera abordé dans ce manuscrit étant donné qu'il constitue le principal système de réponse au stress.

L'axe corticotrope est également appelé axe HPA (*Hypothalamic-Pituitary-Adrenal*) (voir **Fig. 13** pour illustration). C'est d'ailleurs la terminologie que j'utiliserai tout au long de ce document. Le complexe septum-hippocampe semble être le point d'origine de l'activation de l'axe HPA.

Lors de la confrontation à un agent stresseur, et en fonction des informations provenant des circuits corticolimbiques, l'hypothalamus est stimulé et fait le lien entre système nerveux et système endocrinien grâce à ses projections vers l'hypophyse. L'hypothalamus reçoit des connexions directes et indirectes de l'ensemble du SNC. Cette position privilégiée lui permet d'intégrer une multitude d'informations de sources variées ce qui lui confère une place idéale pour remplir un rôle d'« homéostat », un thermostat de l'homéostasie, de régulateur et d'horloge biologique. L'hypothalamus reçoit les informations relatives au stress notamment par les structures corticolimbiques. Ces informations seront plus spécifiquement relayées au niveau du noyau paraventriculaire (PVN) de l'hypothalamus. Ce noyau possède deux types de neurones : les neurones magnocellulaires qui peuvent libérer l'ocytocine ou la vasopressine sous forme de neurosécrétions directement dans la circulation sanguine au niveau de la neurohypophyse (hypophyse postérieure), et surtout les neurones parvocellulaires dont les axones se projettent au niveau de l'éminence médiane et peuvent sécréter le CRF et la vasopressine dans le système porte hypothalamo-hypophysaire. Lors de la réponse au stress, les neurones parvocellulaires libèrent le CRF dans le système porte, à partir duquel il rejoint l'adénohypophyse (hypophyse antérieure) et déclenche alors la libération dans le système circulatoire de l'hormone adrénocorticotrope (*adrenocorticotropic hormone*, ACTH). La vasopressine sera également libérée par les neurones magnocellulaires mais aussi parvocellulaires. Dans ce dernier cas, il s'agit en général de neurones à CRF qui co-sécrètent la vasopressine. Celle-ci va agir en synergie avec le CRF au niveau de l'adénohypophyse en tant que sécrétagogue pour l'ACTH. Le CRF et la vasopressine vont induire la libération de l'ACTH à travers deux voies de signalisation. Le CRF se lie au récepteur CRF_1 qui est associé à une protéine G et permet l'activation d'une adénylate cyclase menant à la formation d'AMPc et à l'activation de la protéine kinase A (PKA). La vasopressine agit plus spécifiquement sur le récepteur V_{1b} (parfois appelé V_3) qui est lié aux signalisations associées au Ca^{2+} et aux phospholipases C (Barberis, Mouillac *et coll.* 1998).

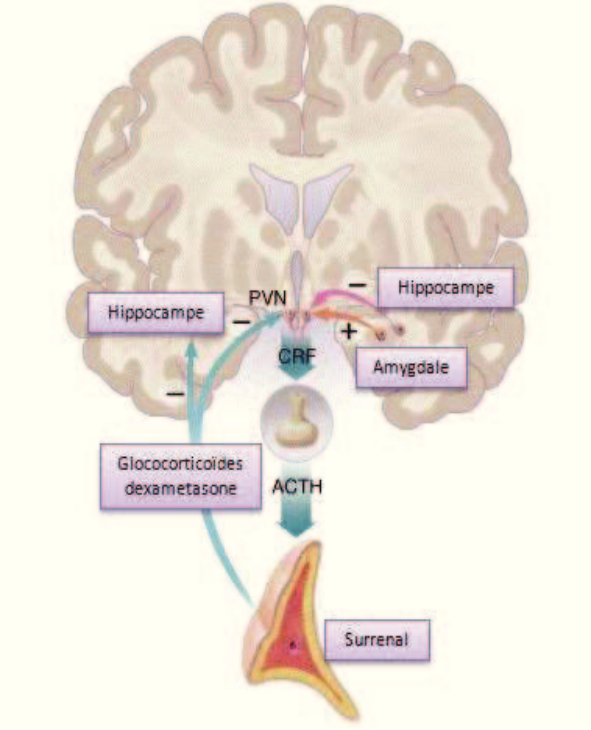


Fig. 13 : ***Organisation de l'axe HPA.***

Une fois sécrétée, l'ACTH parvient, par la circulation sanguine, au niveau des glandes corticosurrénales induisant alors la libération des hormones corticostéroïdes, produit final dans la réponse de l'axe HPA, principalement le cortisol chez les primates et la corticostérone chez les rongeurs. Les hormones corticostéroïdes vont alors agir sur de multiples organes et structures cérébrales à travers deux récepteurs: le récepteur de type I ou récepteur des minéralocorticoïdes (*mineralocorticoid receptor*, MR) et le récepteur de type II ou récepteur des glucocorticoïdes (*glucocorticoid receptor*, GR) ; ce dernier possède une plus faible affinité pour les corticostéroïdes, y compris pour les glucocorticoïdes (de Kloet, Reul *et coll.* 1990). Ainsi, en plus de leurs effets périphériques (voir Tableau 2), les corticostéroïdes vont avoir un effet significatif au niveau du SNC, ils vont pouvoir se lier à leurs récepteurs qui sont exprimés par de nombreux types de neurones dans plusieurs structures corticolimbiques, comme le cortex préfrontal, l'amygdale et l'hippocampe, et affecter les fonctions cognitives et émotionnelles. Les hormones corticostéroïdes agissent alors par des actions génomiques assez larges à travers des effets directes ou indirectes (Stahn and Buttgereit 2008), mais aussi par des actions rapides et non-génomiques (Karst, Berger *et coll.* 2005).

Tableau 2. Effets de l'activation de l'axe HPA

Augmentation de la production de glucose
Exacerbation de l'irritation gastrique
Augmentation de la production d'urée
Augmentation de la libération d'acides gras dans la circulation sanguine
Suppression de certains processus immunitaires
Augmentation de la production de corps cétoniques
Suppression de l'appétit
Sensibilité accrue aux troubles cardio-vasculaire
Atrophie thymolymphatique

En outre, les corticostéroïdes initient une boucle de rétrocontrôle négatif sur l'axe HPA afin d'atténuer la réponse au stress une fois que la situation stressante est passée, si bien qu'une forte libération de ces hormones aboutit, par le biais d'une cascade d'inhibition impliquant l'hypothalamus et l'hypophyse antérieure mais aussi d'autres structures centrales telles que le cortex préfrontal, l'amygdale et l'hippocampe, à une réduction de leur sécrétion subséquente (Bao, Meynen *et coll.* 2008). En condition basale lorsque le taux de cortisol ou de corticostérone est bas, ces hormones se lient principalement au récepteur de haute affinité le MR. Par contre, lors d'un stress et lorsque le taux est haut, le récepteur GR est également recruté. Ainsi, le rétrocontrôle négatif impliquerait une activité plus importante des GR, peut-être en requérant la saturation concomitante des récepteurs MR. L'intervention des GR dans ce phénomène est largement corroborée par l'utilisation clinique de la dexaméthasone, qui a un effet agoniste assez important pour les GR et relativement faible pour les MR, dans l'évaluation du rétrocontrôle négatif sur l'axe HPA (Holsboer 2000).

D. REGULATION NEURALE DE LA REPONSE AU STRESS

Comme nous venons de le voir, l'exposition à un stresseur est à l'origine du recrutement du SNA et de l'axe HPA dont le but est de faire face, de façon adaptée, à la situation qui génère le stress. Même si l'efficacité de ces mécanismes est un élément clé dans la réponse de l'organisme, il en est de même des mécanismes qui contrôlent cette réponse. Le système limbique constitue un élément fondamental dans la mise en place de ses mécanismes de contrôle. Je vais, dans les paragraphes qui suivent, me focaliser sur certaines structures limbiques qui jouent non seulement un rôle important dans la régulation de la réponse au stress mais aussi, qui sont impliquées dans la physiopathologie des maladies associées au stress chronique.

a. Rôle de l'hippocampe

L'hippocampe exerce une influence inhibitrice importante sur le PVN de l'hypothalamus. En effet, la lésion de l'hippocampe entraîne une élévation « globale » du fonctionnement de l'axe HPA : augmentation des taux de CRF et d'AVP ainsi que de la concentration basale de GC circulants (Fendler, Karmos *et coll.* 1961; Knigge 1961; Herman, Schafer *et coll.* 1989). L'ablation de l'hippocampe dorsal ou du fornix latéral (qui porte les informations de l'hippocampe à l'hypothalamus) altère le rythme circadien de sécrétion de GC et augmente leur concentration basale (Fischette, Komisaruk *et coll.* 1980; Herman and Mueller 2006). D'autres travaux ont montré que des lésions de l'hippocampe entier pouvaient prolonger la sécrétion de GC observée en réponse à certains stresseurs tels qu'un stress de contention (Sapolsky, Armanini *et coll.* 1989) ou encore une confrontation à un nouvel environnement (Herman, Dolgas *et coll.* 1998). Cependant, il semblerait que ce phénomène soit sensible à la nature du stresseur car certains auteurs ayant contraints des rats à inhaler de l'éther n'ont pas observé cette élévation (Magarinos, Somoza *et coll.* 1987). Ces études mettent donc en évidence que l'hippocampe est non seulement impliqué dans le contrôle du rythme circadien de libération des GC et dans l'inhibition de l'axe HPA suite à l'exposition à un stresseur, mais aussi que, dans ce dernier cas, la réponse est spécifique de la nature du facteur de stress, à savoir de stresseurs psychogéniques.

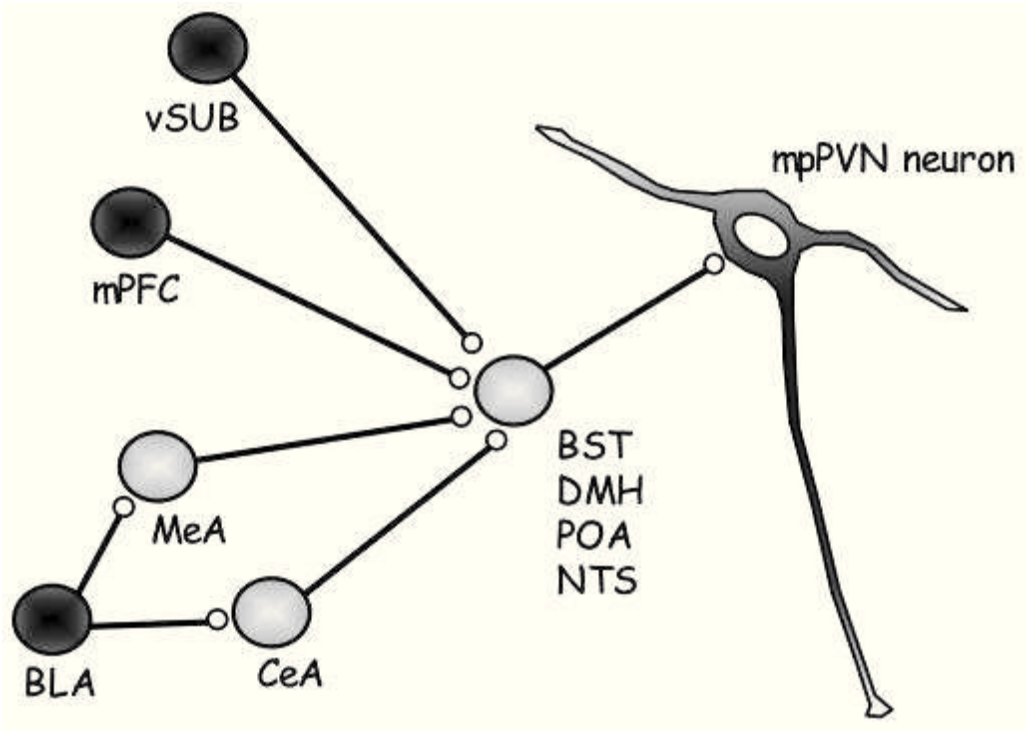
La régulation de l'axe HPA semble être principalement médiée par la partie ventrale de l'hippocampe – le subiculum ventral (vSUB)– car la stimulation de cette zone produit une importante inhibition de l'axe du stress (Casady and Taylor 1976). De plus, des études ont montré que des lésions du vSUB augmentent l'expression du CRH (peptide et ARNm) ainsi que l'expression du gène Fos en réponse à un stress de contention, mais que cela n'affecte pas la sécrétion basale de GC (Herman, Dolgas *et coll.* 1998). Le vSUB constitue un important point de sortie des informations de l'hippocampe destinées à l'hypothalamus. Les efférences venant du vSUB entrent en contact avec les neurones projetant vers le PVN au niveau du noyau de la strie terminale (BST), de l'aire péoptique médiane (PAO), de l'hypothalamus dorsomédian (DMH) ainsi que d'autres noyaux hypothalamiques (Herman, Figueiredo *et coll.* 2003). Ces structures constituent des relais formés principalement par des neurones GABAergiques dont la plupart projettent directement sur le PVN (Cullinan, Herman *et coll.* 1993). Les influx provenant de l'hippocampe, principalement glutamatergiques, atteignent des noyaux « relais » que l'on appelle aussi noyaux péri-PVN, majoritairement constitués de neurones GABAergiques : leur activation entraîne donc une inhibition du PVN (**Fig. 14** ci-après).

Le rôle central du vSUB dans la réponse au stress aigu a conduit certains auteurs à s'intéresser à son rôle lors de la réponse au stress chronique. En utilisant un modèle animal appelé « Chronic Variable Stress » (CVS) – qui consiste à présenter de façon chronique des stresseurs de nature variée, l'équipe d'Herman a montré que l'inhibition médiée par le vSUB n'intervenait pas dans la

régulation des réponses biocomportementales résultant de la confrontation d'un animal à leur protocole de stress chronique (Herman, Cullinan *et coll.* 1995; Herman, Dolgas *et coll.* 1998). Leur hypothèse de départ était que la perte de l'inhibition du vSUB (via des lésions) augmenterait de façon significative les changements biocomportementaux induits par le CVS. Or cela n'a pas été le cas. Leurs données mettaient donc en avant un rôle central de cette structure en réponse au stress aigu mais non significatif en réponse au stress chronique.

Fig. 14 : ***Projections indirectes majeures du système limbique sur le PVN*.**

*Tiré de Jankord & Herman, 2009***.**



Certaines projections du système limbique innervent de façon directe le noyau de la strie terminale (BST), l'aire préoptique médiane (PAO), l'hypothalamus dorsomédian (DMH) et le noyau du tracus solitaire (NTS). Les neurones provenant du subiculum ventral (vSUB), du cortex préfrontal médian (mPFC) et du noyau basolatéral de l'amygdale (BLA) sont majoritairement glutamatergiques (cercles noirs). Les autres sont principalement GABAergiques (cercles blancs). MeA= noyau médian de l'amygdale et CeA=noyau central de l'amygdale.

b. Rôle de l'amygdale

Comme on peut le voir sur la figure (**Fig. 14**), l'amygdale joue également un rôle prépondérant dans la régulation de l'activité de l'axe HPA. La stimulation électrique de l'amygdale augmente la sécrétion de GC chez le rat (Redgate and Fahringer 1973), le singe (Mason 1959) et l'Homme

(Gallagher, Flanigin *et coll.* 1987). À l'inverse, une destruction de l'amygdale entraîne une réduction de la réponse au stress induite par des stimuli olfactifs (Knigge 1961; Feldman and Conforti 1981). Cependant, il existe une régionalisation assez marquée au sein du complexe amygdaloïde. Le noyau central de l'amygdale (CeA) répond de façon importante à des stresseurs systémiques de type inflammatoire ou hémorragique (Thrivikraman, Su *et coll.* 1997; Sawchenko, Li *et coll.* 2000). Des lésions de ce noyau atténuent la réponse de l'axe HPA à ces différents stimuli mais pas au stress de contention (Dayas, Buller *et coll.* 1999; Xu, Day *et coll.* 1999). Au contraire, le noyau médian de l'amygdale (MeA) semble être activé suite à des sons intenses, un stress de contention ou encore suite à un stress de nage forcée (Cullinan, Herman *et coll.* 1995; Dayas, Buller *et coll.* 1999; Xu, Day *et coll.* 1999; Figueiredo, Bodie *et coll.* 2003). Des lésions de cette région réduisent la réponse de l'axe HPA au stress de contention mais pas au stress lié à l'injection d'IL-1β (Dayas, Buller *et coll.* 1999). De la même manière que le vSUB, ces deux noyaux doivent passer par des relais pour affecter l'activité du PVN (**Fig. 14**). Ils sont principalement composés de neurones GABAergiques : leur activation fonctionne donc en atténuant l'inhibition GABAergique médiée par les noyaux « relais », avec pour conséquence directe un effet activateur au niveau du PVN (Herman, Figueiredo *et coll.* 2003). Le noyau basolatéral (BLA), quant à lui, montre une activation prononcée en réponse à des stresseurs psychogéniques tels que la contention, la nage forcée ou les chocs électriques. Sa lésion n'affecte ni l'activité basale de l'axe HPA, ni son activité en réponse à un stress lié à des interactions sociales, à la nouveauté d'un environnement, à la contention, à l'inhalation d'éther ou encore à l'exposition au froid (Feldman, Conforti *et coll.* 1994), suggérant que le BLA n'est pas nécessaire à l'élaboration de la réponse au stress aigu. Les projections du BLA innervent principalement, mais pas exclusivement, d'autres noyaux du complexe amygdaloïde tels que le CeA et le MeA (**Fig. 14**) (Herman, Figueiredo *et coll.* 2003). Cependant, il est important de noter que le BLA envoie aussi des projections vers certains noyaux péri-PVN suggérant que cette structure est idéalement positionnée pour agir sur l'axe du stress indépendamment des autres noyaux de l'amygdale (Dong, Petrovich *et coll.* 2001).

L'amygdale a reçu une attention particulière en tant que médiateur potentiel dans la modulation de l'axe HPA en réponse au stress chronique. De nombreuses études montrent une expression en CRH (ARNm) augmentée dans le CeA après administration de fortes doses de stéroïdes (Makino, Gold *et coll.* 1994) ou en réponse à l'exposition chronique à un stress d'immobilisation (Ulrich-Lai, Xie *et coll.* 2006), mais pas après un protocole de CVS (Ostrander, Ulrich-Lai *et coll.* 2006). Ces données indiquent que l'induction du CRH dans le CeA est associée au stress chronique dans certains modèles uniquement. Cependant, certaines expériences se sont avérées incapables de confirmer une telle implication du CeA dans la physiopathologie du stress chronique. Par exemple, la lésion du CeA n'empêche pas le développement des symptômes induits par le stress chronique ni ne bloque la hausse d'expression du CRH induite par le stress dans le modèle CVS (Prewitt and

Herman 1997). Même s'il semble n'intervenir que très peu dans la régulation de l'axe HPA en réponse à un stresseur aigu, il en est vraisemblablement autrement en cas de stress chronique. Chez des animaux ayant été confrontés à un stress chronique, l'inactivation du BLA par le muscimol, augmente l'activation de l'axe HPA après une exposition à un environnement nouveau (Bhatnagar, Vining *et coll.* 2004), suggérant ainsi une fonction modératrice du BLA.

a. Rôle du cortex préfrontal

Le cortex préfrontal médian est lui aussi impliqué dans la régulation du stress. Plusieurs parties du cortex préfrontal comme le cortex cingulaire antérieur et l'aire prélimbique sont capables d'inhiber l'activité de l'axe HPA. En effet, la lésion du cortex cingulaire antérieur ou prélimbique augmente la sécrétion de l'ACTH et de la corticostérone ainsi que l'activation *c-fos* du PVN à la suite de stress (Diorio, Viau *et coll.* 1993; Figueiredo, Bruestle *et coll.* 2003). Tout comme l'hippocampe, la régulation du cortex préfrontal sur l'axe HPA serait spécifique des réponses de type psychogénique étant donné que la lésion des précédentes aires n'a pas d'effet sur le niveau d'ACTH ou de corticostérone en cas de stresseurs de type biogénique. Le cortex préfrontal pourrait lui aussi jouer un rôle dans le rétrocontrôle négatif de l'axe HPA à la suite d'un stimulus stressant. Cette structure est elle aussi riche en GR et MR. De plus, l'administration de corticostérone ou de dexaméthasone directement dans cette structure induit une diminution du niveau d'ACTH et de corticostérone (Mizoguchi, Ishige *et coll.* 2003). Par contre, les effets inhibiteurs ne peuvent pas être généralisés à l'ensemble du cortex préfrontal médian. Sa partie ventrale comme le cortex infralimbique pourrait avoir une action stimulatrice sur l'axe HPA, la lésion de cette partie induit une diminution de la libération de corticostérone à la suite de stress de contention (Sullivan and Gratton 1999). Ces résultats suggèrent la possibilité d'une organisation topographique intrinsèque du cortex préfrontal médian qui pourrait sous-tendre une régulation divergente de l'axe HPA selon un axe dorso-ventral. Les différents circuits efférents confortent cette hypothèse. Les cortex prélimbique et cingulaire antérieur innervent principalement des structures comme le BNST, l'hypothalamus dorsomédial, l'aire préoptique et la région péri-PVN qui possèdent d'importantes populations de neurones GABAergiques projetant vers le PVN et sont impliquées dans l'inhibition de la réponse au stress (Herman and Cullinan 1997). Au contraire, l'aire infralimbique projette préférentiellement vers la partie antérieure du BNST, le NTS et l'amygdale médiane et centrale qui sont tous impliqués dans la stimulation de la réponse au stress (Hurley *et coll* 1991). Les connectivités distinctes des aires prélimbique-cingulaire et de l'aire infralimbique semblent bien sous-tendre les rôles discordants des différents composants de l'aire préfrontale médiane dans la régulation de la réponse au stress. Enfin, il convient de rappeler que le contrôle de l'axe HPA lors de la réponse au stress est loin d'être la fonction principale du cortex préfrontal médian. Cette structure est surtout impliquée dans le traitement cognitif des informations, notamment dans la mémoire de travail et la

prise de décision. Si le nombre important de GR et de MR dans le cortex préfrontal sert de base à la régulation de l'axe HPA, il doit certainement sous-tendre également une action significative des corticostéroïdes dans les autres fonctions du cortex préfrontal, notamment influencer la prise d'informations et de décisions lors de situations menaçantes ou stressantes.

En bref

La réponse au stress fait intervenir un ensemble de mécanismes physiologiques dont l'activation neurale des organes cibles par le système nerveux autonome (SNA), l'activation de l'axe HPA et l'activation du système sympatho-adréno-médullaire (SAM). Cette réponse est régulée par différentes structures cérébrales dont le cortex préfrontal et l'hippocampe qui inhibent l'axe HPA, ainsi que l'amygdale qui va plutôt exercer l'effet inverse.

4. *Implication du système immunitaire*

Dans cette partie, nous allons voir que le système immunitaire joue un rôle particulièrement important dans les mécanismes de réponse au stress. La présentation faite ci-après tente de synthétiser les connaissances actuelles sur les effets du stress sur l'immunité. Les données sur ce sujet sont très disparates. Elles proviennent d'études réalisées sur des espèces et des lignées d'animaux différentes, utilisant divers facteurs de stress, avec des durées et des fréquences variables. Avant de développer ces différents points, les étapes fondamentales de la réponse immunitaire seront rappelées.

A. QUELQUES RAPPELS SUR L'ORGANISATION ET LE ROLE DU SYSTEME IMMUNITAIRE

L'évolution des espèces, marquée par l'adaptation des organismes à leur environnement, découle principalement de la capacité des individus à se reproduire. Parmi les nombreux facteurs qui peuvent avoir un impact sur la survie des organismes, et donc leur capacité de reproduction, la vulnérabilité à la maladie est souvent considérée comme un des plus influents. Afin de faire face à cette menace microscopique, plantes, champignons et animaux se sont dotés d'un système de défense contre les infections. Ce système de défense complexe, appelé **système immunitaire**, est ainsi présent chez toutes les espèces vivantes et possède la particularité de pouvoir reconnaître le « soi » du « non-soi ». Chez les plantes, les champignons et les invertébrés la réponse immunitaire est exclusivement non-spécifique c'est-à-dire que la réponse est dirigée en fonction d'une

reconnaissance non-spécifique des pathogènes grâce à des signaux communs qui les distinguent comme ne faisant pas partie de l'organisme. En plus de ce premier type de réponse, les premiers vertébrés se sont dotés d'un système immunitaire spécifique (dit adaptatif) dont le rôle principal est l'élaboration d'une mémoire immunitaire qui vient faciliter la réponse à un pathogène déjà « connu » (Schulenburg, Kurz *et coll.* 2004; Amemiya, Saha *et coll.* 2007). L'action de ce système immunitaire spécifique est basée sur l'expression, à la surface des différentes cellules d'un organisme, de motifs protéiques complexes exprimés par une région multigénique et multiallélique du génome appelé : **complexe majeur d'histocompatibilité** (CMH). Le CMH code ainsi pour une sorte de « soi » génétique de l'individu et son action est très importante dans la mise en place de la réponse immunitaire spécifique. On distingue deux types de molécules codées par le CMH : les molécules de classe I qui vont s'exprimer à la surface des cellules nucléées de l'organisme, et les molécules de classe II qui sont exprimées seulement par certaines cellules du système immunitaire capables de phagocytose (Klein 1986).

a. Reconnaissance du « non-soi » par le système immunitaire.

Chez les mammifères, on distingue deux types de réponses immunitaires qui diffèrent dans les mécanismes mis en place pour protéger l'intégrité de l'organisme. Il s'agit de l'immunité dite « **non-spécifique** » ou « **innée** » et de l'immunité dite « **spécifique** ». Lorsqu'un pathogène pénètre dans l'organisme en réussissant à passer les barrières physiques comme la peau ou les muqueuses du tube digestif, le premier type de réponse immunitaire à se mettre en place est la réponse non-spécifique. Elle est basée sur la reconnaissance de certaines structures présentes à la surface des cellules pathogéniques. L'immunité spécifique, aussi appelée « **adaptative** » ou « **acquise »**, est basée sur la reconnaissance d'antigènes qui sont spécifiques à un type de pathogène. Enfin, un dernier élément qui différencie ces deux types de réponse est la rapidité avec laquelle elle est mise en place. Alors que la réponse non-spécifique se déclenche très rapidement (de l'ordre de quelques minutes), la réponse spécifique est plus lente à se mettre en place (de quelques heures à quelques jours lors d'une première exposition). La réponse immunitaire non-spécifique tient son nom de la non-spécificité des cellules responsables de sa mise en place. En d'autres termes, ces éléments sont déjà présents au moment où le pathogène pénètre dans l'organisme. Ces cellules, appelées phagocytes, qui sont constituées principalement des monocytes et macrophages, ont la possibilité de reconnaitre les pathogènes (bactéries, virus, champignons). Cette reconnaissance est possible grâce à la présence sur la paroi cellulaire des pathogènes de structures moléculaires spécifiques qui leur sont communes : les *Pathogen-Associated Molecular Patterns* (PAMPs) (Medzhitov and Janeway 2000). Ces structures ont la particularité d'être reconnues et de se lier à des récepteurs de la famille Toll-like présents à la surface des macrophages. Par exemple, on peut citer la reconnaissance des PAMPs de type lipopolysaccharides bactériens (LPS) présents à la surface des

bactéries Gram négatives, la plus connu étant *Escherichia coli* (responsable notamment de pathologies du tube digestif). Lorsqu'un pathogène est reconnu par une cellule phagocytaire, on assiste à la mise en place du phénomène de phagocytose qui aboutit normalement à la lyse et donc la mort de la cellule ciblée. Les phagocytes activés sont aussi à l'origine de la libération de nombreuses molécules comme par exemple le monoxyde d'azote qui va interférer avec les processus de multiplication du pathogène ou encore des cytokines. Suite à la phagocytose, les cellules deviennent alors « présentatrice d'antigènes » (APC, *antigen presenting cell*). Des leucocytes, plus précisément des lymphocytes T « helper » (divisés en Th1 et Th2) viennent alors se fixer sur ces APC et peuvent ensuite orienter la réponse immunitaire vers une voie d'activation des macrophages et la libération d'interféron-γ (**voie des Th1**) ou vers une voie d'activation des lymphocytes B qui induit la libération d'anticorps spécifiques de l'antigène (**voie des Th2**). On a donc tendance à considérer la voie des Th1 comme une voie qui prolonge la phase inflammatoire alors que la voie des Th2 induit la mise en place de l'immunité spécifique. Ainsi il existe une balance entre ces deux voies régulées par les cytokines produites par les différents acteurs cellulaires de la réponse immunitaire.

b. Les cytokines comme régulateurs de la réponse immunitaire.

Les cytokines sont des molécules assez hétérogènes et divisées en deux familles selon leur rôle lors de la réponse immunitaire. Ainsi on trouve les cytokines dites « **proinflammatoires** » telles que l'interleukine-1 bêta (IL-1β), l'interleukine-6 (IL-6), le facteur de nécrose tumorale alpha (TNF-α) ou encore l'interféron gamma (IFN-γ). Cette famille de cytokines, comme son nom l'indique, est responsable de la mise en place du processus inflammatoire et va notamment stimuler l'expression de certains gènes associés à l'inflammation ou activer la prolifération des macrophages et de certains lymphocytes. En contrepartie, l'activation immunitaire induit la production d'un deuxième type de molécules appelées cytokines « **anti-inflammatoires** » qui vont avoir des effets antagonistes en diminuant notamment la production de substances inflammatoires ou l'activation cellulaire. On retrouve dans cette famille l'interleukine-4 (IL-4), l'interleukine-10 (IL-10) ou le facteur de croissance transformant bêta (TGF-β) entre autres. Cette dernière catégorie de cytokines va avoir un rôle de régulateur de la réponse inflammatoire en empêchant un emballement du système lié à la production de substances pro-inflammatoires. Les cytokines pro-inflammatoires ont un rôle majeur lors du déroulement de la phase inflammatoire de la réponse immunitaire de par leur fonction centrale dans la communication cellulaire et la mise en place de la réponse de phase aigüe lors de l'infection par un pathogène. Par exemple, la libération d'IL-1β va avoir un effet attracteur pour les autres cellules immunitaires et peut également modifier le fonctionnement d'autres types cellulaires via l'existence de récepteurs aux cytokines sur ces derniers. Enfin, la réponse de phase aigüe tire son nom des protéines de phase aigüe libérées par le foie sous l'action

des cytokines pro-inflammatoires et qui jouent un rôle dans la réponse immunitaire notamment dans la mise en place du système du complément qui vient favoriser l'élimination des pathogènes par les phagocytes ou induit une lyse des pathogènes.

B. COMMUNICATION ENTRE SYSTEME NERVEUX CENTRAL ET SYSTEME IMMUNITAIRE

Jusqu'à la fin des années 70, les biologistes considéraient le système immunitaire comme une entité autonome, dont le rôle était de protéger l'organisme des intrusions microbiennes ou virales. Les modifications physiologiques, comme la fièvre, et comportementales, comme la diminution de la locomotion, étaient considérées comme des symptômes provoqués par l'action directe du pathogène sur l'organisme infecté. On parlait alors d'une « débilitation » de l'organisme infecté, induite par l'action du pathogène. Notamment, personne n'avait imaginé qu'il pouvait exister une quelconque relation entre le système nerveux central (SNC) et le système immunitaire.

a. Influence du système nerveux central sur le système immunitaire

En 1975, Robert Ader a mis en évidence la possibilité d'un conditionnement classique de la réponse immunitaire. Plus précisément, alors que ses travaux d'origine portaient sur l'aversion gustative et son conditionnement, il a montré que le SNC pouvait agir directement sur l'activation du système immunitaire (Ader and Cohen 1975). L'expérience en question, un conditionnement classique ou pavlovien, consistait à mettre en relation un stimulus conditionnel (une nouvelle saveur) et un stimulus inconditionnel (malaise gastro-intestinal). Dans ce cas, l'apprentissage est très rapide (un seul essai généralement) et l'animal évitera cette nouvelle saveur par la suite. Lors de leurs expériences, Ader et Cohen ont utilisé une solution de cyclophosphamide pour induire le malaise. Or cette substance possède en plus des effets immunosuppresseurs, et les auteurs ont remarqué une grande mortalité des animaux lors des expériences d'extinction du conditionnement, alors qu'ils ne présentent de façon répétée que le stimulus conditionnel (la saveur) sans intervention du stimulus inconditionnel (la solution de cyclophosphamide). La conclusion de cette expérience, pionnière dans l'étude des relations entre SNC et SI, est qu'il est possible de conditionner la réponse immunitaire tout comme de nombreux autres processus physiologiques et donc que le SNC peut « communiquer » avec le système immunitaire. On sait maintenant que la communication SNC vers SI est possible grâce à de multiples voies qui font intervenir de nombreuses neurohormones comme les catécholamines, la dopamine, des neuropeptides ou encore les produits de l'axe HPA comme le CRF, l'ACTH ou encore les GC (Koff, Fann *et coll.* 1986; Sapolsky, Rivier *et coll.* 1987; Schedlowski, Falk *et coll.* 1993; Labeur, Arzt *et coll.* 1995; Webster, Tonelli *et coll.* 2002; Carr, Tucker *et coll.* 2003). Toutes ces voies ont des rôles à la fois activateur et inhibiteur de l'activité immunitaire (voir **tableau 3**). Par exemple, la NA et la DA peuvent avoir un rôle dans l'activation de certains lymphocytes (Torres, Antonelli *et coll.* 2005). En ce qui concerne les

produits de l'axe HPA, le CRF est responsable d'une immunosuppression via la diminution de la multiplication des lymphocytes T et B ainsi que la diminution de la libération d'IL-1β (Shurin, Kusnecov *et coll.* 1995).

Tableau 3. Aspects neuroendocriniens de la communication entre le système nerveux central et le système immunitaire

Hormone	Récepteurs présents sur	Effets produits
Glucocorticoïdes	Lymphocytes T et B Neutrophiles Monocytes et macrophages	Stimule ou inhibe l'inflammation Inhibe la production d'IL12 Shift de la production de Th1/Th2
CRF	Lymphocytes T Monocytes et macrophages	Stimule la production d'IL1 & d'IL6
ACTH	Lymphocytes B	Stimule ou inhibe la maturation des lymphocytes B Stimule ou inhibe la production de cytokines proinflammatoires
Catécholamines	Lymphocytes T et B Monocytes et macrophages Cellules NK (natural killer)	Shift vers une réponse des Th2 Modulation de la synthèse des cytokines proinflammatoires selon le type de récepteurs
5-HT	Lymphocytes T et B Monocytes et macrophages Cellules NK	Module la synthèse de l(IFNg par les cellules NK Stimule la production d'IL6 par les lymphocytes T
Substance P	Lymphocytes T et B Monocytes et macrophages Éosinophiles, cellules souches	Stimule la sécrétion de cytokines proinflammatoires (IL1, IL6 et TNFa)
Prolactine	Lymphocytes T et B Monocytes et macrophages Cellules NK, granulocytes	Favorise la multiplication des lymphocytes lors de la réponse spécifique (expansion lymphocytaire)
Hormone de croisssance (GH)	Lymphocytes T et B Monocytes et macrophages Cellules NK (natural killer)	Maintien de l'immunocompétence des lymphocytes T et B et des macrophages; Stimule l'activité des anticorps et des cellules NK

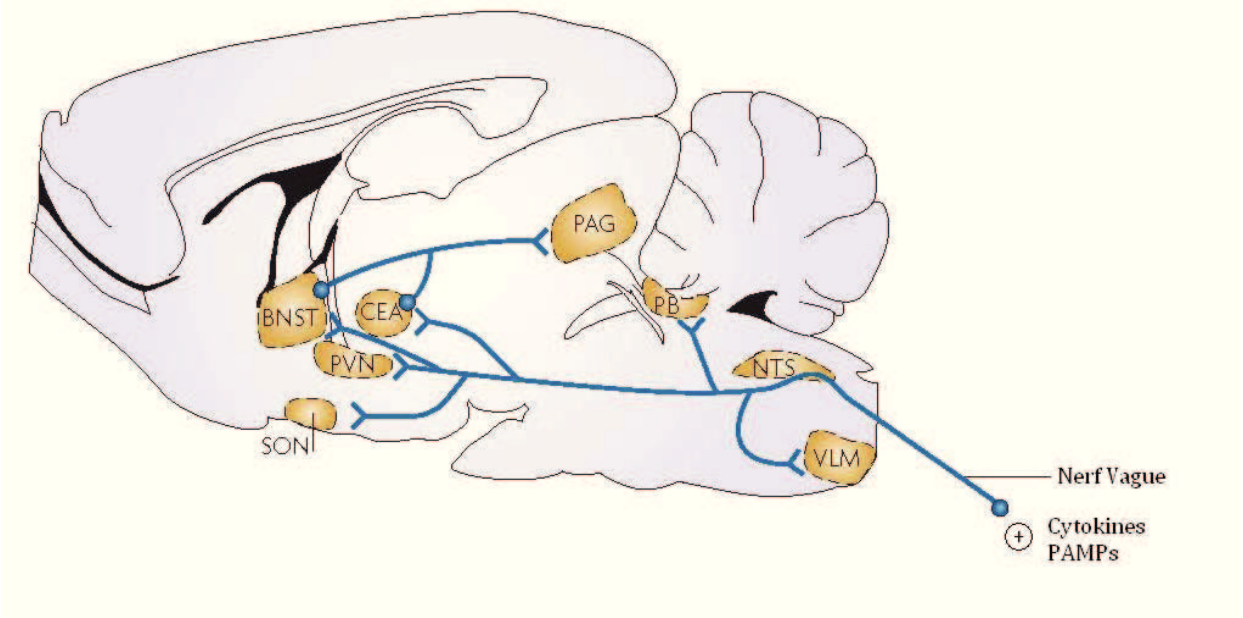
b. Influence du système immunitaire sur le système nerveux central : rôle des cytokines

Les cytokines sont capables, en plus de leur rôle de coordination de la réponse immunitaire, de communiquer avec le SNC. Elles agissent, en tant que signal, directement au niveau central. En effet, l'administration intracérébroventriculaire ou au niveau de l'hypothalamus antérieur d'IL-1β induit la mise en place de la fièvre et une activation de l'axe HPA par exemple (Rothwell and Hopkins 1995). Il existe aussi de nombreux récepteurs aux cytokines sur les neurones et les cellules gliales (Cunningham and De Souza 1993). Une question qui se pose est de savoir comment les cytokines produites en périphérie sont capables de pénétrer au sein du SNC. En effet, la taille de ces molécules (environ 17kDa pour l'IL-1β) ainsi que leur propriété hydrophile les empêche de traverser la barrière hématoencéphalique (BHE). Par la suite, des études ont montré les diverses voies permettant la communication avec le SNC. La première de ces voies est la voie humorale qui consiste en un passage des cytokines produites en périphérie via les organes circumventriculaires

qui offrent une plus grande perméabilité de la BHE (Watkins, Maier *et coll.* 1995) ou par transport actif des molécules à travers la BHE (Banks, Ortiz *et coll.* 1991). La deuxième voie est la voie dite « nerveuse » via une activation locale des fibres afférentes du nerf vague par l'IL-1β et la projection de cette voie au niveau du noyau du tractus solitaire (NTS) (Fleshner, Goehler *et coll.* 1995). Il s'ensuit une activation de nombreux autres noyaux centraux comme par exemple le CeA, le BNST ou encore le PVN par le biais de voies catécholaminergiques (Dantzer, O'Connor *et coll.* 2008) (voir **Fig. 15**).

En outre, suite à la découverte de nombreux récepteurs aux cytokines dans le cerveau, des études ont aussi montré que le SNC peut produire ses propres cytokines, notamment grâce à leur synthèse au niveau des cellules gliales comme les astrocytes ou la microglie (Fontana, Weber *et coll.* 1984; Turrin, Gayle *et coll.* 2001; Anisman and Merali 2003).

Fig. 15 : ***Voie de communication nerveuse entre le système immunitaire et le système nerveux central***. *D'après Dantzer et al., 2008.*



Légende :
BNST: noyau du lit de la strie terminale
CEA: noyau central de l'amygdale
NTS: noyau du tractus solitaire
PAG: substance grise periaqueductale
PB: noyau parabrachial
SON: noyau supraoptique de l'hypothalamus
PAMPs: pattern moléculaire associé à un pathogène
PVN: noyau paraventriculaire de l'hypothalamus
VLM: réticulée ventrolatérale (*ventrolateral medulla*)

C. EFFETS DU STRESS SUR LE SYSTEME IMMUNITAIRE

a. Le stress augmente la production de cytokines inflammatoires en réponse à une stimulation immune

La plupart des études concernant la production de cytokines par les cellules immunitaires après stress utilisent des mitogènes spécifiques des lymphocytes T ou B (phytohémagglutinine, concanavaline A) ou des antigènes contre lesquels l'animal avait été préalablement vacciné. Des études récentes se sont intéressées à la capacité de ces cellules à produire une réponse de type inflammatoire, en utilisant par exemple du lipopolysaccharide (LPS). Comme je l'ai déjà mentionné, le LPS est une macromolécule de la paroi des bactéries à Gram négatif qui stimule préférentiellement les lymphocytes B, les monocytes et les macrophages. Il semble que le stress aigu puisse accroître la production de cytokines inflammatoires telles que l'IL-1 ou l'IL-6 par les cellules spléniques en réponse au LPS (Stark, Avitsur *et coll.* 2001; Moraska, Campisi *et coll.* 2002). De même, les macrophages péritonéaux ou alvéolaires issus de souris stressées présentent une production accrue d'IL-1 et d'IL-6 de façon spontanée (Cheng, Morrow-Tesch *et coll.* 1990) ou en réponse à une stimulation par du LPS (Zhu, Chancellor-Freeland *et coll.* 1996; Persoons, Moes *et coll.* 1997).

Il est vraisemblable que les catécholamines soient impliquées dans cette production de cytokines inflammatoires. En effet, le blocage des récepteurs α-adrénergiques avant l'administration de chocs électriques empêche l'augmentation de la production d'IL-1β par les macrophages alvéolaires (Broug-Holub, Persoons *et coll.* 1998). D'autre part, il a été proposé que le stress puisse exacerber les réponses de type inflammatoire en induisant la libération locale de CRF par les terminaisons nerveuses périphériques (Elenkov and Chrousos 1999). En effet, le CRF potentialise la libération de TNF-α, d'IL-1β et d'IL-6 par les macrophages (Agelaki, Tsatsanis *et coll.* 2002).

Un mécanisme moléculaire permettant de convertir le stress en réponse inflammatoire a récemment été proposé. La voie de transcription du facteur nucléaire κB (NF-κB) est l'une des principales voies de signalisation intracellulaire responsables de l'expression de cytokines inflammatoires (Muzio and Mantovani 2000; O'Neill and Dinarello 2000). Chez l'Homme, un stress aigu active la voie NF-κB dans les cellules mononucléées sanguines et induit l'expression des gènes qui en dépendent (Bierhaus, Wolf *et coll.* 2003). La NA pourrait être responsable de cette activation.

b. Le stress induit un état de résistance aux glucocorticoïdes

Après une session de chocs électriques ou un stress social chronique, la sensibilité des cellules immunitaires à l'effet anti-inflammatoire des GC est diminuée (Stark, Avitsur *et coll.* 2001;

O'Connor, Johnson *et coll.* 2003). Cela se traduit par un moindre effet inhibiteur des GC sur la prolifération des cellules immunitaires et sur leur production de cytokines inflammatoires (Stark, Avitsur *et coll.* 2001). Chez la souris, il a pu être montré que cette modification ne concernait que certains types cellulaires tels que les macrophages mais pas les lymphocytes B (Stark, Avitsur *et coll.* 2001). De façon intéressante, la résistance aux effets anti-inflammatoires des GC n'apparaît pas dans tous les compartiments; elle est observée dans la rate mais pas dans la cavité péritonéale (Avitsur, Stark *et coll.* 2002). Ce phénomène s'atténue progressivement après l'arrêt du stress. Ainsi, la résistance induite par le stress social chez la souris est toujours visible dix jours après la fin du stress mais a totalement disparu au bout d'un mois (Avitsur, Stark *et coll.* 2002). Les mécanismes moléculaires responsables de l'induction de la résistance aux effets anti-inflammatoires des GC par le stress ne sont pas entièrement élucidés. Le stress ne modifie pas l'expression du récepteur GR au niveau des macrophages spléniques. En revanche, il empêche la migration du GR du cytoplasme vers le noyau (Quan, Avitsur *et coll.* 2003). Le stress empêche donc le complexe GR-hormone d'inhiber la transcription des gènes de la voie NFκB tels que ceux des cytokines pro-inflammatoires. Les mécanismes par lesquels le stress affecte la translocation des GR sont en revanche inconnus.

Tous les stresseurs ne sont pas en mesure d'induire un phénomène de résistance aux effets anti-inflammatoires des GC. Par exemple, la contention augmente au contraire de façon transitoire la sensibilité des splénocytes aux GC (Bauer, Perks *et coll.* 2001). Il est possible que l'activité physique associée au stress soit pour partie impliquée puisque l'exercice physique chez l'humain diminue aussi la sensibilité des lymphocytes sanguins à la dexaméthasone (DeRijk, Petrides *et coll.* 1996). Stress et activité physique induisant une libération d'IL-6 plasmatique, son rôle potentiel dans l'induction de la résistance a été testé *in vitro* (Stark, Avitsur *et coll.* 2002) mais ne semble pas moduler pas la sensibilité des splénocytes. Il est tout de même possible que la production de certaines cytokines pendant le stress soit responsable de l'apparition de la résistance. En effet, chez l'Homme, la culture de cellules mononucléées sanguines en présence d'IL-4 et d'IL-2 entraîne un état de résistance aux effets anti-inflammatoire des GC (Kam, Szefler *et coll.* 1993). Cependant, dans cette situation, la résistance apparaît chez les lymphocytes T et non chez les macrophages.

c. Redistribution spatiale des leucocytes

Les cellules du système immunitaire circulent en permanence. Elles passent du sang vers les organes, passent ensuite par les vaisseaux et les ganglions lymphatiques avant de rejoindre la circulation générale. Lors de la réponse à un facteur de stress, l'activation du système nerveux sympathique permet le recrutement des leucocytes en les faisant sortir de réservoirs tels que la rate, le thymus ou les poumons et en les déversant dans le sang (Dhabhar, Miller *et coll.* 1995). Dans un second temps, sous l'effet des GC, les lymphocytes et les monocytes migrent vers les

ganglions lymphatiques et les muqueuses (de la peau, du tube gastro-intestinal, etc). Cette migration conduit à une diminution du nombre de lymphocytes et de monocytes et à une augmentation des polynucléaires dans le compartiment sanguin. Ce phénomène est transitoire et disparaît rapidement après la fin du stress (Dhabhar, Miller *et coll.* 1995). Cette redistribution des leucocytes leur permettrait d'être au bon endroit au bon moment pour faire face à une éventuelle agression microbienne associée au stress, par exemple au niveau de blessures cutanées. Cette mobilisation se fait évidement au détriment des compartiments désaffectés par les cellules immunitaires et est probablement en partie responsable de bon nombre de contradictions rapportées dans la littérature sur les effets tantôt immunosuppresseurs, tantôt immunostimulants du stress (Dhabhar and McEwen 1999).

En situation de stress chronique, il est possible d'observer des altérations à long terme de la formule leucocytaire du sang ou de la rate. Ainsi, le stress social chronique accroît le poids de la rate, augmente son contenu en monocytes et neutrophiles et diminue le nombre de lymphocytes (Avitsur, Stark *et coll.* 2002). Dans le sang, le stress social chronique augmente la proportion de granulocytes et diminue celle des lymphocytes (Stefanski 1998).

d. Augmentation de l'immunité acquise au niveau des muqueuses

Chez le rat, un stress aigu augmente l'immunité spécifique au niveau de la peau. Ceci a été montré pour la réponse cutanée d'hypersensibilité retardée (Dhabhar and McEwen 1996). Le principe de l'hypersensibilité retardée consiste à sensibiliser un animal à un antigène lors d'une première exposition, puis à effectuer une seconde exposition par la voie sous-cutanée environ une semaine plus tard. Cette seconde exposition induit une forte réponse locale, appelée réponse d'hypersensibilité retardée (DTH=delayed type hypersensitivity). La DTH nécessite à la fois un processus inflammatoire et une réponse spécifique d'antigène impliquant des lymphocytes T mémoires. C'est une réponse de type Th1. Chez des rats préalablement sensibilisés pour un antigène, si l'on applique une contention de deux heures juste avant l'injection cutanée, on observe une induration cutanée et une infiltration leucocytaire accrues par apport aux animaux non stressés (Dhabhar 1998). Dans le cas d'une sensibilisation à un produit irritant qui n'implique pas de réponse spécifique d'antigène, le stress n'augmente pas la réponse lors de la deuxième exposition (Dhabhar 1998). Cela signifie que le stress n'accroît pas la DTH en augmentant la réponse inflammatoire non-spécifique, mais en stimulant les lymphocytes mémoires pour l'antigène. Si l'on utilise des souris déficientes pour le gène de l'IFNγ ou que l'on inhibe l'action de la cytokine par des anticorps, le stress n'a plus d'effet immunostimulant (Dhabhar, Satoskar *et coll.* 2000). La stimulation de la DTH par le stress est donc permise par une modulation de la production locale d'IFNγ. Les catécholamines et les GC sont impliqués puisque l'adrénalectomie supprime l'effet stimulant du stress sur la DTH et l'administration de faibles doses de catécholamines ou de

GC a le même effet stimulant que le stress (Dhabhar and McEwen 1999). En revanche, l'administration chronique de corticostérone à des rats, mimant un stress chronique, diminue la DTH (Dhabhar and McEwen 1999). Chez la souris, certains auteurs ont confirmé qu'un stress de contention juste avant l'injection cutanée augmente la DTH (Flint, Valosen *et coll.* 2001). Au contraire, d'autres ont rapporté une inhibition de la DTH (Hosoi, Tsuchiya *et coll.* 1998).

e. Le stress induit la libération systémique de cytokines inflammatoires d'origine non-immune

Un stress aigu peut induire la production de médiateurs de l'inflammation en l'absence de stimulation immune. Ainsi, chez les rongeurs, des niveaux relativement élevés d'IL-6 peuvent être détectés dans la circulation sanguine à la suite d'un stress aigu (LeMay, Vander *et coll.* 1990; Zhou, Kusnecov *et coll.* 1993; Nukina, Sudo *et coll.* 1998). Chez l'Homme, un stress psychologique ou un exercice physique aigu sont en mesure d'augmenter les concentrations plasmatiques de l'IL-6 mais aussi du TNF-α et de l'antagoniste du récepteur de l'IL-1 (Drenth, Van Uum *et coll.* 1995; Steptoe, Willemsen *et coll.* 2001; Owen, Poulton *et coll.* 2003). Chez le rat, d'autres protéines de la phase aiguë telles que la protéine de transport des GC, la glycoprotéine acide α1, l'haptoglobine ou l'albumine sont aussi augmentées après une session de chocs électriques (Deak, Meriwether *et coll.* 1997).

La majorité des études se s'est concentrée sur la production plasmatique d'IL-6. Son origine est encore mal déterminée. L'hypothèse selon laquelle l'IL-6 serait produite suite à une translocation bactérienne au niveau de la muqueuse intestinale (Ando, Brown *et coll.* 2000) est mise à mal par le fait que cette augmentation est aussi observée chez des animaux axéniques (=dépourvus de flore bactérienne intestinale) (Nukina, Sudo *et coll.* 2001). L'hypophyse, les surrénales, la rate et les reins ne semblent pas être des sources significatives d'IL-6 en réponse au stress (Takaki, Huang *et coll.* 1994; Nukina, Sudo *et coll.* 2001). Il a été proposé que la cytokine serait libérée par les cellules de Kuppfer situées au niveau du foie, en réponse à une stimulation sympathique (Sheridan, Feng *et coll.* 1991; Kitamura, Konno *et coll.* 1997; Nukina, Sudo *et coll.* 2001). En réalité, il est probable que les sources soient multiples. Par exemple, les mastocytes sont aussi producteurs d'IL-6 lors du stress. Après un stress de contention, des souris déficientes en mastocytes ne présentent pas d'augmentation d'IL-6 plasmatique (Huang, Pang *et coll.* 2003). *In vitro*, les cellules endothéliales humaines libèrent de l'IL- 6 en réponse à une stimulation par la NA ou l'A (Gornikiewicz, Sautner *et coll.* 2000). Enfin, la masse musculaire est une source importante d'IL-6 lors d'un exercice physique et les cellules musculaires sont capables de libérer de l'IL-6 en réponse à une stimulation par le LPS (Febbraio and Pedersen 2002; Frost, Nystrom *et coll.* 2002). En dépit de ces arguments, les conséquences de la libération de cytokines inflammatoires lors du stress sont inconnues.

Avec l'IL-1 et le TNF-α, l'IL-6 est l'une des principales cytokines responsables de la réponse de fièvre lors d'un processus inflammatoire (Lenczowski, Bluthe *et coll.* 1999; Netea, Kullberg *et coll.* 2000). Le stress induit une hyperthermie (Hashimoto, Watanabe *et coll.* 2001) et il est possible que l'IL-6 soit impliquée (Oka, Oka *et coll.* 2001). L'IL-6 pourrait aussi contribuer à maintenir la production hépatique de glucose, nécessaire à une activité musculaire prolongée (Febbraio and Pedersen 2002). De ce point de vue, elle agirait donc en synergie avec les GC.

En bref

La confrontation au stress a d'importantes répercussions sur le fonctionnement du système immunitaire : il entraîne une redistribution des cellules immunocompétentes, il exacerbe la réponse inflammatoire de l'organisme en réponse à un pathogène, il augmente la synthèse de cytokines pro-inflammatoires. La plupart de ces phénomènes est lié aux contacts étroits qui existent entre les médiateurs du stress (SAM et HPA) et les cellules du système immunitaire.

5. Altérations de la réponse au stress chez les dépressifs

La dépression majeure est très fréquemment associée à des altérations neuroendocrines en particulier une hyperactivité de l'axe HPA et un déficit du rétrocontrôle négatif (voir ci-dessous). Cependant, on ne peut clairement pas affirmer que l'hyperactivité de ce système constitue un élément étiologique suffisant pour induire un état dépressif. Un bon exemple permettant de confirmer cela peut être observé chez les patients atteints d'hypercorticisme chronique, plus communément appelé « syndrome de Cushing ». Cette pathologie, d'origine endogène ou médicamenteuse, est caractérisée par des concentrations plasmatiques élevées en cortisol. Bien qu'environ 80% des patients souffrent de troubles affectifs, seuls un peu plus de la moitié développent un syndrome dépressif majeur (Wolkowitz, Burke *et coll.* 2009). Ceci indique que de telles anomalies sont à l'origine de l'apparition de troubles dépressifs seulement chez une certaine catégorie de patients vraisemblablement porteurs de facteurs de prédisposition.

De la même manière, les altérations du système immunitaire semblent constituer un élément étiopathogénique important dans la mise en place d'un syndrome dépressif. La multitude de travaux réalisés chez des patients atteints de pathologies chroniques nécessitant des traitements par interférons et/ou autres cytokines au long cours, a permis de mettre en avant une hypothèse

« immunitaire de la dépression » (voir partie I.5.C). Cependant, là encore, seuls certains patients développent des effets secondaires neuropsychiatriques de type dépression (Van Gool, Kruit *et coll.* 2003).

A. AU NIVEAU DE L'AXE HPA

Un grand nombre de facteurs de risque génétiques ou environnementaux pour la dépression est corrélé à des modifications de l'activité de l'axe HPA chez l'adulte (Nemeroff 1996). Nous avons vu précédemment que l'exposition à des stresseurs au cours de la période prénatale (exposition à des drogues psychotropes ou à la nicotine), ou au cours de la période post-natale (séparation précoce de la mère ou des traumatismes durant l'enfance) peut prédisposer un sujet à développer une dépression à l'âge adulte accompagnée d'une hyperactivité permanente de l'axe HPA (Tarullo and Gunnar 2006).

Le rôle de l'axe HPA dans la dépression est mis en avant par un certain nombre de travaux rapportant des niveaux plasmatiques, salivaires et urinaires de cortisol élevés, une diminution fonctionnelle de l'activité des récepteurs GR ou MR, une sensibilité exagérée des glandes surrénales à la stimulation par l'ACTH, une réponse affaiblie de l'hypophyse à la stimulation par le CRF, une augmentation du volume des glandes surrénales ou encore un déficit du rétrocontrôle négatif (Pariante 2003).

L'altération du rétrocontrôle négatif est une des données les mieux répliquées, basée en général sur une diminution de la suppression des GC par la dexaméthasone (Nemeroff 1996; Holsboer 2000). Le test de suppression à la dexaméthasone, consiste à injecter un corticostéroïde exogène - la dexaméthasone- ce qui induit dans les heures suivantes une diminution des GC endogènes grâce à l'activation du rétrocontrôle négatif. Ce test montre qu'une grande proportion de patients dépressifs conserve une concentration en GC endogènes élevée, indiquant une altération du rétrocontrôle négatif de l'axe HPA. Un autre test, basé sur le même principe mais plus sensible pour détecter les dysfonctionnements de l'axe HPA est le test de suppression de dexaméthasone-CRF combinés qui associe l'injection de dexaméthasone, suivi plusieurs heures après, d'une injection de CRF. Si l'intégrité du rétrocontrôle négatif est conservée, l'injection de CRF doit entraîner une augmentation limitée d'ACTH et de cortisol. Un grand nombre de patients dépressifs présente une augmentation importante de cortisol après dexaméthasone et CRF (Holsboer 2001). Ces derniers tests identifient non seulement des anomalies de la régulation de l'axe HPA dans la dépression mais indiquent aussi que, lorsque des patients présentent des altérations de l'axe HPA, la rémission clinique est bien souvent associée à la normalisation de l'activité et du rétrocontrôle négatif de l'axe HPA, que la rémission soit spontanée ou qu'elle soit due à des traitements avec des antidépresseurs ou des électrochocs (Nemeroff 1996). Une réponse à ces tests avec un niveau élevé de cortisol est corrélée avec un risque de rechute 5 à 6 fois plus important chez les individus qui

ont déjà eu un épisode dépressif (Zobel, Nickel *et coll.* 2000). Enfin, il a été montré que chez les sujets à haut risque, les anomalies de l'activité de l'axe HPA sont préexistantes à l'apparition des premiers symptômes dépressifs (Holsboer 2000).

a. Implication du CRF

De nombreuses études ont mis en évidence un rôle du CRF dans pathophysiologie de la dépression: une augmentation du nombre de neurones à CRF dans le PVN, du nombre de neurones sécrétant à la fois le CRF et la vasopressine, et du niveau d'expression de CRF dans les neurones du PVN (Raadsheer, van Heerikhuize *et coll.* 1995). Ceci pourrait être responsable de plusieurs symptômes observés chez les patients dépression. Par exemple l'injection intracérébrale de CRF chez des rongeurs induit plusieurs altérations rappelant certains des symptômes de la dépression comme une diminution du comportement alimentaire et de l'activité sexuelle, une perturbation du sommeil et de l'activité et une augmentation de l'anxiété (Holsboer 2001). De plus, un polymorphisme du gène du récepteur CRF_1 a été identifié et associé à une augmentation du risque de développer un syndrome dépressif (Liu, Zhu *et coll.* 2006). Il semble que les effets des antidépresseurs soient également liés à des changements du système CRF. En effet, la concentration en CRF dans le LCR est diminuée par l'administration chronique d'antidépresseurs (Heuser, Schweiger *et coll.* 1996). Le traitement antidépresseur facilite la diminution de la synthèse du CRF à la suite de la stimulation des récepteurs aux corticostéroïdes (Barden 1996). De plus, les antagonistes du récepteur CRF_1 ont montré une certaine efficacité dans différents tests et modèles de dépression chez les rongeurs mais aussi lors d'essais cliniques (Zobel, Nickel *et coll.* 2000). Enfin, il est également possible que les voies centrales du système au CRF soient également impliquées dans la dépression. En effet, ces voies participent à la réponse au stress et elles supportent notamment les effets anxiogènes du CRF, symptômes fréquemment relevés lors d'épisode dépressifs, comme il a été montré par l'utilisation de souris dont le gène du récepteur CRF_1 était inactivé d'une manière conditionnelle (souris *knock-out* –KO– conditionnelle) (Muller, Zimmermann *et coll.* 2003).

b. Implication de la vasopressine

Plusieurs arguments suggèrent aussi l'implication de la vasopressine dans la dépression majeure. Tout d'abord, le niveau de vasopressine et le nombre de cellules exprimant la vasopressine sont augmentés dans le PVN de patients dépressifs (Purba, Hoogendijk *et coll.* 1996; Merali, Kent *et coll.* 2006). Ces changements peuvent avoir des conséquences fonctionnelles directes sur l'activité de l'axe HPA, d'ailleurs la réactivité de l'hypophyse à la stimulation par la vasopressine est augmentée chez les patients (Dinan, Lavelle *et coll.* 1999). Il est également important de noter que, lors d'un stress aigu, le CRF est la principale cause de libération de l'ACTH tandis que la vasopressine prend une part de plus en plus importante dans la sécrétion de l'ACTH

quand le stress devient chronique (Scott and Dinan 1998). Sachant que la dépression est par définition un état qui persiste plusieurs semaines, ces observations indiquent que l'hyperactivité de l'axe HPA dans la dépression serait préférentiellement sous-tendue par la vasopressine plutôt que par le CRF. D'ailleurs, on trouve chez les dépressifs une élévation des niveaux de vasopressine qui est corrélée avec le niveau de cortisol et le risque de suicide (Meynen, Unmehopa *et coll.* 2006). Le niveau de vasopressine plasmatique peut être une donnée significative pour le fonctionnement de l'axe HPA ou lors de la dépression, étant donné que l'injection intraveineuse de vasopressine est capable d'induire directement l'élévation des niveaux d'ACTH et de cortisol (Gispen-de Wied, Westenberg *et coll.* 1992). Enfin, un polymorphisme du gène du récepteur V_{1b} de la vasopressine aurait un effet protecteur contre la dépression majeure (van West, Del-Favero *et coll.* 2004).

B. AU NIVEAU DU SYSTEME NERVEUX AUTONOME

Tout comme l'axe HPA, le SNA semble également être perturbé chez les patients atteints de dépression majeure. En effet, il a été montré à plusieurs reprises que les concentrations plasmatique et urinaire en catécholamines, en particulier en NA, sont plus élevées chez les dépressifs que chez des patients contrôles (Wyatt, Portnoy *et coll.* 1971; Esler, Turbott *et coll.* 1982; Lake, Pickar *et coll.* 1982; Barnes, Veith *et coll.* 1983; Siever and Davis 1985; Roy, Pickar *et coll.* 1988; Veith, Lewis *et coll.* 1994). Comme la concentration plasmatique en NA reflète le niveau d'activité de la branche sympathique du SNA, les niveaux élevés de NA rapportés dans ces différents travaux ont été associés à une hausse de l'activité du SNS chez les dépressifs. Cependant, l'interprétation de la variation du taux de NA plasmatique demeure complexe en raison de la balance entre les processus de synthèse et de dégradation (Esler, Jennings *et coll.* 1988). Plus récemment, Gold *et coll.* ont mesuré chez 22 patients, atteints d'une forme sévère de dépression majeure, les concentrations en NA dans le LCR et le plasma ainsi que les taux plasmatiques d'adrénaline et de cortisol (Gold, Wong *et coll.* 2005). L'intérêt majeur de leur travail a été de réaliser ces mesures toutes les heures sur une période totale de 30h. Ils ont ainsi pu observer que les taux de NA (plasma et LCR) étaient significativement élevés chez les dépressifs entre 2h du matin et 1h de l'après-midi avec un pic à 10h. Cependant, il semblerait que ces résultats ne soient valables que pour les patients souffrant de dépression majeure sévère ; par contre, chez des patients atteint de dépression atypique les données ne sont pas du tout les mêmes, voire même opposées (Gold, Gabry *et coll.* 2002).

D'autres études ont également mis en évidence des altérations du fonctionnement de la branche parasympathique du SNA chez les patients dépressifs mais les résultats sont assez contradictoires, vraisemblablement en raison de la grande disparité des troubles dépressifs. Par exemple, des données indiquent une diminution de l'activité parasympathique chez les dépressifs (Rechlin, Weis

et coll. 1994; Guinjoan, Bernabo *et coll.* 1995) alors que d'autres ne détectent aucune altérations (Yeragani, Pohl *et coll.* 1991; Moser, Lehofer *et coll.* 1998; Bar, Greiner *et coll.* 2004).

En bref

Les systèmes de réponse au stress sont fortement altérés au cours de la dépression, tant au niveau du système sympatho-adréno-médullaire (SAM) qu'au niveau de l'axe HPA. Leur activité, en particulier celle de l'axe HPA est augmentée chez les patients dépressifs. Cependant, il est important de considérer que de telles altérations sont vraisemblablement nécessaires mais pas suffisantes pour induire un état dépressif. D'autres facteurs entrent en compte, comme par exemple le système immunitaire dont le fonctionnement est également perturbé au cours de la dépression.

6. L'individualité dans la réponse au stress

A. SOURCES DE VARIABILITE EN REPONSE AU STRESS

Les conséquences biologiques et comportementales du stress semblent varier de façon importante en fonction d'un certain nombre de facteurs, conférant un caractère unique à la réponse mise en place par l'organisme. Dans les lignes qui suivent, je vais détailler quelques uns de ces facteurs qui contribuent grandement à la variabilité observée lors des expérimentations, et qui, par conséquent, peuvent conduire à des résultats confus d'une étude à l'autre, voire à des contradictions. Ces contradictions viennent en partie du fait que la notion de stress est beaucoup trop large et recouvre des situations extrêmement diverses. Le caractère potentiellement stressant d'un stimulus résulte de plusieurs facteurs. Il dépend de la nature de ce stress, mais aussi de la capacité de l'organisme à répondre de façon adaptée à ce stress. Cette aptitude dépend vraisemblablement de caractéristiques stables de l'animal (sa réactivité émotionnelle, la façon dont il perçoit et interprète les stimuli environnementaux) et de caractéristiques transitoires, liées à l'état de l'organisme au moment où survient le stress.

a. Différences liées à la nature du stress

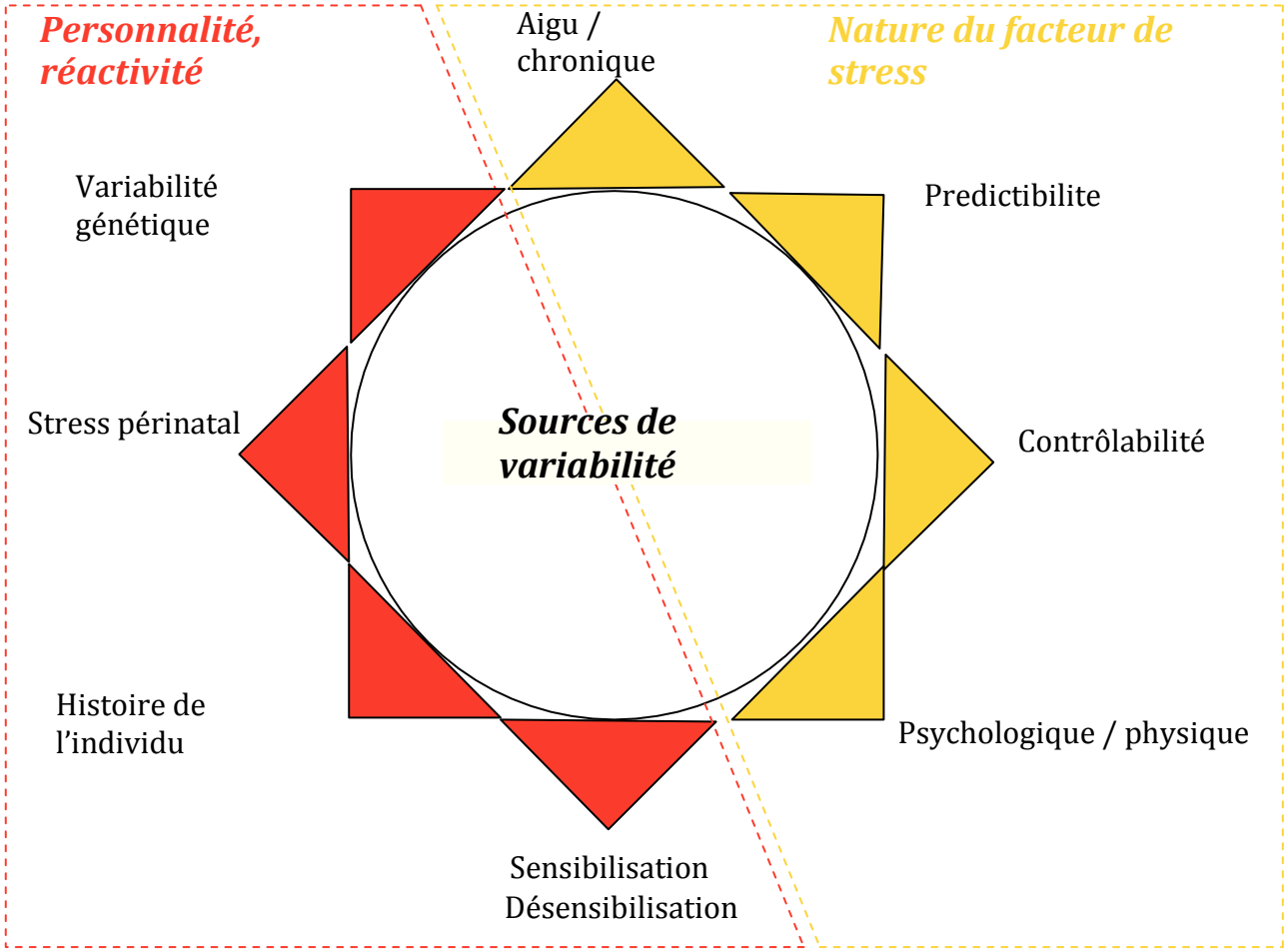
Hans Selye pensait que la réponse au stress était non spécifique. En effet, tous les stresseurs entraînent une activation de l'axe corticotrope et du système sympathique. Cependant, Pacák et Palkovits (2001) ont montré que l'activation endocrinienne et l'expression de la protéine Fos dans le cerveau sont très différentes selon qu'il s'agit d'un stress de contention, d'une

hémorragie, d'une hypoglycémie, d'une exposition au froid ou à la douleur (Pacak and Palkovits 2001). Il n'est pas surprenant que des « agressions » visant des variables physiologiques aussi importantes que la glycémie, la pression artérielle ou la température corporelle présentent des signatures neuroendocriniennes différentes. Des stresseurs essentiellement de nature psychologique (chocs électriques, contention, stress social) semblent également entraîner des réponses physiologiques différentes. Plusieurs critères de classification des facteurs de stress ont été identifiés, permettant de rendre compte de cette variabilité (**Fig. 16**). Ainsi, les réponses comportementales et biologiques à des chocs électriques sont beaucoup plus importantes si ces chocs sont inévitables que si l'animal a la possibilité de se mettre à l'abri (Mormede, Dantzer *et coll.* 1988; Palermo-Neto, de Oliveira Massoco *et coll.* 2003). L'amplitude de la réponse au stress dépend aussi de la prédictibilité du stresseur (Mormede, Dantzer *et coll.* 1988; Pitman, Natelson *et coll.* 1995). En effet, l'exposition intermittente à un même type de stresseur peut conduire à une diminution progressive des réponses comportementales, neuroendocrines et immunologiques de l'organisme. Ce phénomène, communément appelé « habituation », peut être comparé au processus d'habituation à un stimulus sensoriel. Bien que l'habituation à un stresseur ne soit pas une règle (la réponse peut parfois ne pas changer ou même être augmentée), elle a été rapportée dans de nombreuses situations de stress et pour diverses variables physiologiques. Par exemple, l'activité cardiaque autonome en réponse à un conflit social diminue à chaque nouvelle rencontre chez les rats victorieux (Sgoifo, Pozzato *et coll.* 2001). L'augmentation des catécholamines plasmatiques en réponse à un stimulus sonore décroît avec les répétitions du stimulus (De Boer, Slangen *et coll.* 1988). L'altération de la prolifération lymphocytaire induite par l'exposition à un bruit intense ou à des chocs électriques diminue à chaque répétition, et finit par disparaître (Lysle, Cunnick *et coll.* 1990; Sandi, Cambronero *et coll.* 1992).

Ainsi, si les caractéristiques intrinsèques des facteurs de stress constituent un premier facteur de variabilité dans la réponse émise par l'organisme face au stresseur, on comprend d'ores et déjà pourquoi la multitude de protocoles utilisant différents types de stresseurs aigus mène à des résultats parfois contradictoires. De la même manière, il ne paraît ainsi pas très étonnant que les protocoles de stress chronique utilisés (qui ne sont jamais identiques d'une expérience à l'autre, même au sein d'un même laboratoire) fournissent des résultats pas toujours concordants. Les expériences réalisées au cours de cette thèse permettront d'illustrer ce problème.

Et quand bien même, nous parviendrions à utiliser à chaque fois le même protocole de stress, une multitude d'autres facteurs, liés à aux caractéristiques de l'individu cette fois, interviendraient et engendreraient de la variabilité.

Fig. 16 : ***Sources de variabilité dans la réponse au stress.***



b. Les différences liées à l'individu

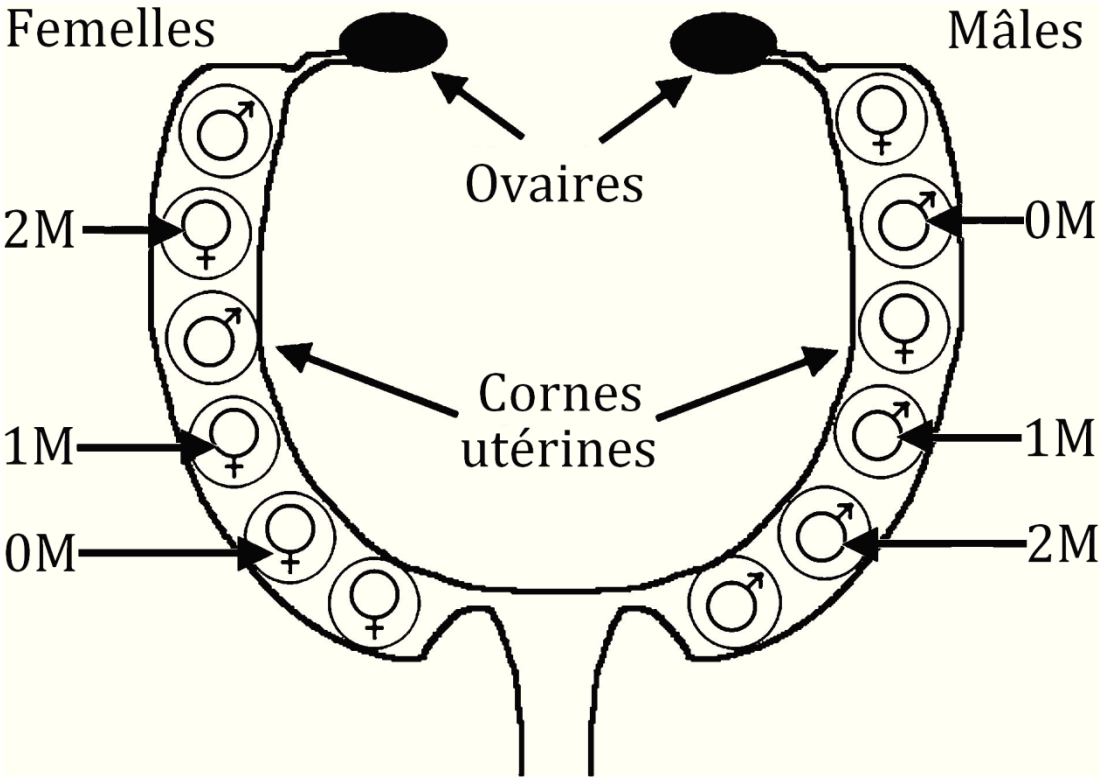
Dès la conception, et tout au long de sa vie, un individu est soumis à différentes contraintes qui vont façonner son « individualisme » tant au niveau comportemental que biologique. Dans les paragraphes qui suivent, sont exposés quelques uns des facteurs qui contribuent à instaurer l'individualité comportementale et biologique en essayant de respecter un aspect temporel allant de la conception à la vie adulte.

Rôle de la position intra-utérine

Chez les rongeurs, les fœtus sont disposés de façon linéaire à l'intérieur des deux cornes utérines (**Fig. 17**). Des échanges hormonaux se déroulent au niveau des fœtus adjacents. Par conséquent, un fœtus placé entre 2 autres fœtus mâles (appelé 2M sur la figure) est dans un « milieu hormonal » différent d'un fœtus placé entre deux autres femelles (0M). Au cours du développement, les androgènes, et en particulier la testostérone, vont participer activement à la masculinisation ou la féminisation du cerveau (vom Saal and Bronson 1980). Il va sans dire que l'action des hormones a un impact important sur la mise en place de certains comportements tels la reproduction et l'agression (Hutchison, Wozniak *et coll.* 1999). Les fœtus 2M, qu'ils soient mâles ou femelles, étant exposés à une plus grande quantité d'androgènes que les fœtus 1M et 0M vont être plus fortement masculinisés. Cela va se traduire par un poids à l'âge adulte plus important, des comportements agressifs et une territorialité plus prononcés ainsi qu'un comportement de reproduction accru [voir pour revue (Ryan and Vandenbergh 2002)]. A l'inverse, un fœtus mâle entouré par deux fœtus femelles va présenter plus de traits féminins.

À cette source de variabilité, vient s'ajouter le stress subi par la mère en gestation qui a pour conséquence l'exposition des fœtus à des concentrations en GC plus élevées. Dans ce cas, la position intra-utérine va également jouer un rôle central dans les effets biocomportementaux induits par l'exposition aux GC. En effet, il a été observé que l'effet des androgènes sur le développement des fœtus est différent en présence de taux élevés de GC : seuls, ils augmentent la territorialité et l'agressivité alors qu'en présence de taux élevés de GC ils augmentent les comportements de soumission (Leshner and Schwartz 1977). Ces travaux montrent bien que très tôt au cours du développement, chaque individu acquiert des caractéristiques qui vont le différencier des autres individus d'une même portée, contribuant ainsi à la mise en place, des premières « briques » de la vie, de la variabilité interindividuelle.

Fig. 17 : ***Exemple de répartition intra-utérine des f tus chez les rongeurs.*** *D'après Ryan et Vandenbergh, 2002.*



Facteurs postnataux

Comme nous venons de le voir, tous les individus d'une même portée ne naissent pas égaux et possèdent chacun des traits de caractère spécifiques qui se traduiront au moment de l'allaitement par exemple. En effet, les individus les plus combatifs auront un accès aux tétines plus régulier et se développeront par conséquent plus rapidement (Barnard, Behnke *et coll.* 1998). Ainsi les différences entre les individus s'accentueront et contribueront grandement à influencer le statut social de chaque individu. Un autre facteur particulièrement déterminant dans la réponse ultérieure d'un individu confronté à un stresseur est l'attention portée par la mère à ses petits. Nombreuses sont les études montrant que les interactions sociales, avec les parents ou avec ses semblables, prédisposent un individu à certains types de personnalité (Meaney 2001; Champagne, Francis *et coll.* 2003). Par exemple, il a été montré que des soins parentaux importants étaient corrélés positivement à l'agressivité des petits à haut statut social (Barnard, Behnke *et coll.* 1998).

Environnement social à l'âge adulte

Des caractéristiques environnementales telles que les liens sociaux au sein d'un groupe peuvent aussi influencer le type de réponse à une situation stressante (Sachser, Durschlag *et coll.* 1998; Ruis, te Brake *et coll.* 2001). Dans ce cas, la classification n'est valable que dans le contexte social et peut varier si l'animal est changé d'environnement. Le statut social résulte alors de l'interaction entre des

caractéristiques propres à l'individu et les caractéristiques des autres membres du groupe dans lequel il se trouve (Drews 1993). Chez les rongeurs, le statut social est corrélé à l'activité locomotrice (Vekovishcheva, Sukhotina *et coll.* 2000), à l'agressivité (Blanchard, Flannelly *et coll.* 1988; Koolhaas, De Boer *et coll.* 1997), à la réactivité émotionnelle (Aubert 2001) et à des caractéristiques cognitives (Aubert 2001; Barnard and Luo 2002). En conditions stressantes, les dominants présenteraient une réponse majoritairement sympathique alors que les dominés auraient une réponse plutôt de nature corticotrope (Ely and Henry 1978). Le rang social semble également influencer la réactivité immunitaire. : en particulier la croissance tumorale (Grimm, Emerman *et coll.* 1996). D'autre part, les dominés seraient plus sensibles aux infections virales (Ebbesen, Villadsen *et coll.* 1991) et parasitaires (Schuster and Schaub 2001). Le rang social constitue donc une variable pertinente permettant de mieux appréhender la variabilité interindividuelle en réponse au stress.

L'état d'activation des systèmes neuroendocrine et immunitaire

Un autre paramètre qui semble contribuer grandement à la variabilité entre les individus dans la réponse à un stresseur est « l'état » dans le quel se trouve l'organisme au moment où la réponse est initiée. En effet, il semblerait, par exemple, que l'état « inflammatoire » dans le quel se trouve l'animal au moment du challenge entraîne des variations importantes dans la réponse émise par l'organisme face au stresseur. L'influence réciproque entre stress et réactivité inflammatoire est sujette à un nombre croissant d'études. Il été montré, chez le rat, qu'un challenge inflammatoire (injection de LPS ou d'IL-1) peut sensibiliser pour plusieurs semaines l'axe corticotrope. Ainsi, lorsque l'on stimule à nouveau l'animal avec un stimulus de nature inflammatoire (IL-1) ou non inflammatoire (flash lumineux), la réponse en matière de sécrétion d'ACTH et de corticostérone est augmentée par rapport aux animaux n'ayant pas subi de challenge inflammatoire (Schmidt, Janszen *et coll.* 1995; Weidenfeld and Yirmiya 1996). Cette sensibilisation de l'axe corticotrope est en partie permise par un accroissement de la synthèse et du stockage de la vasopressine dans les neurones producteurs de CRH de l'hypothalamus. Lors d'un nouveau stress, la vasopressine est libérée en même temps que le CRH et agit en synergie sur la libération d'ACTH (Schmidt, Binnekade *et coll.* 1996; Tilders and Schmidt 1999). De plus, une activité inflammatoire importante semble réduire la sensibilité de l'axe corticotrope au rétrocontrôle négatif des glucocorticoïdes, accentuant d'autant plus le phénomène de sensibilisation (Weidenfeld and Yirmiya 1996).

De façon réciproque, il a été observé que les chocs électriques ou la défaite sociale augmentent la sensibilité du système immunitaire à un challenge inflammatoire ultérieur (Johnson, O'Connor *et coll.* 2002; O'Connor, Johnson *et coll.* 2003). Cet accroissement de la réponse inflammatoire est permis par une diminution de la sensibilité des cellules immunitaires à l'inhibition par les glucocorticoïdes (Stark, Avitsur *et coll.* 2001).

Conséquences bio-comportementales de l'individualité

Au sein d'une espèce, les individus diffèrent dans leur façon de répondre au stress. L'étude des différences interindividuelles est souvent abordée par une tentative de classification en différents « styles adaptatifs », incluant des paramètres psychologiques, comportementaux et plus rarement physiologiques. En psychologie humaine, des études épidémiologiques ont permis d'établir des corrélations entre le « **style adaptatif** » des individus, le niveau de stress perçu et quelques mesures biologiques (Stowell, Kiecolt-Glaser *et coll.* 2001). D'après les critères de Rosenman et Friedman, il est possible de définir deux profils de réactivité comportementale dits A et B (Consoli 1993). Les individus de type A, caractérisés par une hyperactivité, une impatience et une précipitation, ont une réponse sympathique supérieure aux individus de type B lors d'un stress physique ou psychologique et présentent un risque de maladies cardiovasculaires supérieur (Schroeder, Narkiewicz *et coll.* 2000).

Les travaux réalisés chez l'animal montrent que le « style adaptatif » n'est pas uniquement comportemental et psychologique, mais aussi physiologique (Koolhaas 2008). Chez le rat, les individus peuvent opter pour deux types de stratégie comportementale face à une situation stressante. L'attitude « **proactive** » correspond à des animaux qui présentent un comportement actif en essayant d'éliminer le facteur de stress. Les animaux proactifs sont en général plus agressifs que leurs semblables. L'autre stratégie, dite « **réactive** », consiste à subir le stress de façon passive et correspond à des individus peu agressifs. Le choix de l'une de ces deux stratégies par l'animal est une caractéristique stable dans le temps, que l'on peut ainsi considérer comme un trait, et elle est très bien corrélée avec des critères neuroendocriniens (tableau 4). Par exemple, Rodgers et collaborateurs ont montré en 1999 que les concentrations plasmatiques en corticostérone sont fortement corrélées à l'expression de comportements anxieux de type « risk assessment » à la fois chez la souris et chez le rat, 2 à 5 minutes après avoir été confronté au paradigme de la croix surélevée (Rodgers, Haller *et coll.* 1999). Ces résultats illustrent bien les différences interindividuelles en terme de style adaptatif, associées à la fois à des variables comportementales et biologiques.

Cependant, aucun des deux styles ne peut être qualifié de mieux adapté que l'autre à l'environnement : ils correspondent seulement à des stratégies différentes et, en fonction de la situation (stress évitable ou non, prévisible ou non), un style ou l'autre sera plus efficace (Koolhaas, Korte *et coll.* 1999).

Tableau 4. Profils de réactivité chez le rat. *Adapté de Koolhaas, 1999.*

	Style proactif	**Style réactif**
Caractéristiques comportementales		
Latence d'attaque	Faible	Élevée
Evitement actif	Élevé	Faible
Stéréotypie	Élevée	Faible
Freezing	Faible	Élevé
Caractéristiques endocriniennes		
Activité de l'axe HPA	Faible	Élevée
Réactivité de l'axe HPA	Faible	Élevée
Réactivité sympathique	Élevée	Faible
Réactivité parasympathique	Faible	Élevée
Testostérone plasmatique	Élevée	Faible

B. ORIGINES DE L'INDIVIDUALITE

a. Différences génétiques

Les différents profils de réactivité observés au sein d'une espèce ou au sein d'un groupe résultent de l'interaction entre des déterminismes d'origines génétique et épigénétique (Fig.17). L'implication de facteurs génétiques dans la variabilité individuelle est facilement mise en évidence en comparant entre eux différents groupes génétiquement homogènes. L'obtention de lignées consanguines chez les rongeurs est réalisée en effectuant des croisements entre congénères de même génotype sur de nombreuses générations. Les lignées ainsi obtenues diffèrent très nettement dans leur réponse à de nombreux tests comportementaux, même si elles ont été élevées dans le même environnement (Mormede, Courvoisier *et coll.* 2002). Des différences entre lignées ont aussi été observées au niveau de l'augmentation des GC et des catécholamines plasmatiques après confrontation à divers stresseurs chez la souris, le rat ou les oiseaux (Mormede, Courvoisier *et coll.* 2002).

Les variations entre lignées se manifestent également au niveau de la susceptibilité à certaines infections. Par exemple, il existe des lignées de souris résistantes aux mycobactéries, dites BCG-résistantes (C3H/HeCr, A/J et DBA/2), et d'autres BCG-sensibles (Bi0.A, C57BL/6, BALB/c) chez lesquelles la croissance bactérienne est beaucoup plus importante (Forget, Skamene *et coll.* 1981). Ces différences immunitaires et neuroendocriniennes conduisent à une forte variabilité des conséquences qu'un stresseur peut avoir sur le système immunitaire. Ainsi, le stress de contention est capable de diminuer la résistance à une infection par des mycobactéries chez les souches BCG-sensibles, mais pas chez les BCG-résistantes (Brown, Sheridan *et coll.* 1993). Ou encore, l'augmentation de la réponse humorale par le stress est observée chez les souris BALB/cByJ mais pas chez les C57BL /6J (Shanks and Kusnecov 1998).

De plus, il est possible de sélectionner spécifiquement des lignées pour un critère comportemental donné. Ainsi, Benus et coll. ont crée des lignées de rongeurs agressifs et non agressifs en sélectionnant les mâles selon la durée de la latence d'attaque lorsqu'un animal étranger est introduit sur leur territoire (Benus, Bohus *et coll.* 1991). Les souris et les rats SAL (latence d'attaque courte) présentent un profil de réactivité proactif, alors que les LAL (latence d'attaque longue) montrent un profil de type réactif (Koolhaas, Korte *et coll.* 1999). La réactivité et la vulnérabilité au stress sont donc sous le contrôle de facteurs génétiques.

Une autre source de variabilité génétique est liée au sexe. Ces différences s'expriment notamment au niveau de la réactivité comportementale dans différentes situations anxiogènes utilisées pour mettre au point des modèles animaux d'anxiété ou de dépression (Palanza, Gioiosa *et coll.* 2001). Par exemple, la réponse comportementale de rats à une session de chocs électriques dépend de leur sexe: les femelles semblent moins affectées que les mâles (Steenbergen, Heinsbroek *et coll.* 1989). Le sens de ces différences varie selon le modèle utilisé. Notons cependant que les modèles de stress social chronique sont obtenus à partir d'animaux mâles, alors qu'il est plus difficile d'obtenir de fortes relations de dominance ou de hauts niveaux d'agressivité chez les femelles (Palanza, Gioiosa *et coll.* 2001).

b. Rôle de l'épigénétique

Qu'est-ce que l'épigénétique ?

« L'épigénétique a toujours été l'ensemble de ces choses bizarres et merveilleuses que la génétique ne sait pas expliquer.» *Denise Barlow (Vienne, Autriche).*

****

« On peut sans doute comparer la distinction entre la génétique et l'épigénétique à la différence entre l'écriture d'un livre et sa lecture. Une fois que le livre est écrit, le texte (les gènes ou l'information stockée sous forme d'ADN) sera le même dans tous les exemplaires distribués au public. Cependant, chaque lecteur d'un livre donné aura une interprétation légèrement différente de l'histoire, qui suscitera en lui des émotions et des projections personnelles au fil des chapitres. D'une manière très comparable, l'épigénétique permettrait plusieurs lectures d'une matrice fixe (le livre ou le code génétique), donnant lieu à diverses interprétations, selon les conditions dans lesquelles on interroge cette matrice. » *Thomas Jenuwein (Vienne, Autriche).*

****

Ces citations illustrent plutôt bien ce qu'est l'épigénétique : des modifications réversibles de l'expression des gènes qui ne s'accompagnent pas de changement de la séquence nucléotidique. Ce terme comprend la modification de l'ADN par méthylation des cytosines, la modification de protéines

histones par fixation covalente de différents groupements chimiques (acétylation, méthylation, phosphorylation, ubiquitination, etc.), l'incorporation de variants d'histone (H2A-X, H2A.Z, H3.3, etc.) et les régulations médiées par les petits ARNs non-codants. Tous ces changements sont finement régulés et soumis à de nombreuses modifications et ce, en réponse à un environnement donné et impliquent toutes les voies de signalisation décrites à ce jour. L'épigénétique constitue l'un des fondements de la diversité biologique.

Mécanismes impliqués

L'ADN, et les histones qui l'entourent, constituent le nucléosome, éléments de base de la chromatine (147 pb d'ADN entouré d'un octamère de quatre protéines histones H2A, H2B, H3 et H4) (**Fig. 18**). Une des manières dont l'expression d'un gène peut être régulée est l'état de la chromatine. Celle-ci est soit décondensée ou "ouverte" (on l'appelle alors « euchromatine ») permettant ainsi l'accès à la machinerie transcriptionnelle et l'expression génique, soit décondensée ou "fermée" (hétérochromatine), empêchant l'expression d'un gène. L'état de la chromatine est dicté par les modifications post-traductionnelles des protéines histones liées à l'ADN. La méthylation de ces protéines au niveau de résidus lysines entraîne une fermeture de la chromatine. Au contraire, l'acétylation également au niveau de résidus lysines entraîne une ouverture de la chromatine permettant ainsi la transcription. Il existe également d'autres types de modifications telles que la phosphorylation, la sumoylation et l'ubiquitination (Wade, Pruss *et coll.* 1997; Shiio and Eisenman 2003; Shilatifard 2006) qui aboutissent elles aussi à l'ouverture ou à la fermeture de la chromatine générant ainsi une interaction complexe entre la chromatine et les facteurs de transcription qui régulent l'expression des gènes.

Un autre type de modifications de l'expression génique consiste à agir directement au niveau de l'ADN (Fig. 18). Par exemple, la méthylation des cytosines qui précèdent des guanines au niveau de régions riches en dinucléotides CG appelés îlots CpG. Ces modifications, médiées par des enzymes – les DNA methyltransférases (DNMTs) -, aboutissent en général à l'abolition de l'expression du gène méthylé (mais ce n'est pas systématique).

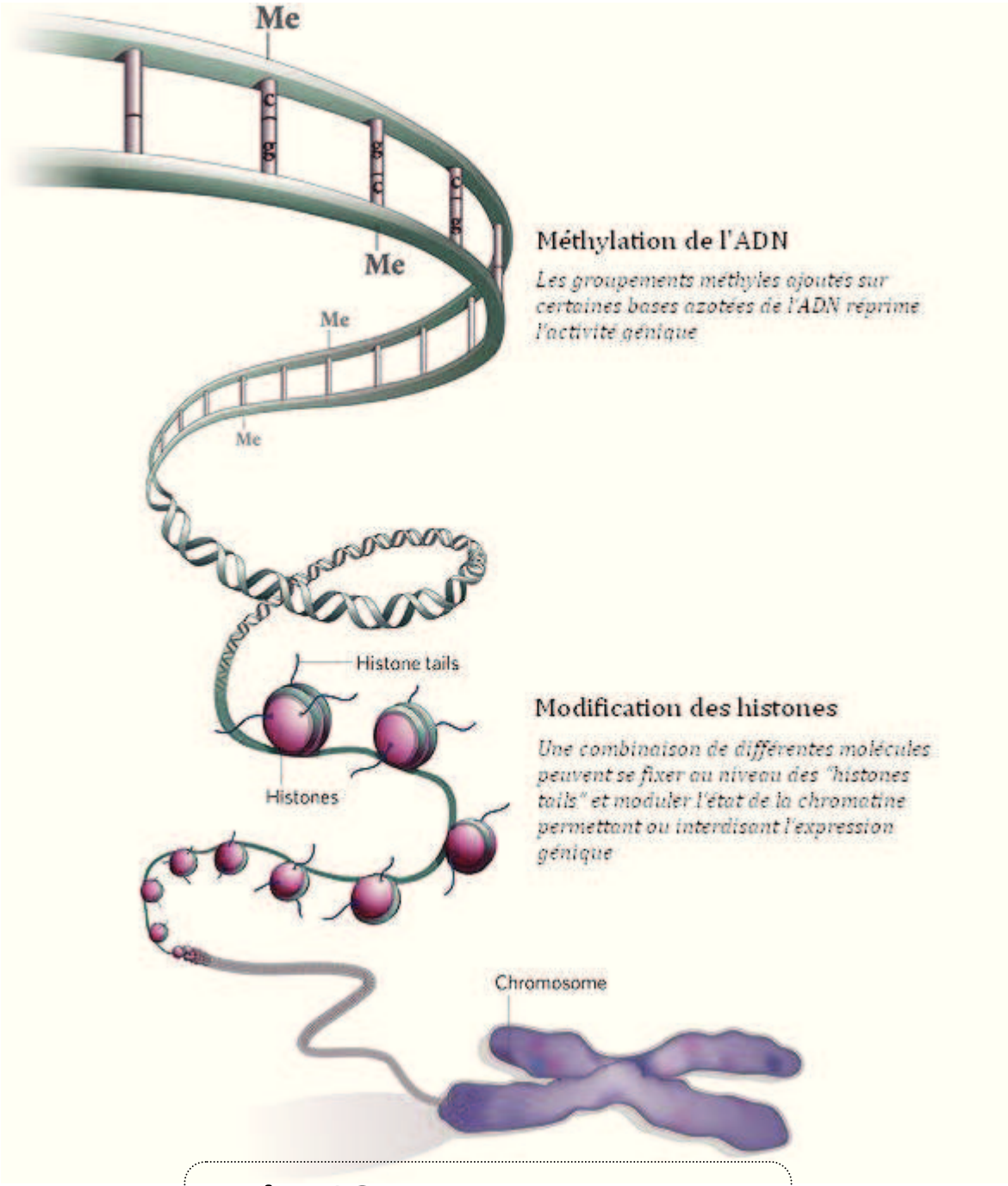


Fig. 18 : ***Les deux composantes du code épigénétique.*** *Adapté de Qiu, 2006.*

En conclusion : l'ADN, plus données que programme

Le concept de programme génétique, né de la découverte du code porté par l'ADN (succession de A, T, G, C), est devenu obsolète depuis que l'épigénétique a mis en exergue le rôle prépondérant de l'environnement cytoplasmique – la machinerie cellulaire - qui constitue vraisemblablement le programme « clé » capable de lire les données contenues dans l'ADN. Cet environnement chimique est bien évidemment influencé par le génotype d'un individu mais aussi par les facteurs environnementaux liés à l'histoire de l'individu qui vont façonner les éléments constitutifs de la machinerie cellulaire (mise en présence de toxine/traitements pharmacologiques/drogues, malnutrition, adversité sociale etc) et ainsi participer à l'élaboration d'un véritable « code épigénétique » qui va activement contribuer à augmenter la variabilité entre les individus (voir **Fig. 19**). Un autre aspect intéressant de l'épigénétique est que ce code épigénétique peut-être transmis au moment de la division cellulaire : ce ne sont non plus les gènes seuls qui seront transmis mais aussi leur état d'activité (état de méthylation par exemple) [voir (Atlan 1998), p38]. L'épigénétique semble constituer ainsi les fondements de la variabilité entre les individus.

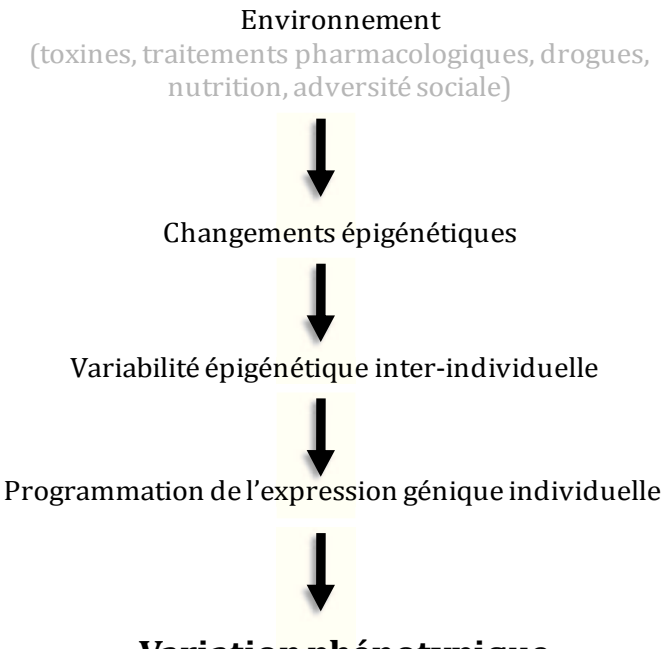


Fig. 19 : ***L'origine épigénétique de la variabilité phénotypique.*** *Adapté de Szyf et coll, 2007*

c. Quelles conséquences sur l'expression d'un *pattern* comportemental ?

Compte tenu de leur faculté à permettre ou inhiber l'expression de tels ou tels gènes, on comprend tout à fait le rôle central que vont jouer les processus épigénétiques dans l'expression d'un pattern comportemental. En effet, d'après l'organisation structurale des être vivants, on peut voir que l'expression d'un comportement est sous-tendue par une multitude de mécanismes touchant différents niveaux d'organisation (voir **Fig. 20**). En quelque sorte, un comportement peut être vu comme la résultante des derniers niveaux d'intégration des informations traitées par l'organisme. À ce titre, il va être influencé par tous mécanismes modifiant les niveaux inférieurs. Nous avons vu dans la partie précédente que l'épigénétique permettait d'influencer l'expression génique sans modifications notoires de la séquence nucléotidique de l'ADN. Ainsi, l'ensemble des mécanismes épigénétiques va constituer une des sources primaires principales de variabilité en altérant par exemple l'expression de gènes codant pour des protéines spécifiques, lesquelles engendreront des effets particuliers, susceptibles d'affecter différentes fonctions cellulaires telles que la neuroplasticité par exemple, qui, à son tour, va agir sur les circuits neuronaux chargés de réguler l'humeur (au niveau de différents noyaux/tissus/structures) et enfin aboutir à l'expression d'une réponse comportementale spécifique d'un individu face à un stresseur.

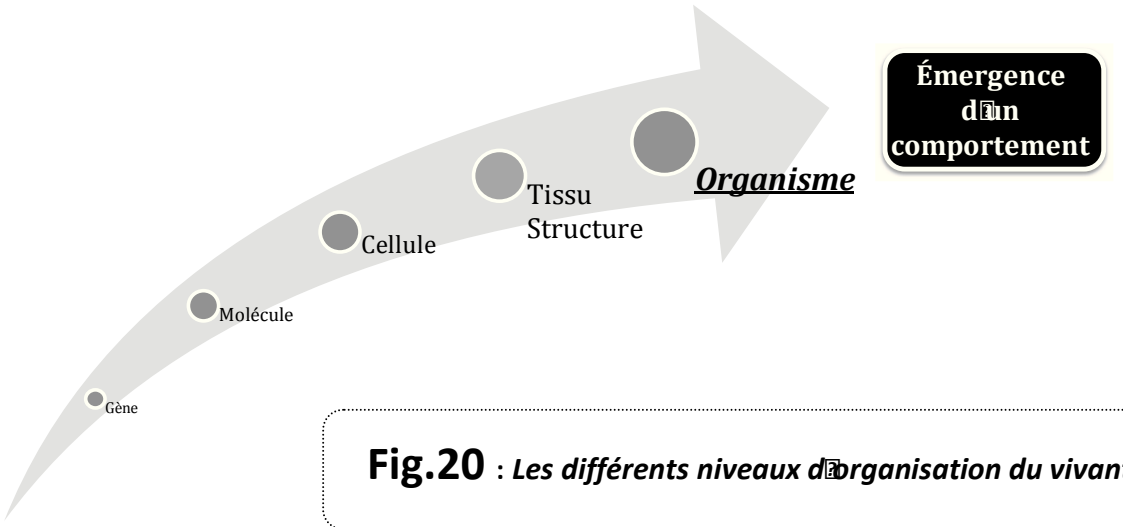


Fig.20 : ***Les différents niveaux d'organisation du vivant***

Compte tenu de ces arguments, il est bien évident que chaque individu pourra réagir de façon spécifique face à un stresseur particulier, certains étant affectés par un stress de contention par exemple, alors que d'autres seront résistants à ce même stresseur bien que potentiellement vulnérables face à d'autres types de stresseurs.

Ceci a de lourdes conséquences au moment du traitement des données et doit nous interroger sur la pertinence d'une approche statistique classique considérant « l'individu moyen » en comparaison à une approche prenant en considération « l'individu propre ». Cet aspect sera plus largement abordé et discuté dans la partie discussion de ce manuscrit.

En bref

Une multitude de facteurs peuvent faire varier les réponses biochimiques et comportementales mises en place par un individu lorsqu'il est confronté à un facteur de stress. Certains sont d'origine génétique, d'autres développementale ou environnementale. Ne pas tenir compte de ces différences interindividuelles entraîne bien souvent des incohérences dans les résultats obtenus d'une étude à l'autre.

III. LE MÉTABOLISME DU TRYPTOPHANE

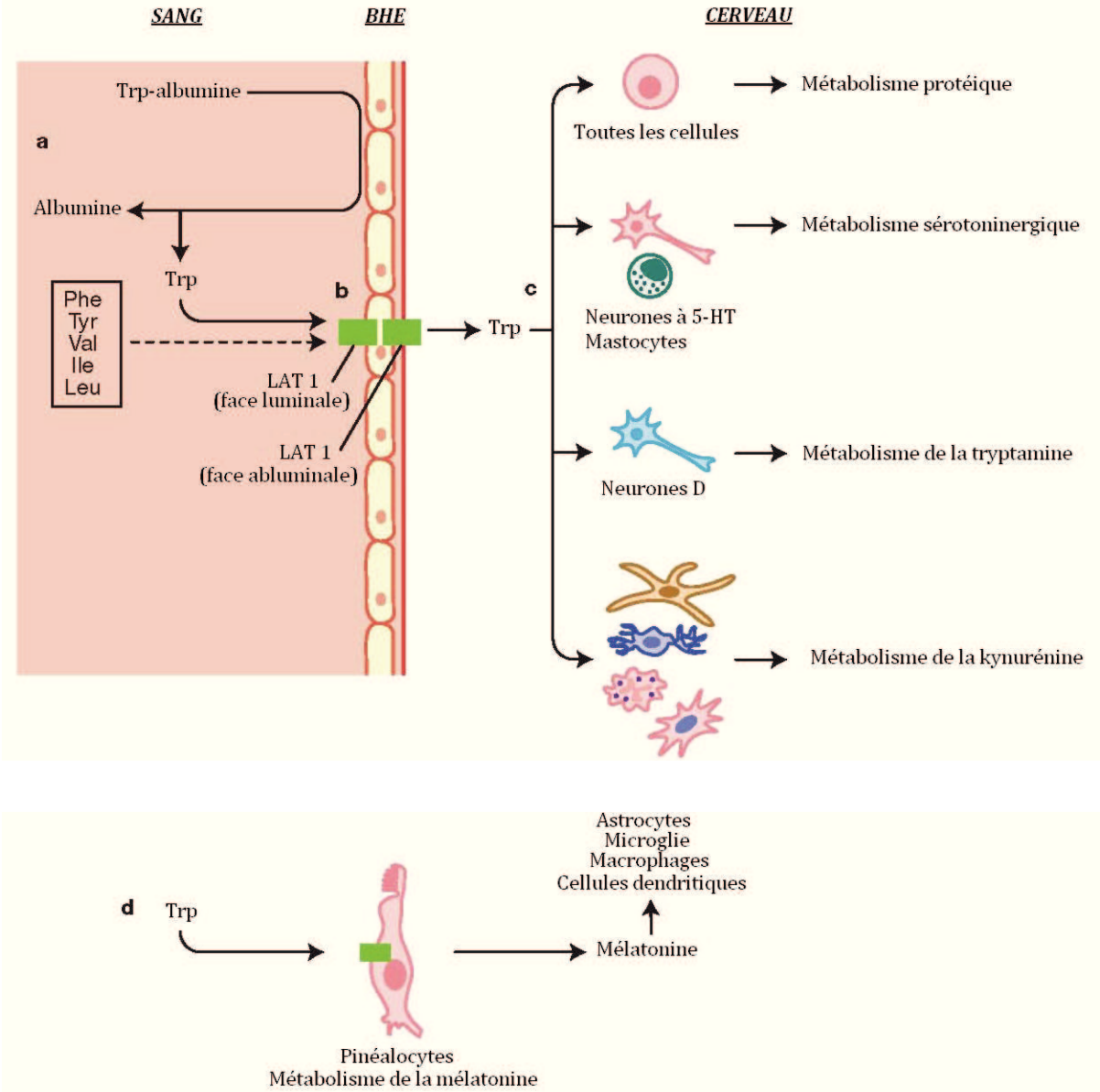
1. *Organisation du métabolisme : absorption et utilisation du TRP dans l'organisme*

Le tryptophane (TRP) est un acide aminé essentiel c'est-à-dire non présent naturellement dans l'organisme. Il y pénètre par l'alimentation. Une fois dans la circulation sanguine, on le trouve sous deux formes : il peut être complexé ou non à l'albumine. Il existe un équilibre entre ces deux formes dans la circulation sanguine (McMenamy 1965). Au repos, 50 à 80% du TRP plasmatique est lié à l'albumine, constituant ainsi un complexe qui ne peut passer la barrière hémato-encéphalique (BHE) (Mc and Oncley 1958). Les 10% restants circulent sous la forme libre et sont disponibles pour le transport à travers la BHE (Madras, Cohen *et coll.* 1974). En périphérie, la majeure partie du TRP est utilisée pour la synthèse des protéines, le reste étant engagé dans des voies de synthèse de composés tels que la sérotonine (produite par les cellules entérochromaffines de l'intestin ; environ 2% du TRP non lié à l'albumine) et la kynurénine (produite par les cellules immunitaires et les hépatocytes; environ 98% du TRP non lié à l'albumine) dont nous détaillerons les métabolismes dans les parties 2 et 3. Le TRP inutilisé en périphérie est transporté du sang vers le cerveau à travers la BHE par un mécanisme compétitif utilisé par plusieurs autres acides aminés neutres tels que la tyrosine, la

phénylalanine, la leucine, l'isoleucine et la valine (Oldendorf and Szabo 1976; Pardridge 1977; Fernstrom 1983). Une fois la BHE traversée, le TRP se trouve dans le parenchyme cérébral et est donc disponible pour une utilisation dans différentes voies métaboliques (**Fig. 21**). À ce niveau, le TRP peut être utilisé par l'ensemble des cellules pour la synthèse de différentes protéines, en particulier par les neurones sérotoninergiques et les cellules mastocytaires pour produire de la 5-HT, par les neurones D* pour la production de tryptamine, par les cellules gliales pour former de la kynurénine, et enfin par les cellules de la glande pinéale pour la synthèse de mélatonine.

* Neurones D : neurones non monoaminergiques comparables à des neurones dopaminergiques mais exprimant seulement la *L-aromatic acid decarboxylase* (L-AADC = qui catalyse la transformation de DOPA et de 5-HTP en DA et 5-HT respectivement) mais pas la *tyrosine hydroxylase (*TH = qui permet la synthèse de DOPA à partir de tyrosine). Ces cellules ont la particularité de pouvoir produire des composés tels que la tryptamine, la phenylethylamine, la tyramine et l'octopamine.

Fig. 21 : ***Vue synthétique du métabolisme du tryptophane dans le système nerveux central.*** *D'après Ruddick et coll (2006).*

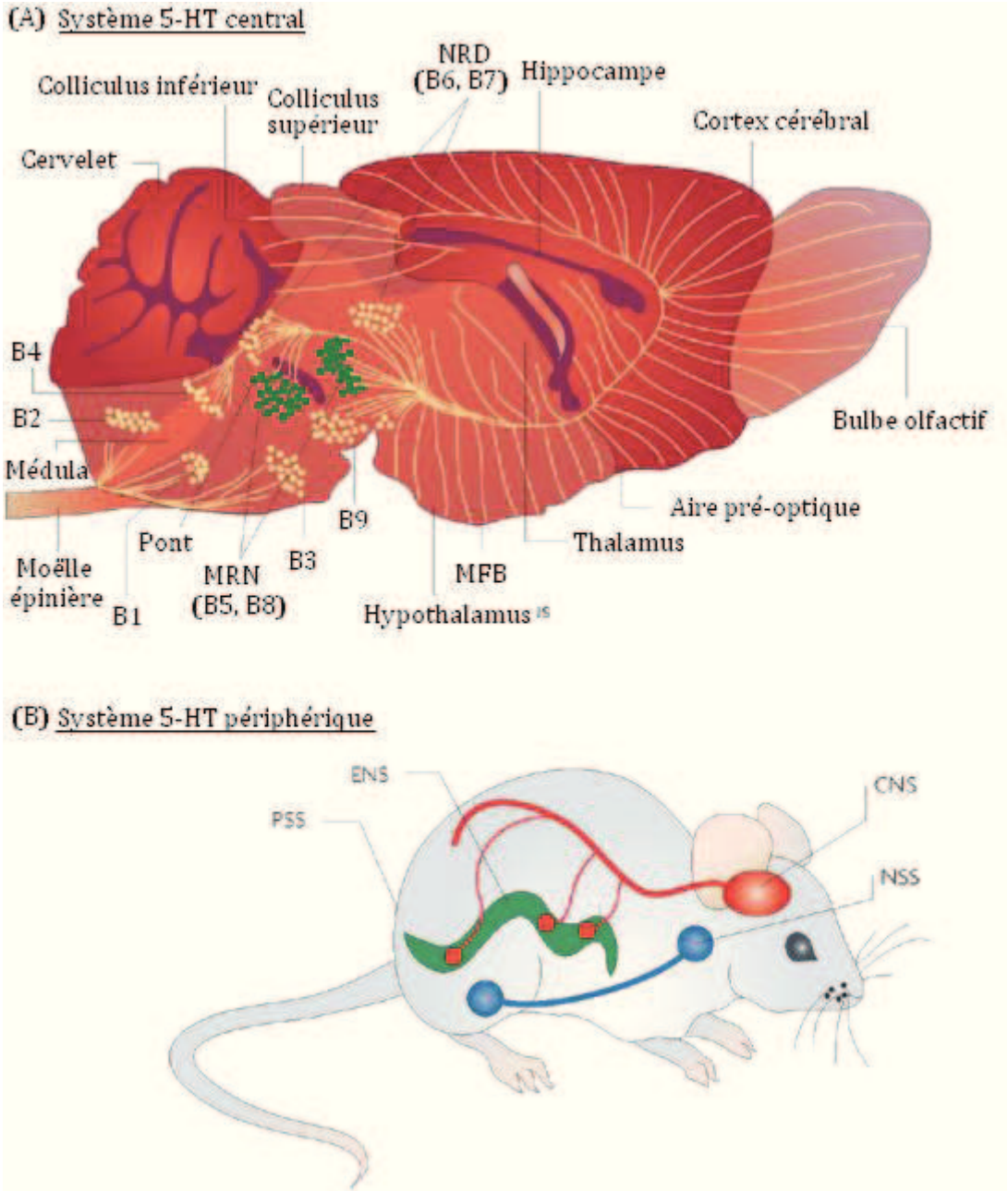


(a) La majeure partie du tryptophane (Trp) plasmatique est liée à l'albumine (50 à 80%). La dissociation du complexe se fait vraisemblablement au contact du glycocalyx membranaire des cellules endothéliales. Cette dissociation est facilitée par un faible débit sanguin ce qui suggère que les variations du flux sanguin peuvent affecter l'apport local en Trp. (b) Le Trp libre est transporté au niveau du parenchyme cérébral via le transporteur des acides aminés de type L (LAT1) qui transporte également d'autres acides aminés comme la tyrosine (Tyr), la phénylalanine (Phe), la valine (Val), l'isoleucine (Ile) et la leucine (Leu). Le transport est donc compétitif. (c) Ensuite le Trp est utilisé dans différentes voies métaboliques : protéique (dans toutes les cellules), sérotoninergique (dans les neurones à 5-HT et les mastocytes), tryptaminergique (dans les neurones D), et kynuréninergique (dans les neurones, les astrocytes, la microglie et les cellules dendritiques). (d) La mélatonine est également synthétisée à partir du Trp, dans la glande pinéale qui n'est protégée par la barrière hémato-encéphalique (BHE).

2. *Sérotonine, stress et dépression*

La sérotonine ou 5-hydroxytryptamine (5-HT) a été identifiée il y a plus de 50 ans comme un facteur vasoconstricteur sérique relargué par les plaquettes sanguines (Hardisty and Stacey 1955). Sa localisation dans les cellules entérochromaffines du tractus gastro-intestinal a été démontrée en 1952 alors que sa présence au niveau du SNC a été mise en évidence par Twarog et Page en 1953 (Twarog and Page 1953; Amin, Crawford *et coll.* 1954). En utilisant la technique d'histofluorescence, Dahlströem et Fluxe ont pu identifier les neurones qui synthétisent la 5-HT (Dahlstroem and Fuxe 1964; Steinbusch, Verhofstad *et coll.* 1981). Ils ont montré que les corps cellulaires des neurones sérotoninergiques se situent dans 9 noyaux différents du tronc cérébral désignés de B1 à B9 et qui constituent les noyaux du Raphé (**Fig. 22** ci-après) (Dahlstroem and Fuxe 1964; Steinbusch, Verhofstad *et coll.* 1981; Touret, Kitahama *et coll.* 1987; Tork 1990). Les différentes projections axonales issues de ces noyaux innervent la moelle épinière et l'ensemble du cerveau, notamment le thalamus et le noyau ventriculaire supérieur, le globus pallidus, l'amygdale, le cortex, le striatum, l'hippocampe, le septum, le locus coeruleus et l'hypothalamus (Graeff 1997). Le fait que l'on retrouve des terminaisons contenant de la 5-HT dans toutes les zones du cerveau expliquerait l'implication de la 5-HT dans un grand nombre de processus biologiques. Dans le SNC, la 5-HT est considérée comme le neurotransmetteur jouant un rôle majeur dans la régulation du sommeil, du comportement sexuel, de la température, de la prise alimentaire (effets anorexigènes), des états émotionnels et de l'humeur (Cases, Seif *et coll.* 1995; Gainetdinov, Wetsel *et coll.* 1999).

Fig. 22 : ***L'organisation des systèmes sérotoninergiques central et périphérique chez la souris.*** *D'après Murphy et Lesch (2008).*



(A) Dans le SNC, les corps cellulaires des neurones sérotoninergiques sont groupés dans les 9 noyaux du raphé (B1 à B9). Les noyaux les plus caudaux (médula) projettent vers la moëlle et la périphérie, alors que les noyaux situé plus au niveau rostral – les noyaux du raphé dorsal (NRD) (B6, B7, en jaune) et médian (NRM) (B5, B8, en vert) – projettent vers différentes aires cérébrales. (B) La 5-HT est également présente en périphérie, au niveau du système nerveux entérique (ENS), du système sérotoninergique neuroendocrinien (NSS) et du système sérotoninergique périphérique (PSS) incluant le cœur, les poumons, les vaisseaux sanguins, le pancréas et les plaquettes .

A. BIOSYNTHESE ET DEGRADATION DE LA SEROTONINE

La 5-HT ne peut pas traverser directement la BHE et sa synthèse au niveau cérébral se fait exclusivement dans les neurones sérotoninergiques (Fig. 22) (Fernstrom and Wurtman 1971). La 5-HT est formée en 2 étapes (Boadle-Biber 1993). La 1ère étape, réalisée par la tryptophane-5-hydroxylase (TPH) convertit le Trp en 5-hydroxytryptophane (5-HTP) (**Fig. 23**)(Grahame-Smith 1964). Cette enzyme est distribuée dans les neurones sérotoninergiques à travers l'ensemble du SNC (Weissmann, Belin *et coll.* 1987) et possède une forte activité dans le mésencéphale, la médulla, l'hypothalamus, l'hippocampe et le cortex (Anden, Dahlstrom *et coll.* 1965; Fuxe 1965). Ensuite, une enzyme de la famille des décarboxylases (L-AADC), dont la distribution est la même que celle de la TPH, transforme le 5-HTP en 5-HT. Elle possède une activité 200 fois plus forte que la TPH, ce qui explique que l'on ne retrouve que des traces de 5-HTP dans le cerveau (Long, Youngblood *et coll.* 1982). Cette enzyme catalyse également la synthèse de DA à partir de DOPA et est donc présente dans les neurones à DA.

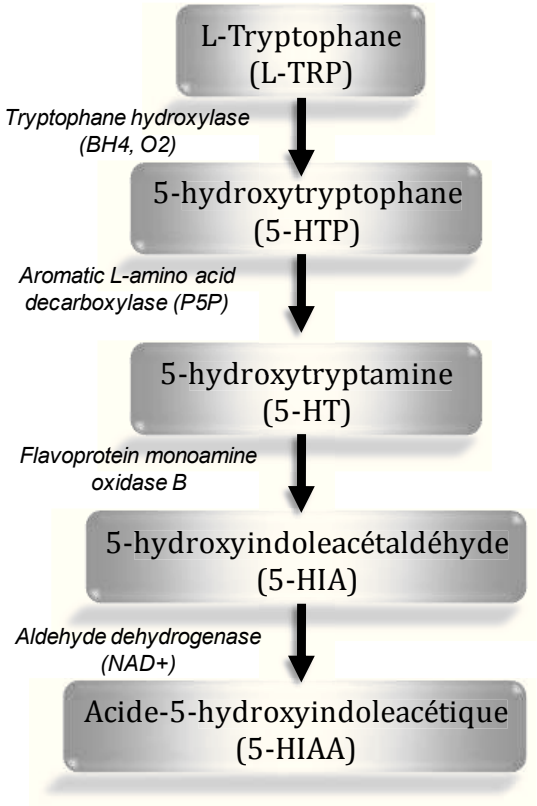


Fig. 23 : Le métabolisme de la sérotonine (5-HT) dans l'organisme.
P5P = phosphate de pyridoxal ; BH_4 = Tétrahydrobioptérine ; O_2 = dioxygène ; NAD = nicotinamide adénine dinucléotide.

L'élimination de la 5-HT est assurée par sa recapture après libération dans l'espace synaptique grâce à un transporteur membranaire spécifique (SERT) qui permet le retour de la 5-HT dans les terminaisons présynaptiques des neurones (Stephan, Chen *et coll.* 1997). En bloquant le SERT, les antidépresseurs de type ISRS permettent de renforcer, au niveau de l'espace synaptique, des concentrations de 5-HT suffisantes pour compenser un déficit sérotoninergique. La dégradation de la 5-HT est réalisée par la monoamine oxydase de type A (MAO A), située à l'intérieur des neurones dans la paroi interne des mitochondries (Ortega-Corona, Carranza *et coll.* 1981). Le produit final, l'acide 5-hydroxyindole acétique (5-HIAA) est excrété au niveau rénal et par conséquent mesurable dans les urines, constitue un marqueur de l'activité sérotoninergique. Le 5-HIAA cérébral ne représente que 5% environ de la concentration urinaire de ce métabolite.

B. INFLUENCE DU TRYPTOPHANE SUR LA PRODUCTION DE 5-HT

Comme je l'ai indiqué précédemment, le TRP (sous sa forme libre) est transporté de la circulation sanguine vers le cerveau par l'intermédiaire du transporteur LAT 1 (Segawa, Fukasawa *et coll.* 1999; Kanai, Segawa *et coll.* 2000). Ce même transporteur permet aussi le passage d'autres acides aminés (LNAAs) (voir Fig. 21). Le TRP entre donc en compétition avec ceux-ci pour traverser la BHE (Salter, Knowles *et coll.* 1989). Par conséquent, la concentration cérébrale en TRP disponible pour la synthèse de 5-HT serait donc fonction du niveau des autres acides aminés neutres plasmatiques, leucine, isoleucine, valine, phénylalanine, tyrosine et méthionine plutôt que de la concentration en TRP libre. C'est d'ailleurs ce qui a été observé par plusieurs auteurs (Pardridge and Oldendorf 1977; Fernstrom 1983; Leathwood 1987; Salter, Knowles *et coll.* 1989). Ce mécanisme de compétition existe dans les conditions physiologiques (Pardridge 1977) et, il est d'ailleurs possible de réduire la capture de TRP par le cerveau en augmentant la concentration sérique d'un de ces LNAAs (Blasberg and Lajtha 1966; Murray 1973; Drewes, Conway *et coll.* 1977).

Le taux de TRP pénétrant dans le cerveau semble être un élément de régulation majeur de la synthèse de 5-HT (Curzon 1979) puisqu'une hausse de la concentration plasmatique en TRP libre entraîne une augmentation du taux cérébral de 5-HT (Tagliamonte, Biggio *et coll.* 1973; Spano, Szyszka *et coll.* 1974). En effet, en condition physiologique, la TPH n'est pas saturée vis-à-vis de son substrat (Fernstrom and Wurtman 1971). Ainsi, un apport en TRP (endogène ou exogène) induit une augmentation de la concentration cérébrale en TRP accompagnée d'une élévation de la synthèse de 5-HT dans le cerveau de rat (Ashcroft, Eccleston *et coll.* 1965; Aghajanian and Asher 1971; Knott and Curzon 1974) alors qu'un régime dépourvu de TRP provoque une diminution des concentrations centrales de 5-HT et de son métabolite le 5-HIAA (Fernstrom and Hirsch 1977; Fernstrom 1983). On observe ce phénomène également chez l'Homme, chez qui la diminution de l'apport alimentaire en TRP diminue significativement la concentration en 5-HT dans le cerveau, entraînant par la même occasion des altérations comportementales, cognitives et émotionnelles. [voir pour revue (Reilly, McTavish *et coll.* 1997) et (Moore, Landolt *et coll.* 2000)]. De plus, l'administration orale de faibles doses de TRP augmente les concentrations en 5-HIAA du liquide céphalorachidien chez l'Homme (Gillman, Bartlett *et coll.* 1981). Ces données montrent ici l'importance du TRP pour la synthèse de la 5-HT centrale.

C. MODIFICATIONS DU SYSTEME 5-HT AU COURS DU STRESS

De nombreuses études ont montré que la 5-HT est impliquée dans la régulation des systèmes vasculaire, rénal et musculaire, du système nerveux (syndromes dépressifs, schizophrénie, autisme, anxiété, Alzheimer, sommeil, retard mental…), de l'axe HPA, mais aussi dans la régulation de la réponse immunitaire etc. Parmi les effets cérébraux résultant d'un dysfonctionnement de la 5-HT, il est connu qu'une hypoactivité du système sérotoninergique intervient très probablement chez les patients déprimés et chez les maniaco-dépressifs (Owens and Nemeroff 1994). A l'inverse, l'anxiété

généralisée pourrait être associée à une exacerbation de la transmission sérotoninergique cérébrale (Eison and Eison 1994; Baldwin and Rudge 1995; Handley 1995; Chaouloff, Berton *et coll.* 1999; Lanfumey, Mongeau *et coll.* 2008). Ces hypothèses reposent surtout sur les connaissances concernant les mécanismes d'action des antidépresseurs et des anxiolytiques. Cependant, il est évident que ces affirmations sont très généralistes et que les choses ne sont pas aussi simples. En effet, il semble beaucoup plus probable que les altérations de ce système de neurotransmission soient non seulement structure-dépendantes mais aussi étiologie-dépendantes. De plus, comme l'organisation structurale et fonctionnelle du cerveau de chaque individu est unique, il est tout à fait envisageable qu'à trouble psychiatrique équivalent, les altérations du système 5-HT soient différentes d'un individu à l'autre. Sachant que le TRP peut affecter de différentes manières les concentrations centrales en 5-HT, à ce titre, c'est un acteur possible de la symptomatologie dépressive. Dans les deux paragraphes qui suivent nous allons aborder les effets du stress sur le fonctionnement du système 5-HT.

a. Effets d'un stress aigu

Même si elle est bien démontrée, l'implication exacte de la 5-HT dans la phénoménologie de la réponse au stress demeure encore aujourd'hui incertaine. Tout d'abord, les terminaisons des neurones sérotoninergiques sont très nombreuses dans la plupart des structures impliquées dans la modulation des émotions et de la réponse au stress telles que l'hippocampe, l'hypothalamus, l'amygdale, le cortex préfrontal, la substance grise péri-acqueducale ou encore le striatum (Chaouloff 1993). De plus, les corps cellulaires des neurones à 5-HT des noyaux du raphé reçoivent de nombreuses afférences des régions citées ci-dessus, permettant ainsi au système sérotoninergique de recevoir en permanence des informations sur les caractéristiques intrinsèques de la réponse de l'organisme face au stresseur (Pineyro and Blier 1999). Il n'est par conséquent pas très étonnant que la 5-HT soit étroitement impliquée dans ces phénomènes. Classiquement, il est reporté dans la littérature qu'un stress aigu, qu'il soit de nature psychologique, physique, métabolique ou bien immunologique, augmente les niveaux extracellulaires de 5-HT (Rueter, Fornal *et coll.* 1997). En 1996, Rueter *et coll.* ont mesuré chez des rats confrontés à différentes situations de stress et/ou d'éveil comportemental, les concentrations extracellulaires en 5-HT dans l'amygdale, le cortex préfrontal, l'hippocampe et le striatum (par microdialyse). Le stress généré par chacune des situations était de nature variée et permettait ainsi de vérifier si la libération de 5-HT était spécifique d'un type de stress en particulier. Leurs résultats vont dans le sens d'une implication non spécifique de la 5-HT dans la réponse au stress et suggèrent plutôt que la hausse de 5-HT est liée à l'augmentation de l'état d'activation, d'éveil comportemental induit par la situation (Rueter and Jacobs 1996). Cependant, ces données sont remises en question par d'autres montrant que les changements de 5-HT extracellulaire sont structure- et stresseur-dépendants (Kirby, Allen *et coll.* 1995; Adell, Casanovas *et coll.* 1997). Néanmoins, il semblerait qu'un certain nombre de paramètres puissent expliquer de telles différences dans les résultats obtenus par les auteurs cités ci-dessus [voir pour revue (Chaouloff, Berton *et coll.* 1999)].

Toutefois, certains arguments permettent vraisemblablement de trancher sur le rôle de la 5-HT dans la réponse au stress. En effet, il a été montré que l'administration de LPS (100µg/kg) entraîne une hausse significative et durable (environ 6h post-injection) des taux de 5-HT et de 5-HIAA extracellulaires dans l'hippocampe de rats (Linthorst, Flachskamm *et coll.* 1995). Cependant, les auteurs observent aussi que l'activité générale des animaux est diminuée par l'administration de LPS. Ainsi les auteurs concluent que la hausse de 5-HT est bien le fait du stress généré par le LPS et non pas la conséquence d'un éveil comportemental. D'autres travaux semblent confirmer ces résultats (Merali, Lacosta *et coll.* 1997; Pauli, Linthorst *et coll.* 1998)

b. Effets d'un stress chronique

S'il est maintenant admis qu'un stress aigu augmente la libération de 5-HT dans plusieurs structures cérébrales, il n'en est pas de même en cas de stress chronique au cours duquel la physiologie de l'organisme est modifiée. En effet, bon nombre de systèmes sont altérés par une situation de stress chronique. Par exemple, la réponse du noyau paraventriculaire de l'hypothalamus est différente : en cas de stress aigu, l'initiation de la réponse dépend plus de la sécrétion de CRF que de la production d'AVP, alors qu'en cas de stress chronique ce serait l'inverse [voir pour revue (Lightman 2008)]. Ce changement serait impliqué dans la modification des rythmes circadien et ultradien de libération de cortisol aboutissant à une hausse de sa concentration dans le plasma (Ma, Levy *et coll.* 1997; Ma and Lightman 1998). Etant donné l'importance du lien entre les taux plasmatiques de cortisol et le fonctionnement du système 5-HT, il est légitime de penser que son fonctionnement va être modifié en condition de stress chronique. En effet, il semblerait que le stress chronique entraîne plutôt une diminution de 5-HT, vraisemblablement médiée par les concentrations élevées en cortisol (Leonard 2006). Cependant, il semblerait encore une fois que les choses ne soient pas aussi simples puisque certaines études menées chez l'animal viennent appuyer cette hypothèse (Torres, Gamaro *et coll.* 2002; Li, Kong *et coll.* 2003; Elhwuegi 2004; Vancassel, Leman *et coll.* 2008; Yalcin, Coubard *et coll.* 2008) alors que d'autres ne montrent pas d'altérations de la concentration extracellulaire en 5-HT (Bickerdike, Wright *et coll.* 1993; Amat, Matus-Amat *et coll.* 1998; Amat, Matus-Amat *et coll.* 1998). D'autres travaux montrent même qu'une heure d'immobilisation pendant 24 jours entraîne une élévation des taux de 5-HT dans le cortex frontal, l'hypothalamus, l'hippocampe et et le striatum (Adell, Garcia-Marquez et coll. 1988). Des facteurs tels que la nature des stresseurs utilisés, la prédictibilité/contrôlabilité des stresseurs ou encore les différences interindividuelles dans la réponse au stress sont susceptibles d'expliquer de telles divergences dans les résultats (Amat, Matus-Amat *et coll.* 1998; Lathe 2004). Les travaux réalisés au cours de cette thèse permettront d'apporter quelques éclaircissements à ce niveau.

D. MODIFICATIONS SEROTONINERGIQUES CHEZ LES DEPRESSIFS

Un bon nombre d'arguments attestent d'un dérèglement du système 5-HT au cours des troubles dépressifs. Compte tenu de l'importante littérature concernant ce sujet, je ne citerai ici que quelques travaux en essayant de traduire du mieux possible ce qui émerge de cette vaste quantité de données. En effet, une simple recherche dans PUBMED incluant les termes : [serotonin AND « major depression »] donne 1835 références. Si l'on étend la recherche à : serotonin AND depression, l'on obtient plus de 14000 références, ce qui traduit l'importance du lien entre 5-HT et dépression.

Ce lien peut vraisemblablement être observé à différents niveaux : au niveau des processus de synthèse - faisant intervenir son précurseur, le TRP, ainsi que l'enzyme TPH -, au niveau des récepteurs auxquels la 5-HT se fixe – en particulier les récepteurs 5-HT_{1A} et 5-HT_{2A} -, au niveau de sa recapture par le transporteur SERT, et enfin au niveau de son métabolisme.

En effet, plusieurs études montrent que la concentration plasmatique en TRP est diminuée chez les patients dépressifs (Cowen, Parry-Billings *et coll.* 1989; Anderson, Parry-Billings *et coll.* 1990; Maes, Jacobs *et coll.* 1990; Maes, Wauters *et coll.* 1996; Capuron, Ravaud *et coll.* 2002; Raison, Dantzer *et coll.* 2009). Par conséquent il a été supposé que la disponibilité du TRP pour la synthèse cérébrale de 5-HT était diminuée chez les dépressifs, sous-tendant ainsi un affaiblissement des taux cérébraux en 5-HT. Cette hypothèse est largement confortée par les nombreux travaux utilisant le paradigme de « déplétion en TRP » décrit par Delgado (Delgado, Charney *et coll.* 1989). Une étude de 1998 a utilisé ce paradigme expérimental chez des patients non dépressifs de façon à évaluer l'impact sur le système 5-HT cérébral (Carpenter, Anderson *et coll.* 1998). Après avoir prélevé le LCR des patients toutes les 15 minutes sur une période de 13,5h (avant, pendant et après la déplétion en TRP), les auteurs ont ainsi pu montrer que les concentrations plasmatiques en TRP étaient fortement corrélées aux concentrations du LCR. Ils ont également observé une diminution du taux de 5-HIAA dans le LCR, leur permettant ainsi de conclure que la déplétion en TRP était particulièrement efficace pour réduire le métabolisme cérébral de la 5-HT. De plus, des perturbations cognitives et affectives ont été mises en évidence chez ces patients (Murphy, Smith *et coll.* 2002). Il a été observé qu'une déplétion en TRP pouvait entraîner des rechutes chez un certain nombre de patients dépressifs en phase de rémission [voir pour revue [(Moore, Landolt *et coll.* 2000)]. D'autre part, il semblerait que la biodisponibilité du TRP, reflétée par le ratio TRP/LNAA plasmatique, soit un indice pertinent de l'efficacité des traitements antidépresseurs tels que le TRP, l'amytriptiline, l'imipramine ou le lithium.. Les patients ayant une faible disponibilité en TRP étant ceux qui répondent le mieux aux traitements par ISRS tels que le citalopram ou la paroxétine (Moller 1990; Moller, Bech *et coll.* 1990). Ces données suggèrent ainsi que (a) la disponibilité en TRP pour la synthèse de 5-HT influence la réponse thérapeutique d'un traitement antidépresseur, (b) que de faibles concentrations plasmatiques en TRP soient reliées à un hypofonctionnement sérotoninergique, et (c) qu'un traitement antidépresseur puisse compenser ce déficit.

L'hypothèse d'une altération des récepteurs sérotoninergiques dans la physiopathologie de la dépression a été proposée dans les années 70 par Ashcroft *et coll*. (Ashcroft and Glen 1974). Depuis, de

nombreuses études ont reporté des perturbations au niveau de certains récepteurs sérotoninergiques tels que les récepteurs 5-HT_{2A} [voir pour revue (D'Haenen, Bossuyt *et coll.* 1992) et (Celada, Puig *et coll.* 2004)] ; les résultats étant cependant assez contradictoires (Dhaenen 2001). Les récepteurs 5-HT_{1A} semblent également largement impliqués dans la physiopathologie de la dépression. En effet, des altérations, tant au niveau de l'expression des récepteurs que de leur fonction, ont été mises en évidence dans des études utilisant des outils pharmacologiques ou d'imagerie cérébrale (Parsey, Oquendo *et coll.* 2006; Drevets, Thase *et coll.* 2007; Boldrini, Underwood *et coll.* 2008). Les récepteurs 5-HT_{1A} semblent également avoir un rôle important dans l'efficacité des traitements antidépresseurs, mais là encore, la littérature est assez contradictoire. En effet, une étude récente de l'équipe d'Alain Gardier, utilisant la technique de microdialyse, montre clairement que l'effet anxiolytique/antidépresseur de la fluoxétine dépend de la désensibilisation des autorécepteurs 5-HT_{1A} (localisés dans les noyaux du raphé) (Popa, Cerdan *et coll.*). Leurs données suggèrent donc un rôle clé de ces récepteurs dans l'effet thérapeutique de la fluoxétine. À l'inverse, Holick *et coll.* rapportent des résultats opposés : les effets comportementaux d'un traitement chronique à la fluoxétine sont présents chez des souris dépourvues de récepteurs 5-HT_{1A} (KO-5-HT_{1A}), indiquant que la fluoxétine ne recquière pas le récepteur 5-HT_{1A} pour exercer ses effets thérapeutiques (Holick, Lee *et coll.* 2008). Cependant, il est probable que des mécanismes de compensation aient pu se mettre en place chez ces animaux. Très récemment, Richardson-Jones *et coll*. sont parvenus à produire des souris « 1A-Low » et « 1A-High » exprimant respectivement peu et beaucoup de récepteurs 5-HT_{1A} dans les noyaux du Raphé (autorécepteurs), l'expression des récepteurs post-synaptiques (hétérorécepteurs) n'étant pas affectée (Richardson-Jones, Craige *et coll.*). Les auteurs ont ainsi pu montrer que les souris « 1A-High » sont plus vulnérables au stress et ne répondent pas aux antidépresseurs : la réduction préalable du niveau d'expression des autorécepteurs suffit à rendre les animaux résistants en individus répondeurs. De tels résultats établissent une relation causale entre le niveau d'expression des autorécepteurs 5-HT_{1A}, la vulnérabilité au stress et la réponse aux antidépresseurs.

Plusieurs arguments attestent néanmoins de l'importance des ces deux types de récepteurs sérotoninergiques dans le mécanisme d'action des antidépresseurs (Celada, Puig *et coll.* 2004).

D'autres travaux insistent encore sur le rôle des enzymes de synthèse de la 5-HT, certains mettant en avant une implication majeure de la TPH_1 – principalement localisée en périphérie et au niveau de l'hypophyse - (Gizatullin, Zaboli *et coll.* 2006; Gizatullin, Zaboli *et coll.* 2008) et d'autres de la TPH_2 - majoritairement présente dans le SNC - (Bach-Mizrachi, Underwood *et coll.* 2006; Bach-Mizrachi, Underwood *et coll.* 2008).

L'étude du turnover de la 5-HT donne également des indications pertinentes quant aux relations existant entre 5-HT et dépression. En effet, d'après une étude de Raison *et coll.,* la concentration en 5-HIAA dans le LCR serait l'indicateur le plus important permettant de prédire la sévérité des symptômes dépressifs chez des patients traités par immunothérapie (Raison, Borisov *et coll.* 2009). Ceci ne s'observerait que chez une sous-population de patients (Asberg, Thoren *et coll.* 1976).

Pour finir, il me semble important de citer dans cette partie les travaux réalisés sur le transporteur de la 5-HT. En effet, l'étude prospective/longitudinale menée par Caspi *et coll*. en 2003 montre que les individus porteurs d'une ou deux copies de l'allèle « c » (pour allèle court) présentent une dépression diagnostiquée plus fréquente, des symptômes dépressifs ainsi que des tentatives de suicide en rapport avec les événements « stressants » plus nombreux que les patients porteurs de l'allèle « l » (pour allèle long) (Caspi, Sugden *et coll.* 2003; Pezawas, Meyer-Lindenberg *et coll.* 2005). En fait, même si le gène du 5-HTT n'est pas directement associé à la dépression, il pourrait modérer la réponse sérotoninergique au stress. C'est notamment ce que montrent les études réalisées sur les animaux de laboratoire (Murphy, Li *et coll.* 2001; Bennett, Lesch *et coll.* 2002; Bartolomucci, Carola *et coll.* 2010).

Bien que cette description soit non exhaustive, elle permet tout de même de bien mettre en avant les liens existant entre le système 5-HT et les mécanismes intervenant dans la survenue et les traitements des troubles dépressifs.

En bref

Le système sérotoninergique semble constituer un élément central dans la physiopathologie et le traitement des troubles dépressifs. En effet, plusieurs types d'altérations ont été reportées, tant au niveau de son métabolisme (synthèse dégradation) qu'au niveau de sa recapture neuronale ou encore de son action au niveau de récepteurs pré- et post-synaptiques (5-HT_{1A} et 5-HT_{2A} par exemple). En tant qu'unique précurseur de la 5-HT, le TRP constitue une cible d'intérêt, susceptible de contribuer aux altérations sérotoninergiques observées au cours des troubles dépressifs.

3. La voie de la kynurénine : une voie alternative à la synthèse de 5-HT

A. UN PEU D'HISTOIRE

On sait depuis longtemps que le TRP est le principal précurseur d'une voie alternative à la synthèse de 5-HT : la voie de la kynurénine (KYN) qui mène à la production de NAD (Nicotinamide Adénine Dinucléotide), un important co-facteur intervenant non seulement dans les réactions d'oxydo-réduction mais aussi dans les processus de réparation et de maintien de la stabilité de l'ADN [voir pour revue (Khan, Forouhar *et coll.* 2007)]. Dès 1904, donc bien avant que la 5-HT ne soit découverte, des études mentionnaient la présence d'acide kynurénique – un des métabolites de la KYN – dans l'urine de chiens (Ellinger 1904). Cependant, il fallut attendre 1947 pour que la voie KYN soit reconnue comme principale voie de conversion du TRP en NAD (Beadle, Mitchell *et coll.* 1947). Plus tard, la découverte du rôle de neurotransmetteur/hormone de la 5-HT a complètement évincé l'intérêt de la

voie de la KYN et les études menées sur le métabolisme du TRP se sont principalement focalisées sur la voie sérotoninergique, vraisemblablement à tort compte tenu du fait qu'en périphérie, 1 à 10% seulement du TRP non utilisé pour la synthèse protéique est converti en 5-HT (Peters 1991) alors qu'environ 95% est transformé en KYN (Wolf 1974). Ainsi, des altérations de la concentration en TRP ou de l'activité de la TPH, la plupart du temps interprétées en termes d'effets « sérotoninergiques », pourraient également agir de façon non négligeable sur le métabolisme de la KYN (Price, Charney *et coll.* 1990) dont certains intermédiaires métaboliques sont neuroactifs. Les diverses actions biologiques et bio-comportementales de ces métabolites seront détaillées dans la suite du manuscrit.

Ce désintérêt pour la voie KYN a perduré jusqu'à ce que soit découvert le rôle des acides quinolinique (QUIN) et kynurénique (KYNA) dans la modulation de l'activité neuronale, en particulier des récepteurs aux acides aminés excitateurs (Stone and Perkins 1981; Stone, Connick *et coll.* 1987). Au début des années 80, et en parallèle à l'intérêt croissant porté aux récepteurs des acides aminés excitateurs dans la neurotransmission, l'apprentissage, la mémoire et les mécanismes de neurodégénérescence (Choi, Koh *et coll.* 1988; Stone and Burton 1988; Collingridge and Lester 1989), il y eut un regain d'intérêt pour l'analyse et la compréhension de la fonction de la voie de la KYN dans le SNC. Mon travail de thèse s'inscrit d'ailleurs dans la continuité de l'ensemble des travaux réalisés dont le but est de mieux comprendre dans quelle mesure cette voie métabolique est impliquée dans les processus physiopathologiques sous-tendant les désordres neuropsychiatriques telles que la dépression.

B. PRESENTATION DU METABOLISME

a. Initiation du métabolisme

La transformation du TRP en KYN est initiée par deux enzymes qui possèdent chacune un pattern d'expression et des modes de régulation bien distincts : la tryptophane-2,3-dioxygenase (TDO, EC 1.13.11.12) et l'indoleamine-2,3-dioxygenase (IDO, EC 1.13.1.42) (**Fig. 24**).

Tryptophan-2,3-dioxygénase

La TDO est une hémoprotéine d'environ 190 kDa principalement exprimée dans le foie (Botting 1995), même si des travaux récents suggèrent sa présence au niveau du SNC chez la souris (Kanai, Nakamura *et coll.* 2009) ainsi que chez l'Homme (Miller, Llenos *et coll.* 2006). Son activité est régulée par les espèces réactives de l'oxygène (ROS) tels l'anion superoxide (O_2-) qui permet de réduire la forme ferrique de l'enzyme, qui est la forme inactive, en forme ferreuse (forme active) (Li, Wang *et coll.* 2006). Ainsi la TDO nécessite des systèmes qui génèrent des ROS (Tanaka and Knox 1959; Hayaishi and Nozaki 1969; Hitchcock and Katz 1988). Cette particularité est intéressante dans la mesure où certains métabolites de la voie KYN sont connus pour leur propriété anti- *vs.* pro-oxydantes suggérant un mécanisme de rétrocontrôle du fonctionnement de l'enzyme par ses produits de sécrétion. Cependant, en cas d'accumulation trop importante de ROS, la TDO est inhibée (Li, Wang *et coll.* 2006).

Sa durée de vie est d'environ deux heures et son activité est rapidement modulée par la disponibilité en TRP (Schutz, Chow *et coll.* 1972) permettant ainsi une régulation fine des concentrations plasmatiques en TRP (Badawy 1977). En effet, il a été montré que l'administration de TRP augmente de façon significative l'activité de l'enzyme TDO avec pour conséquence une baisse de la concentration en TRP disponible pour la synthèse de 5-HT et de KYN dans le CNS (Sourkes 1971).

La TDO est suspectée de jouer un rôle majeur dans la modulation du métabolisme du TRP en réponse à des facteurs de stress puisqu'il est maintenant clairement admis qu'elle est activée par les GC (Comings, Muhleman *et coll.* 1995). Ce mécanisme d'activation passerait par la présence au niveau du promoteur du gène de la TDO de deux éléments de réponse aux GC (GRE) (Schmid, Scherer *et coll.* 1982; Danesch, Gloss *et coll.* 1987). Ces deux GRE semblent agir de façon indépendante et additive puisque la délétion d'un des deux éléments entraîne une induction de la TDO d'un facteur 1,5 à 2,5 suite à une injection de dexaméthasone, alors qu'en condition normale (présence des deux GRE), l'induction est plus importante (d'un facteur 3 à 5) (Danesch, Gloss *et coll.* 1987). La TDO ne métabolise que la forme L- du tryptophane, cependant, des travaux ont montré que la forme D- pouvait également être transformée en D-KYN, suggérant ainsi l'existence d'une autre enzyme capable de produire la KYN à partir du TRP (Tashiro, Tsukada *et coll.* 1961; Higuchi and Hayaishi 1967) : l'IDO.

L'indoleamine-2,3-dioxygénase

L'IDO est une hémoprotéine de 45 kDa capable de transformer le TRP en N-formylkynurénine (Shimizu, Nomiyama *et coll.* 1978; Takikawa, Yoshida *et coll.* 1986; Werner, Hirsch-Kauffmann *et coll.* 1987; Taylor and Feng 1991). Son activité est également régulée par les ROS. Compte tenu du lien entre l'IDO et les ROS, il a été montré que l'enzyme pouvait être inhibée par la superoxide dismutase (SOD) qui catalyse la réaction de dismutation de l'O_2- (Hirata and Hayaishi 1971). Il semblerait qu'il existe d'autres mécanismes de régulation de l'enzyme IDO. En effet, une étude de 2007 a montré que le monoxyde d'azote (NO) est capable de se fixer sur la protéine IDO et ainsi de diminuer son activité enzymatique (Thomas, Terentis *et coll.* 2007). Il est intéressant de noter à ce sujet que l'action de l'acide quinolinique (un des métabolites de la KYN) sur le récepteur NMDA entraîne une hausse de la production de NO (Braidy, Grant *et coll.* 2010) constituant ainsi une sorte de rétrocontrôle négatif permettant ainsi de ralentir l'activité de l'enzyme via une action directe sur la protéine.

En ce qui concerne la thématique « stress et dépression », il est évident qu'une des plus importantes caractéristiques de cette enzyme est sa capacité à être activée par les cytokines pro-inflammatoires telles que l'IFNγ qui est l'activateur le plus important (Taylor and Feng 1991). En effet, nous avons vu précédemment que lors d'une dépression ou de la confrontation à un stresseur, l'activation des axes du stress va avoir d'importantes répercussions sur la libération de ces médiateurs de l'immunité, ce qui va, par conséquent, influer sur le métabolisme du TRP via la voie KYN. Il a été montré que l'IFNα peut également induire l'IDO dans les leucocytes sanguins chez l'Homme (Carlin, Borden *et coll.* 1989).

L'activation de l'enzyme par les IFNs se fait vraisemblablement grâce à la présence de deux éléments de réponse à l'IFNα au niveau de la région promotrice du gène (ISRE1 et ISRE2) ainsi qu'à la présence de l'élément de réponse à l'IFNγ (GAS) (Kadoya, Tone *et coll.* 1992; Hassanain, Chon *et coll.* 1993; Chon, Hassanain *et coll.* 1995; Konan and Taylor 1996). De plus, des travaux montrent que l'IDO peut aussi être activée par certaines interleukines comme l'IL-1 ou l'IL-6 (Wirleitner, Neurauter *et coll.* 2003) ou par le *Tumor Necrosis Factor* (TNFα) (O'Connor, Andre *et coll.* 2009). De façon intéressante, son activité est diminuée par les cytokines anti-inflammatoires telles l'IL4 (Musso, Gusella *et coll.* 1994). L'équilibre entre cytokines pro- et anti-inflammatoire constitue donc un facteur central dans la modulation de l'activité de l'IDO.

L'IDO possède un pattern d'expression beaucoup plus large que son homologue TDO puisqu'on la trouve tant dans les tissus centraux que périphériques (Botting 1995). En périphérie, elle est principalement exprimée dans les cellules immnocompétentes (macrophages, lymphocytes, cellules dendritiques) suite à une activation du système immunitaire (Schwarcz and Pellicciari 2002). Dans le cerveau, elle est présente dans tous les types cellulaires (neurones et cellules gliales) mais son activité est relativement réduite en condition non-inflammatoires (Guillemin, Brew *et coll.* 2005). D'autre part, comme son nom l'indique, elle ne métabolise pas que le TRP mais peut également agir sur plusieurs indolamines dont la 5-HT (Shimizu, Nomiyama *et coll.* 1978) (**Fig. 24**). Ce mécanisme de dégradation est particulièrement important compte tenu du rôle central de la 5-HT dans les processus de régulation du stress et de l'humeur. On peut ainsi imaginer qu'une hausse locale de la concentration en IDO puisse diminuer le taux de 5-HT.

Au niveau fonctionnel, l'IDO apparaît comme un élément central dans la modulation des systèmes de défense de l'organisme en agissant directement sur la prolifération des cellules du système immunitaire. En effet, elle peut induire une déplétion locale en TRP qui est en partie responsable de l'activité antimicrobienne et anti-tumorale de l'IFNγ (Burke, Knowles *et coll.* 1995; Friberg, Jennings *et coll.* 2002). En effet, les bactéries et virus ayant besoin de TRP pour se développer, ce mécanisme pourrait alors constituer un important moyen de défense de l'organisme face aux pathogènes. Un second rôle de l'IDO a pu être mis en évidence par plusieurs auteurs : la diminution de la prolifération des lymphocytes T. Celui-ci serait à la fois médié par la déplétion en TRP (le TRP est nécessaire à la prolifération des lymphocytes) mais aussi et surtout par l'accumulation de métabolites toxiques issus du métabolisme de la KYN (voir partie 3.C pour plus de détails). Ces derniers sont capables de générer du stress oxydant et d'induire de l'excitotoxicité, ce qui a pour conséquences de bloquer le cycle cellulaire des lymphocytes, empêchant ainsi leur prolifération. C'est d'ailleurs ce qu'ont reporté Munn *et al.* en observant que l'induction de l'IDO, au niveau des macrophages, par l'IFNγ est à l'origine de l'inhibition de la prolifération des lymphocytes T (Munn, Shafizadeh *et coll.* 1999). Ce mécanisme est particulièrement important au moment de la grossesse puisqu'il permet l'immunotolérance de la mère envers son fœtus. Cet effet immunosuppresseur de l'IDO peut, dans certains cas, être préjudiciable

pour l'organisme puisqu'il peut conférer aux cellules tumorales la capacité de passer au travers « des mailles » du système immunitaire (Mellor and Munn 2004). En effet, il a été montré que les lymphocytes T activés infiltrant les cellules tumorales semblaient inertes comme si un mécanisme les empêchait d'exercer leur activité défensive (Negus, Stamp *et coll.* 1997).

Bien que ces deux enzymes catalysent la même réaction, leur régulation/distribution respective dans l'organisme leur confère des propriétés biologiques propres et bien distinctes. Ainsi, dans des conditions normales, il semblerait que le métabolisme du TRP tout entier est régulé majoritairement par la TDO, comme l'indique l'étude de Kanai *et al.* dans laquelle ils montrent que des souris dont le gène de la TDO a été inactivé présentent des concentrations plasmatiques et cérébrales en TRP, 5-HIAA et KYN augmentées par rapport à leurs congénères non déficientes, traduisant une hyperactivité globale du métabolisme du TRP au sein de la voie 5-HT (Kanai, Funakoshi *et coll.* 2009). Cependant, lorsque le système immunitaire est activé, comme c'est le cas dans de nombreuses pathologies caractérisées par une inflammation sous-jacente, l'IDO semble prendre une part importante de l'orientation du métabolisme du TRP.

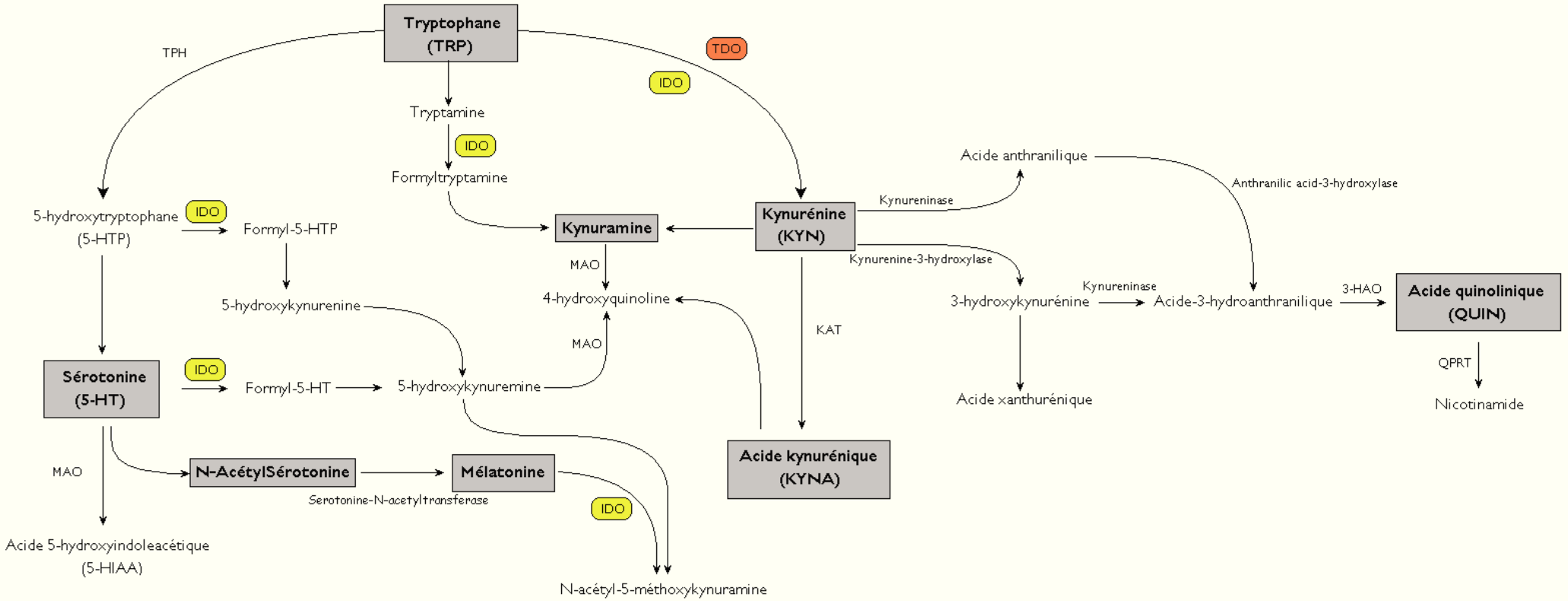
b. Les deux voies du métabolisme

Une fois synthétisée la KYN est utilisée au sein de deux voies distinctes (**Fig. 24**). La première est initiée, d'un côté par la *kynurénine 3-hydroxylase* qui catalyse la synthèse de **3-hydroxykynurénine (3HK),** et de l'autre par la *kynuréninase* qui permet la formation d'**acide anthranilique (ANTHRA)**. Ces deux réactions ne se déroulent pas dans les mêmes compartiments cellulaires puisque la *kynurénine 3-hydroxylase* est localisée au niveau de la paroi externe des mitochondries (Okamoto, Yamamoto *et coll.* 1967) alors que *la kynuréninase* est une enzyme cytosolique (Kawai, Okuno *et coll.* 1988; Takeuchi, Tsubouchi *et coll.* 1995). La seconde voie fait intervenir l'enzyme *kynurénine aminotransférase (KAT)* et aboutit à la synthèse d**'acide kynurénique (KYNA)**. Alors que KYNA ne semble pas être métabolisé, 3HK et ANTHRA sont tous deux transformés en acide-**3-hydroxyanthranilique (3HA)**. Sous l'effet de la *3-hydroxyanthranilate dioxygenase (3HAO)*, le 3HA est transformé en **acide quinolinique (QUIN)**. Des études d'immunohistochimie montrent que *3HAO* et *KAT* sont toutes les deux localisées majoritairement au niveau des astrocytes entourant les synapses glutamatergiques (Roberts, Du *et coll.* 1992; Roberts, McCarthy *et coll.* 1995). Ensuite, QUIN est métabolisé en NAD par la *quinolinate phosphoribosyl transferase (QPRT)*, une enzyme aussi localisée au niveau des astrocytes (Stone 1993).

Le récent regain d'intérêt pour l'étude de la voie KYN provient essentiellement de travaux montrant l'implication de cette voie métabolique dans plusieurs affections du SNC tels que la maladie de Huntington (Forrest, Mackay *et coll.*), la démence d'Alzheimer (Gulaj, Pawlak *et coll.*), la maladie de Parkinson (Nemeth, Toldi *et coll.* 2006) ou encore la démence associée au SIDA etc. (Stone 2001; Stone and Darlington 2002). Mais avant de voir dans quelle mesure la voie KYN est impliquée dans la

physiopathologie de ces différents troubles, voyons tout d'abord quels sont les mécanismes par lesquels les différents métabolites de la KYN agissent dans l'organisme et en particulier dans le SNC.

Fig. 24 : ***Le métabolisme de la kynurénine dans l'organisme.***



IDO : indoleamine-2,3-dioxygenase
TDO : tryptophan-2,3-dioxugenase
MAO :monoamine oxidase
KAT : kynurenine-aminotransferase

3HAO : 3-hydroxyanthranilic acid oxygenase
QPRT : quinolinic *acid phosphoribosyltransferase*
TPH : tryptophan-hydroxylase

c. Mécanismes d'action des métabolites de la kynurénine

Plusieurs métabolites de la kynurénine sont capables d'agir sur différents systèmes au niveau du SNC tels que les systèmes de neurotransmission, le métabolisme énergétique, le stress oxydant etc. C'est le cas en particulier de QUIN, 3HK et KYNA dont les mécanismes d'action sont détaillés dans la section qui suit.

Acide quinolinique

QUIN a été longtemps considéré comme un simple intermédiaire dans la synthèse de NAD. L'importance de son rôle dans le SNC n'a été mise en évidence qu'à la fin des années 70, quand Lapin a découvert qu'il entraînait des convulsions suite à son administration dans les ventricules chez la souris (Lapin 1978). Un peu plus tard, les convulsions induites par QUIN ont été associées à une excitation neuronale résultant de l'action de QUIN en tant qu'agoniste sur les récepteurs glutamatergiques sensibles au NMDA (Stone and Perkins 1981; Schwarcz, Whetsell *et coll.* 1983). A partir de la, il a été suggéré que QUIN puisse être impliqué dans diverses pathologies du SNC, en particulier dans les troubles neurodégénératifs [voir pour revue (Stone and Darlington 2002)]. Dans le SNC, il est produit majoritairement (mais pas exclusivement) par les macrophages et les cellules microgliales activées (Heyes, Achim *et coll.* 1996). Les concentrations en QUIN augmentent en fonction de l'âge (Moroni, Lombardi *et coll.* 1984), suite à une infection bactérienne ou virale (Saito, Markey *et coll.* 1992), et dans ce cas on observe une hausse qui peut aller jusqu'à 400 fois la concentration normale. L'augmentation de QUIN dans le SNC entraîne des lésions excitotoxiques dans plusieurs régions cérébrales mais certaines sont plus sensibles que d'autres, c'est le cas notamment du striatum et de l'hippocampe (Heyes, Ellis *et coll.* 2001). En activant les récepteurs NMDA, QUIN produit une entrée de Ca_2+ dans les neurones cibles qui, en plus d'être responsable du phénomène d'excitotoxicité, va également activer la *nitric oxyde synthase (NOS)* permettant ainsi la synthèse de monoxyde d'azote (NO). En cas d'accumulation, le NO peut devenir extrêmement toxique pour les cellules en produisant le radical péroxynitrite. Des travaux ont mis en évidence l'implication de cette voie dans les mécanismes de toxicité induits par QUIN (Noack, Lindenau *et coll.* 1998; Perez-De La Cruz, Gonzalez-Cortes *et coll.* 2005). Donc, bien que son activité soit plus faible que celle du glutamate en tant que composé excitateur, QUIN est quasiment aussi actif que ce dernier en tant que neurotoxine car il agit non seulement en activant les récepteurs NMDA mais aussi en induisant des dysfonctionnements au niveau des mitochondries (Bordelon, Chesselet *et coll.* 1997) via la formation de radicaux libres (Behan, McDonald *et coll.* 1999; Santamaria, Galvan-Arzate *et coll.* 2001).

En effet, plusieurs études ont montré que QUIN est capable de générer des ROS et d'activer, en conséquence, des voies de dégénérescence cellulaire (Rios and Santamaria 1991; Stone, Behan *et coll.* 2000; Santamaria, Galvan-Arzate *et coll.* 2001; Santamaria, Jimenez-Capdeville *et coll.* 2001; Stone

2001). Ceci est renforcé par le fait que ces effets toxiques sont inhibés par des « free radical scavengers » tels que α-phenyl-t-butylnitrone (Nakao and Brundin 1997) ou l'OPC-14117 (Nakai, Qin *et coll.* 1999). Son activité pro-oxydante due à la production de ROS entraîne également un phénomène de péroxydation des lipides *in vitro* et *in vivo* (Rios and Santamaria 1991; Santamaria and Rios 1993), renforcée par son action « anti » antioxydante puisqu'il a été montré que QUIN était capable de diminuer l'activité des mécanismes de défense anti-oxydants non enzymatiques (TRAP = Total free Radical trapping Antioxidant Potential) ainsi que la concentration en glutathion-SH (GSH = forme réduite du glutathion qui constitue la principale activité antioxydante des cellules) (Leipnitz, Schumacher *et coll.* 2005). Ces propriétés de QUIN peuvent être réversées par l'administration d'agents anti-oxydants comme la mélatonine (Southgate, Daya *et coll.* 1998; Behan, McDonald *et coll.* 1999; Cabrera, Reiter *et coll.* 2000) ou des inhibiteurs de la NOS tels que le L-NARG (Santamaria, Santamaria *et coll.* 1997).

Des travaux plus récents montrent que QUIN peut également agir de façon plus directe sur la transmission glutamatergique, en particulier sur les concentrations en GLU par l'intermédiaire de deux mécanismes maintenant bien caractérisés. Le premier est l'inhibition de la recapture du GLU synaptique par les astrocytes. En effet, les mécanismes de recapture du GLU astrocytaire constituent le moyen le plus efficace de contrôler sa concentration synaptique et éviter ainsi tous les phénomènes d'excitotoxicité dus à l'hyperexcitation des récepteurs NMDA (Robinson and Dowd 1997; Anderson and Swanson 2000). Il a été montré que QUINinhibe le système de recapture astrocytaire, contribuant ainsi à augmenter les concentrations en GLU dans la fente synaptique (Tavares, Tasca *et coll.* 2002). La même équipe a aussi observé que QUIN stimule la libération de GLU au niveau de synaptosomes en agissant sur le transporteur localisé à leur surface (Tavares, Schmidt *et coll.* 2005). Ainsi, QUIN pourrait également exercer son activité neurotoxique en augmentant la concentration synaptique en GLU. D'autre part, cette propriété « pro-glutamatergique » suggère que QUIN pourrait également être impliqué dans la modulation de la plasticité synaptique au sein des réseaux de neurones.

Dans une culture cellulaire, des concentrations de l'ordre du µM sont toxiques après quelques heures d'exposition (Khaspekov, Kida *et coll.* 1989; Matsuo, Tsukada *et coll.* 2000), tout comme des concentrations sub-micromolaires suite à une exposition de plusieurs semaines (Whetsell and Schwarcz 1989; Guillemin, Kerr *et coll.* 2005). Les concentrations basales en QUIN n'excèdent pas 1µM, mais en réponse à des toxines bactériennes, elles peuvent augmenter jusqu'à 246 fois dans le tissu cérébral. Des travaux montrent qu'il existe une relation entre la modification des concentrations cérébrales en QUIN et l'installation de certaines pathologies neurodégénératives (Heyes, Saito *et coll.* 1992; Stone 2001; Nemeth, Toldi *et coll.* 2005). En effet, des patients atteints de la maladie d'Alzheimer ont des taux de QUIN élevés dans le striatum, le néocortex et le cervelet (Guidetti, Bates *et coll.* 2006), tout comme les patients atteints de la maladie de Parkinson dont la concentration en QUIN est également augmentée dans le striatum (Nemeth, Toldi *et coll.* 2006).

3-hydroxykynurénine

Parmi les métabolites neuroactifs issus du métabolisme de la KYN, on trouve également la 3-hydroxykynurénine (3HK) dont la synthèse est catalysée par la *kynurénine-3-hydroxylase* (Nakagami, Saito *et coll.* 1996) (**Fig. 24**). On sait assez peu de choses sur le rôle joué par la 3HK en conditions physiologiques. Par contre, son mode d'action est relativement bien caractérisé : tout comme QUIN, elle va exercer ses effets par la formation de radicaux libres (Nakagami, Saito *et coll.* 1996; Okuda, Nishiyama *et coll.* 1998) lui conférant, en cas d'accumulation, des propriétés neurotoxiques. Il semblerait que ce composé ait une action neurotoxique moindre par rapport à QUIN. Une partie de la toxicité de la 3HK viendrait d'un de ces métabolites, le 3HA, qui, par auto-oxydation, entraîne la formation d'O_2-, très toxique car générateur destress oxydant. Comme je l'ai mentionné plus tôt, cette propriété du 3HA est particulièrement intéressante compte tenu du fait que l'anion superoxide est un activateur des enzymes IDO et TDO qui initient la voie KYN. Ainsi, on peut imaginer que l'activation de cette voie résulte en un cercle vicieux entraînant son auto-alimentation. Concernant le mode d'action de 3HK, Okuda *et coll.* ont montré à plusieurs reprises que son accumulation dans les tissus augmente la production de péroxyde d'hydrogène (H_2O_2) (Okuda, Nishiyama *et coll.* 1996; Okuda, Nishiyama *et coll.* 1998) qui constitue une autre espèce de ROS. Pour exercer ses effets toxiques, la 3HK doit être excrétée de la cellule car le blocage de son transporteur (transporteur des acides aminés neutres) empêche l'augmentation d' H_2O_2 (Okuda, Nishiyama *et coll.* 1998). Tout comme QUIN, la synthèse de 3HK est particulièrement sensible aux facteurs de l'inflammation : en effet, l'IFNγ entraîne une élévation prononcée de la synthèse de QUIN et de 3HK (Saito, Markey *et coll.* 1992; Saito, Crowley *et coll.* 1993). D'autres études ont montré que ce composé agit également en augmentant la mort des neurones par potentialisation de la toxicité induite par QUIN (Guidetti and Schwarcz 1999). La concentration cérébrale en 3HK est relativement faible en conditions physiologiques mais augmente fortement dans le cerveau de souris suite à une activation du système immunitaire ou une administration d'interféron-γ (Saito, Markey *et coll.* 1992). On observe également une hausse des concentrations dans des cas d'infection au VIH, et plus spécifiquement dans les cas associés à une démence (Sardar, Bell *et coll.* 1995), dans le cerveau de patients Huntington (Pearson and Reynolds 1992; Guidetti, Reddy *et coll.* 2000) ainsi que dans celui de souris transgéniques constituant un modèle murin de la maladie de Huntington (Guidetti, Reddy *et coll.* 2000), alors qu'elle est diminuée dans le cerveau de patients Alzheimer (Baran, Jellinger *et coll.* 1999).

Acide kynurénique (KYNA)

L'acide kynurénique a été identifié en 1853 mais ce n'est que 50 ans plus tard qu'il fut reconnu comme produit du métabolisme de la kynurénine (Beadle, Mitchell *et coll.* 1947). Dans les années 80, deux groupes de chercheurs ont mis en évidence, chez l'Homme, la présence de KYNA dans le cerveau (Moroni, Russi *et coll.* 1988). Dans le SNC, comme en périphérie, KYNA est formé suite à la transamination irréversible de la kynurénine par la KAT (**Fig. 24**). Chez les mammifères, plusieurs enzymes non spécifiques catalysent cette réaction au niveau des organes périphériques. Par exemple dans le foie de rat, quatre isoformes ont été caractérisés (Kido 1984). Cependant, chez le rat et l'Homme, on n'en trouve que deux dans le cerveau : KAT1 et KAT2 (Okuno, Nakamura *et coll.* 1991; Schmidt, Guidetti *et coll.* 1993; Guidetti, Okuno *et coll.* 1997). Ces deux enzymes sont préférentiellement localisées dans les cellules gliales (Ceresoli-Borroni, Guidetti *et coll.* 1999) ainsi qu'en plus faible proportion dans les mitochondries des astrocytes (Okuno, Schmidt *et coll.* 1991). Des études suggèrent qu'en conditions physiologiques, KAT2 participe à plus de 70% de la production de KYNA chez le rat (Guidetti, Okuno *et coll.* 1997).

À cause de sa structure bipolaire, KYNA passe très mal la BHE (Fukui, Schwarcz *et coll.* 1991), à moins que sa concentration plasmatique ne soit pharmacologiquement élevée (Scharfman, Goodman *et coll.* 2000). Ainsi, l'influx de KYNA sanguin n'est que de 0.0023 nmol/h/g (Fukui, Schwarcz *et coll.* 1991), ce qui suggère que le KYNA d'origine périphérique n'a que peu d'effet sur la concentration retrouvée dans le SNC. Une fois synthétisé au niveau des astrocytes majoritairement, KYNA est libéré dans le milieu extracellulaire (Swartz, During *et coll.* 1990; Gramsbergen, Hodgkins *et coll.* 1997) où il va agir via plusieurs mécanismes. Tout d'abord, le premier mode d'action mis en évidence fut sa fonction d'antagoniste des récepteurs NMDA (Perkins and Stone 1982). Cette propriété est très intéressante compte tenu du fait qu'à ce titre, KYNA peut contrecarrer les effets excitateurs de QUIN. C'est d'ailleurs ce qu'ont montré Sapko *et al*. en 2006 en utilisant des souris déficientes en KAT2 chez lesquelles ils observèrent, après administration intra-striatale de QUIN à des doses toxiques, des lésions beaucoup plus importantes que chez leurs congénères non mutées, cet effet étant réversé par une élévation pharmacologique préalable du niveau de KYNA dans le striatum (Sapko, Guidetti *et coll.* 2006). Les auteurs en conclurent que la synthèse de KYNA joue un rôle important dans le contrôle de la vulnérabilité des neurones à la toxicité induite par un excès de QUIN.

Plus récemment, des études ont montré que KYNA pouvait également agir au niveau des récepteurs nicotiniques, en particulier au niveau des récepteurs α7 nicotiniques (Hilmas, Pereira *et coll.* 2001). Des études de microdialyse *in vivo* ont révélé que l'administration de faibles concentrations de KYNA (entre 30 et 100 nM) réduisent significativement les concentrations extracellulaires en GLU dans le striatum et le cortex préfrontal (Moroni, Cozzi *et coll.* 2005). De si faibles doses laissent penser que KYNA exerce cet effet par l'intermédiaire des récepteurs nicotiniques et non pas via les récepteurs NMDA. Ceci a d'ailleurs été confirmé récemment par une étude de microdialyse réalisée par Wu *et coll.* dans laquelle ils montrent que l'effet anti-glutamatergique de KYNA est bloqué par un agoniste nicotinique (Wu, Pereira *et coll.* 2009).

Aucune enzyme de dégradation de KYNA n'a été identifiée jusque là, et bien qu'il ait été suggéré dans les années 50 que l'acide quinaldique soit un métabolite résultant du catabolisme de KYNA (Kaihara, Price *et coll.* 1956), aucune autre étude n'a confirmé ce résultat (Turski, Nakamura *et coll.* 1988). En conditions physiologiques, le seul mécanisme permettant d'éliminer le KYNA du cerveau est un transporteur sensible au probenecid (Moroni, Russi *et coll.* 1988).

d. Voie KYN et métabolisme énergétique

Plusieurs métabolites de la voie KYN affectent différentes composantes du métabolisme énergétique de la cellule. Par exemple, KYNA, 3HK, 3HA, ANTHRA et QUIN augmentent tous la recapture de glucose et inhibent la production de CO_2. De plus, l'activité des complexes protéiques I, II et IV de la chaîne respiratoire mitochondriale est inhibée par 3HK alors que 3HA inhibe de façon sélective les complexes I et II. ANTHRA est connu pour inhiber les complexes I et III et QUIN les complexes II et III (Ribeiro, Grando *et coll.* 2006; Schuck, Tonin *et coll.* 2007; Schuck, Tonin *et coll.* 2007). En effet, une de ces études a mis en avant la capacité de QUIN à augmenter la recapture de glucose de 55% et à diminuer de 35% l'activité du complexe II de la chaîne respiratoire (Schuck, Tonin *et coll.* 2007). De plus, l'inhibition du complexe II par QUIN n'était plus observée en présence de SOD et de catalase, indiquant que cet effet est médié par la formation de ROS. Les auteurs ont alors suggéré que QUIN pouvait produire des altérations majeures du métabolisme énergétique qui pouvaient vraisemblablement contribuer à expliquer sa toxicité. Au contraire KYN et KYNA semblent ne pas avoir d'effets sur les complexes enzymatiques de la chaîne respiratoire. De plus, l'activité NA^+/K^+-ATPase n'est pas modifiée par ces composés. Cependant, le fait que KYNA augmente la recapture de glucose indique que ce métabolite n'est pas seulement produit en tant que composé neuroprotecteur/neuromodulateur, mais aussi en tant qu'agent capable de perturber le métabolisme énergétique. Ainsi, l'ensemble de ces données suggère que les métabolites de la voie KYN induisent des perturbations énergétiques au sein du SNC, et que, par conséquent, ils soient impliqués dans la physiopathologie de certaines maladies neurodégénératives. C'est d'ailleurs ce que nous allons aborder dans la partie qui suit.

En bref

La voie de la kynurénine est initiée par deux enzymes : l'IDO et la TDO, respectivement induites par les cytokines pro-inflammatoires et les glucocorticoïdes. Une fois produite, la kynurénine est métabolisée au sein de deux voies dont l'une est qualifiée de « neurotoxique » car elle génère des composés tels que 3HK et QUIN qui peuvent entraîner un dysfonctionnement cellulaire, voire induire des mécanismes de mort cellulaire via une action sur le système glutamatergique et le stress oxydant. Au contraire, l'autre voie, dite « neuroprotectrice », permet la synthèse de KYNA, un composé capable de réverser les effets toxiques de QUIN et 3HK.

C. Quel rôle de la voie KYN en pathologie ?

Comme nous venons de le voir, les propriétés convulsivantes et neurotoxiques de QUIN et 3HK ainsi que les propriétés neuroprotectrices de KYNA, suggèrent que ces « kynurénines endogènes » sont impliquées dans des pathologies neurologiques sous-tendues par des processus neurodégénératifs chez l'Homme (Schwarcz, Foster *et coll.* 1984). Le lien entre métabolites de la KYN et neurotoxicité est supporté par des travaux expérimentaux démontrant clairement les effets toxiques de QUIN à des concentrations de l'ordre du nanomolaire (Whetsell and Schwarcz 1989; Kerr, Armati *et coll.* 1998), la toxicité d'une exposition aigue à 3HK (1µM) (Okuda, Nishiyama *et coll.* 1998) et les effets protecteurs de KYNA (1nM) (Scharfman, Hodgkins *et coll.* 1999). Etant donné l'activité de ces composés, il est tout à fait possible que des déséquilibres au sein de la voie KYN affectent le fonctionnement du SNC. Ainsi, QUIN, 3HK et KYNA, ensemble ou séparément, pourraient constituer la cause primaire de certains troubles, ou, tout du moins, jouer un rôle facilitateur/aggravant sur le développement de ces affections.

a. La maladie de Huntington

Des niveaux élevés de 3HK ont été observés au niveau du putamen et du cortex fronto-temporal chez des patients atteints par la maladie de Huntington (patients HD) (Pearson and Reynolds 1992; Guidetti, Reddy *et coll.* 2000). Comme mentionné ci-avant, ce composé peut entraîner des altérations du fonctionnement cellulaire, voire même la mort des cellules, en générant des ROS (voir partie III.3.B.c). Ces données sont en accord avec le fait que l'activité de l'enzyme 3HAO, responsable de sa dégradation, est augmentée dans le cerveau des patients HD (Schwarcz, Okuno *et coll.* 1988). De plus, les niveaux de KYNA dans le noyau caudé sont diminués dans le cerveau de sujets atteints de cette pathologie, ce qui est cohérent avec la baisse d'activité des enzymes KAT I et KAT II reportée chez ces patients (Stone 2001). Ces données suggèrent donc une importante modification du métabolisme de la KYN qui semble être détourné vers la voie de la synthèse de 3HK et QUIN au détriment de la voie produisant KYNA, contribuant ainsi à augmenter la vulnérabilité des neurones à la toxicité induite par 3HK et QUIN. Plus récemment, Guidetti *et coll*. ont démontré que les niveaux de 3HK et QUIN sont augmentés de 3 à 4 fois dans le néocortex et le striatum chez des patients HD au stade 1 (début de la maladie) alors qu'à un stade plus avancé ces différences disparaissent (Guidetti, Luthi-Carter *et coll.* 2004). Les auteurs en ont conclu que le dysfonctionnement de la voie KYN pourrait jouer un rôle important dans l'initiation des processus de dégénérescence chez les patients HD, ce qui avait déjà été proposé 20 ans auparavant (Schwarcz, Whetsell *et coll.* 1983). D'autres travaux viennent renforcer l'implication des métabolites de la KYN dans la physiopathologie de ce trouble. Tout d'abord, il a été montré chez le rongeur que l'administration de QUIN au niveau du striatum pouvait induire l'expression du gène de la huntingtine (HTT) (Tatter, Galpern *et coll.* 1995). De plus, il a été montré que la HTT pouvait augmenter l'expression locale des sous-unités NR_1/NR_{2B} des récepteurs NMDA. Cette propriété est tout à fait cohérente avec le fait que les neurones du striatum (dans des modèles

murins de HD) sont plus sensibles aux effets toxiques de QUIN et du NMDA (Chen, Luo *et coll.* 1999; Zeron, Hansson *et coll.* 2002).

En 2006, Mackay *et coll*. ont décrit une augmentation de la conversion du TRP en KYN chez des patients HD, démontrant que l'activité de la voie de la KYN est augmentée. Ces données suggèrent que les enzymes IDO et TDO sont hyperactives chez ces patients. Ceci est en accord d'une part avec le fait que cette pathologie s'accompagne d'une élévation de la production de cytokines proinflammatoires qui induisent l'IDO, et d'autre part avec l'élévation de la production de ROS qui activent les deux enzymes (Perez-De La Cruz and Santamaria 2007). En plus de cela, certains auteurs ont observé une élévation plus importante du ratio KYN/TRP chez les patients HD en réponse à un apport oral de TRP (Stoy, Mackay *et coll.* 2005).

b. La maladie d'Alzheimer

La maladie d'Alzheimer (MA) est la forme la plus fréquente de démence touchant des dizaines millions de personnes dans le monde. Certains auteurs ont évalué les concentrations plasmatiques en TRP, KYN et certains marqueurs d'inflammation (néoptérine et IL2) chez des patients Alzheimer (AD) et ont montré que l'utilisation du TRP au sein de la voie de KYN est accrue de façon plus importante encore que chez les patients âgés non-Alzheimer (Widner, Leblhuber *et coll.* 2000). De façon intéressante, le ratio KYN/TRP est corrélé à l'importance du déclin cognitif chez ces patients ainsi qu'à l'augmentation des titres des marqueurs de l'inflammation, soulignant le lien important entre inflammation, métabolisme de la KYN et déclin cognitif. En parallèle, il a été mis en évidence que le taux de KYNA du sérum et du LCR des patients AD est diminué (Heyes, Saito *et coll.* 1992; Hartai, Juhasz *et coll.* 2007), indiquant que la voie « neurotoxique » est favorisée chez ces patients. De nombreux travaux ont été menés dans le but d'évaluer dans quelle mesure le fonctionnement interne de la voie de la KYN est altéré dans la MA. Ainsi, plusieurs observations ont permis de faire le lien entre les métabolites de cette voie et les troubles physiopathologiques concomitants à la symptomatologie de la MA. C'est le cas notamment pour QUIN dont les concentrations ont été trouvées très augmentées dans l'hippocampe des patients AD et en particulier à proximité des plaques séniles (Guillemin, Brew *et coll.* 2005). Les auteurs de ce travail montrent également que ce mécanisme est corrélé à l'expression de l'IDO dans cette structure. L'hypothèse mise en avant par les auteurs est l'importante activation des cellules gliales à proximité des plaques qui, sous l'effet de la neuroinflammation concomitante à la maladie, constituent la source cérébrale majeure de QUIN.

De plus, des données suggèrent l'existence d'un lien entre QUIN et le peptide Aβ42 qui est considéré comme jouant un rôle central dans la physiopathologie de la MA (Walsh, Klyubin *et coll.* 2002). En effet, ce dernier peut non seulement induire la production de QUIN par les cellules gliales et les macrophages (Widner, Leblhuber *et coll.* 2000; Guillemin, Brew *et coll.* 2005) mais aussi inhiber la recapture du glutamate par les astrocytes (Parpura-Gill, Beitz *et coll.* 1997; Tavares, Tasca *et coll.* 2000) contribuant ainsi à accroître les mécanismes d'excitotoxicité induits par QUIN. D'un point de vue plus clinique, il est intéressant de constater, chez les patients AD, que l'activation de la voie KYN

est corrélée à l'importance du déclin cognitif (Widner, Leblhuber *et coll.* 1999; Widner, Leblhuber *et coll.* 2000), suggérant ainsi que ses métabolites constituent d'importants médiateurs dans la modulation des fonctions cognitives. Cette hypothèse est largement appuyée par des données attestant d'un dérèglement de cette voie au cours de diverses pathologies souvent associées à une altération des fonctions cognitives. C'est notamment le cas de la maladie de Huntington (Stoy, Mackay *et coll.* 2005), de la maladie de Parkinson (Nemeth, Toldi *et coll.* 2006), de la sclérose latérale amyotrophique (Guillemin, Meininger *et coll.* 2005) ou encore de la démence associée au SIDA (Heyes, Rubinow *et coll.* 1989; Martin, Heyes *et coll.* 1992; Heyes, Ellis *et coll.* 2001).

c. La maladie de Parkinson

Des taux élevés de 3HK ont été décrits au niveau du putamen et de la substance noire de patients atteints de la maladie de Parkinson (PD). Le ratio KYN/3HK est réduit dans la substance noire, dans le cortex préfrontal et le putamen (Ogawa, Matson *et coll.* 1992). Ces changements suggèrent que la KYN est préférentiellement utilisée pour produire 3HK plutôt que KYNA, un phénomène qui, à terme, pourrait être responsable d'un accroissement de la vulnérabilité des neurones aux métabolites oxydants. De plus, les taux de 3HK sont plus élevés chez les patients n'ayant pas été traités par la L-DOPA (Ogawa, Matson *et coll.* 1992).

d. Démence associée au SIDA

Un nombre important d'arguments suggère que la voie KYN est impliquée dans les phénomènes de neurotoxicité à l'origine des anomalies rencontrées dans le cerveau des patients atteints par cette forme de démence (Heyes 1996). Par exemple, il a été observé que l'activité de l'IDO était augmentée dans le cerveau de ces patients en comparaison à des patients non infectés par le VIH ainsi que des patients infectés mais non déments (Sardar, Bell *et coll.* 1995). De plus, ce phénomène semble être accompagné d'une élévation de la production de 3HK et de QUIN. En 1996, Chao *et coll*. ont rassemblé, dans un article de revue, l'ensemble des données impliquant QUIN dans la physiopathologie de cette forme de démence (Chao, Hu *et coll.* 1996). Le rôle des récepteurs NMDA dans cette affection est maintenant relativement bien établi (Lipton 1998). Etant donné que QUIN agit en tant qu'antagoniste sur les récepteurs NMDA, le fait que sa concentration augmente d'un facteur 20 dans le LCR des patients suggère fortement son implication dans la symptomatologie associée à ce trouble (Heyes, Brew *et coll.* 1991). D'ailleurs, ces changements du taux de QUIN apparaissent comme étant corrélés positivement aux dysfonctionnements cognitifs et moteurs (Heyes, Rubinow *et coll.* 1989; Heyes, Brew *et coll.* 1991; Martin, Heyes *et coll.* 1992). Il a également été rapporté que la concentration de QUIN pouvait être augmentée jusqu'à 300 fois dans le LCR de patients sidéens déments (Heyes, Saito *et coll.* 1998). Cependant, lorsque ces patients sont traités à la zidovudine (antirétroviral inhibiteur nucléosidique de la transcriptase inverse), les concentrations en QUIN chutent de façon importante et congruente à l'amélioration des symptômes neurologiques. Des résultats similaires ont été trouvés chez des enfants infectés par le VIH : les niveaux de QUIN centraux étaient augmentés d'un facteur 4 et

le traitement par la zidovudine entraînait un retour à des taux de base (Stone 2001). De façon générale, les niveaux élevés de QUIN trouvés chez les patients sidéens semblent provenir des cellules immunitaires activées par le processus inflammatoire induit par l'attaque virale. Ceci est suggéré par l'observation que les concentrations sériques en KYN et QUIN, tout comme les concentrations dans le LCR, sont étroitement corrélées aux taux de β2-microglobuline et de néoptérine, deux marqueurs de l'activation du système immunitaire (Heyes, Brew *et coll.* 1992). De façon intéressante, il a aussi été observé chez les patients sidéens des niveaux plasmatiques et cérébraux élevés de 3HK (Pearson and Reynolds 1991; Sardar, Bell *et coll.* 1995; Sardar and Reynolds 1995).

e. Ischémie cérébrale

L'ischémie cérébrale est à l'origine d'une importante dégénérescence neuronale, un phénomène auquel les métabolites neurotoxiques de la voie KYN pourraient contribuer. En effet, il a été montré, chez la gerbille, qu'une occlusion vasculaire (5 à 15 min) n'entraine pas de modifications de la concentration en QUIN sous 24h mais, par contre, que cette concentration augmente fortement (d'un facteur 50) quelques jours après la lésion (Heyes and Nowak 1990; Saito, Crowley *et coll.* 1993). Ces changements étaient accompagnés par une hausse substantielle de l'activité de toutes les enzymes de la voie de la KYN excepté les KATs (traduisant élévation importante du ratio QUIN/KYNA) suggérant que le métabolisme est dévié vers la voie « neurotoxique » et que ce phénomène pourrait participer aux dommages neuronaux causés par la lésion. De façon similaire, il a été montré que KYNA et ses analogues (acide 7-chloro-kynurénique) sont capables de diminuer l'intensité des dommages ischémiques dans différents modèles (Wood, Bussey *et coll.* 1993). Ainsi, il fut proposé en 1993 que la microglie et les macrophages puissent contribuer activement aux phénomènes de mort cellulaire retardée induits par l'ischémie probablement par l'intermédiaire de QUIN (Lees 1993). Cette hypothèse fut renforcée plus tard par une étude de Baratte *et coll*. dans laquelle les auteurs observent un immuno-marquage élevé de QUIN dans les cellules microgliales de gerbille entre 4 et 7 jours après ischémie (Baratte, Molinari *et coll.* 1998). Peu de temps après, Walker *et coll*. montrèrent que le niveau de KYNA est élevé dans le cerveau et dans le LCR de fœtus de brebis, mais qu'il diminue après la naissance (Walker, Curtis *et coll.* 1999). Ces auteurs observèrent alors que la restriction du débit sanguin au niveau du cordon ombilical (entre 120 et 140 jours de gestation) produit une baisse de KYNA dans l'hypothalamus et l'hippocampe. De telles altérations amplifient la vulnérabilité du cerveau à l'hypoxie/ischémie. Ainsi, le risque de dommages causés par hypoxie cérébrale peut être réduit par l'inhibition de la *kynuréninase* et de la *kynurenine 3-hydroxylase* qui entraîne une hausse de la concentration en KYNA (Stone 2001).

En bref

Plusieurs pathologies neurodégénératives sont caractérisées par une altération de l'équilibre entre les deux voies de la KYN vraisemblablement médiée par les processus inflammatoires sous-jacents à la maladie qui activent le métabolisme par l'intermédiaire de l'IDO. Ainsi, l'accumulation de 3HK et/ou de QUIN dans les tissus nerveux pourraient être à l'origine des phénomènes de dégénérescence observés lors de ces pathologies.

D. ÉQUILIBRE ENTRE LES DEUX VOIES DANS LE SNC

Les données mentionnées ci-dessus mettent en avant l'importance de l'équilibre cérébral entre les voies de synthèse de QUIN et de KYNA qui agissent de façon opposée sur le système glutamatergique. Sans parler d'état pathologique lié aux différents mécanismes neurotoxiques/neuroprotecteurs énoncés ci-avant, il est important de noter que QUIN et KYNA sont capables de moduler la concentration en GLU dans l'espace synaptique ainsi que dans le milieu extracellulaire. Etant donné que la concentration extracellulaire en GLU est considérée comme un index d'excitation synaptique (Lombardi and Moroni 1992; Blandina, Cherici *et coll.* 1995; Cozzi, Attucci *et coll.* 1997; Moroni, Cozzi *et coll.* 1998; Lorrain, Baccei *et coll.* 2003) et que le glutamate intervient dans la régulation de nombreux processus biologiques, on peut considérer la voie KYN comme un acteur central dans la modulation du fonctionnement cérébral. A ce titre, il est important de mentionner le fait que le métabolisme de la KYN ne se fait pas de la même manière dans toutes les cellules du cerveau. En effet, même si l'IDO est exprimée dans toutes les cellules du SNC : neurones (Guillemin, Brew *et coll.* 2005), astrocytes (Guillemin, Kerr *et coll.* 2001), microglie (Guillemin, Smith *et coll.* 2003), oligodendrocytes et cellules endothéliales (Schroten, Spors *et coll.* 2001; Owe-Young, Webster *et coll.* 2008), ce n'est pas le cas de toutes les enzymes du métabolisme. Par exemple, des travaux montrent que les astrocytes ne possèdent pas l'enzyme de synthèse de la 3HK : *la kynurénine 3-hydroxylase* (voir **Fig. 24**). Ils ne peuvent donc synthétiser que KYNA (**Fig. 25**). Cependant, ils possèdent tout de même les enzymes nécessaires à la dégradation de QUIN (Guillemin, Kerr *et coll.* 2001). Ils sont donc capables de le métaboliser et donc de diminuer sa toxicité. Au contraire, les cellules de la microglie possèdent l'intégralité des enzymes du métabolisme. Il a d'ailleurs été proposé que ce soit les seules cellules à synthétiser QUIN en cas d'inflammation (Guillemin, Smythe *et coll.* 2005).

Il y a donc un équilibre entre les deux voies de la KYN sous-tendu par l'équilibre entre cellules microgliales et astrocytes. Ainsi, la modification de cet équilibre, en particulier la diminution du

nombre d'astrocytes ou l'activation de la microglie en réponse à une inflammation, pourrait tout à fait être à l'origine de l'accroissement de l'activité de la voie « neurotoxique » produisant QUIN et 3HK, entrainant ainsi des dysfonctionnements cellulaires voire la mort des cellules.

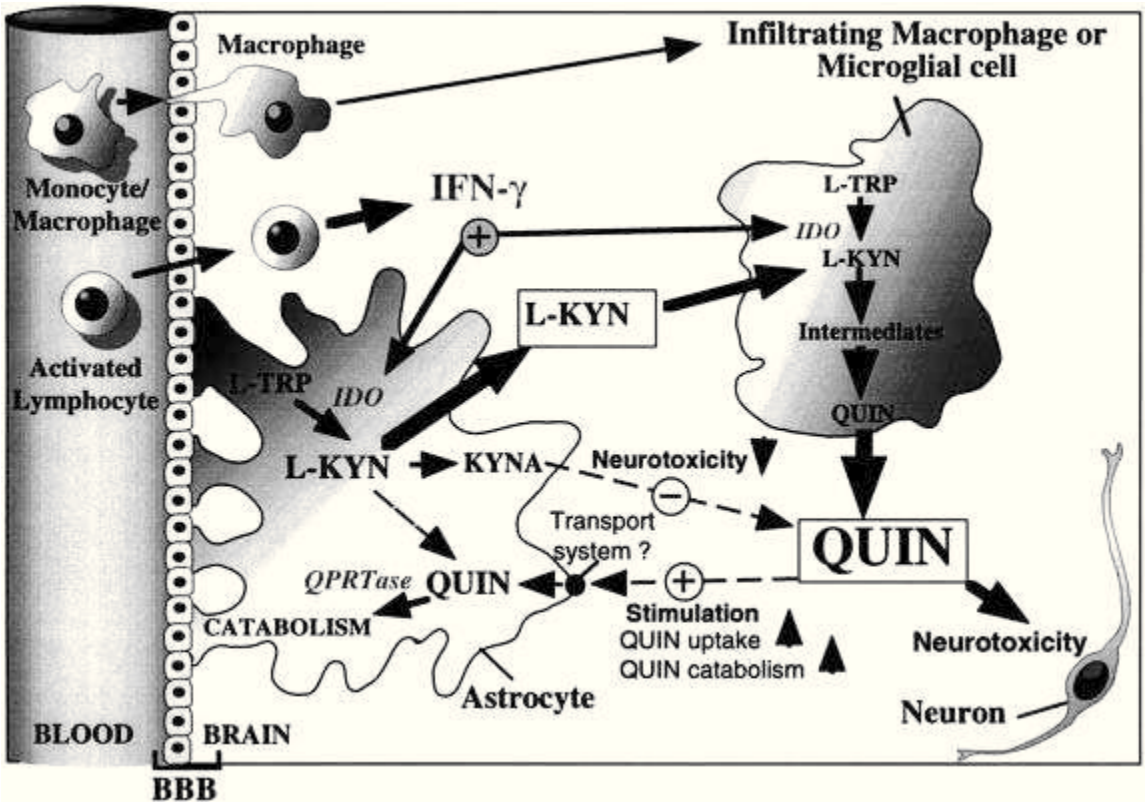


Fig. 25 : ***Le métabolisme de la kynurénine dans le système nerveux central.*** *D'après Guillemin et coll., 2001.*

En bref

L'équilibre entre les deux voies du métabolisme de la KYN est influencé par la capacité des cellules à synthétiser QUIN et KYNA. Dans le SNC, les astrocytes ne peuvent produire que KYNA alors que les cellules microgliales synthétisent préférentiellement QUIN, tout du moins en condition d'inflammation. Ainsi, les astrocytes peuvent être vus comme contribuant préférentiellement aux effets « neuroprotecteurs » et la microglie comme impliquée plutôt dans les effets « neurotoxiques ».

E. VOIE KYN EN REPONSE AU STRESS

Comme nous l'avons vu précédemment, la réponse au stress se caractérise par l'activation de l'axe HPA qui élève le taux de cortisol, mais aussi par l'activation du système immunitaire qui accroît la libération de certaines cytokines proinflammatoires. Conformément à cela ainsi qu'aux mécanismes d'activation de la voie KYN (Cf. partie II.3.B), il semble donc que la libération de ces différents médiateurs aura des répercussions sur le métabolisme de la KYN.

En effet, les glucocorticoïdes libérés au cours de la réponse au stress sont de puissants inducteurs de l'enzyme TDO. Ainsi, il a été montré chez l'Homme et chez le rat que l'exposition temporaire à un stress physique (faible température) entraîne non seulement une diminution des concentrations plasmatiques en TRP mais aussi une augmentation des concentrations en métabolites de la KYN (Francesconi, Boyd *et coll.* 1972; Sitaramam and Ramasarma 1975). Après avoir réalisé, chez le rat, l'ablation des surrénales, les auteurs ont constaté que l'activation de la voie KYN disparaît complètement. Afin de s'assurer de l'implication réelle de la corticostérone dans ce phénomène, ils ont bloqué l'activité sympathique de rats n'ayant pas subi d'adrénalectomie et ont observé que l'activation de la voie KYN était toujours présente. Ceci suggérait par conséquent que l'activation de la TDO au cours du stress dépend exclusivement de la libération de GC par les surrénales en réponse à l'activation de l'axe HPA.

D'autres études ont produit des résultats similaires. C'est le cas de l'étude de Pawlak *et coll.* qui montre que l'exposition de rats à un stresseur psychogénique aigu (choc électrique) entraîne une hausse immédiate mais transitoire (24h) des concentrations en TRP, KYN, 3HK et KYNA, à la fois dans les tissus périphériques (foie et reins) et dans le SNC (le cervelet, la médulla, l'hypothalamus, le striatum, l'hippocampe et le cortex préfrontal) (Pawlak, Takada *et coll.* 2000). Compte tenu du fait que l'activation de la TDO par les GC n'augmente pas le taux cérébral de kynurénine (Connick, Lombardi *et coll.* 1988), les résultats de Pawlak suggèrent fortement que l'IDO est également impliquée dans les mécanismes d'activation de la voie KYN au niveau du SNC, en réponse à la confrontation à un stresseur

aigu, ce qui est tout à fait cohérent avec la libération de cytokines proinflammatoires observée en réponse à ce type de stimulus. En effet, comme je l'ai mentionné auparavant, les cytokines constituent de puissants inducteurs de l'IDO (Babcock and Carlin 2000). Bien qu'aucune étude n'ait encore établi de lien direct entre la libération de cytokines au cours d'un stress psycho-émotionnel et l'activation de la voie KYN par l'IDO, la stimulation de l'IDO par les cytokines a néanmoins été décrite chez la souris, après un stress immunologique induit par l'administration aigue de LPS (Fujigaki, Saito *et coll.* 2001; Lestage, Verrier *et coll.* 2002; Andre, O'Connor *et coll.* 2008; O'Connor, Lawson *et coll.* 2008).

F. VOIE KYN DANS LA DEPRESSION

Nous avons vu précédemment que l'hyperactivité de l'axe HPA (conduisant à une élévation des taux de GC circulants) ainsi que l'altération du fonctionnement du système immunitaire (production accrue de cytokines proinflammatoires) sont deux caractéristiques majeures de la physiopathologie des troubles dépressifs. Même si ces deux types de dysfonctionnements ne sont pas présents chez tous les patients dépressifs, il n'en demeure pas moins que l'altération conjointe ou indépendante de ces systèmes au cours de la dépression a des conséquences identiques sur le métabolisme de la KYN. En effet, les perturbations décrites ci-dessus ont toutes deux pour conséquence d'activer la production de KYN et de ses métabolites à partir du TRP. Certains auteurs mettent même en avant une possible déplétion en TRP plasmatique en cas d'activation périphérique trop importante, affaiblissant ainsi le pool de TRP disponible pour la synthèse de 5-HT. Ce déficit pourrait alors contribuer aux dysfonctionnements sérotoninergiques observés au cours de certains états dépressifs. Une telle hypothèse est corroborée par le fait que le cortisol et les médiateurs de l'inflammation, de par leur action respective sur la TDO et l'IDO, accroissent de façon importante la demande en TRP pour synthétiser la KYN. Si l'on ajoute à cela le fait que la KYN (ainsi que certains de ses métabolites) synthétisée en périphérie entre en compétition avec le TRP au niveau du transporteur permettant son passage dans le parenchyme cérébral (Fukui, Schwarcz *et coll.* 1991), on peut supposer qu'il en résulte une baisse de la disponibilité en TRP pour la synthèse cérébrale de 5-HT. D'autre part, l'IDO étant capable de cataboliser la 5-HT (voir **Fig. 24**), l'augmentation de son expression par les cytokines renforcerait encore plus l'idée d'un déséquilibre entre KYN et 5-HT au cours de la dépression.

De nombreuses études cliniques viennent appuyer cette théorie, en rendant compte d'une diminution de la concentration plasmatique en TRP chez les patients dépressifs (Maes, Wauters *et coll.* 1996; Song, Lin *et coll.* 1998), chez les patients devenus dépressifs après immunothérapie (Bonaccorso, Puzella *et coll.* 2001; Bonaccorso, Marino *et coll.* 2002; Capuron, Ravaud *et coll.* 2002; Hauser, Khosla *et coll.* 2002) ou encore chez les femmes souffrant de dépression post-partum (Schrocksnadel, Widner *et coll.* 2003; Kohl, Walch *et coll.* 2005). Capuron *et coll.* ont même montré que cette diminution est corrélée à l'importance des symptômes dépressifs chez les patients traités par immunothérapie (Capuron, Ravaud *et coll.* 2002). Dans le même esprit, des travaux menés chez l'Homme ont récemment montré que les concentrations plasmatiques en KYN ainsi que les taux du LCR sont augmentés chez des patients traités à l'IFNα (Raison, Dantzer *et coll.* 2009). Ces auteurs ont

également rapporté une corrélation positive entre les concentrations en KYN et QUIN et les taux d'IFNα, dans le CSF. D'autres marqueurs d'inflammation semblent également corrélés aux titres de KYN et QUIN dans le LCR. De plus, KYN et QUIN semblent être aussi corrélés positivement à l'intensité des symptômes dépressifs mesurée par l'échelle MADRS.

Cependant, les éléments les plus convaincants de l'importance de cette voie métabolique dans la symptomatologie dépressive proviennent sans nul doute des expériences réalisées chez les rongeurs. En particulier les travaux menés par Moreau *et coll.* (Moreau, Lestage *et coll.* 2005) montrent que l'activation aigüe ou chronique du système immunitaire entraîne l'expression de comportements de type « anxiodépressifs ». La mise en place de ces comportements est indépendante de l'apparition du comportement de maladie classique observé au cours d'une infection. Mais leur principale découverte a été de démontrer que l'inhibition de l'enzyme IDO, soit par inhibition directe soit par diminution des processus inflammatoires, contrecarre les effets dépressogènes de l'immunoactivation. Ainsi, ils ont pu mettre en évidence un lien causal entre l'activation du métabolisme de la KYN et l'apparition des comportements de type anxiodépressifs. Cependant, les mécanismes d'action responsables de ce phénomène demeurent encore aujourd'hui inconnus. L'hypothèse la plus vraisemblable est une accumulation des métabolites toxiques de la kynurénine. C'est en tout cas ce que suggèrent les résultats du travail mené par Wichers *et coll.* montrant que les scores obtenus à l'échelle MADRS sont positivement corrélés au rapport KYN/KYNA plasmatique chez des patients devenus dépressifs après traitement à l'IFNγ (Wichers, Koek *et coll.* 2005). Ces données traduisent un hypofonctionnement de la voie neuroprotectrice de la kynurénine, potentiellement impliqué dans l'étiologie des symptômes dépressifs. De plus, une étude clinique a montré que le ratio KYNA/KYN est diminué dans le plasma des patients dépressifs majeurs, renforçant l'hypothèse d'une perturbation de la voie neuroprotectrice au cours de la dépression (Myint, Kim *et coll.* 2006). Cependant, l'élément important mis en évidence par Myint *et coll.* dans ce travail est que ce déséquilibre est rétabli par un traitement antidépresseur chez les patients n'ayant subi qu'un seul épisode dépressif. En effet, chez les patients ayant subi deux épisodes, le traitement, bien qu'ayant amélioré les symptômes, n'a pas rétabli le rapport KYNA/KYN. Ceci suggère que la répétition des troubles inflige un déficit durable de la voie neuroprotectrice de la kynurénine, un peu comme une sorte de « trace » résiduelle des épisodes passés, conduisant à favoriser l'action des composés neurotoxiques de la voie de la kynurénine (QUIN et 3HK).

Des études menées chez le rat convergent vers cette théorie puisque l'immunoactivation engendrée par l'injection périphérique de LPS induit l'expression de la principale enzyme de la voie neurotoxique: la *kynurenine-3-hydroxylase* (qui permet la synthèse de 3HK à partir de la KYN) sans affecter l'expression de l'enzyme favorisant la voie neuroprotectrice – la KAT (Connor, Starr *et coll.* 2008). Les auteurs en concluent que les cytokines proinflammatoires sont capables de détourner le catabolisme de la KYN vers la voie de synthèse des composés neurotoxiques, suggérant que les symptômes dépressifs pourraient être causés, au moins partiellement, par ces mécanismes.

L'ensemble des données présenté dans ce paragraphe amène à s'interroger sur l'implication des métabolites de la kynurénine dans la modulation des états émotionnels. Des travaux de psychopharmacologie mettent en avant un rôle non négligeable des métabolites de la kynurénine dans les états anxieux (Lapin 1981). En effet, il semblerait que KYN, 3HK et QUIN possèdent des propriétés anxiogènes alors que KYNA induirait plutôt des effets anxiolytiques (Lapin 2003). Plus récemment, il a été montré que l'administration périphérique de doses croissantes de KYN augmentait l'expression des comportements de résignation mesuré dans le test de Porsolt et le test de suspension caudale chez la souris (O'Connor, Lawson *et coll.* 2008). Ces résultats soulignent encore plus l'importance de l'équilibre entre les métabolites de la kynurénine qui pourraient non seulement participer à la modulation de l'humeur, chez l'Homme comme chez l'animal, mais aussi aux altérations structurales et fonctionnelles rapportées au cours des troubles dépressifs.

En bref

La sécrétion des glucocorticoïdes et des cytokines pro-inflammatoires est augmentée en réponse au stress et lors des troubles dépressifs. Ainsi, l'utilisation du TRP au sein de la voie KYN s'en trouve augmentée et nous fait nous interroger quant à l'implication exacte de cette voie métabolique dans la physiopathologie de la dépression.

4. Rôle hypothétique de la voie de la kynurénine dans la dépression

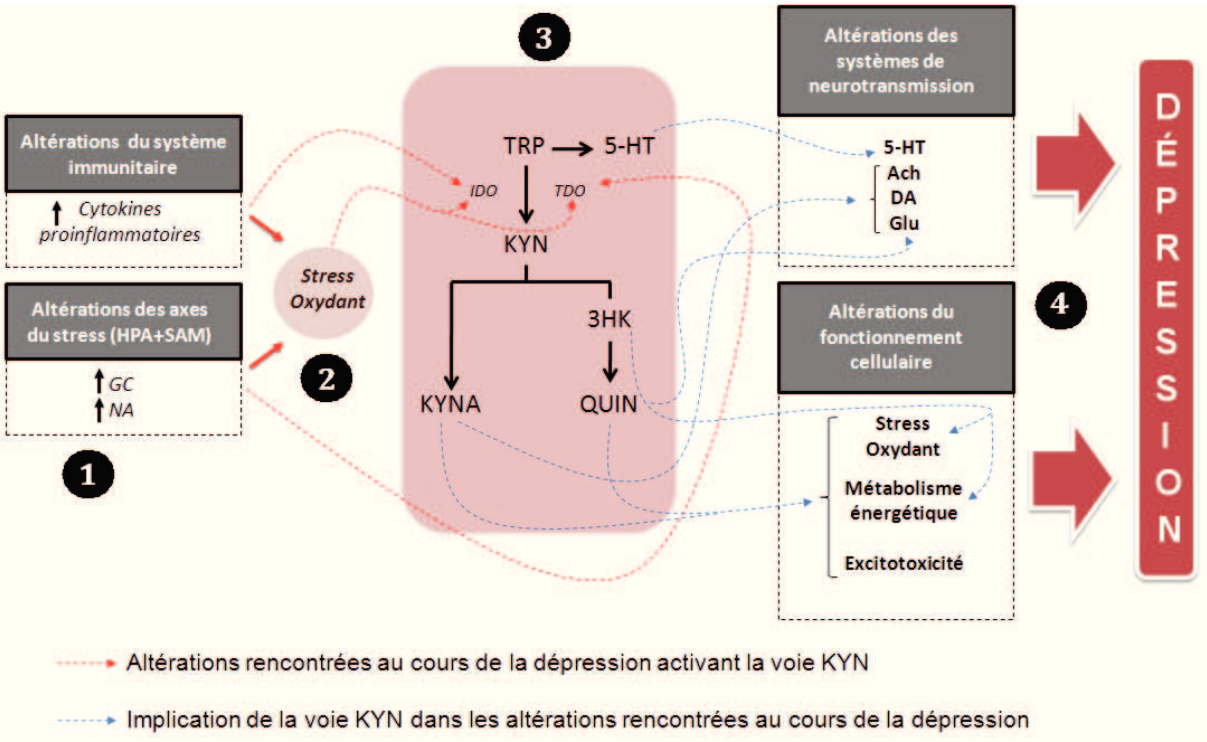
Nous avons vu que les troubles dépressifs sont caractérisés par un certain nombre de modifications physiopathologiques, tant au niveau cérébral que périphérique, faisant intervenir différents systèmes dont les médiateurs sont de nature variée (neurotransmetteurs, hormones, neuropeptides etc.). Une telle complexité ne peut être étudiée que par une approche réductionniste consistant à réduire la nature complexe des choses à une somme de principes fondamentaux, afin de les appréhender plus facilement. C'est pourquoi, en pratique, les mécanismes mis en jeu dans l'étiologie et la physiopathologie de la dépression sont abordés de façon plus ou moins isolée (comme le montrent les différentes hypothèses neurobiologiques de la dépression présentées précédemment), même si une approche multi-niveau tend à se développer de plus en plus. Dans cet esprit, je vais tenter, dans la partie qui suit, d'avoir une approche intégrative permettant non seulement d'unifier l'ensemble des théories précédemment exposées, mais aussi d'intégrer dans ce modèle le métabolisme du TRP et en particulier la voie de la KYN. Ceci me permettra ensuite d'énoncer les objectifs de ce travail de thèse.

Même si la dépression résulte du dysfonctionnement de plusieurs systèmes biologiques, il est important de garder à l'esprit que tous les médiateurs de ces systèmes agissent vraisemblablement

par un mécanisme commun : la modulation du fonctionnement cellulaire, faisant intervenir un certain nombre de processus tels qu'une action au niveau du métabolisme énergétique, une modification des protéines par phosphorylation/déphosphorylation (effets non-génomiques ; court terme), ainsi qu'une modification de l'expression génique (effets génomiques ; moyen terme et long terme). Plusieurs arguments confortent une telle hypothèse étiopathogénique de la dépression. Tout d'abord, la littérature (clinique et préclinique) montre bien qu'un syndrome dépressif peut être engendré par plusieurs mécanismes : une induction pharmacologique par la réserpine par exemple (entraîne une déplétion en monoamines), une augmentation des taux de cytokines pro-inflammatoires (lors d'un traitement à l'IFN par exemple), une déplétion en TRP alimentaire (qui diminue les concentrations cérébrales en 5-HT) ou encore une hausse d'activité de l'axe HPA (modélisée chez l'animal par l'administration chronique de corticostérone). Ceci implique que ces dysfonctionnements, même s'ils sont de nature différente, mobilisent des mécanismes pathogéniques communs sous-tendant la survenue des troubles. À ce titre, le métabolisme du TRP, et en particulier la voie de synthèse de la KYN, pourrait constituer un substratum commun reliant les altérations citées ci-dessus à la modification du fonctionnement cellulaire sous-tendant les altérations rencontrées au cours des troubles dépressifs. En effet, nous avons vu que l'activation de la voie KYN pouvait affecter différents systèmes de neurotransmission (5-HT, DA, Ach et GLU), perturbés dans le cerveau de patients dépressifs, mais qu'elle pouvait aussi participer de façon plus directe à la régulation du fonctionnement cellulaire en générant des métabolites ayant des activités opposées, participant ainsi à la régulation du métabolisme énergétique et au maintient de la balance entre processus anti- *vs*. pro-oxydants. Ainsi, on peut supposer que cette voie métabolique constitue un lien entre la perturbation des systèmes de maintient de l'homéostasie, que sont les axes du stress et le système immunitaire, et les divers dysfonctionnements cellulaires et moléculaires vraisemblablement à l'origine de la symptomatologie dépressive (voir **Fig. 26**).

Cependant, ce modèle demeure très simpliste puisqu'il ne tient pas compte des différents compartiments au sein desquels se déroulent ces altérations, ce qui constitue pourtant un élément essentiel dans la compréhension de cette pathologie et représente un élément d'étude d'un intérêt certain. En effet, la dépression est souvent abordée d'un point de vue « central » c'est-à-dire que les études se concentrent sur les altérations cérébrales, ce qui est compréhensible compte tenu de la nature « psychique » des troubles dépressifs. Cependant, certaines altérations périphériques sont susceptibles de jouer un rôle majeur, même s'il est indirect, dans l'apparition ou l'accroissement des déficits centraux. C'est d'ailleurs vraisemblablement le cas du métabolisme de la KYN, dont l'activation périphérique peut constituer une source non négligeable de composés neurotoxiques : KYN et 3HK, qui passent la BHE et peuvent donc être métabolisés en QUIN dans le cerveau. C'est pourquoi nous nous sommes attachés à mener des analyses sur les deux fronts : à la fois au sein du SNC mais aussi en périphérie.

Fig. 26 : ***Schéma de synthèse reliant le métabolisme du TRP à la physiopathologie dépression.***



1 Le système immunitaire et les axes du stress (axe HPA et SAM) constituent des éléments activateurs de l'utilisation du TRP au sein de la voie KYN, par le biais des GC et des cytokines pro-inflammatoires qui activent les enzymes TDO et IDO respectivement. Le fonctionnement de ces deux systèmes est perturbé chez les patients dépressifs, résultant la plupart du temps (mais pas exclusivement) en la hausse des taux circulants et tissulaires de GC et de cytokines pro-inflammatoires ; **2** L'hyperactivité de ces systèmes s'accompagne souvent de l'augmentation de la production de radicaux libres, source de stress oxydant, mais aussi co-activateurs des enzymes TDO et IDO. **3** Une fois activée la voie KYN synthétise des composés neuroactifs qui vont agir à plusieurs niveaux et pouvoir ainsi moduler/perturber l'activité de systèmes physiologiques tels que des systèmes de neurotransmission, l'équilibre entre les processus pro vs. anti-oxydants, ou encore le métabolisme énrgétique. **4** Il en résulte ainsi une modification du fonctionnement cellulaire par l'intermédiaire de divers mécanismes (altération des lipides, des protéines et de l'ADN ; modification de l'expression génique), vraisemblablement à l'origine de la symptomatologie dépressive.

*****

OBJECTIFS DE LA THÈSE

*****

« La science est l'asymptote de la vérité. Elle approche sans cesse, et ne touche jamais. »
Victor Hugo.

Objectifs généraux

Le rôle de la sérotonine dans la physiopathologie des troubles dépressifs n'est aujourd'hui plus à remettre en question. En effet, plusieurs décennies de travaux ont clairement montré l'implication centrale de ce neurotransmetteur dans la régulation de divers processus physiologiques tels que la modulation de l'humeur ou encore de la réponse de l'organisme face au stress. Cependant, la sérotonine est synthétisée à partir du tryptophane, un acide aminé qui peut également être converti, au sein de la voie de la kynurénine, en divers métabolites capables de modifier le fonctionnement cérébral. De plus en plus d'études mettent en avant un rôle crucial de cette voie alternative à la synthèse de 5-HT dans la physiopathologie des troubles neuropsychiatriques et en particulier des troubles dépressifs. Cependant, plusieurs éléments demeurent inconnus en ce qui concerne les liens entre cette voie métabolique et les altérations bio-comportementales observées chez les patients dépressifs.

Comme nous l'avons vu, la plupart des arguments mettant l'accent sur l'implication du métabolisme de la KYN dans la physiopathologie de la dépression s'appuient sur des données cliniques obtenues à partir de dosages plasmatiques, et depuis peu, de dosages réalisés dans le LCR de patients dépressifs. Cependant, de telles données ne reflètent que très grossièrement ce qui se passe dans les régions du cerveau qui sont impliquées dans l'origine des troubles dépressifs, à savoir les régions du système limbique. En effet, compte tenu des modes d'action par lesquels la voie KYN peut agir, il semble plus pertinent d'étudier ce qui se passe au niveau de structures du système limbique telles que le cortex préfrontal, l'amygdale, l'hippocampe et le striatum qui participent activement à la régulation de l'humeur et des émotions et dont le fonctionnement est altéré chez les patients dépressifs. Pour cela, il est donc nécessaire d'utiliser un modèle animal de dépression. Comme je l'ai décrit précédemment, certains auteurs ont étudié l'implication de cette voie métabolique dans un modèle de dépression induite par une inflammation chronique (infection par le BCG). Un tel modèle semble particulièrement adapté pour étudier les liens entre la voie KYN et les altérations biocomportementales rencontrées chez les patients devenus dépressifs suite à un traitement immunothérapeutique par exemple. Cependant, comme il a été énoncé précédemment, différents types de stresseurs (psychogénique *vs.* biogénique) entraînent des conséquences biochimiques et comportementales qui semblent être spécifiques du facteur de stress. Ainsi, les conséquences d'un stress chronique de type immunologique (biogénique) ne sont pas forcément les mêmes que celles résultant d'un stress chronique de type psychogénique comme c'est le cas avec le modèle UCMS. Par conséquent, le rôle de la voie KYN dans les altérations induites par un stress chronique de type psychogénique n'a encore jamais été exploré.

C'est pourquoi nous nous sommes attachés, en premier lieu, à réaliser une caractérisation des effets de l'UCMS sur le métabolisme de la KYN, pour pouvoir par la suite, utiliser ce modèle afin de comprendre comment le métabolisme de la KYN intervient dans les altérations biochimiques et

comportementales observées au cours de la symptomatologie dépressive. Les objectifs principaux sont présentés ci-dessous.

Objectif 1 : Caractériser les effets biochimiques de l'UCMS sur le métabolisme périphérique et central de la KYN.

Objectif 2 : Étude du lien entre les altérations de la voie KYN induites par l'UCMS et l'expression de comportements de type anxio-dépressifs.

Objectif 3 : Vérifier si un traitement chronique par un antidépresseur (inhibiteur sélectif de la recapture de sérotonine ; fluoxétine) réverse les altérations de la voie KYN induites par l'UCMS.

Objectif 4 : Evaluer les conséquences bio-comportementales d'un traitement chronique avec un inhibiteur de l'IDO et comparer les effets avec ceux d'un traitement chronique à la fluoxétine.

Démarches réflexive et expérimentale

Dans la partie qui suit, je vais détailler la démarche théorique globale qui a guidé les travaux menés tout au long de cette thèse. Je m'arrêterai également sur la justification de certains points de la démarche expérimentale qui a été suivie.

Etant donné que cette thématique de recherche est naissante dans le laboratoire, il nous a d'abord semblé primordial de vérifier si des altérations du métabolisme de la KYN étaient détectables chez des souris UCMS par rapport aux souris contrôles. Pour cela, nous avons, dans un premier temps, confronté des souris au modèle UCMS pendant 6 à 7 semaines afin d'évaluer les conséquences sur le métabolisme de la KYN à la fois au niveau périphérique et au niveau du SNC. Compte tenu des liens mis en évidence en clinique entre l'activation périphérique de la voie KYN et l'intensité des symptômes dépressifs, nous avons voulu vérifier si de telles relations étaient observables chez les souris UCMS. Ensuite, nous avons focalisé notre recherche sur les effets des antidépresseurs de type ISRS sur les altérations induites par l'UCMS, tant au niveau de la voie 5-HT que de la voie KYN, pour ensuite les comparer aux effets d'un inhibiteur de l'enzyme IDO : le 1-methyltryptophane.

Pourquoi le modèle UCMS ?

Comme nous l'avons vu dans l'introduction de ce manuscrit, plusieurs facteurs étiopathogéniques contribuent à la survenue d'un syndrome dépressif. En tant que facteur déclencheur et/ou prédisposant à la dépression, le stress chronique à l'âge adulte constitue l'un de ces facteurs. De plus, de tous les modèles utilisés jusqu'à présent, il est celui qui satisfait un plus grand nombre de critères de validité auquel doit répondre un modèle animal en comparaison avec d'autres modèles (Nestler and Hyman). En effet, il satisfait au critère de validité de construction car il est basé sur l'utilisation d'un

des facteurs étiologiques des troubles dépressifs : l'exposition récurrente à des facteurs de stress. D'autre part, certains comportements induits par ce paradigme peuvent être associés à des symptômes observés chez l'Homme (perte/gain de poids, anhédonie, anxiété, hyperréactivité au stress), lui conférant une bonne validité descriptive. Enfin, le fait qu'un traitement chronique (et non sub-chronique ou aigu) par antidépresseurs reverse certaines altérations bio-comportementales montre qu'il a également une bonne validité prédictive (voir partie I.6 pour une définition des différents critères de validité d'un modèle animal).

De plus, ce modèle semble particulièrement adapté dans le cadre de notre thématique. En effet, il a été montré par plusieurs équipes que ce paradigme entraîne des altérations au niveau de l'axe HPA et du système immunitaire résultant en des niveaux circulants accrus de corticostérone (Ibarguen-Vargas, Surget *et coll.* 2008; Detanico, Piato *et coll.* 2009; Palumbo, Canzobre *et coll.* 2010) et de cytokines proinflammatoires (Li, Wang *et coll.* 2008; Palumbo, Canzobre *et coll.* 2010). L'utilisation du TRP au sein de la voie KYN étant augmentée par les GC ainsi que par les cytokines proinflammatoires (voir partie III.3.B), l'utilisation d'un tel modèle semble alors particulièrement pertinente.

Pourquoi évaluer le métabolisme de la KYN en périphérie et dans le SNC ?

La majeure partie de la synthèse de KYN a lieu en périphérie. Cependant, certains composés de cette voie (tels que KYN et 3HK) peuvent modifier l'apport cérébral en TRP car ils entrent en compétition avec ce dernier au niveau du transporteur LAT1 (Fukui, Schwarcz *et coll.* 1991). Compte tenu de cette propriété, il est possible que l'activation de la voie KYN périphérique soit responsable d'une diminution de l'apport en TRP cérébral, nécessaire à la synthèse de 5-HT. Il paraissait donc important de vérifier si une éventuelle activation périphérique de la voie KYN était liée à une diminution des taux cérébraux en 5-HT. D'autant plus que cet argument est largement utilisé dans la littérature pour mettre en avant le lien entre troubles neuropsychiatriques et voie KYN.

D'autre part, en tant que précurseur métabolique de différentes substances neuroactives, la KYN périphérique peut tout à fait, après avoir été transportée dans le parenchyme cérébral, être utilisée localement et constituer ainsi une importante source de composés capables de modifier le fonctionnement cérébral. De plus, une telle approche, que l'on peut qualifier de « systémique », parait pertinente compte tenu des nombreux travaux suggérant un lien étroit entre troubles dépressifs et dysfonctionnement périphérique (par exemple au niveau du système cardio-vasculaire ou encore au niveau des cellules du système immunitaire).

Pourquoi évaluer le métabolisme de la 5-HT dans le SNC ?

Comme il est mentionné ci-dessus, le métabolisme de la KYN peut affecter la synthèse de 5-HT cérébrale. Or, dans le SNC, le système sérotoninergique joue un rôle particulièrement important dans la modulation de plusieurs fonctions physiologiques (humeur, agressivité, veille/sommeil etc.). Des altérations des taux cérébraux de 5-HT ont été notées après plusieurs semaines de stress chronique

chez la souris (Vancassel, Leman *et coll.* 2008; Yalcin, Coubard *et coll.* 2008). La voie KYN étant liée à la voie de synthèse de la 5-HT, il pourrait alors être intéressant de vérifier si ces altérations peuvent être reliées à des altérations du métabolisme de la KYN.

Traitement statistique des données : effet groupe ou approche corrélationnelle ?

En biologie, les approches les plus classiques renvoient à des méthodes considérant que les variations ne sont que des erreurs autour de la moyenne. Elles sont par conséquent basées sur les calculs de caractéristiques d'un individu « moyen ». Hors, de plus en plus de données remettent en question ce genre d'approche. En effet, ce n'est pas l'individu « moyen » qui développe telle ou telle pathologie mais plutôt un groupe d'individus spécifiques se trouvant dans un environnement spécifique. En témoignent, chez l'Homme, les études montrant que certaines altérations neurobiologiques ne sont rencontrées que chez certaines sous-catégories de patients [ex : seuls les individus dépressifs décrits comme « impulsifs » présentent des taux de 5-HIAA diminués (plasma et CSF) par rapport aux individus « non-impulsifs » et aux individus « contrôles » (Spreux-Varoquaux, Alvarez *et coll.* 2001)]. Ainsi, la diminution du métabolisme sérotoninergique serait plus une caractéristique liée à une sous-catégorie de patients dépressifs plutôt qu'un trait commun à tous les patients. Toujours dans le même esprit, les nombreuses études menées par l'équipe de Jaap Koolhaas, centrées sur les différents styles de *coping*, illustrent très bien l'intérêt d'avoir une approche de type corrélationnelle [voir pour revue (Koolhaas, de Boer *et coll.* 2010)].

C'est pourquoi nous avons décidé de ne pas réduire notre démarche d'analyse des données à une approche de type « effet-groupe » mais plutôt de la compléter par une analyse corrélationnelle prenant en compte la réalité du monde, c'est-à-dire la variation naturelle entre individus. Cette double approche permet ainsi, non seulement une analyse plus poussée des données, mais aussi d'aboutir à des conclusions qui auraient été « invisibles » par une approche utilisant un individu moyen. Plusieurs résultats obtenus lors ce travail de thèse illustrent d'ailleurs très bien l'utilité d'une analyse « individuelle ».

*****

RÉSULTATS ET DISCUSSIONS INTERMÉDIARES

*****

« Une chose qui convainc n'est pas vraie pour autant. Elle est seulement convaincante. »
Friedrich Nietzsche.

I. LA VOIE DE LA KYNURÉNINE EST-ELLE AFFECTÉE PAR L'UCMS ?

1. Introduction de l'étude

Des altérations du métabolisme du TRP au sein de la voie de la KYN ont été mises en évidence à plusieurs reprises chez des patients présentant un syndrome dépressif (voir introduction), et semblent jouer un rôle central dans la physiopathologie des troubles dépressifs. Une meilleure compréhension de l'implication de ces changements métaboliques dans l'étiologie de la dépression nécessite d'étudier plus précisément les liens existant entre ces changements et les anomalies neurobiologiques et comportementales observées chez les dépressifs. Pour cela, l'utilisation de modèles animaux paraît indispensable. Même si certaines avancées ont été réalisées à l'aide de modèles basés sur l'induction d'un état inflammatoire chronique, rien n'est connu quant aux effets de l'exposition au stress psychosocial qui est pourtant une des causes principales de l'apparition d'un syndrome dépressif.

Le modèle UCMS, étant basé sur l'exposition chronique et imprédictible à des stresseurs de type socio-environnementaux, constitue un modèle de choix pour étudier l'étiopathogénie de cette maladie. Dans ce premier travail, nous avons donc voulu étudier les conséquences de l'UCMS sur l'utilisation du TRP au sein de la voie KYN. Pour cela, nous nous sommes focalisés sur une approche purement biochimique nous permettant de répondre à plusieurs interrogations concernant les effets de l'UCMS sur le métabolisme de la KYN. Nous avons pu montrer que l'UCMS : (1) augmente l'utilisation du TRP au sein de la voie KYN en périphérie mais pas dans le SNC, (2) que l'activation périphérique de la voie KYN n'induit pas de déplétion en TRP ni de perturbation des taux de 5-HT/5-HIAA dans le SNC, (3) qu'il entraîne une accumulation de composés toxiques (3HK) dans les tissus périphériques, (4) qu'il induit un déséquilibre structure-dépendant du métabolisme de la KYN dans le SNC : la synthèse de 3HK étant favorisée dans l'amygdale et le striatum alors que l'inverse se produit dans le cortex cingulaire. (5) De plus, nous avons aussi mis en évidence une corrélation inverse très robuste entre le taux de 5-HT et le taux de KYN dans les 4 structures étudiées.

Tous ces aspects seront discutés de façon plus détaillée dans la partie « Discussion » ci-après.

ARTICLE 1 :

PERIPHERAL AND CEREBRAL METABOLIC ABNORMALITIES OF THE TRYPTOPHAN-KYNURENINE PATHWAY IN A MURINE MODEL OF MAJOR DEPRESSION

Anthony Laugeray, Jean-Marie Launay, Jacques Callebert, Alexandre Surget, Catherine Belzung, Pascal R Barone.

Behavioural Brain Research, Février 2010.

Behavioural Brain Research 210 (2010) 84–91

Contents lists available at ScienceDirect

Behavioural Brain Research

journal homepage: www.elsevier.com/locate/bbr

Research report

Peripheral and cerebral metabolic abnormalities of the tryptophan–kynurenine pathway in a murine model of major depression

Anthony Laugeray[a,*], Jean-Marie Launay[c], Jacques Callebert[c], Alexandre Surget[a], Catherine Belzung[a], Pascal R. Barone[b]

[a] UMRS INSERM U930, CNRS ERL 3106, Université François Rabelais, Tours, France
[b] Département des Sciences du Comportement, Université François Rabelais, Tours, France
[c] Service de Biochimie, Hôpital Lariboisière, CR Claude Bernard, IFR6, Assistance Publique, Hôpitaux de Paris, Paris, France

ARTICLE INFO

Article history:
Received 1 December 2009
Received in revised form 2 February 2010
Accepted 5 February 2010
Available online 12 February 2010

Keywords:
Major depression
Unpredictable chronic mild stress
Tryptophan
Kynurenine
Quinolinic acid
Kynurenic acid
Mice

ABSTRACT

Occurring both peripherally and centrally, the kynurenine pathway (KP) – an alternative pathway to 5-HT synthesis from tryptophan (TRP) – could be of particular value to better understand the link between peripheral changes of circulating levels of glucocorticoids (GC)/proinflammatory cytokines and altered neurotransmission observed in depressed patients. Indeed, it is activated by these mediators of stress and can produce several neuroactive compounds like quinolinic acid (QUIN) and kynurenic acid (KYNA) that can respectively increase and decrease glutamate concentration in brain. In order to characterize the role of both the peripheral and cerebral KP in the pathophysiology of depressive disorders, we used the Unpredictable Chronic Mild Stress (UCMS) to induce a depressive-like syndrome and we then measured the level of relevant TRP-KYN pathway metabolites: KYN, 3-hydroxykynurenine (3HK; precursor of QUIN) and KYNA. We also measured TRP-5HT pathway metabolites: TRP, 5-HT, 5-HIAA. We showed that UCMS increased TRP catabolism along the KP in the periphery. 5-HT and KYN were found to be strongly negatively correlated in all brain structures of control mice and of UCMS mice except in the hippocampus. More importantly we found that KYN was preferentially metabolized along the QUIN pathway at the subcortical level (amygdala/striatum) whereas, at the cortical level (cingulate cortex), the QUIN pathway was reduced. Considering the role of these metabolites on the glutamatergic neurotransmission, we propose that such KP alterations could participate to the cortical/subcortical glutamatergic alterations reported in depressed patients.

© 2010 Elsevier B.V. All rights reserved.

1. Introduction

The amino acid tryptophan (TRP) is metabolized mainly through two metabolic routes: serotonin (5-HT) and kynurenine (KYN) pathways. Much attention has recently been focused on the role of the kynurenine pathway (KP) in the pathophysiology of depressive disorders. Indeed, since several years, a KP up-regulation has increasingly often been reported in patients suffering from various types of depressive disorders such as major depression [39], bipolar disorders [35], major/minor depressive states related to immunotherapeutic treatments [8], pre- and post-partum depression [27,33], cardiovascular disease-related depression [46]. Such patients not only presented increased levels of KYN in plasma but also reduced levels of TRP leading to a raised KYN/TRP ratio. Interestingly, this phenomenon has been found to be positively correlated with the intensity of depressive symptoms [33]. The KP occurs both peripherally and centrally and is engaged by two enzymes: tryptophan-2,3-dioxygenase (TDO; EC 1.13.11.11) and indoleamine-2,3-dioxygenase (IDO; EC 1.13.11.52), which differ in their tissue localization and regulation [11]. TDO is predominantly expressed in the liver and constitutes the major source of KYN in non-inflammatory conditions. It is activated by glucocorticoids (GC) [10]. IDO is present both in brain (neurons, glial cells) and peripheral tissues (lung, spleen etc.) [21] and is stimulated by proinflammatory cytokines [7].

Abbreviations: UCMS, unpredictable chronic mild stress; TRP, tryptophan; KYN, kynurenine; 5-HT, serotonin; 5-HIAA, 5-hydroxyindoleacetic acid; KP, kynurenine pathway; 3HK, 3-hydroxykynurenine; QUIN, quinolinic acid; ANA, anthranilic acid; 3-HANA, 3-hydroxyanthranilic acid; 5-HANA, 5-hydroxyanthranilic acid; PIC, picolinic acid; KYNA, kynurenic acid; IDO, indoleamine-2,3-dioxygenase; TDO, tryptophan-2,3-dioxygenase; IFN, interferon; IL, interleukin; TNF, tumor necrosis factor; NMDA, N-methyl-D-aspartate; CC, cingulate cortex; HIPPO, hippocampus; AMY, amygdala; STR, striatum; MDD, major depressive disorder; DNA, deoxyribonucleic acid; CNS, central nervous system; HPLC, high performance liquid chromatography.

* Corresponding author at: INSERM U930, Bat O, Faculté des Sciences et Techniques, Parc Grandmont, 37200 Tours, France. Tel.: +33 02 47 36 69 99; fax: +33 02 47 36 72 85.
E-mail addresses: anthony.laugeray@etu.univ-tours.fr, alaugeray@yahoo.fr (A. Laugeray).

0166-4328/$ – see front matter © 2010 Elsevier B.V. All rights reserved.
doi:10.1016/j.bbr.2010.02.014

High levels of circulating GC and proinflammatory cytokines are two common features of depressive disorders [6,34], that is why it was postulated that the activation of the peripheral KP through TDO/IDO could be of importance in precipitating depressive symptoms by depleting plasma TRP and then inducing serotonin-depletion-related disorders such as depression [38,28]. But this hypothesis has never been clearly demonstrated. It has also been assumed that depressive features might likely be related to the couple of downstream neuroactive compounds further produced along the KP. Among these, the N-methyl-D-aspartate (NMDA) agonist quinolinic acid (QUIN) has been shown to enhance synaptosomal glutamate release and to inhibit the glutamate uptake into astrocytes, resulting in an increased glutamate concentration into the synaptic cleft and at the perisynaptic level [47]. On the contrary, kynurenic acid (KYNA) has been shown to significantly decrease extracellular glutamate levels in rat brain through its antagonist activity on alpha7 nicotinic acetylcholine receptors (α7AChR) [51]. The QUIN pathway can subsequently be seen as a pro-glutamatergic metabolic route whereas the KYNA pathway can exert an anti-glutamatergic effect. Given that alterations of the glutamatergic neurotransmission have been reported in the brain of depressed patients [43,22,23], it has subsequently been proposed that cerebral changes in the balance between these pathways could be implicated in such pathological processes by locally modifying neurotransmission or even by inducing neurotoxic processes [30]. In line with this are the clinical studies showing a reduced activity of the KYNA pathway in depressed patients [39,48], contributing to the recently proposed "neurodegenerative theory of depression" [30]. However, the above data were obtained from patient's blood which is probably far from what happens into the brain and, consequently does not inform about intracerebral concentrations. Given that human brain investigation is very restricted, we explored the role of the KP in corticolimbic structures involved in the regulation of emotions and mood by using an animal model of depressive syndrome: the Unpredictable Chronic Mild Stress (UCMS). UCMS is an informative model to study depression in animals [49], as it mimics the role of socio-environmental stressors in precipitating a depressive-like pathology [44]. It has been shown that the murine model satisfied several criteria for a valid model of depression [45]. In addition it has often been reported that chronic stress procedure promoted a rise in circulating GC [24] and of proinflammatory cytokines [5], two pathomechanisms of interest regarding KP activation.

In respect of the above data, the aim of this study was first to verify if UCMS promoted an accelerated catabolism of TRP along the KP in the periphery by measuring *postmortem* peripheral levels of TRP, KYN and KYN/TRP ratio. We then checked the cerebral consequences on the 5-HT metabolism by examining 5-HT and 5-HIAA contents in the following corticolimbic structures: cingulate cortex (CC), hippocampus (HIPPO), amygdala (AMY) and striatum (STR). Finally, we verified if UCMS might promote local alterations of the balance between the QUIN and KYNA pathways by measuring the cerebral level of KYNA and 3HK, the two first metabolites of each route.

2. Materials and methods

2.1. Animals

Male BALB/c mice aged of 2 months at onset of the UCMS exposure were purchased from Centre d'Elevage Janvier (Le Genest Saint Isle, France). Animals were group-housed ($n = 5$ per cage) until the beginning of the UCMS regimen and maintained under standard laboratory conditions (12/12 h light–dark cycle on at 11:00 h/off at 23:00 h, 22 ± 1 °C, food and water *ad libitum*). All animal care and treatment were in accordance with the European Community Council directive 86/609/EEC.

2.2. Unpredictable chronic mild stress

The stress regimen was previously described [45] and is a variant of the chronic mild stress procedure described by Willner in rat [50]. Mice were repeatedly subjected to various socio-environmental stressors according to a "random" schedule for a total period of 6 weeks (Fig. 1A). UCMS-exposed mice were maintained under standard laboratory conditions but were isolated in small individual cages (24 cm × 11 cm × 12 cm) while non-stressed control mice were reared (four by cage) in larger laboratory cages (42 cm × 28 cm × 18 cm). The stressors were: altered bedding (sawdust change, removal of sawdust, damp sawdust, substitution of sawdust with 21 °C water, rat feces); cage tilting (45°); cage exchange (mice were positioned in the empty cage of another male); altered length and time of light/dark cycle, forced swimming.

2.3. Coat state and body weight

Body weight and fur coat state were assessed weekly, as markers of the progression of the UCMS-evoked syndrome. The total score of the coat state resulted from the sum of scores obtained from five different body parts: head, neck, dorsal coat, ventral coat, and hindpaws. For each body area, a score of 0 was given for a well-groomed coat and 1 for an unkempt coat. Thus the more elevated is the total score the nastier is the fur. Dirty state is characterized by fluffy, greasy, less dense coat or piloerection. Both of these physical parameters have been pharmacologically validated [13,17,44,45].

2.4. Tissue sampling

2.4.1. Brain tissues

Brain structures were collected 3 days after the end of the stress procedure and were microdissected by a single investigator. Brains were rapidly removed from CO_2-killed mice and placed in ice-cold slurry of 0.9% NaCl. Rostro-caudal sections (2 mm) were quickly obtained on a brain tissue blocker. Four consecutive sections from Bregma +2.4 to −3.1 were then microdissected [41]. CC was dissected from the first two sections and included prelimbic and cingulate cortices. Dorsal and ventral parts of the STR were obtained from the second slice. AMY was obtained from the third section and HIPPO from the third and the fourth sections (Fig. 1B). All samples were immediately frozen and stored at −80 °C.

2.4.2. Peripheral tissues

Lungs were removed just after the brain was extracted from the mice skull and immediately frozen and stored at −80 °C. This tissue was chosen because of its high level of IDO expression [4,37].

2.4.3. HPLC measurements of TRP metabolites

TRP, 5-HT and 5-HIAA were measured using HPLC, as described by Kema et al. [26]. Metabolites of the kynurenine pathway: KYN, KYNA and 3HK were measured using HPLC, as described by Fujigaki et al. [15]. Absolute concentrations of each metabolic intermediate were normalized to pmol/mg using wet tissue masses for each extracted sample and were then compared among UCMS and control animals. Physiologically appropriate ratios of intermediate pairs were calculated using normalized pmol/mg data. This resulted in a series of transformation ratios that can be used to estimate the activity of transformation of a precursor compound to a product [52,37]. The use of transformation ratios helps give a more extensive description of the physiological processes occurring in each metabolic pathway.

2.5. Statistics

2.5.1. Group comparisons

All data were analyzed using non-parametric procedures, especially adapted to the statistical analysis of small samples ($n < 30$). Independent two-group comparisons were analyzed with the Mann–Whitney test. As significance test only gives the probability of obtaining the observed effect and not how large the effect is, we decided to report estimates of effect sizes using a robust index: the probability of superiority (PS), also called "probabilistic index" or "measure of stochastic superiority" [1,12,19,29]. Briefly, PS is the probability that a randomly sampled score from one population is larger than a randomly sampled score from another population. It is calculated as follows: $PS = U/mn$, where U is the Mann–Whitney U statistic, m is the number of individuals in the first sample, and n is the number of individuals in the second sample. PS values, ranging from 0.5 to 1, allow putting in evidence a small effect (from 0.5 to 0.64), a medium effect (from 0.65 to 0.71) or a large effect (from 0.72 to 1) [19]. An effect was considered significant when (1) $p < 0.05$ and (2) $PS > 0.64$. Spearman's rank correlations were calculated to describe associations between metabolites of interest. All data were analyzed with Statistica 6.1 software.

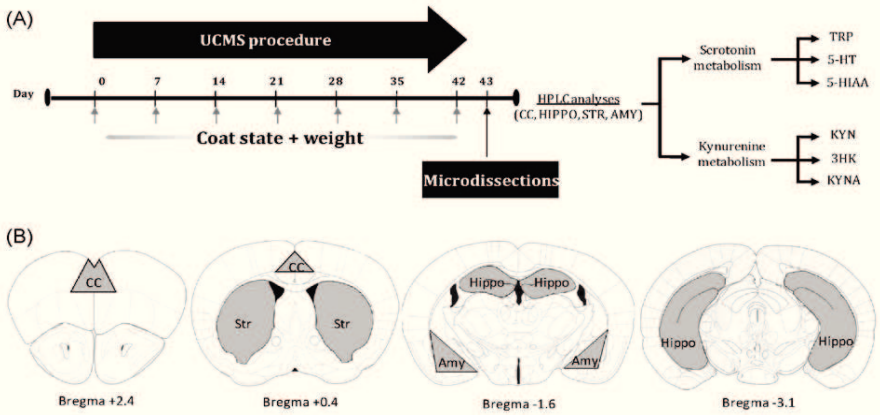


Fig. 1. Experimental design. (A) 29 mice were separated into two groups: the UCMS "S" group ($n = 14$) and the non-stressed "NS" group ($n = 15$). The unpredictable chronic mild stress (UCMS) regimen lasted 6 weeks. Each week, the coat state was evaluated and the body weight was measured. Cingulate cortex (CC), striatum (STR), amygdala (AMY) and hippocampus (HIPPO) were collected from all the mice for HPLC analysis, three days after the end of UCMS. (B) Representative figures of the brain regions dissected (see Section 2). Figures are adapted from Paxinos and Franklin (2001).

3. Results

3.1. Efficiency of UCMS in inducing a depressive-like syndrome

The body weight gain and fur coat state were assessed during 6 weeks (Fig. 2) only as bio-behavioral markers of the progression of the UCMS-evoked syndrome. UCMS led to a significant deterioration of coat state from week 1 to week 6 as demonstrated by an increased coat state score: $p < 0.001$; PS = 0.8 (large effect) for the first week $p < 0.001$; PS = 0.9 (large effect) for the sixth week. In addition, UCMS mice showed a reduction of the body weight gain at week 5 and 6 compared to control mice: $p < 0.05$; PS = 0.7 (medium effect) for the fifth week and $p < 0.05$; PS = 0.73 (large effect) for the sixth week.

3.2. UCMS effects on the peripheral KP

UCMS did not modify the concentration of TRP (Table 1) and KYNA (Table 2) in LUNG. On the contrary, the content of KYN, KYN/TRP (Table 1) and 3HK (Table 2) were significantly raised compared to control mice (respectively $p < 0.05$; PS = 0.7 – medium effect; $p < 0.05$; PS = 0.73 – large effect; $p < 0.05$; PS = 0.69 – medium effect).

3.3. UCMS effects on cerebral levels of TRP, KYN and 5-HT

As shown in Table 1, UCMS significantly reduced the levels TRP in HIPPO ($p < 0.05$; PS = 0.72 – large effect) and STR ($p < 0.05$; PS = 0.74 – large effect) while no differences were observed in AMY and CC. 5-HT, 5-HT/TRP, 5-HIAA, 5-HIAA/5-HT, KYN and KYN/TRP were not different between control and UCMS mice in any structures.

3.4. Assessment of the balance between cerebral KYN and 5-HT pathways

In control mice, the Spearman's correlation test revealed highly significant relationships between 5-HT and KYN contents in the brain. The results are depicted in Fig. 3. It is shown that 5-HT is inversely correlated with KYN in AMY ($r = -0.98$; $p < 10^{-6}$), HIPPO ($r = -0.87$; $p < 10^{-6}$), STR ($r = -0.99$; $p < 10^{-6}$), and CC ($r = -0.97$; $p < 10^{-6}$). Similarly, in UCMS mice, both compounds were negatively correlated with one to another in AMY ($r = -0.99$; $p < 10^{-6}$), the STR ($r = -0.97$; $p < 10^{-6}$), and CC ($r = -0.94$; $p < 10^{-6}$), but not in HIPPO ($r = -0.43$; $p = 0.12$) (Fig. 3).

3.5. UCMS effects on the cerebral KP

How KYN metabolism along QUIN and KYNA pathways is affected by UCMS can be appreciated in Table 2.

KYNA branch: Disturbances in KYNA branch was observed in AMY ($p < 0.01$; PS = 0.78 – large effect) and in STR ($p < 0.05$; PS = 0.69 – medium effect) where UCMS decreased its absolute concentration without significantly changing the KYNA/KYN ratio. No effect was observed in other structures.

QUIN branch: UCMS effect was more pronounced on the constitutive compounds of the QUIN branch as reflected by the significant decrease of 3HK ($p < 0.05$; PS = 0.77 – large effect) and the 3HK/KYN

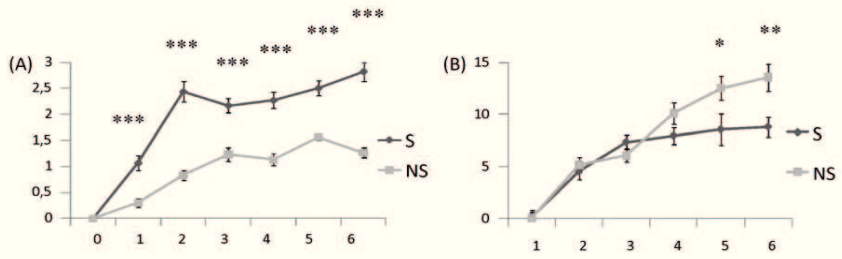


Fig. 2. UCMS-induced changes in physical state (A) and body weight (B). (A) The evaluation of the coat state during each week of unpredictable chronic mild stress (UCMS) revealed a significant degradation of the coat state, from week 1 to week 6, in stressed "S" mice ($n = 14$) in comparison to non-stressed "NS" mice ($n = 15$). (B) A significant reduction of the body weight gain from the fifth week of UCMS is observed in UCMS-exposed mice. $^{*}p < 0.05$; $^{**}p < 0.01$ and $^{***}p < 0.001$. Data represent the median ± the semi-interquartile range (SIQR).

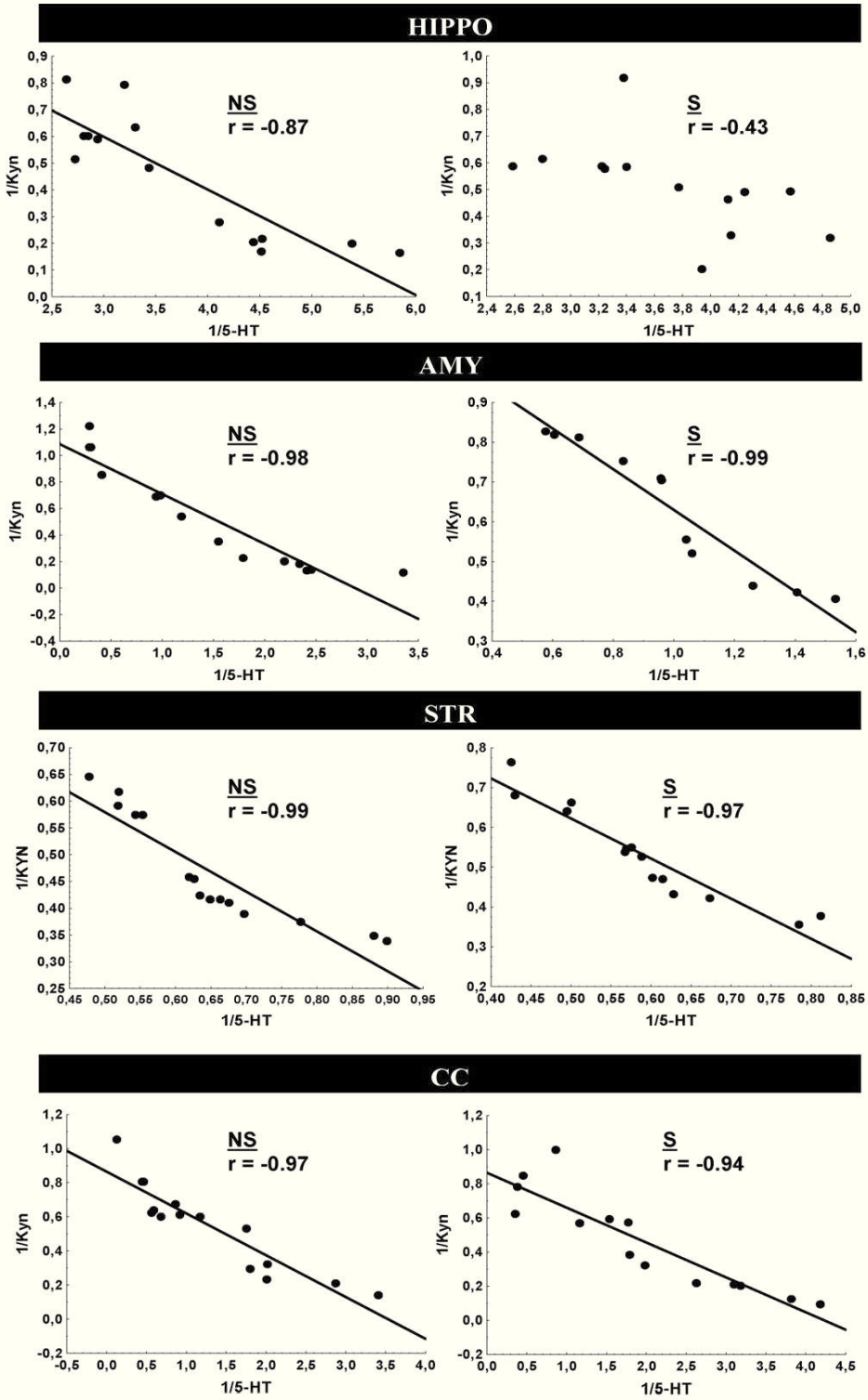
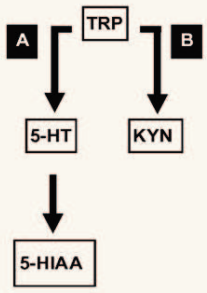


Fig. 3. Correlations between 5-HT and KYN in non-stressed (NS) and UCMS mice (S); Spearman's correlation coefficients were determined for each tissue (periphery: LUNG and brain: HIPPO = hippocampus; CC = cingulate cortex; AMY = amygdala, STR = striatum) in each experimental condition (control vs UCMS mice). Data are represented in a transformed mode: 1/5-HT on *x*-axis vs 1/KYN on *y*-axis.

Table 1
UCMS effect on kynurenine (KYN)–serotonin (5HT) routes of tryptophan (TRP) metabolism.

		HIPPO			CC			AMY		
		NS	S	UCMS effect	NS	S	UCMS effect	NS	S	UCMS effect
	TRP	**13.56 ± 1.4**	**11.02 ± 0.002 ***	↓	55.8 ± 18.6	41.5 ± 11.9	-	35.4 ± 9.71	39.1 ± 11.6	-
A	5-HT	0.29 ± 0.06	0.26 ± 0.03	-	1.09 ± 0.6	0.56 ± 0.37	-	0.74 ± 0.82	0.95 ± 0.25	-
	5-HT/TRP	0.017 ± 0.005	0.023 ± 0.002	-	0.02 ± 0.006	0.017 ± 0.007	-	0.025 ± 0.017	0.025 ± 0.004	-
	5-HIAA	0.82 ± 0,13	0.78 ± 0,15	-	2.22 ± 1.32	1.84 ± 0.72	-	1.81 ± 0.83	2.2 ± 1.05	-
	5-HIAA/5-HT	3.39 ± 1	2.6 ± 0,09	-	1.92 ± 1.82	2.74 ± 0.48	-	2.1 ± 1.51	2.1 ± 0.75	-
B	KYN	2.07 ± 1,66	1.85 ± 0,22	-	1.66 ± 0.86	2.17 ± 1.56	-	2.35 ± 2.08	1.9 ± 0.5	-
	KYN/TRP	0.17 ± 0,1	0.17 ± 0,04	-	0.032 ± 0.042	0.067 ± 0.047	-	0.78 ± 0.053	0.049 ± 0.036	-

		STR			LUNG		
		NS	S	UCMS effect	NS	S	UCMS effect
	TRP	**23.1 ± 2.6**	**21.7 ± 1.9 ***	↓	69.8 ± 3.1	68.9 ± 8.2	-
A	5-HT	1.58 ± 0.18	1.72 ± 0.08	-	0.56 ± 0.10	0.58 ± 0.18	-
	5-HT/TRP	0.069 ± 0.01	0.076 ± 0.01	-	0.0091 ± 0.002	0.0088 ± 0.02	-
	5-HIAA	2.09 + 1.42	1.63 + 0.68	-	1.69 + 0.07	1.73 + 0.31	-
	5-HIAA/5-HT	1.62 + 1.06	0.91 + 0.36	-	2.79 + 0.43	3.11 + 1.06	-
B	KYN	2.36 ± 0.37	1.88 ± 0.32	-	**2.58 ± 1.12**	**3.92 ± 1.06 ***	↑
	KYN/TRP	0.09 ± 0.017	0.1 ± 0.01	-	**0.037 ± 0.016**	**0.065 ± 0.026 ***	↑

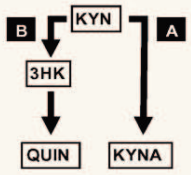


Data are the median ± SIQR (semi-interquartile range). All reported values are expressed in pmol/mg tissue weight. To make the table clearer we have dissected the results of both pathways of TRP metabolism: "A" corresponds to 5-HT branch and "B" to the KYN branch as represented in the figure. HIPPO = Hippocampus; CC = cingulate cortex; AMY = amygdala, STR = striatum and LUNG = lungs. Black arrows indicate the effect of UCMS on each parameter. "NS" = Non-stressed group ($n = 15$) and "S" = stressed group ($n = 14$). Values in bold indicate a significant effect of UCMS: $^{*}p < 0.05$.

Table 2
UCMS effect on KYNA and QUIN routes of the kynurenine pathway.

		HIPPO			CC			AMY		
		NS	S	UCMS effect	NS	S	UCMS effect	NS	S	UCMS effect
A	KYNA	0.90 ± 0.54	1.09 ± 0.24	-	0.90 ± 0.35	1.06 ± 0.40	-	**1.20 ± 0.48**	**0.81 ± 0.12 ****	↓
	KYNA/KYN	0.29 ± 0.20	0.55 ± 0.12	-	0.27 ± 0.14	0.29 ± 0.25	-	0.60 ± 0.38	0.44 ± 0.18	-
B	3HK	0.051 ± 0.037	0.057 ± 0.047	-	**0.073 ± 0.029**	**0.045 ± 0.021 ***	↓	**0.048 ± 0.005**	**0.058 ± 0.012 ***	↑
	3HK/KYN	0.018 ± 0.014	0.029 ± 0.017	-	**0.038 ± 0.026**	**0.021 ± 0.011 ***	↓	0.022 ± 0.014	0.031 ± 0.013	-

		STR			LUNG		
		NS	S	UCMS effect	NS	S	UCMS effect
A	KYNA	**0.90 ± 0.18**	**0.69 ± 0.11***	↓	16.6 ± 2.4	26 ± 16	-
	KYNA/KYN	0.37 ± 0.05	0.33 ± 0.12	-	5.46 ± 1.53	5.10 ± 1.81	-
B	3HK	**0.084 ± 0.022**	**0.121 ± 0.016 ***	↑	**0.036 ± 0.011**	**0.072 ± 0.011 ***	↑
	3HK/KYN	**0.037 ± 0.009**	**0.057 ± 0.010 *****	↑	0.017 ± 0.006	0.019 ± 0.005	-



Data are the median ± SIQR (semi-interquartile range). All reported values are expressed in pmol/mg tissue weight. To make the table clearer we have dissected the results of both pathways of KYN metabolism: "A" corresponds to the KYNA branch and "B" corresponds to the QUIN branch as shown in the above figure. HIPPO = Hippocampus; CC = cingulate cortex; AMY = amygdala, STR = striatum and LUNG = lungs. Black arrows indicate the effect of UCMS on each parameter. "NS" = Non-stressed group ($n = 15$) and "S" = stressed group ($n = 14$). Values in bold indicate a significant effect of UCMS: $^{*}p < 0.05$; $^{**}p < 0.01$; $^{***}p < 0.005$.

ratio ($p < 0.05$; PS = 0.74 – large effect) in CC, whereas in AMY and STR, 3HK was significantly raised (respectively $p < 0.05$; PS = 0.71 – medium effect and $p < 0.05$; PS = 0.72 – large effect; $p < 0.05$). In addition, the 3HK/KYN ratio was significantly increased in STR of UCMS animals ($p < 0.005$; PS = 0.82 – large effect). No changes were observed in HIPPO.

3.6. Assessment of the balance between cerebral QUIN and KYNA pathways

To investigate the balance between QUIN and KYNA pathways, we performed the correlation analysis with KYNA and 3HK that are the first metabolites of each route. In control mice, the Spearman's correlation test showed no correlation between these compounds neither in HIPPO ($r = -0.01$; $p = 0.96$), AMY ($r = 0.29$; $p = 0.33$), STR ($r = -0.47$; $p = 0.08$) nor in CC ($r = -0.19$; $p = 0.49$). The same results were observed in UCMS mice: HIPPO ($r = 0.47$; $p = 0.09$), AMY ($r = -0.04$; $p = 0.89$), STR ($r = 0.21$; $p = 0.49$), CC ($r = -0.03$; $p = 0.91$).

4. Discussion

In this study we examined how TRP/KYN metabolism is altered in UCMS induced-depressive-like syndrome in mice [36,44]. In agreement with previous works [2,13,17,24,36,44,53], we observed that UCMS produces bio-behavioural alterations indicative of an established UCMS-evoked syndrome.

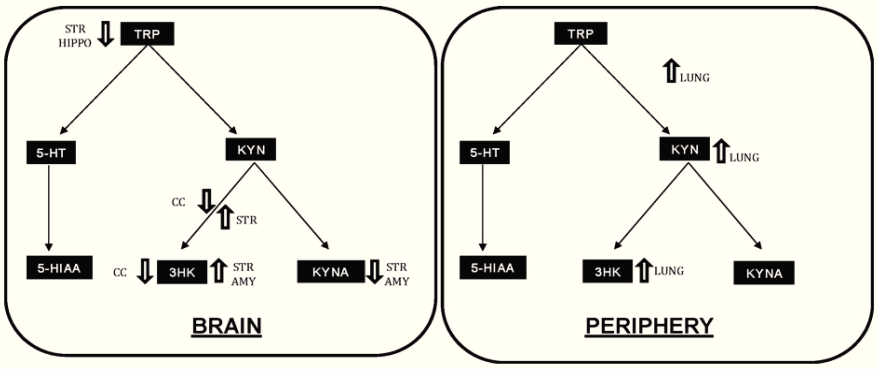


Fig. 4. Peripheral and brain kynurenine pathway (KP) abnormalities induced by UCMS in mice. Arrows indicate the direction of the UCMS effect in corresponding structures. UCMS induced an accelerated use of TRP along the KP in the periphery (LUNG). However, brain KYN metabolism is strongly affected by UCMS, in a region-dependent manner: KYNA pathway being favoured in CC but decreased in AMY and STR. No changes are observed in the HIPPO.

We showed that in UCMS mice, KP is increased in the periphery. This finding is in agreement with clinical studies showing that the KP is up-regulated in the blood of depressed patients [39] and with preclinical studies reporting a rise in the peripheral KP activity in mice chronically confronted to a biogenic stressor [37]. Our result provides the first evidence that a recurrent exposure to psychosocial challenges activates the KP.

Since TDO and IDO are respectively activated by corticosterone [10] and proinflammatory cytokines [7] and their concentrations being raised by UCMS [18,24], an increased KP activity in UCMS mice is not so surprising. Therefore, we were wondering about the respective contribution of these enzymes in this activation. TDO, being not expressed in lung and immune cells, our first conclusion was that KP activation was due to an elevated IDO activity (IDO being widely expressed in pulmonary immune cells). However, mice having not being blood-perfused, the blood-derived contents of TRP and KYN (largely hepatic) could therefore contribute to our result. In line with this is the fact that hepatic TDO is strongly induced by corticosterone that, in turn, is elicited by UCMS [24]. Therefore, we cannot conclude about the respective contribution of IDO and TDO to the activation of the peripheral KP in UCMS mice.

We also showed that 3HK is elevated in UCMS mice, indicating that KYN is preferentially metabolized along the QUIN pathway. This suggests that peripheral KP metabolites are involved in UCMS-induced depressive-like syndrome and is in agreement with clinical data reporting that QUIN precursors may be related to depressive symptoms in humans [32]. KYN, 3HK and TRP enter the brain through the large neutral amino acid transporter [16]. As a consequence, elevated peripheral levels of KYN and 3HK could reduce TRP transport into the brain and consequently cerebral 5-HT content. In accordance with this, UCMS mice we found a reduction of TRP content in HIPPO and STR in UCMS mice. However, no changes of 5-HT metabolism were observed, suggesting that the pool of TRP dedicated to 5-HT synthesis is not affected by UCMS. The reduction of TRP level could result from an increase metabolism of TRP through the QUIN pathway as shown in STR.

We show that 5-HT and KYN are strongly correlated in all brain structures of control and UCMS mice, suggesting that some animals preferentially use TRP to produce 5-HT while in others KYN synthesis is favored. Proinflammatory cytokines could be the key factor controlling the balance between both pathways. Indeed, individuals may vary in their cerebral cytokines pattern of expression [40]. As a consequence, one individual with a high basal level of proinflammatory cytokines would preferentially metabolize TRP along the KP. These correlations also indicate that, in cerebral structures, KYN is likely to result from local synthesis rather than from blood-derived KYN contents. In agreement with this is the fact that IDO is constitutively expressed in brain tissues of BALB/c mice [31].

Our findings also provide evidence for a region-specific effect of UCMS on the two branches of the KP (Fig. 4): the QUIN route is increased at the subcortical level (AMY/STR) whereas it is decreased in CC. A possible explanation for this might be linked to the region-specific expression of proinflamatory cytokines which activate IDO differentially in the cortical and subcortical regions [4]. Interestingly, no KP changes were observed in HIPPO. It is surprising considering the role that this structure plays in depression. This result could be explained by the fact that we used the wholehippocampus for biochemical analyses. Indeed, it was shown that cytokine environment might be region-specific within the hippocampus [42]. In this case, KP might be activated by proinflammatory cytokines in some hippocampal subregions and inhibited by anti-inflammatory cytokines in others, resulting in a global lack of effect.

QUIN was not measured in this study, however, it was reported that the variation of 3HK was strongly associated to QUIN variation [3,20,9]. As QUIN was shown to enhance glutamate concentration [47] whereas KYNA was found to have opposite effects [51], we suggest that UCMS-induced QUIN/KYNA imbalances may locally contribute to a modification of the glutamatergic homeostasis. Since recent studies have provided evidence for a determinant role of glutamate in the pathophysiology of mood disorders [22,43], we propose that the imbalance in CC could be related to an anti-excitogenic effect (KYNA pathway unchanged and QUIN pathway reduced) whereas that reported in AMY and STR could be associated with a raised excitogenic effect (QUIN pathway favoured and KYNA pathway reduced). It is interesting to note that it is in agreement with recent Human brain-imaging data showing that glutamatergic neurotransmission is reduced in prefrontal cortex [14] and increased in amygdala [25] in depressed patients.

In summary, we show for the first time that chronic stress induces peripheral and cerebral neurochemical abnormalities of the KP in mice (Fig. 4). This pathway might have relevant interest for a better understanding of peripheral and cerebral alterations of TRP-KYN pathway and its links with cytokinergic activation occurring in stress-related disorders.

Financial disclosures

Anthony Laugeray, Jean-Marie Launay, Jacques Callebert, Alexandre Surget and Pascal Barone report no biomedical finan-

cial interests or potential conflicts of interests. Catherine Belzung is a consultant for Takeda.

Acknowledgements

The authors thank Julien Celestine, Elsa Isingrini, Arnaud Aubert for helpful discussions. A part of this work was presented at the 6th FENS forum of European Neuroscience, GENEVA, July 12–16, 2008. This work was also presented at the 10th World Congress of Biological Psychiatry, PARIS, June 28–July 2, 2009, at the Summer meeting of the British Association for Psychopharmacology, OXFORD, July 26–29, 2009 and at the 10th Psychoimmunology Expert Meeting, GUNZBURG, November 12–15, 2009.

References

[1] Acion L, Peterson JJ, Temple S, Arndt S. Probabilistic index: an intuitive non-parametric approach to measuring the size of treatment effects. Stat Med 2006;25:591–602.
[2] Alonso R, Griebel G, Pavone G, Stemmelin J, Le Fur G, Soubrie P. Blockade of CRF(1) or V(1b) receptors reverses stress-induced suppression of neurogenesis in a mouse model of depression. Mol Psychiatry 2004;9:278–86, 24.
[3] Amori L, Guidetti P, Pellicciari R, Kajii Y, Schwarcz R. On the relationship between the two branches of the kynurenine pathway in the rat brain in vivo. J Neurochem 2009;109:316–25.
[4] Andre C, O'Connor JC, Kelley KW, Lestage J, Dantzer R, Castanon N. Spatio-temporal differences in the profile of murine brain expression of proinflammatory cytokines and indoleamine 2,3-dioxygenase in response to peripheral lipopolysaccharide administration. J Neuroimmunol 2008;200:90–9.
[5] Anisman H. Cascading effects of stressors and inflammatory immune system activation: implications for major depressive disorder. J Psychiatry Neurosci 2009;34:4–20.
[6] Barden N. Implication of the hypothalamic–pituitary–adrenal axis in the physiopathology of depression. J Psychiatry Neurosci 2004;29:185–93.
[7] Byrne GI, Lehmann LK, Kirschbaum JG, Borden EC, Lee CM, Brown RR. Induction of tryptophan degradation in vitro and in vivo: a gamma-interferon-stimulated activity. J Interferon Res 1986;6:389–96.
[8] Capuron L, Ravaud A, Neveu PJ, Miller AH, Maes M, Dantzer R. Association between decreased serum tryptophan concentrations and depressive symptoms in cancer patients undergoing cytokine therapy. Mol Psychiatry 2002;7:468–73.
[9] Ceresoli-Borroni G, Guidetti P, Amori L, Pellicciari R, Schwarcz R. Perinatal kynurenine 3-hydroxylase inhibition in rodents: pathophysiological implications. J Neurosci Res 2007;85:845–54.
[10] Comings DE, Muhleman D, Dietz G, Sherman M, Forest GL. Sequence of human tryptophan 2,3-dioxygenase (TDO2): presence of a glucocorticoid response-like element composed of a GTT repeat and an intronic CCCCT repeat. Genomics 1995;29:390–6.
[11] Dale WE, Dang Y, Brown OR. Tryptophan metabolism through the kynurenine pathway in rat brain and liver slices. Free Radic Biol Med 2000;29:191–8.
[12] Delaney HD, Vargha A. Comparing several robust tests of stochastic equality with ordinally scaled variables and small to moderate sized samples. Psychol Methods 2002;7:485–503.
[13] Ducottet C, Griebel G, Belzung C. Effects of the selective nonpeptide corticotropin-releasing factor receptor 1 antagonist antalarmin in the chronic mild stress model of depression in mice. Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry 2003;27:625–31.
[14] Feyissa AM, Chandran A, Stockmeier CA, Karolewicz B. Reduced levels of NR2A and NR2B subunits of NMDA receptor and PSD-95 in the prefrontal cortex in major depression. Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry 2009;33:70–5.
[15] Fujigaki S, Saito K, Takemura M, Fujii H, Wada H, Noma A, et al. Species differences in L-tryptophan–kynurenine pathway metabolism: quantification of anthranilic acid and its related enzymes. Arch Biochem Biophys 1998;358:329–35.
[16] Fukui S, Schwarcz R, Rapoport SI, Takada Y, Smith QR. Blood–brain barrier transport of kynurenines: implications for brain synthesis and metabolism. J Neurochem 1991;56:2007–17.
[17] Griebel G, Simiand J, Serradeil-Le Gal C, Wagnon J, Pascal M, Scatton B, et al. Anxiolytic- and antidepressant-like effects of the non-peptide vasopressin V1b receptor antagonist, SSR149415, suggest an innovative approach for the treatment of stress-related disorders. Proc Natl Acad Sci USA 2002;99:6370–5.
[18] Grippo AJ, Francis J, Beltz TG, Felder RB, Johnson AK. Neuroendocrine and cytokine profile of chronic mild stress-induced anhedonia. Physiol Behav 2005;84:697–706.
[19] Grissom RJ, Kim JJ. Review of assumptions and problems in the appropriate conceptualization of effect size. Psychol Methods 2001;6:135–46.
[20] Guidetti P, Bates GP, Graham RK, Hayden MR, Leavitt BR, MacDonald ME, et al. Elevated brain 3-hydroxykynurenine and quinolinate levels in Huntington disease mice. Neurobiol Dis 2006;23:190–7.
[21] Guillemin GJ, Brew BJ, Noonan CE, Takikawa O, Cullen KM. Indoleamine 2,3 dioxygenase and quinolinic acid immunoreactivity in Alzheimer's disease hippocampus. Neuropathol Appl Neurobiol 2005;31:395–404.
[22] Hashimoto K. Emerging role of glutamate in the pathophysiology of major depressive disorder. Brain Res Rev 2009.
[23] Hashimoto K, Sawa A, Iyo M. Increased levels of glutamate in brains from patients with mood disorders. Biol Psychiatry 2007;62:1310–6.
[24] Ibarguen-Vargas Y, Surget A, Touma C, Palme R, Belzung C. Multifaceted strain-specific effects in a mouse model of depression and of antidepressant reversal. Psychoneuroendocrinology 2008;33:1357–68.
[25] Karolewicz B, Szebeni K, Gilmore T, Maciag D, Stockmeier CA, Ordway GA. Elevated levels of NR2A and PSD-95 in the lateral amygdala in depression. Int J Neuropsychopharmacol 2009;12:143–53.
[26] Kema IP, Schellings AM, Hoppenbrouwers CJ, Rutgers HM, de Vries EG, Muskiet FA. High performance liquid chromatographic profiling of tryptophan and related indoles in body fluids and tissues of carcinoid patients. Clin Chim Acta 1993;221:143–58.
[27] Kohl C, Walch T, Huber R, Kemmler G, Neurauter G, Fuchs D, et al. Measurement of tryptophan, kynurenine and neopterin in women with and without postpartum blues. J Affect Disord 2005;86:135–42.
[28] Konsman JP, Parnet P, Dantzer R. Cytokine-induced sickness behaviour: mechanisms and implications. Trends Neurosci 2002;25:154–9.
[29] Kraemer HC, Kupfer DJ. Size of treatment effects and their importance to clinical research and practice. Biol Psychiatry 2006;59:990–6.
[30] Leonard BE, Myint A. The psychoneuroimmunology of depression. Hum Psychopharmacol 2009;24:165–75.
[31] Lestage J, Verrier D, Palin K, Dantzer R. The enzyme indoleamine 2,3-dioxygenase is induced in the mouse brain in response to peripheral administration of lipopolysaccharide and superantigen. Brain Behav Immun 2002;16:596–601.
[32] Mackay GM, Forrest CM, Christofides J, Bridel MA, Mitchell S, Cowlard R, et al. Kynurenine metabolites and inflammation markers in depressed patients treated with fluoxetine or counselling. Clin Exp Pharmacol Physiol 2008.
[33] Maes M, Verkerk R, Bonaccorso S, Ombelet W, Bosmans E, Scharpe S. Depressive and anxiety symptoms in the early puerperium are related to increased degradation of tryptophan into kynurenine, a phenomenon which is related to immune activation. Life Sci 2002;71:1837–48.
[34] Miller AH, Maletic V, Raison CL. Inflammation and its discontents: the role of cytokines in the pathophysiology of major depression. Biol Psychiatry 2009;65:732–41.
[35] Miller CL, Llenos IC, Cwik M, Walkup J, Weis S. Alterations in kynurenine precursor and product levels in schizophrenia and bipolar disorder. Neurochem Int 2008;52:1297–303.
[36] Mineur YS, Belzung C, Crusio WE. Effects of unpredictable chronic mild stress on anxiety and depression-like behavior in mice. Behav Brain Res 2006;175:43–50.
[37] Moreau M, Lestage J, Verrier D, Mormede C, Kelley KW, Dantzer R, et al. Bacille Calmette-Guerin inoculation induces chronic activation of peripheral and brain indoleamine 2,3-dioxygenase in mice. J Infect Dis 2005;192:537–44.
[38] Myint AM, Kim YK. Cytokine-serotonin interaction through IDO: a neurodegeneration hypothesis of depression. Med Hypotheses 2003;61:519–25.
[39] Myint AM, Kim YK, Verkerk R, Scharpe S, Steinbusch H, Leonard B. Kynurenine pathway in major depression: evidence of impaired neuroprotection. J Affect Disord 2006.
[40] Patel NS, Paris D, Mathura V, Quadros AN, Crawford FC, Mullan MJ. Inflammatory cytokine levels correlate with amyloid load in transgenic mouse models of Alzheimer's disease. J Neuroinflammation 2005;2:9.
[41] Paxinos G, Franklin K. The mouse brain in stereotoxic coordinates. San Diego, CA: Academic Press; 2001.
[42] Rosi S, Ramirez-Amaya V, Vazdarjanova A, Worley PF, Barnes CA, Wenk GL. Neuroinflammation alters the hippocampal pattern of behaviorally induced Arc expression. J Neurosci 2005;25:723–31.
[43] Sanacora G, Zarate CA, Krystal JH, Manji HK. Targeting the glutamatergic system to develop novel, improved therapeutics for mood disorders. Nat Rev Drug Discov 2008;7:426–37.
[44] Santarelli L, Saxe M, Gross C, Surget A, Battaglia F, Dulawa S, et al. Requirement of hippocampal neurogenesis for the behavioral effects of antidepressants. Science 2003;301:805–9.
[45] Surget A, Wang Y, Leman S, Ibarguen-Vargas Y, Edgar N, Griebel G, et al. Corticolimbic transcriptome changes are state-dependent and region-specific in a rodent model of depression and of antidepressant reversal. Neuropsychopharmacology 2009;34:1363–80.
[46] Swardfager W, Herrmann N, Dowlati Y, Oh PI, Kiss A, Walker SE, et al. Indoleamine 2,3-dioxygenase activation and depressive symptoms in patients with coronary artery disease. Psychoneuroendocrinology 2009.
[47] Tavares RG, Schmidt AP, Abud J, Tasca CI, Souza DO. In vivo quinolinic acid increases synaptosomal glutamate release in rats: reversal by guanosine. Neurochem Res 2005;30:439–44.
[48] Wichers MC, Koek GH, Robaeys G, Verkerk R, Scharpe S, Maes M. IDO and interferon-alpha-induced depressive symptoms: a shift in hypothesis from tryptophan depletion to neurotoxicity. Mol Psychiatry 2005;10:538–44.
[49] Willner P. Chronic mild stress (CMS) revisited: consistency and behavioural–neurobiological concordance in the effects of CMS. Neuropsychobiology 2005;52:90–110.

[50] Willner P. Validity, reliability and utility of the chronic mild stress model of depression: a 10-year review and evaluation. Psychopharmacology (Berl) 1997;134:319–29.
[51] Wu HQ, Pereira EF, Bruno JP, Pellicciari R, Albuquerque EX, Schwarcz R. The astrocyte-derived alpha7 nicotinic receptor antagonist kynurenic acid controls extracellular glutamate levels in the prefrontal cortex. J Mol Neurosci 2009.
[52] Wu YH, Feenstra MG, Zhou JN, Liu RY, Torano JS, Van Kan HJ, et al. Molecular changes underlying reduced pineal melatonin levels in Alzheimer disease: alterations in preclinical and clinical stages. J Clin Endocrinol Metab 2003;88:5898–906.
[53] Yalcin I, Coubard S, Bodard S, Chalon S, Belzung C. Effects of 5,7-dihydroxytryptamine lesion of the dorsal raphe nucleus on the antidepressant-like action of tramadol in the unpredictable chronic mild stress in mice. Psychopharmacology (Berl) 2008;200:497–507.

3. Résultats complémentaires

A. DOSAGES DE L'ACIDE QUINOLINIQUE (QUIN)

Initialement, nous avions mesuré les concentrations en QUIN dans chacun des tissus par HPLC mais nous avons du exclure ces données de notre analyse compte tenu d'un biais méthodologique lié à la sensibilité de la technique de mesure. Nous avons alors réanalysé les échantillons en utilisant la spectrométrie de masse qui permet d'augmenter la sensibilité des mesures de QUIN (Moroni, Lombardi *et coll.* 1984). Les résultats obtenus sont présentés ci-dessous :

On peut voir que l'UCMS ne modifie pas les concentrations en QUIN dans l'hippocampe, l'amygdale et le striatum alors que dans le cortex cingulaire et les poumons, le taux de QUIN est significativement élevé par l'UCMS.

Table 2 bis - UCMS effect on peripheral and cerebral QUIN concentrations

	HIPPO			CC			AMY		
	NS	S	UCMS effect	NS	S	UCMS effect	NS	S	UCMS effect
QUIN	17.3 ± 1.23	18.3 ± 1.0	-	**17.4 ± 2.2**	**28.5 ± 13.3***	↑	18.2 ± 9.5	15.9 ± 2.8	-
QUIN/3HK	0.34 ± 0.16	0.36 ± 0.17	-	**0.25 ± 0.09**	**0.75 ± 0.23*****	↑	0.36 ± 0.24	0.24 ± 0.04	-
	STR			LUNG					
	NS	S	UCMS effect	NS	S	UCMS effect			
QUIN	16.5 ± 2.7	16.2 ± 2.4	-	**14.3 ± 1.9**	**17.8 ± 1.01***	↑			
QUIN/3HK	0.18 ± 0.05	0.14 ± 0.05	-	0.29 ± 0.22	0.26 ± 0.05	-			

Data are the median + SIQR. * p<0.05; *** p<0.0005 compared with NS group. N=14 in S group and N=15 in NS group. QUIN values are expressed in nmol/mg tissue weight.

4. Discussion

Cette première étude nous a permis de montrer que l'exposition répétée à des stresseurs de type psychogénique entraîne des modifications de l'utilisation du TRP au sein des voies 5-HT et KYN, tant en périphérie que dans le SNC. Ainsi, nous avons observé :

(1) que l'UCMS induit un détournement du métabolisme du TRP vers la voie de la KYN

(2) que cette activation ne diminue pas la biodisponibilité du TRP pour la synthèse de 5-HT cérébrale

(3) que le métabolisme périphérique de la KYN est détourné vers la synthèse de composés toxiques tels que 3HK et QUIN

(4) que les altérations du métabolisme de la KYN induites dans le SNC diffèrent selon la structure étudiée.

(5) que les voies 5-HT et KYN sont étroitement régulées dans le SNC (corrélation inverse très robuste entre 5-HT et KYN)

Chacun de ces résultats est discuté de façon plus détaillée dans les pages qui suivent. Pour faciliter la compréhension, je m'aiderai d'un schéma récapitulatif simplifié (cf. **Fig. 27** ci-dessous) que je ferai évoluer tout au long de ma discussion en fonction des différentes données obtenues au cours de mon travail de thèse.

Ce schéma représente en fait ce qui est connu sur les altérations du métabolisme de la KYN induites par l'UCMS. Étant donné qu'aucune étude n'a utilisé de modèle de dépression basé sur l'exposition à des stresseurs de type psycho-émotionnels, il est, pour le moment, dénué d'informations. Cela ne veut

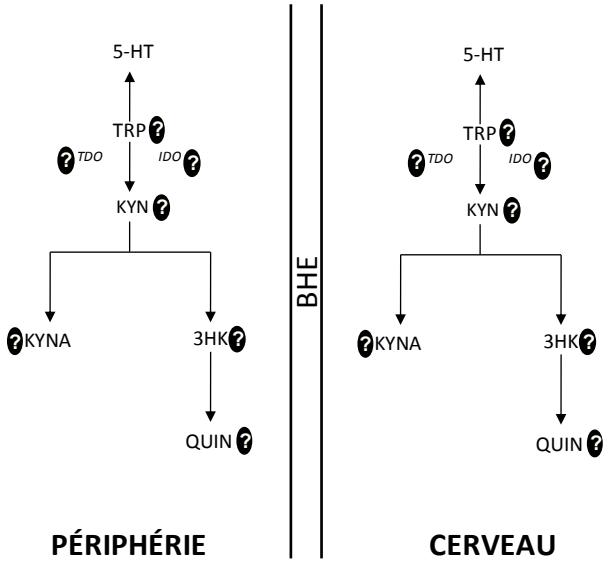


Fig. 27 : *Schéma évolutif des effets de l'UCMS sur le métabolisme de la KYN.*

pas dire pour autant qu'on ne sait rien sur le rôle de cette voie métabolique dans la dépression, c'est juste que toutes les études précliniques réalisées jusqu'à maintenant ont utilisé des modèles animaux de dépression qui diffèrent, d'un point de vue phénoménologique, notoirement de l'UCMS (voir **Fig. 28** pour un schéma récapitulant les altérations de la voie de la KYN au cours du syndrome dépressif chez l'Homme et l'animal).

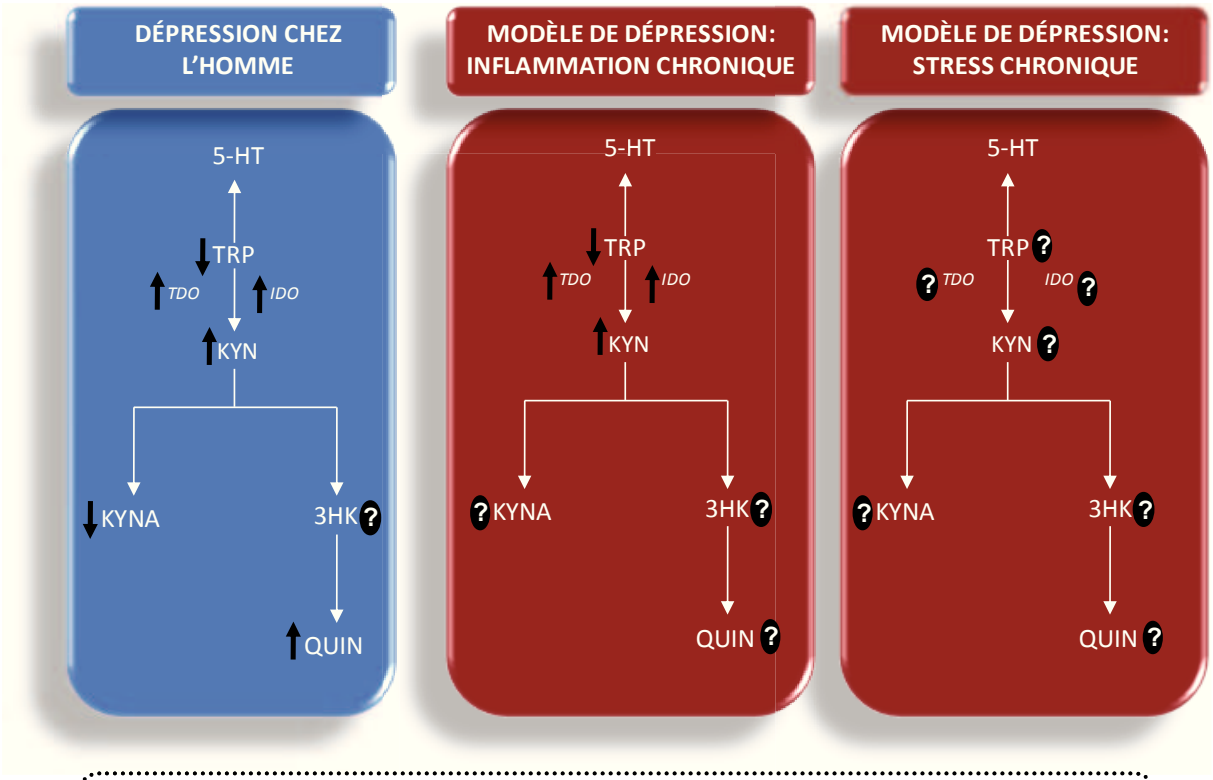
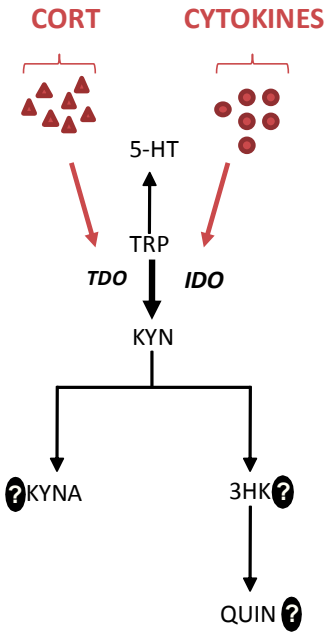


Fig. 28 : *Synthèse des connaissances sur les altérations de la voie KYN au cours du syndrome dépressif chez l'Homme et l'animal.*

A. QUELS SONT LES MECANISMES RESPONSABLES DE L'ACTIVATION PERIPHERIQUE DE LA VOIE KYN PAR L'UCMS ?

Grâce à ce travail, nous avons d'abord pu montrer que l'UCMS induit une activation de la voie de la KYN se traduisant par une hausse de la concentration périphérique en KYN ainsi que par une élévation du ratio KYN/TRP (qui reflète l'activité des enzymes TDO/IDO). Comme nous l'avons évoqué précédemment, deux mécanismes sont susceptibles d'aboutir à une telle activation (cf. schéma **Fig. 29**) : la hausse des taux circulants de corticostérone (CORT) - qui induirait spécifiquement la TDO - et l'augmentation de la production de cytokines inflammatoires qui activerait plutôt l'IDO. Même si nos données ne permettent pas de trancher sur la contribution respective de ces deux médiateurs, d'autres études permettent de se faire une idée sur la question. En effet, il a été montré au laboratoire que la concentration plasmatique en CORT est augmentée en réponse à l'UCMS (Ibarguen-Vargas, Surget *et coll.* 2008). Une étude plus récente, au cours de laquelle les titres de CORT ont été mesurés à différents moments du cycle jour-nuit, a montré que la libération de CORT n'est augmentée qu'à certains moments du cycle circadien (Surget, Tanti *et coll.* Soumis). Ainsi, on peut supposer que durant ces pics quotidiens, le métabolisme du TRP au sein de la voie KYN est accru, entraînant une hausse de la production des métabolites de la KYN. D'autres travaux ont également mis en évidence une augmentation des taux circulants de CORT chez des souris ayant été confrontées à des protocoles de stress chronique plus ou moins similaires à l'UCMS (Detanico, Piato *et coll.* 2009; Palumbo, Canzobre *et coll.* 2010). De plus, plusieurs auteurs ont mis en évidence une libération accrue de cytokines pro-inflammatoires en réponse à un protocole de stress chronique (Kubera, Symbirtsev *et coll.* 1996; Kubera, Basta-Kaim *et coll.* 1998; Grippo, Francis *et coll.* 2005; Goshen, Kreisel *et coll.* 2007), capables d'activer l'IDO et ainsi contribuer à détourner le métabolisme du TRP au sien de la voie KYN.



PÉRIPHÉRIE

Fig. 29 : ***Mécanismes d'activation possibles de la voie KYN par l'UCMS.***

Récemment, une étude menée chez des souris BALB/c confrontées à un protocole de stress « chronique » (4.5 jours ; stress acoustique+2h d'immobilisation deux fois par jour) a montré que la voie de la KYN est activée chez les animaux stressés (Kiank, Zeden *et coll.* 2010), ce qui est en accord avec les résultats issus de notre expérience. Cependant, certaines données ne coïncident pas avec les nôtres. En effet, les auteurs observent une diminution de la concentration périphérique en TRP (plasma) alors que ce n'est pas le cas dans notre étude. Trois explications sont possibles : tout d'abord, Kiank *et coll.* ont utilisé des femelles alors que nous avons utilisé des mâles. L'activité de la TDO étant

sensible à la concentration en œstrogènes (Patnaik and Sarangi 1980), la différence observée pourrait tout à fait provenir d'une différence mâle/femelle de régulation hormonale de l'enzyme. Deuxièmement, il se pourrait aussi que ces divergences soient dues aux différences méthodologiques entre les deux expériences. En effet, Kiank *et coll*. présentent leur modèle comme un modèle de stress chronique alors que celui-ci ne dure que 4.5 jours ce qui n'est pas comparable aux 42 jours de stress dans notre cas. Il serait alors plus approprié de parler de stress « sub-chronique ». De plus, les stresseurs utilisés d'un jour à l'autre sont toujours les mêmes et sont présentés au même moment dans la journée, contrairement à notre protocole de stress qui utilise différentes combinaisons de stresseurs d'un jour à l'autre, présentés à divers moments de la journée (2 à 8 fois/jour). La troisième explication est liée au fait que nos mesures « périphériques » reflètent à la fois le compartiment sanguin et le compartiment pulmonaire (nos animaux n'ayant pas été perfusés) alors que Kiank *et coll.* rapportent des dosages plasmatiques. Ainsi, il se pourrait que le pool pulmonaire de TRP ait pu masquer une diminution du pool sanguin de TRP.

B. IMPLICATION DE L'IDO OU DE LA TDO ?

En l'état actuel, nos données ne permettent pas de répondre à cette question : l'activation de la voie KYN par l'UCMS observée dans cette étude peut donc résulter de l'activation de l'une, de l'autre ou des deux enzymes. Comme je l'ai indiqué précédemment, des données récentes obtenues au laboratoire indiquent que le *pattern* d'altération de la libération de corticostérone n'est augmenté que durant une phase particulière du cycle circadien (Surget, Tanti *et coll.* Soumis) (cf. **Fig. 30** ci-dessous et Annexe 2).

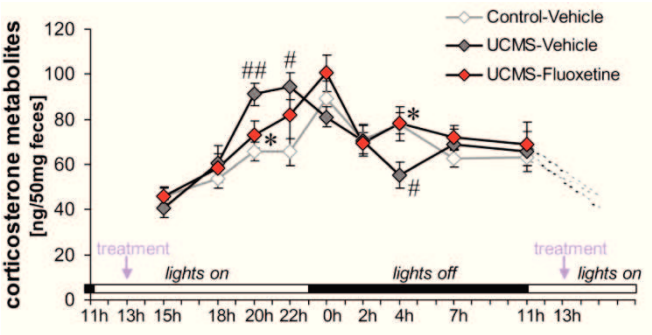


Fig. 30 : Altérations de la libération de corticostérone induites par 7 semaines d'UCMS et effet d'un traitement chronique à la fluoxétine.
Début du traitement à J14 – Administration quotidienne à 13h ; # p<0.05 vs. Control-Vehicle ; ## p<0.01 vs. Control-Vehicle ; * P<0.05 vs. UCMS-Vehicle. N=9-11/group.

Ainsi, une activation de la voie KYN pourrait se produire quotidiennement, conjointement à la hausse des taux de corticostérone, et ainsi favoriser l'accumulation des métabolites toxiques de la KYN. Cependant, il est probable que l'IDO soit plus impliquée dans le détournement du métabolisme. En effet, dans leur étude, Kiank *et coll.* montrent que l'activation de l'IDO par le stress dépend de l'IFNγ et du TNFα puisque l'administration intrapéritonéale d'anticorps anti-IFNγ et anti-TNFα bloque l'activation de l'IDO induite par leur protocole de stress (Kiank, Zeden *et coll.* 2010).

À FAIRE :

Pour savoir si l'activation de la voie KYN induite par l'ICMS est dépendante de la TDO et/ou de l'IDO, il pourrait être intéressant de : (1) bloquer la TDO avec un inhibiteur spécifique tel que le 680C91 (Salter, Hazelwood et coll. 1995), (2) soumettre des souris TDO$^{-/-}$ - récemment générées par Kanai et coll. (Kanai, Funakoshi et coll. 2009) - à un protocole d'ICMS et évaluer les changements biologiques et comportementaux induits, (3) faire la même chose avec des souris IDO$^{-/-}$ (Baban, Chandler et coll. 2009), ou encore (4) d'évaluer les effets d'un traitement chronique avec un inhibiteur de l'IDO tel que le 1-méthyltryptophane (1MT) (Suzuki, Tone et coll. 2001) ou l'exiguamine (Volgraf, Lumb et coll. 2008). C'est en partie ce que nous avons fait dans l'une des expériences réalisées pendant cette thèse lors de laquelle nous avons étudié l'effet d'un traitement chronique au 1MT (inhibiteur de l'IDO) sur les altérations de la voie KYN induites par l'ICMS. Les résultats présentés dans l'article 3 apporteront donc d'importantes indications quant à l'implication de l'IDO dans la réorganisation métabolique induite par l'ICMS.

C. L'ACTIVATION DE LA VOIE KYN ENTRAINE-T-ELLE UNE DEPLETION EN TRP, ET PAR CONSEQUENT UNE DEPLETION EN 5-HT, DANS LE SNC ?

Compte tenu de l'organisation du métabolisme du TRP (la synthèse de 5-HT se déroule en parallèle à la synthèse de KYN), il est séduisant de supposer qu'une augmentation de l'utilisation du TRP au sein de la voie KYN puisse diminuer la biodisponibilité du TRP pour la synthèse cérébrale de 5-HT. Cette hypothèse, qui à notre connaissance n'a pas été clairement vérifiée, repose notamment sur les résultats d'études montrant qu'une diminution de l'apport alimentaire en TRP entraîne une baisse de la synthèse de 5-HT dans le SNC qui peut être accompagnée de troubles de l'humeur et/ou mnésiques ainsi que d'une hausse des comportements agressifs (Bell, Abrams *et coll.* 2001). Même s'il est difficile de remettre en question ces effets, il semble que le détournement du TRP au sein de la voie KYN ne soit pas suffisant pour induire l'apparition de symptômes dépressifs. Comme le suggère Trevor Stone dans son article de revue de 1993, consacré à la neuropharmacologie de la voie de la KYN (Stone 1993), l'activation de la voie KYN ne peut suffisamment diminuer la disponibilité en TRP pour induire une déplétion cérébrale en 5-HT. En effet, il a été montré que la KYN synthétisée en périphérie pouvait être transportée dans le cerveau par l'intermédiaire du transporteur des acides aminés neutres (qui

transporte aussi le TRP dans le cerveau) et constituait par ailleurs la principale source de KYN du SNC (plus de la moitié de la KYN cérébrale proviendrait de la périphérie) (Gal and Sherman 1980; Fukui, Schwarcz *et coll.* 1991). Ainsi, une hausse des taux circulants de KYN, accompagnée d'une réduction de la concentration en TRP, pourrait tout à fait être à l'origine de la diminution de l'apport cérébral en TRP (par un mécanisme de compétition au niveau du transporteur). Cependant, des travaux anciens montrent que les concentrations plasmatiques basales en KYN, qui sont de l'ordre du nanomolaire, sont 1000 fois trop faibles pour perturber le passage du TRP dans le SNC par ce mécanisme (Joseph and Kadam 1979; Naito, Ishiguro *et coll.* 1987). Les résultats obtenus au cours de cette première étude semblent être en accord avec cette hypothèse car, même s'ils indiquent une baisse de la concentration en TRP dans certaines structures du SNC (hippocampe et striatum), les taux de 5-HT et de 5-HIAA ne sont diminués ni dans ces structures, ni dans les autres structures étudiées (amygdale et cortex cingulaire), ce qui aurait pourtant du être le cas s'il y avait eu une réelle déplétion en TRP résultant de l'activation de la voie KYN par l'UCMS. Ceci est d'ailleurs en accord avec les travaux de O'Connor *et coll.* montrant que l'induction d'un état dépressif chez des souris infectées par le BCG (=syndrome dépressif induit par une inflammation chronique), bien qu'entraînant une baisse de la concentration plasmatique en TRP, ne modifie pas les concentrations cérébrales en 5-HT et 5-HIAA (O'Connor, Andre *et coll.* 2009; O'Connor, Lawson *et coll.* 2009). Par conséquent, nos données ainsi que celles de O'Connor *et coll*. suggèrent que le métabolisme du TRP au sein de la voie KYN pourrait bien jouer un rôle important dans la physiopathologie des troubles dépressifs mais que ce dernier n'est pas lié à un phénomène de déplétion en TRP. Compte tenu des mécanismes d'action des différents métabolites de la KYN, il semble plus pertinent que ces derniers puissent jouer un rôle de perturbateur du fonctionnement cellulaire susceptible de conduire à des altérations de la neuroplasticité et ainsi participer à la physiopathologie de la dépression. D'autres arguments de la littérature confortent une telle hypothèse, en particulier les études menées chez les patients dépressifs chez lesquels l'intensité des symptômes dépressifs est positivement corrélée à l'état d'activation de la voie KYN. Ces données constituent un argument très fort attestant du lien entre l'état dépressif et le détournement métabolique du TRP vers la voie KYN et ses métabolites. L'importance de ce lien fait l'objet de l'article 2 et est discuté de façon plus importante dans la partie « Discussion » correspondante.

D. QUEL EFFET DE L'UCMS SUR LE METABOLISME PERIPHERIQUE DE LA KYN ?

Nos données suggèrent qu'une fois produite, la KYN est préférentiellement métabolisée au sein de la voie de synthèse de 3HK et de QUIN, alors que la voie KYNA reste inchangée (cf. **Fig. 31** ci-après). Ce résultat est particulièrement intéressant car il indique clairement qu'en cas de stress chronique, l'utilisation du TRP est déviée vers la synthèse de 3HK et QUIN qui pourraient alors s'accumuler dans les tissus périphériques et ainsi perturber localement le fonctionnement cellulaire compte tenu de la capacité de ces composés à générer du stress oxydant. Le fait que la concentration en KYNA demeure inchangée atteste de l'indépendance des deux voies d'utilisation de KYN, et est donc en accord avec les

résultats d'Amori *et coll.* montrant que l'activation de l'une de ces voies n'entraîne pas forcément l'inhibition de l'autre et *vice versa* (Amori, Guidetti *et coll.* 2009). On peut alors s'interroger sur les mécanismes à l'origine d'une telle déviation. Nous avons vu auparavant que l'UCMS induit une libération plus importante de cytokines proinflammatoires de la part des cellules du système immunitaires. Il a été montré que certaines de ces cytokines sont capables d'augmenter l'activité enzymatique de la *kynurenine monooxygenase* (KMO ; enzyme responsable de la synthèse de 3HK) et de la *kynureninase* (KASE ; enzyme qui dégrade 3HK et participe à la synthèse de QUIN) (Alberati-Giani, Ricciardi-Castagnoli *et coll.* 1996; Chiarugi, Calvani *et coll.* 2001). Ainsi, une hausse des concentrations en cytokines proinflammatoires induite par l'UCMS pourrait être à la base d'une telle réorganisation du métabolisme du TRP.

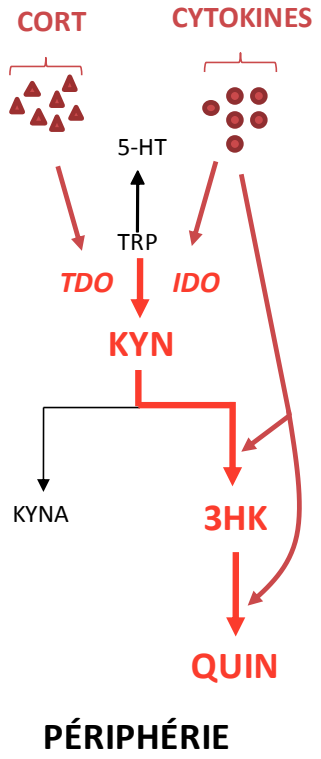


Fig. 31 : *L'UCMS dévie le métabolisme périphérique de la KYN.*

Par ailleurs, nos résultats divergent par rapport à l'étude de Kiank *et coll.* qui montre qu'une exposition sub-chronique au stress résulte en une augmentation de la concentration plasmatique en KYNA chez les individus stressés alors que le taux de QUIN reste inchangé (Kiank, Zeden *et coll.* 2010). Leur travail montre donc qu'il y a bien déviation métabolique du métabolisme de la KYN mais que celle-ci se fait à l'inverse de ce que nous observons dans notre étude. Ce résultat est plutôt étrange étant donné que ces auteurs montrent aussi que l'IFNγ et le TNFα sont responsables de l'activation de la voie KYN par le biais de l'IDO. Or, ces mêmes cytokines sont de puissants inducteurs des enzymes KMO et KASE. Elles sont donc sensées entraîner une élévation des concentrations en 3HK et en QUIN. Cependant, on peut supposer que ces enzymes ne sont activées par les cytokines qu'en cas d'exposition plus prolongée au stress.

À FAIRE :

Évaluer l'implication des enzymes KMO et KASE : pour cela, des inhibiteurs tels que l'UPF 648 pour la KMO (Amori, Guidetti et coll. 2009) et le (o-methoxybenzoyl) alanine pour la KASE (Chiarugi, Carpenedo et coll. 1996) pourraient être administrés quotidiennement (en intra-péritonéal) à des souris contrôles vs. UCMS. Des mesures d'activité enzymatique et des concentrations en KYN, 3HK et QUIN permettraient d'apprécier l'effet de l'UCMS sur l'utilisation de la KYN au sien de la voie QUIN.

E. QUE SE PASSE-T-IL ALORS DANS LE SNC ?

Tout d'abord, il est important de remarquer que ni la concentration en KYN ni le ratio KYN/TRP ne sont modifiés par l'UCMS dans le SNC, que ce soit dans l'amygdale, l'hippocampe, le cortex cingulaire ou le striatum (Voir **Fig. 32** ci-après). Ces données suggèrent que le métabolisme du TRP au sein de la voie KYN n'est pas accéléré en réponse à l'UCMS comme c'est le cas en périphérie. Cependant, comme nous n'avons pas mesuré directement l'activité enzymatique de l'IDO – qui est l'enzyme majoritaire exprimée dans les cellules cérébrales - on ne peut exclure l'éventualité que la voie soit tout de même activée sans que cela n'apparaisse dans nos données. En effet, l'étude d'une voie métabolique comprenant plusieurs intermédiaires est rendue difficile par le fait que chacun de ces intermédiaires est à la fois le substrat d'une réaction mais aussi le produit d'une autre. Ainsi, l'accumulation d'un des métabolites peut s'expliquer soit par une hausse de sa synthèse (anabolisme) soit par une baisse de sa dégradation (catabolisme). Mais si la synthèse et la dégradation d'un composé sont tous deux augmentés, il peut en résulter une « apparente » absence d'effe Dans notre cas, la concentration en KYN ne semble pas être modifiée par l'UCMS. Cependant, on ne peut exclure l'éventualité qu'une activation de la voie KYN ne soit pas décelable en raison d'un catabolisme plus élevé aboutissant à une synthèse plus importante de 3HK, phénomène que nous observons dans le striatum et l'amygdale. De plus, on observe une diminution de la concentration en TRP dans le striatum, et, comme les concentrations en 5-HT et en 5-HIAA ne sont pas augmentées, on peut logiquement supposer que le pool de TRP est diminué en raison d'une demande accrue au sein de la voie KYN ce qui renforcerait l'hypothèse d'une activation de la voie KYN non décelée. Nos données ne nous permettent donc pas de conclure clairement quant à un éventuel effet activateur de l'UCMS sur la voie KYN dans le SNC. Toutefois, le fait que la concentration en 3HK soit augmentée par l'UCMS dans l'amygdale et le striatum sans que le taux de KYN ne soit diminué (cf. Fig. 32 ci-dessous) suggère un apport de KYN soit endogène (à partir du TRP local) soit exogène (KYN périphérique).

Un apport de KYN endogène pourrait aller dans le sens de l'hypothèse présentée ci-dessus, d'une activation non décelée de la voie KYN (activation locale de l'IDO qui produirait de la KYN). De la même manière, un apport exogène pourrait coïncider avec l'augmentation périphérique de KYN induite par l'UCMS étant donné que la majorité de la KYN cérébrale est d'origine périphérique (Gal and Sherman 1980).

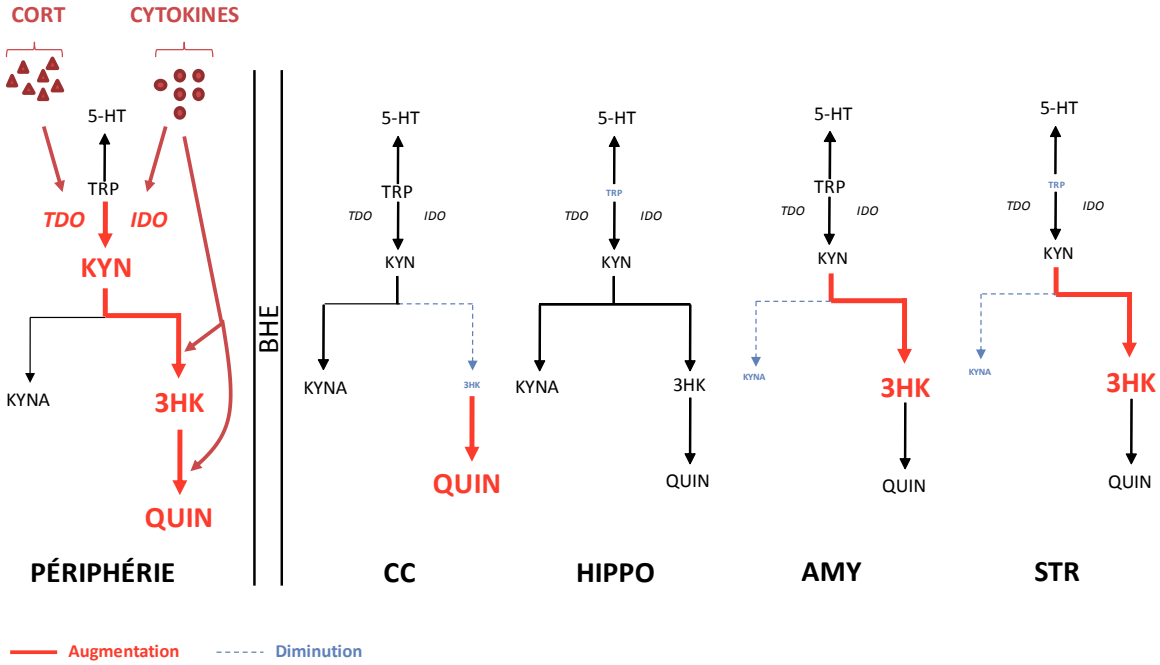


Fig. 32 : *L'UCMS dévie le métabolisme central de la KYN de façon structure-dépendante dans le SNC.*

Conjointement à la hausse de 3HK, l'UCMS a entraîné une baisse de la concentration en KYNA dans ces deux structures. Ce résultat renforce encore plus l'hypothèse d'une réorganisation du métabolisme de la KYN en réponse à l'UCMS et rend bien compte de la notion de perturbation de la balance entre les voies QUIN et KYNA souvent assimilée dans la littérature à l'équilibre neurodégénérescence/neuroprotection. En effet, l'UCMS entraîne clairement, dans ces deux structures, un déséquilibre vers la voie de synthèse de QUIN.

Dans le cortex cingulaire, la concentration en QUIN a été trouvée augmentée alors que le taux de 3HK est diminué. Ceci est particulièrement intéressant compte tenu de la relation « précurseur-produit » existant entre ces deux composés. Les données de la littérature tendent à montrer que la concentration en 3HK est liée à la concentration en QUIN (quand 3HK augmente, QUIN augmente et inversement) (Guidetti, Bates *et coll.* 2006; Ceresoli-Borroni, Guidetti *et coll.* 2007). Cependant, comme il a été évoqué auparavant, nos résultats ne sont pas en accord avec cette hypothèse et suggèrent plutôt une indépendance des mécanismes de synthèse de ces deux métabolites. Une étude récente d'Amori *et coll.* (2009) vient d'ailleurs conforter nos données. Dans leur travail, ces auteurs montrent que l'administration dans le striatum d'un inhibiteur de la *KMO* (enzyme de synthèse de 3HK à partir de KYN, aussi appelée *kynurenine hydroxylase*) induit une baisse de la concentration en 3HK mais ne modifie pas le taux de QUIN, ce qui suggère que 3HK n'est pas la source exclusive de QUIN et que, par conséquent, ce dernier peut-être produit par l'intermédiaire d'autres composés. Cette hypothèse est en accord avec des travaux montrant que QUIN peut être synthétisé à partir de l'acide anthranilique, lui-même produit à partir de la KYN sous l'effet de l'enzyme *kynuréninase* (Voir **Fig. 33** + **Fig. 24** pour un rappel de l'organisation de la voie dans son entier) (Alberati-Giani, Ricciardi-Castagnoli *et coll.* 1996; Toma, Nakamura *et coll.* 1997). Ainsi, nos résultats pourraient indiquer que l'UCMS augmente l'activité de la *KMO* dans l'amygdale et le striatum (ce qui expliquerait l'augmentation de 3HK) sans altérer l'activité de la *KASE* (pas d'effet sur la concentration en QUIN). Alors que dans le cortex cingulaire, l'UCMS diminue l'activité de la *KMO* (3HK est diminué) alors qu'il augmente l'activité de la *KASE* (QUIN est augmenté).

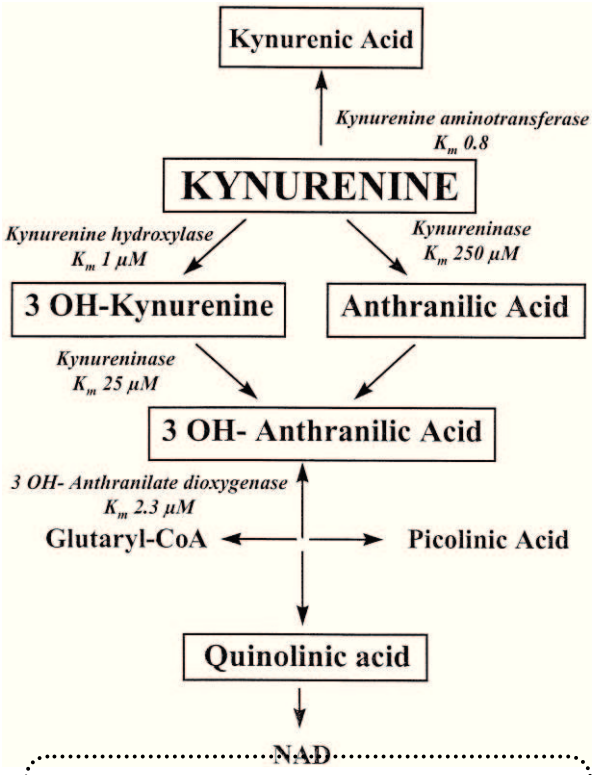


Fig. 33 : ***Voies de synthèse de l'acide quinolinique.*** *D'après Moroni, 1999.*

A la lueur de ces nouveaux résultats, il nous faut modifier quelque peu les conclusions émises dans l'article 1 quant à l'implication du métabolisme cérébral

de la KYN dans la physiopathologie des troubles dépressifs. En ce qui concerne l'amygdale et le striatum, nous avions conclu que l'UCMS détournait le métabolisme de la KYN vers la voie de synthèse de QUIN. Même si les mesures des taux de QUIN n'indiquent pas d'augmentation, il n'en reste pas moins que les taux de KYNA sont diminués par l'UCMS, traduisant tout de même un déséquilibre entre les voies 3HK/QUIN et KYNA en défaveur de cette dernière. Étant donné que l'équilibre entre ces deux voies est considéré comme un index pertinent d'excitabilité neuronale (Wu, Guidetti *et coll.* 2000), un tel déséquilibre peut être assimilé à une hausse de l'activité excitatrice dans ces deux structures. Par contre, en ce qui concerne le cortex cingulaire, notre hypothèse d'une baisse de l'activité excitatrice semble être remise en question compte tenu de la hausse de QUIN mise en évidence par les dosages en spectrométrie de masse. Il semblerait que l'UCMS induise le même genre d'altération dans cette structure que dans l'amygdale et le striatum : un déséquilibre en faveur de la voie de synthèse de QUIN et donc une éventuelle hausse de l'excitabilité neuronale.

Une des structures dans laquelle nous nous attendions à observer un effet de l'UCMS est l'hippocampe. En effet, cette structure est sans nul doute la plus étudiée dans le domaine « stress, dépression et cognition », de nombreux changements ayant été observés après un stress chronique, tant au niveau des neurotransmetteurs et de leurs récepteurs, de l'expression des cytokines et de leurs récepteurs, des mécanismes de survie/mort cellulaire (stress oxydant, facteurs neurotrophiques, neurogénèse etc) ou même au niveau structural. Une étude de Goshen *et coll.* a montré que des souris n'exprimant pas de récepteurs à l'IL-1β de type 1 ne présentent pas les altérations bio-comportementales observées chez leurs homologues non-mutées après avoir été confrontées à 5 semaines de stress chronique (Goshen, Kreisel *et coll.* 2007). Ces auteurs ont également observé ce résultat en utilisant des souris surexprimant un antagoniste des récepteurs à l'IL-1. L'IL-1β étant capable d'activer l'IDO (Nisapakultorn, Makrudthong *et coll.* 2009), nous nous attendions à observer une activation de la voie KYN dans l'hippocampe de nos souris UCMS ; or, il semble que ce ne soit pas le cas bien que la diminution de la concentration en TRP suggère une utilisation accrue au sein de la voie KYN. Ici aussi, nous ne pouvons exclure la possibilité que l'ensemble du métabolisme soit activé mais que ceci ne soit pas visible.

<u>À FAIRE</u> :

Déterminer l'activité des enzymes IDO, KAT, KMO et KASE dans chacune des structures étudiées de façon s'affranchir des problèmes méthodologiques liés aux mesures des concentrations en métabolites. Ainsi, nous pourrions déterminer plus précisément les effets de l'UCMS sur la voie KYN dans le SNC.

F. QU'APPREND-ON SUR L'EQUILIBRE ENTRE LES VOIES 5-HT ET KYN DANS LE SNC ?

Nous avons vu précédemment que l'activation de la voie KYN, même quand elle est accompagnée d'une baisse de la concentration en TRP, n'est pas suffisante pour diminuer la concentration cérébrale en TRP et, par conséquent, ne peut pas entraîner de diminution de la concentration en 5-HT dans le cerveau par ce mécanisme. D'ailleurs ceci est en accord avec le fait que la concentration en TRP plasmatique n'est pas corrélée à la concentration en TRP dans le LCR (Moreno, Parkinson *et coll.* 2010; Raison, Dantzer *et coll.* 2010). A ce niveau de la discussion, il est important de rappeler que lorsqu'on parle de déplétion en TRP induite par activation de la voie KYN via l'IDO, il est question de déplétion locale et non pas d'une déplétion systémique susceptible d'affecter le SNC (Voir la partie « IDO et immuno-régulation » de l''introduction pour plus de détails). Ainsi, il parait plus pertinent d'étudier les liens entre TRP, KYN et 5-HT de façon plus « locale », c'est-à-dire au sein de structures corticolimbiques telles que celles que nous avons étudiées dans l'expérience présentée. A ce niveau, nous avons pu montrer que la concentration en 5-HT est inversement corrélée à la concentration en KYN quelque soit la structure étudiée. D'autre part, il est intéressant de noter que ces corrélations sont présentes aussi bien chez les souris non-stressées que chez les souris UCMS, ce qui indique que le stress chronique ne perturbe pas cet équilibre entre les deux voies. Prises dans leur ensemble, ces données montrent l'importance de la notion d'équilibre entre les voies 5-HT et KYN dans le SNC. A partir de ce résultat on peut imaginer que certains individus seraient plus « sérotoninergiques », c'est-à-dire qu'ils auraient tendance à utiliser le TRP pour produire de la 5-HT, alors que d'autres seraient plus « kynuréninergiques » et se verraient plus aptes à synthétiser de la KYN à partir du TRP disponible. Compte tenu de l'implication de la 5-HT dans la régulation de l'humeur et des processus émotionnels, il pourrait être intéressant de vérifier si des individus de la première catégorie diffèrent d'un point de vue comportemental des individus de la deuxième. Si tel était le cas, on pourrait alors s'interroger sur l'importance de la voie KYN cérébrale dans l'expression des comportements de type anxio-dépressifs. Quelques éléments de réponse seront apportés dans l'article 2 présenté ci-après, au cours duquel nous aborderons les liens existant entre comportement et voie de la KYN.

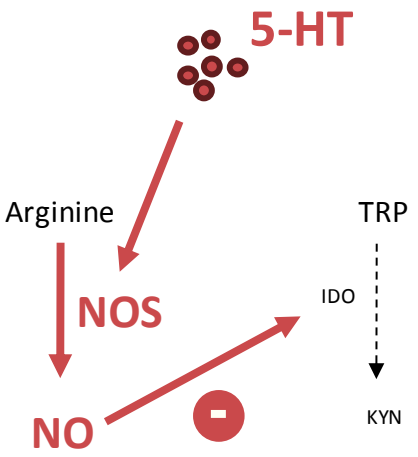


Fig. 34 : ***Lien entre NO, KYN et 5-HT.***

Les corrélations entre les taux de 5-HT et de KYN, très robustes ($r>0.9$ et $p<0.00001$), nous amènent à nous interroger quant aux mécanismes participant à une régulation si précise. Un mécanisme susceptible d'intervenir pourrait bien concerner de façon directe l'enzyme IDO. En effet, il a été montré qu'en plus du TRP, cette enzyme peut métaboliser plusieurs indoleamines comme la tryptamine et la mélatonine mais aussi et surtout le 5-HTP et la 5-HT (Shimizu, Nomiyama *et coll.* 1978) (Voir **Fig. 24**, p109). Ainsi, un tissu exprimant une forte concentration d'IDO présentera logiquement un taux de 5-HT diminué. On comprend alors mieux comment une concentration élevée en KYN est associée à un faible taux de 5-HT. Un autre mécanisme de régulation pourrait faire intervenir l'oxyde nitrique (NO) compte tenu des relations assez étroites qu'entretiennent la 5-HT, la KYN et le NO (Cf. **Fig. 34** ci-contre). Des travaux indiquent que le NO est un puissant inhibiteur de l'enzyme IDO (Thomas, Mohr *et coll.* 1994; Alberati-Giani, Malherbe *et coll.* 1997). En parallèle, il a été montré que la 5-HT est capable d'activer la forme neuronale de la *nitric oxide synthase* (NOS), augmentant ainsi la concentration locale en NO (Breard, Sari *et coll.* 2007). Ainsi, des taux élevés de 5-HT, en activant la synthèse de NO, entraîneraient une inhibition de l'enzyme IDO et donc une plus faible concentration de KYN, expliquant ainsi les corrélations robustes observées entre les taux de 5-HT et de KYN dans les 4 structures étudiées.

L'ensemble des données présenté dans cette première étude montre bien que le métabolisme du TRP au sein de la voie KYN est affecté par une exposition chronique à des facteurs de stress socio-environnementaux tels que ceux auxquels l'Homme peut être confronté au quotidien. Certaines données sont en accord avec les altérations observées en clinique chez les patients dépressifs et nous permettent donc d'augmenter la validité descriptive du modèle UCMS. La suite de notre démarche a été d'étudier l'effet de l'UCMS sur cette voie métabolique d'un point de vue comportemental.

II. VOIE KYN ET MODULATION DU COMPORTEMENT

1. Introduction de l'étude

Après avoir montré que le métabolisme de la KYN est altéré par l'UCMS, nous avons voulu voir si ce détournement métabolique pouvait être relié à l'expression de comportements de type anxio-dépressifs. En effet, compte tenu de la capacité de certains métabolites de la KYN à moduler le fonctionnement cellulaire, soit en modifiant l'équilibre entre processus pro- vs. anti-oxydants soit en modifiant les systèmes de neurotransmission (Voir l'introduction pour plus de détails), nous nous sommes interrogés sur l'implication des changements induits par l'UCMS dans la modulation du comportement. Cette fois encore, cette analyse a été initiée à partir des résultats obtenus en clinique montrant que l'activation de la voie KYN périphérique était positivement corrélée à l'intensité des symptômes dépressifs mesurés par les échelles d'Hamilton (HDRS ou HAM-D) et/ou de Montgomery et Asberg (MARDS). De plus, certains travaux menés chez l'animal mettent en évidence des altérations comportementales en réponse à l'administration intrapéritonéale ou intracérébrale de certains des métabolites de la KYN.

Tout d'abord, je tiens à signaler que les données utilisées dans l'article suivant ont été obtenues lors de la même expérience que celle présentée dans l'article 1. Dans ce premier article, nous avons eu une approche d'analyse « par groupe », c'est-à-dire focalisée sur « un individu moyen ». Dans cette étude, l'approche a été « individualiste », c'est-à-dire que nous avons utilisé l'analyse par corrélation afin d'avoir accès à un autre type d'informations tout aussi intéressant qu'une analyse par groupe. Nous avons alors observé que le ratio KYN/TRP périphérique est positivement corrélé à (1) l'expression de comportements de type anxio-dépressifs, (2) aux concentrations en 5-HT et 5-HIAA dans le cortex cingulaire, (3) et négativement corrélé à la concentration en KYNA dans l'amygdale des souris UCMS uniquement. Ces résultats suggèrent qu'après un stress chronique, les souris UCMS ayant la plus forte activation de la voie KYN en périphérie sont aussi celles qui expriment le plus d'altérations comportementales, qui ont un métabolisme sérotoninergique plus élevé dans le cortex cingulaire et qui ont aussi le moins de KYNA dans l'amygdale.

ARTICLE 2 :

EVIDENCE FOR A KEY ROLE OF THE PERIPHERAL KYNURENINE PATHWAY IN THE MODULATION OF ANXIETY- AND DEPRESSION-LIKE BEHAVIOURS IN MICE: FOCUS ON INDIVIDUAL DIFFERENCES.

Anthony Laugeray, Jean-Marie Launay, Jacques Callebert, Alexandre Surget, Catherine Belzung, Pascal R. Barone.

Pharmacology, Biochemistry and Behaviour, En révision.

Evidence for a key role of the peripheral kynurenine pathway in the modulation of anxiety- and depression-like behaviours in mice: focus on individual differences.

Anthony Laugeray [1,2] *, Jean-Marie Launay[3], Jacques Callebert[3], Alexandre Surget[1,2], Catherine Belzung[1,2], Pascal R. Barone[2].

[1] *UMRS INSERM U930, CNRS ERL 3106, Tours, France.*
[2] *Université François Rabelais, Tours, France.*
[3] *Service de Biochimie, Hôpital Lariboisière, CR Claude Bernard, IFR6, Assistance Publique Hôpitaux de Paris, Paris, France.*

Corresponding author : * Anthony Laugeray, INSERM U930 – Bat O – Faculté des Sciences et Techniques - Parc Grandmont, 37200, TOURS.
Tel: +33 (0)2 47 36 69 99; Fax +33 (0)2 47 36 72 85;
Email: alaugeray@yahoo.fr

Running title: Peripheral kynurenine pathway is linked to stress-related behaviors in chronically stressed mice.

Abbreviations used: UCMS, unpredictable chronic mild stress; TRP, tryptophan; KYN, kynurenine, 5-HT, serotonin; 5-HIAA, 5-hydroxyindoleacetic acid; KP, kynurenine pathway; 3HK, 3-hydroxykynurenine; QUIN, quinolinic acid; KYNA, kynurenic acid, IDO, indoleamine-2,3-dioxygenase; TDO, tryptophan-2,3-dioxygenase; IFN, interferon; CC, cingulate cortex; HIPPO, hippocampus; AMY, amygdala; HPLC, high performance liquid chromatography.

Number of words in the abstract = 201
Number of words in the text = 3911
Number of figures = 5
Number of tables = 0
Number of supplementary material = 0

Abstract

We previously reported that confronting mice to the Unpredictable Chronic Mild Stress procedure (UCMS) resulted in peripheral and cerebral alterations of the kynurenine pathway (KP). The present study tested whether KP disturbances are associated with differences in anxiety- and depressive-like behaviors in both naïve and UCMS mice. Non-stressed and UCMS mice were subjected to the elevated plus maze test and to the forced swim test. Mice were then sacrificed for quantification of TRP-5-HT and TRP-KYN metabolites in two corticolimbic structures involved in the regulation of mood (cingulate cortex=CC; amygdala=AMY). We showed that an elevated peripheral KYN/TRP ratio is correlated to the magnitude of anxiodepressive-like phenotypes only in UCMS mice. We also observed, in UCMS mice, that a high peripheral KYN/TRP ratio is associated with an increased metabolism of 5-HT in CC and a reduced level of kynurenic acid (KYNA) in AMY. Our results suggest that elevated peripheral KP might underlie cerebral biochemical changes and might consequently be involved in the modulation of behavior but only in UCMS mice. These findings make more complete the comprehension of the KP involvement in behavioral changes induced by chronic stress and suggest that it could play a crucial role in the modulation of emotional states.

Keywords: Anxiety, depression, animal model, unpredictable chronic mild stress, tryptophan, kynurenine, mice.

Introduction

Since 1970, the major route of tryptophan (TRP) metabolism – the so-called kynurenine pathway (KP) – is suspected to be related to the pathophysiology of depressive disorders (Curzon and Bridges 1970). In this work, Curzon and Bridges reported that patients with major depression presented high levels of urinary kynurenine (KYN) and other KP metabolites like 3-hydroxykynurenine (3HK) (see Fig. 1 for a description of the metabolic pathways of tryptophan). This phenomenon was widely attributed to a glucocorticoid-induced activation of tryptophan-2,3-dioxygenase (TDO), one of the two enzymes converting TRP to KYN. Glucocorticoids are chemical mediators secreted in response to stress through activation of the Hypothalamus-Pituitary-Adrenal (HPA) axis. Stress is a key etiological factor in anxiety and major depressive disorders (Caspi, Sugden *et coll.* 2003) and it is now largely acknowledged that HPA axis abnormalities are one of the major features of depressive disorders leading to high levels of circulating cortisol (Barden 2004). Later on, it was proposed that depressive states could also be associated with immune system dysregulations leading to an increased production of proinflammatory cytokines (Renault, Hoofnagle et coll. 1987; Smith 1991; Myint, Leonard et coll. 2005). Such a phenomenon also occurs in response to stress (Steptoe, Hamer et coll. 2007). Interestingly, it was found that the second enzyme converting TRP to KYN, the indoleamine-2,3-dioxygenase (IDO), is activated by proinflammatory cytokines (O'Connor, Andre *et coll.* 2009). Therefore, two depression-related mechanisms, the neuroendocrine response to stress and inflammatory processes, might activate the KP.

(Fig. 1 could be inserted here)

More recently, a body of evidence has considerably strengthened the hypothesis of a crucial involvement of the KP in the pathophysiology of depression and other stress-related disorders since the KYN/TRP ratio was found to be increased in the blood of patients suffering from major depression (Maes, Verkerk *et coll.* 2002; Myint, Kim *et coll.* 2006). This measure is widely used to examine the activity of the KP because it has been shown to be strongly correlated with TDO/IDO activity (Moreau, Lestage *et coll.* 2005; O'Connor, Lawson *et coll.* 2008). It is interesting to note that such an increased KYN/TRP ratio was also observed in patients suffering from other diseases in which depressive symptoms are commonly observed. This is the case in cancer patients chronically treated with interferon α (IFNα) – a proinflammatory cytokine used because of its strong immunomodulatory and antiviral effects – who developed depressive symptoms as side effects (Wichers, Koek *et coll.* 2005; Vignau, Costisella *et coll.* 2009). In those patients, it was shown that the intensity of depressive symptoms was positively correlated with the KYN/TRP ratio, implying that patients having higher peripheral KP activity were also those presenting the most severe symptoms. Animal studies have also strongly contributed to support this assumption as it was found that an elevated peripheral KP (measured by the KYN/TRP ratio) was related to expression of depression-like behaviors in the forced swim test (FST) while its inhibition resulted in a reduction of these behaviors (O'Connor, Lawson *et coll.* 2008). In addition, we have recently demonstrated that confronting mice to the Unpredictable

Chronic Mild Stress (UCMS) – an animal model of stress-induced depression – promoted an increase of the KYN/TRP ratio at the peripheral level (Laugeray, Launay et coll. 2010). Peripheral KYN can be taken-up from blood to brain, where it is further metabolized along two distinct pathways (see Fig. 1). It is transformed to quinolinic acid (QUIN) and kynurenic acid (KYNA) that are interesting as modulators of emotional states since they respectively increase and decrease the extracellular level of glutamate (Tavares, Schmidt *et coll.* 2005; Wu, Pereira *et coll.* 2009) which has been shown to be involved in anxiety and stress-related disorders (Cortese and Phan 2005; Cortese, Mitchell *et coll.* 2010). Moreover, in our previous work, we have shown that UCMS promoted a corticolimbic region-specific imbalance between QUIN and KYNA pathways suggesting that glutamatergic homeostasis could be differentially modulated by KP changes in these structures (Laugeray, Launay *et coll.* 2010). Therefore, as a source of QUIN and KYNA, peripherally synthesized KYN might likely contribute to modulate neural substrates of emotional states and consequently participate to affective changes observed during depression or other stress-related disorders.

The aim was firstly to verify whether peripheral KP is related to stress-related behaviors in mice confronted to the UCMS. As patients with the highest KYN/TRP ratios are also those having the most intensive depressive symptoms (Maes, Verkerk *et coll.* 2002; Wichers, Koek *et coll.* 2005), we expected to obtain a similar link between behavior and peripheral KP activity measured by the KYN/TRP ratio in mice. Secondly, given that serotoninergic metabolism has long been implicated in the regulation of emotional states, we checked if peripheral KP is related to changes in 5-HT neurochemistry by measuring 5-HT and 5-HIAA levels. Thirdly, because of their modulating role on glutamatergic neurotransmission which is importantly involved in emotional reactivity (Cortese and Phan 2005; Kugaya and Sanacora 2005), we checked if cerebral QUIN and KYNA contents were correlated to stress related behavior ion UCMS. All measurements were carried out in two corticolimbic structures known to be importantly involved in the regulation of emotional states (cingulate cortex=CC; amygdala=AMY) (Mayberg 1997), and performed in non-stressed mice as a control condition.

It is now widely accepted that mice of the same strain may be very different in terms of behavioral/biochemical response to stress, even if genetically identical, because of epigenetic regulation (Lathe 2004; Koolhaas 2008). Therefore, confronting mice to aversive situations may lead to inconsistent results if individual differences are not taken into account. That is why we used a correlative approach rather than the classical intergroup comparison. Moreover, this kind of analyses will bring more informative data on the extent to which peripheral KP is linked to the modulation of stress-related behaviors and brain chemistry in both normal and chronic stress conditions.

Materials and methods

First of all, it is important to keep in mind that mice studied in this report are the same as those for which biochemical data have already been reported (Laugeray, Launay *et coll.* 2010). That is the reason why mean/median values are not provided in this report.

***Animals*.** Male BALB/c mice aged of 2 months were purchased from Centre d'Elevage Janvier (Le Genest Saint Isle, France). Animals were group-housed (n=5 per cage) until the beginning of the experiments and maintained under standard laboratory conditions (12h/12h light-dark cycle - on at 8:00/off at 20:00 -, 22±1°C, food and water *ad libitum*). All animal care and treatment were in accordance with the European Communities Council Directive of 24 November 1986 (86/609/EEC).

General procedure

On their arrival, mice were kept in the laboratory for two weeks before the onset of the experiments. A 6-week UCMS procedure was then conducted on half of the mice (n=14). UCMS exposed mice were isolated in small individual cages (24 cm × 11 cm × 12 cm), while non-stressed control mice (n=15) were housed in groups of 5 in standard laboratory cages (42 cm × 28 cm × 18 cm). The day after the end of UCMS, mice behavior was assessed as follow: elevated plus maze test (EPM) on the first day and forced swim test (FST) on the second day. One day after the last behavioral assay, mice were sacrificed and relevant peripheral/brain tissues were collected. Then, neurochemical analyses were performed. The experimental design is illustrated in Fig. 2A.

Unpredictable Chronic Mild Stress (UCMS): It is a variant of the chronic mild stress procedure described by Willner in rats (Willner 1997) and then adapted to mice (Monleon, D'Aquila et coll. 1995). Briefly, mice were recurrently subjected to various psychogenic stressors according to a "random" schedule for a total period of 6 weeks. The stress schedule is detailed on Fig. 2B. The stress procedure did not involve any food or water deprivation. The stressors were: altered bedding (change or removal of sawdust, damp sawdust, substitution of sawdust with 21°C water), cage exchange (mice were placed in the empty cage of another male), altered length and time of light/dark cycle.

Behavioral procedures:

The elevated plus maze (EPM)

The EPM was used because of its documented ability to readily detect the variability of anxiety-like behaviors in rodents (Pellow, Chopin et coll. 1985; Yee, Zhu et coll. 2007). The apparatus was composed of a central part (5x5 cm), two opposing open arms (27x5 cm) and two opposing enclosed arms (27x5x15 cm). The maze was made of black Plexiglas, elevated at a height of 40 cm and the open arms were illuminated by two 20-W white bulbs providing a 50-lx illumination on their

extremities. The test lasted 5 min and began with the placement of mice in the center of the maze, facing an enclosed arm. A video camera mounted above the maze was used to record each trial and to allow a later analysis. The time spent in anxiogenic open arms was used as a conventional spatiotemporal measure of open-arm avoidance. However, given that BALB/c mice are known to strongly express avoidance of open spaces (Anisman, Hayley et coll. 2001) we also assessed ethological measures of risk assessment (time spent in stretched-attend postures + time spent in flat-back approach) also reported to be relevant as an index of anxiety (Rodgers and Johnson 1995; Rodgers, Cao *et coll.* 1997).

The forced swim test (FST)

The FST was performed according to standard published procedures with minor modifications (Porsolt, Bertin *et coll.* 1977; Ducottet, Griebel *et coll.* 2003). Mice were placed into a glass cylinder (12 cm diameter, 25 cm tall) filled to a depth of 10 cm with water (23 °C). A 6 minutes test session was conducted and videotaped for a latter analysis. The time during which mice were immobile was measured during the last 4 minutes of test. A mouse was considered immobile when it floated passively performing only slight movements of its limbs and tail without any gross head movements that could be judged as searching. "Immobility" included slow drifting on the water surface without any initiation of swimming.

Tissue sampling

Brain tissues:

Brain structures were microdissected by a single investigator as previously described (Surget, Wang et coll. 2009). Brains were rapidly removed from CO_2-killed mice and placed in ice-cold slurry of 0.9% NaCl. Rostro-caudal sections (2 mm) were quickly obtained on a brain tissue blocker with slots that served as guides for razor blades. These provided a series of four coronal brain sections from Bregma + 2.4 to - 3.1 that were then microdissected (Fig. 2A). Using the mouse brain atlas of Franklin and Paxinos (1997), CC was dissected from the first section and included prelimbic and cingulate cortices. AMY was obtained from the third section. All samples were immediately frozen and stored at -80°C.

Peripheral tissues:

Lungs were removed just after the brain was extracted from the mice skull (by another investigator) and immediately frozen and stored at -80°C.

Biochemical measurements of TRP metabolites.

TRP, 5-HT and 5-HIAA were determined by high-performance liquid chromatography (HPLC) using the method of Kema et al. (Kema, Schellings et coll. 1993). KYN was measured using HPLC as described by Fujigaki et al (Fujigaki, Saito et coll. 1998). KYN/TRP ratio was calculated from absolute concentrations of KYN and TRP. KYNA was purified as previously described in Moroni et

al., 1988 (Moroni, Russi *et coll.* 1988) and quantified using HPLC with a post column derivatization method (Swartz, During *et coll.* 1990). QUIN was measured in tissue homogenates using mass-fragmentography as previously reported (Moroni, Lombardi *et coll.* 1984; Heyes and Markey 1988).

Statistics.

It is important to keep in mind that our goal is not to make comparisons between non-stressed and UCMS mice but rather to explore the extent to which peripheral KP could be related to both emotional reactivity and brain chemistry in each group. Consequently, Spearman rank correlation coefficients were used to characterize the link between emotional reactivity in the EPM/FST and peripheral KP on the one hand and between neurochemical parameters and peripheral KP on the other. Given that calculating numerous correlations increases the risk of a type I error, i.e., to erroneously conclude the presence of a significant correlation, all reported p-value were Bonferroni-corrected (Curtin and Schulz 1998).

(Fig. 2 could be inserted here)

Results

Link between peripheral KP and anxiety/depression-like behaviors (Fig. 3).

In UCMS mice

The Spearman correlation test indicates that peripheral KP activity, measured by the KYN/TRP ratio, is positively correlated with time spent in risk-assessment in the EPM (r=0.57; p=0.032) and with immobility time in the FST (r=0.66; p=0.014). On the contrary, no correlation was observed between KYN/TRP and the time spent in open arms of the EPM (r=-0.20; p=0.48).

In non-stressed mice

The Spearman correlation test revealed no correlations between peripheral KYN/TRP ratio and any behavioral parameters in the EPM and the FST: time in open arms of the EPM (r=-0.10; p=0.73), time in risk assessment (r=0.03;p=0.92), immobility time in the FST (r=0.07;p=0.80).

(Fig. 3 could be inserted here)

Link between peripheral KP and brain chemistry.

5-HT Metabolism (Fig. 4)

In UCMS mice

A positive correlation was found between the peripheral KYN/TRP ratio and the concentration of 5-HT in CC (r=0.56; p=0.04). While a similar positive correlation was observed between KYN/TRP and

5-HIAA in CC (r=0.64; p=0.02), no such associations were seen with 5-HT (r=0.19; p=0.65) and 5-HIAA (r=0.33; p=0.27) in AMY.

In non-stressed mice

CC 5-HT (r=0.07; p=0.80), AMY 5-HT (r=-0.22; p=0.44), CC 5-HIAA (r=-0.09;p=0.76) and AMY 5-HIAA (r=-0.08;p=0.78) were not found to be correlated with peripheral KYN/TRP.

(Fig. 4 could be inserted here)

KYN metabolism (Fig. 5)

In UCMS mice

Like KYNA levels in CC, the concentrations of QUIN in CC and AMY were not found to be correlated with peripheral KYN/TRP ratio (r=-0.44; p=0.15 – r=0.04; p=0.88 – r=-0.02; p=0.96 respectively). However, the content of KYNA in AMY was observed to be negatively associated with peripheral KYN/TRP (r=-0.62; p=0.03).

In non-stressed mice

Similarly, neither QUIN nor KYNA were observed to be linked to peripheral KYN/TRP in any of the two structures investigated: CC QUIN (r=-0.08; p=0.77), AMY QUIN (r=0.08; p=0.77), CC KYNA (r=0.07; p=0.80) and AMY KYNA (r=0.20; p=0.50).

(Fig. 5 could be inserted here)

Discussion

Given that clinical evidence suggest a close association between anxiety/depression symptoms and elevated peripheral KP activity, we investigated the extent to which peripheral KP could be related to both behavioral and biochemical parameters in both UCMS and non-stressed mice. We showed that mice with a high peripheral KP activity are also those that express more anxiety-like and depressive-like behaviors, but this association is only seen in UCMS mice. Moreover, we found that these mice also have higher levels of 5-HT and 5-HIAA in CC and lower levels of KYNA in AMY, which could likely underlie the expression of anxiety and depressive-like behavioral patterns.

Role of the peripheral KP in the modulation of anxio-depressive states

Peripheral KP activity, mediated by TDO/IDO activation, seems to play a key role in the modulation of affective states both in humans and rodents (Moreau, Andre *et coll.* 2008; O'Connor, Lawson *et coll.* 2008; O'Connor, Lawson *et coll.* 2009). Several clinical works reported an increased activity of the KP in the plasma of patients experiencing anxiety/depression (Maes, Verkerk *et coll.* 2002; Myint, Kim *et coll.* 2006). Similarly, a large preclinical evidence suggests that activation of the peripheral KP is related to the expression of a depressive-like syndrome (O'Connor, Lawson *et coll.* 2008). Despite these data, the question of the respective roles of peripheral and brain KP in these effects was left unresolved. With regard to this question, important clues can be provided by our results. Indeed, we

previously showed that peripheral KP is activated after a 6-week period of UCMS (Laugeray, Launay *et coll.* 2010). However, no link with emotional changes was established because behavioral data were missing. In the present study, we observe that UCMS-mice having higher peripheral KP activity express more risk assessment behaviors in the EPM and are more resigned in the FST. Interestingly this result is not observed in non-stressed animals, indicating that activity of the peripheral KP is obviously only involved in the modulation of UCMS-induced behavioral responses. These findings are in agreement with those of O'Connor *et al.* who found that non-stressed mice receiving a systemic administration of KYN expressed more pro-depressant behaviors in the FST (O'Connor, Lawson *et coll.* 2008). In addition, our results are also in accordance with those of Lapin *et al.* who reported a raised expression of anxiety-like behaviors in non stressed mice after KYN administration (Lapin 2003). One can suppose that such conditions (administration of pharmacological doses) are likely to mimic an important activation of the KP, maybe more than it is during UCMS, and may consequently alter behavior through alterations of cerebral functioning, possibly through high levels of toxic KYN metabolites such as 3HK that is a potent generator of free radicals (Okuda, Nishiyama *et coll.* 1998; Goldstein, Leopold *et coll.* 2000). In line with such a hypothesis are recent results showing that oxidative stress is directly linked to stress-related behaviors in mice (Rammal, Bouayed *et coll.* 2008; Rammal, Bouayed *et coll.* 2010).

Peripheral KP activity is related to brain 5-HT neurochemistry

These findings raise the question of by what mechanisms a high peripheral KP activity could promote stress-related behaviors in UCMS mice. Several hypotheses have been formulated to answer this question. Some authors proposed that activated KP could deplete circulating TRP and then reduce brain 5-HT synthesis inducing serotonin-depletion-related behavioral abnormalities (Konsman, Parnet *et coll.* 2002; Myint and Kim 2003). But we show here that it is obviously not the case. Indeed, if this assumption was true we should have obtained a negative correlation between cerebral 5-HT levels and peripheral KYN/TRP ratio which is not the case. On the contrary we found a positive correlation between CC 5-HT and the peripheral KYN/TRP ratio. This is in agreement with our previous study in which we did not observe any effect of UCMS-related KP activation on brain 5-HT metabolism (Laugeray, Launay *et coll.* 2010). This demonstrates that behavioural differences observed in these mice are not due to depleted levels of 5-HT. Interestingly, we report a more elevated level of 5-HT and 5-HIAA in the CC of UCMS mice presenting a high peripheral KP activity.

CC is a part of the medial prefrontal cortex (mPFC) and it is well established that mPFC is responsive to stressors (Bland, Hargrave et coll. 2003). At a behavioral level, 5-HT in the mPFC has been implicated in stress-related anxiety and fear. 5-HT efflux has been shown to be increased in this structure as a result of the psychological stress induced by conditioned fear (Hashimoto, Inoue et coll. 1999) or by the confrontation to aversive situations such as an elevated platform (Rex, Marsden et coll. 1993). Moreover, it has been argued that uncontrollable stress produced anxiety associated with

increases in extracellular 5-HT (Bland, Hargrave *et coll.* 2003). According to these data, one can suppose that a high peripheral KP could be related to negative affective states induced by UCMS as we found high levels of 5-HT and 5-HIAA in the CC of UCMS having the highest peripheral KYN/TRP ratio. This is in agreement with present findings showing that UCMS mice having a high peripheral KP activity express more anxiety- and depression-like behaviors. Taken together, these data indicate that, during pathological conditions such as chronic stress, activated peripheral KP might be associated with both behavioral and cerebral serotoninergic changes.

Cerebral KP and modulation of stress-related behaviors

To explain the link between a high peripheral KP activity and the rise in anxio-depressive behaviors, it was also suggested that neuroactive compounds further produced along the KP could be of importance as some of them are known to modulate glutamatergic neurotransmission. This is the case for QUIN and KYNA that act respectively as pro- and anti-glutamatergic compounds (Connick and Stone 1988; Hilmas, Pereira *et coll.* 2001).

A new point that is put forward in this study is the involvement of cerebral KP in the modulation of emotional reactivity. Indeed, we show that, in addition to be related to both behavioral and cerebral serotoninergic changes in UCMS mice, peripheral KP is also associated with cerebral KP changes. Indeed, the level of KYNA in AMY was found to be negatively correlated with the peripheral KYN/TRP ratio, suggesting that UCMS mice having an elevated peripheral KP activity are also those that have the lowest levels of KYNA in AMY. This is of particular importance considering the role of KYNA. Initially described as a broad spectrum antagonist of ionotropic glutamate receptors (Perkins and Stone 1982), KYNA was later shown to block the glycine site of the NMDA receptor with much higher potency (Kessler, Terramani et coll. 1989). However, KYNA is unlikely to inhibit this site under physiological conditions (Hilmas, Pereira *et coll.* 2001). Rather, endogenous KYNA (at the nanomolar range) can exert its anti-glutamatergic action by antagonizing α7 nicotinic receptors (Hilmas, Pereira *et coll.* 2001). Indeed, microdialysis studies show that nanomolar concentrations of KYNA are able to reduce the extracellular content of glutamate in prefrontal cortex (Wu, Pereira *et coll.* 2009) and striatum (Carpenedo, Pittaluga et coll. 2001), resulting in a decrease of glutamate-related excitatory effect. What is interesting regarding our study is that the mean KYNA concentration is about 30 nM regardless of the structure, which is in the same range that those reported in the work of Wu *et al.*. Therefore, one can suppose that the lowered level of KYNA observed in the amygdala of UCMS mice with a high peripheral KP activity can locally promote a neuronal excitation mediated by an increased glutamate release. A rise in excitatory activity within the AMY is known to strongly activate the stress response system (Herman, Ostrander et coll. 2005) and then to be responsible for the expression of stress-related behaviors; that is in agreement with our finding that these mice express stress-related behaviors more importantly. Moreover, such a hypothesis is in accordance with numerous works highlighting the crucial role of glutamatergic neurotransmission in the etiology and

the pathophysiology of anxiety (Simon and Gorman 2006; Mathew, Price *et coll.* 2008; Barkus, McHugh *et coll.* 2009) and depressive symptoms (Sanacora, Zarate et coll. 2008; Hashimoto 2009; Skolnick, Popik et coll. 2009).

Conclusion

We previously reported that confronting mice to recurrent psychogenic stressors resulted in the increase of the peripheral KYN/TRP ratio traducing an activation of the peripheral KP. With the present study, we are able to go into detail by showing that UCMS mice having higher peripheral KP activity are also those that have 1) higher expression of stress-related behaviors in the EPM and the FST, 2) increased 5-HT metabolism in CC and 3) reduced level of KYNA in AMY. The correlative approach, however, precludes any conclusion as to whether the variations revealed in this study are causally linked to the observed behavioral variations (or *vice versa*).

These results might be of importance regarding the comprehension of the complex role played by peripheral alterations in the occurrence of emotional disturbances induced by chronic stress. Beyond the functional implication of the peripheral KP in behavior, we also modestly contributed to better understand the role of the cerebral KP in behavioural changes observed in response to a chronic stress exposure by showing that corticolimbic modifications of KP metabolites may be related to stress-related disorders in chronically stressed animals. Even if several lines of evidence point out the glutamatergic system as a key factor between KP alterations and behavioral changes, further experiments are needed to fully validate this assumption.

The fact that the KP is under the control of both the neuroendocrine and immune systems, two of the most important physiological systems involved in the response to stress, and that it is able to modulate corticolimbic systems of neurotransmission, makes this metabolic pathway a relevant candidate for explaining alterations encountered during chronic stress.

Financial Disclosures

A. Laugeray, JM. Launay, J Callebert, A. Surget and P. Barone report no biomedical financial interests or potential conflicts of interests. Catherine Belzung is a Consultant for Takeda.

REFERENCES

Anisman, H, Hayley, S, Kelly, O, Borowski, T, Merali, Z. Psychogenic, neurogenic, and systemic stressor effects on plasma corticosterone and behavior: mouse strain-dependent outcomes. Behav Neurosci 2001;115:443-454.

Barden, N. Implication of the hypothalamic-pituitary-adrenal axis in the physiopathology of depression. J Psychiatry Neurosci 2004;29:185-193.

Barkus, C, McHugh, SB, Sprengel, R, Seeburg, PH, Rawlins, JN, Bannerman, DM. Hippocampal NMDA receptors and anxiety: At the interface between cognition and emotion. Eur J Pharmacol 2009.

Bland, ST, Hargrave, D, Pepin, JL, Amat, J, Watkins, LR, Maier, SF. Stressor controllability modulates stress-induced dopamine and serotonin efflux and morphine-induced serotonin efflux in the medial prefrontal cortex. Neuropsychopharmacology 2003;28:1589-1596.

Carpenedo, R, Pittaluga, A, Cozzi, A, Attucci, S, Galli, A, Raiteri, M, Moroni, F. Presynaptic kynurenate-sensitive receptors inhibit glutamate release. Eur J Neurosci 2001;13:2141-2147.

Caspi, A, Sugden, K, Moffitt, TE, Taylor, A, Craig, IW, Harrington, H, McClay, J, Mill, J, Martin, J, Braithwaite, A, Poulton, R. Influence of life stress on depression: moderation by a polymorphism in the 5-HTT gene. Science 2003;301:386-389.

Connick, JH, Stone, TW. Quinolinic acid effects on amino acid release from the rat cerebral cortex in vitro and in vivo. Br J Pharmacol 1988;93:868-876.

Cortese, BM, Mitchell, TR, Galloway, MP, Prevost, KE, Fang, J, Moore, GJ, Uhde, TW. Region-specific alteration in brain glutamate: Possible relationship to risk-taking behavior. Physiol Behav 2010;99:445-450.

Cortese, BM, Phan, KL. The role of glutamate in anxiety and related disorders. CNS Spectr 2005;10:820-830.

Curtin, F, Schulz, P. Multiple correlations and Bonferroni's correction. Biol Psychiatry 1998;44:775-777.

Curzon, G, Bridges, PK. Tryptophan metabolism in depression. J Neurol Neurosurg Psychiatry 1970;33:698-704.

Ducottet, C, Griebel, G, Belzung, C. Effects of the selective nonpeptide corticotropin-releasing factor receptor 1 antagonist antalarmin in the chronic mild stress model of depression in mice. Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry 2003;27:625-631.

Fujigaki, S, Saito, K, Takemura, M, Fujii, H, Wada, H, Noma, A, Seishima, M. Species differences in L-tryptophan-kynurenine pathway metabolism: quantification of anthranilic acid and its related enzymes. Arch Biochem Biophys 1998;358:329-335.

Goldstein, LE, Leopold, MC, Huang, X, Atwood, CS, Saunders, AJ, Hartshorn, M, Lim, JT, Faget, KY, Muffat, JA, Scarpa, RC, Chylack, LT, Jr., Bowden, EF, Tanzi, RE, Bush, AI. 3-Hydroxykynurenine and 3-hydroxyanthranilic acid generate hydrogen peroxide and promote alpha-crystallin cross-linking by metal ion reduction. Biochemistry 2000;39:7266-7275.

Hashimoto, K. Emerging role of glutamate in the pathophysiology of major depressive disorder. Brain Res Rev 2009.

Hashimoto, S, Inoue, T, Koyama, T. Effects of conditioned fear stress on serotonin neurotransmission and freezing behavior in rats. Eur J Pharmacol 1999;378:23-30.

Herman, JP, Ostrander, MM, Mueller, NK, Figueiredo, H. Limbic system mechanisms of stress regulation: hypothalamo-pituitary-adrenocortical axis. Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry 2005;29:1201-1213.

Heyes, MP, Markey, SP. Quantification of quinolinic acid in rat brain, whole blood, and plasma by gas chromatography and negative chemical ionization mass spectrometry: effects of systemic L-tryptophan administration on brain and blood quinolinic acid concentrations. Anal Biochem 1988;174:349-359.

Hilmas, C, Pereira, EF, Alkondon, M, Rassoulpour, A, Schwarcz, R, Albuquerque, EX. The brain metabolite kynurenic acid inhibits alpha7 nicotinic receptor activity and increases non-alpha7 nicotinic receptor expression: physiopathological implications. J Neurosci 2001;21:7463-7473.

Kema, IP, Schellings, AM, Hoppenbrouwers, CJ, Rutgers, HM, de Vries, EG, Muskiet, FA. High performance liquid chromatographic profiling of tryptophan and related indoles in body fluids and tissues of carcinoid patients. Clin Chim Acta 1993;221:143-158.

Kessler, M, Terramani, T, Lynch, G, Baudry, M. A glycine site associated with N-methyl-D-aspartic acid receptors: characterization and identification of a new class of antagonists. J Neurochem 1989;52:1319-1328.

Konsman, JP, Parnet, P, Dantzer, R. Cytokine-induced sickness behaviour: mechanisms and implications. Trends Neurosci 2002;25:154-159.

Koolhaas, JM. Coping style and immunity in animals: making sense of individual variation. Brain Behav Immun 2008;22:662-667.

Kugaya, A, Sanacora, G. Beyond monoamines: glutamatergic function in mood disorders. CNS Spectr 2005;10:808-819.

Lapin, IP. Neurokynurenines (NEKY) as common neurochemical links of stress and anxiety. Adv Exp Med Biol 2003;527:121-125.

Lathe, R. The individuality of mice. Genes Brain Behav 2004;3:317-327.

Laugeray, A, Launay, JM, Callebert, J, Surget, A, Belzung, C, Barone, PR. Peripheral and cerebral metabolic abnormalities of the tryptophan-kynurenine pathway in a murine model of major depression. Behav Brain Res 2010;210:84-91.

Maes, M, Verkerk, R, Bonaccorso, S, Ombelet, W, Bosmans, E, Scharpe, S. Depressive and anxiety symptoms in the early puerperium are related to increased degradation of tryptophan into kynurenine, a phenomenon which is related to immune activation. Life Sci 2002;71:1837-1848.

Mathew, SJ, Price, RB, Charney, DS. Recent advances in the neurobiology of anxiety disorders: implications for novel therapeutics. Am J Med Genet C Semin Med Genet 2008;148C:89-98.

Mayberg, HS. Limbic-cortical dysregulation: a proposed model of depression. J Neuropsychiatry Clin Neurosci 1997;9:471-481.

Monleon, S, D'Aquila, P, Parra, A, Simon, VM, Brain, PF, Willner, P. Attenuation of sucrose consumption in mice by chronic mild stress and its restoration by imipramine. Psychopharmacology (Berl) 1995;117:453-457.

Moreau, M, Andre, C, O'Connor, JC, Dumich, SA, Woods, JA, Kelley, KW, Dantzer, R, Lestage, J, Castanon, N. Inoculation of Bacillus Calmette-Guerin to mice induces an acute episode of sickness behavior followed by chronic depressive-like behavior. Brain Behav Immun 2008;22:1087-1095.

Moreau, M, Lestage, J, Verrier, D, Mormede, C, Kelley, KW, Dantzer, R, Castanon, N. Bacille Calmette-Guerin inoculation induces chronic activation of peripheral and brain indoleamine 2,3-dioxygenase in mice. J Infect Dis 2005;192:537-544.

Moroni, F, Lombardi, G, Carla, V, Moneti, G. The excitotoxin quinolinic acid is present and unevenly distributed in the rat brain. Brain Res 1984;295:352-355.

Moroni, F, Russi, P, Lombardi, G, Beni, M, Carla, V. Presence of kynurenic acid in the mammalian brain. J Neurochem 1988;51:177-180.

Myint, AM, Kim, YK. Cytokine-serotonin interaction through IDO: a neurodegeneration hypothesis of depression. Med Hypotheses 2003;61:519-525.

Myint, AM, Kim, YK, Verkerk, R, Scharpe, S, Steinbusch, H, Leonard, B. Kynurenine pathway in major depression: Evidence of impaired neuroprotection. J Affect Disord 2006.

Myint, AM, Leonard, BE, Steinbusch, HW, Kim, YK. Th1, Th2, and Th3 cytokine alterations in major depression. J Affect Disord 2005;88:167-173.

O'Connor, JC, Andre, C, Wang, Y, Lawson, MA, Szegedi, SS, Lestage, J, Castanon, N, Kelley, KW, Dantzer, R. Interferon-gamma and tumor necrosis factor-alpha mediate the upregulation of

indoleamine 2,3-dioxygenase and the induction of depressive-like behavior in mice in response to bacillus Calmette-Guerin. J Neurosci 2009a;29:4200-4209.

O'Connor, JC, Lawson, MA, Andre, C, Briley, EM, Szegedi, SS, Lestage, J, Castanon, N, Herkenham, M, Dantzer, R, Kelley, KW. Induction of IDO by bacille Calmette-Guerin is responsible for development of murine depressive-like behavior. J Immunol 2009b;182:3202-3212.

O'Connor, JC, Lawson, MA, Andre, C, Moreau, M, Lestage, J, Castanon, N, Kelley, KW, Dantzer, R. Lipopolysaccharide-induced depressive-like behavior is mediated by indoleamine 2,3-dioxygenase activation in mice. Mol Psychiatry 2008.

Okuda, S, Nishiyama, N, Saito, H, Katsuki, H. 3-Hydroxykynurenine, an endogenous oxidative stress generator, causes neuronal cell death with apoptotic features and region selectivity. J Neurochem 1998;70:299-307.

Pellow, S, Chopin, P, File, SE, Briley, M. Validation of open:closed arm entries in an elevated plus-maze as a measure of anxiety in the rat. J Neurosci Methods 1985;14:149-167.

Perkins, MN, Stone, TW. An iontophoretic investigation of the actions of convulsant kynurenines and their interaction with the endogenous excitant quinolinic acid. Brain Res 1982;247:184-187.

Porsolt, RD, Bertin, A, Jalfre, M. Behavioral despair in mice: a primary screening test for antidepressants. Arch Int Pharmacodyn Ther 1977;229:327-336.

Rammal, H, Bouayed, J, Soulimani, R. A direct relationship between aggressive behavior in the resident/intruder test and cell oxidative status in adult male mice. Eur J Pharmacol 2010;627:173-176.

Rammal, H, Bouayed, J, Younos, C, Soulimani, R. Evidence that oxidative stress is linked to anxiety-related behaviour in mice. Brain Behav Immun 2008;22:1156-1159.

Renault, PF, Hoofnagle, JH, Park, Y, Mullen, KD, Peters, M, Jones, DB, Rustgi, V, Jones, EA. Psychiatric complications of long-term interferon alfa therapy. Arch Intern Med 1987;147:1577-1580.

Rex, A, Marsden, CA, Fink, H. Effect of diazepam on cortical 5-HT release and behaviour in the guinea-pig on exposure to the elevated plus maze. Psychopharmacology (Berl) 1993;110:490-496.

Rodgers, RJ, Cao, BJ, Dalvi, A, Holmes, A. Animal models of anxiety: an ethological perspective. Braz J Med Biol Res 1997;30:289-304.

Rodgers, RJ, Johnson, NJ. Factor analysis of spatiotemporal and ethological measures in the murine elevated plus-maze test of anxiety. Pharmacol Biochem Behav 1995;52:297-303.

Sanacora, G, Zarate, CA, Krystal, JH, Manji, HK. Targeting the glutamatergic system to develop novel, improved therapeutics for mood disorders. Nat Rev Drug Discov 2008;7:426-437.

Simon, AB, Gorman, JM. Advances in the treatment of anxiety: targeting glutamate. NeuroRx 2006;3:57-68.

Skolnick, P, Popik, P, Trullas, R. Glutamate-based antidepressants: 20 years on. Trends Pharmacol Sci 2009;30:563-569.

Smith, RS. The macrophage theory of depression. Med Hypotheses 1991;35:298-306.

Steptoe, A, Hamer, M, Chida, Y. The effects of acute psychological stress on circulating inflammatory factors in humans: a review and meta-analysis. Brain Behav Immun 2007;21:901-912.

Surget, A, Wang, Y, Leman, S, Ibarguen-Vargas, Y, Edgar, N, Griebel, G, Belzung, C, Sibille, E. Corticolimbic transcriptome changes are state-dependent and region-specific in a rodent model of depression and of antidepressant reversal. Neuropsychopharmacology 2009;34:1363-1380.

Swartz, KJ, During, MJ, Freese, A, Beal, MF. Cerebral synthesis and release of kynurenic acid: an endogenous antagonist of excitatory amino acid receptors. J Neurosci 1990;10:2965-2973.

Tavares, RG, Schmidt, AP, Abud, J, Tasca, CI, Souza, DO. In vivo quinolinic acid increases synaptosomal glutamate release in rats: reversal by guanosine. Neurochem Res 2005;30:439-444.

Vignau, J, Costisella, O, Canva, V, Imbenotte, M, Duhamel, A, Lhermitte, M. [Impact of interferon alpha immunotherapy on tryptophan metabolism in patients with chronic hepatitis C. Results of a pilot studies on ten patients]. Encephale 2009;35:477-483.

Wichers, MC, Koek, GH, Robaeys, G, Verkerk, R, Scharpe, S, Maes, M. IDO and interferon-alpha-induced depressive symptoms: a shift in hypothesis from tryptophan depletion to neurotoxicity. Mol Psychiatry 2005;10:538-544.

Willner, P. Validity, reliability and utility of the chronic mild stress model of depression: a 10-year review and evaluation. Psychopharmacology (Berl) 1997;134:319-329.

Wu, HQ, Pereira, EF, Bruno, JP, Pellicciari, R, Albuquerque, EX, Schwarcz, R. The Astrocyte-Derived alpha7 Nicotinic Receptor Antagonist Kynurenic Acid Controls Extracellular Glutamate Levels in the Prefrontal Cortex. J Mol Neurosci 2009.

Yee, BK, Zhu, SW, Mohammed, AH, Feldon, J. Levels of neurotrophic factors in the hippocampus and amygdala correlate with anxiety- and fear-related behaviour in C57BL6 mice. J Neural Transm 2007;114:431-444.

Figures legend

Figure 1: Simplified overview of the tryptophan metabolism. TRP = tryptophan; 5-HT = serotonin; 5-HIAA = 5-hydroxyindoleacetic acid; KYN = kynurenine; TDO = tryptophan-2,3-dioxygenase; IDO = indoleamine-2,3-dioxygenase; 3HK = 3-hydroxykynurenine; QUIN = quinolinic acid, KYNA = Kynurenic acid.

Figure 2: Experimental design. (A) 14 mice were confronted to the *Unpredictable Chronic Mild Stress* (UCMS) regimen during 6 weeks. One day after the last stressor, mice were tested in the elevated plus maze test (EPM) and the forced swim test (FST). Cingulate cortex (CC) and amygdala (AMY) were collected from all the mice for biochemical analyses, one day after the last behavioral test. Representative figures of the brain regions dissected are adapted from Paxinos and Franklin (2001). (B) Detailed schedule of the UCMS.

Figure 3: Correlations between peripheral kynurenine pathway and anxiety/depression-like behaviors in both Unpredictable Chronic Mild Stress and non-stressed mice. Peripheral kynurenine pathway (KP) activity was estimated by measuring the kynurenine to tryptophan (KYN/TRP) ratio in the lungs of both *Unpredictable Chronic Mild Stress* (UCMS) and non-stressed mice. Anxiety and depression-like behaviors were respectively assessed in the elevated plus maze (EPM) test and the forced swim test (FST). (A) Spearman's coefficient and associated p value are reported for each correlation. Bold values indicate a significant correlation ($p<0.05$ Bonferroni-corrected). (B) Significant correlated variables are depicted as dot plots.

Figure 4: Correlations between peripheral kynurenine pathway and cerebral 5-HT metabolism. Peripheral kynurenine pathway (KP) activity was estimated by measuring the kynurenine to tryptophan (KYN/TRP) ratio in the lungs of both *Unpredictable Chronic Mild Stress* (UCMS) and non-stressed mice. 5-HIAA and 5-HT levels were determined in amygdala (AMY) and cingulate cortex (CC) of all mice by HPLC. (A) Spearman's coefficient and associated p value are reported for each correlation. Bold values indicate a significant correlation ($p<0.05$ Bonferroni-corrected). (B) Significant correlated variables are depicted as dot plots.

Figure 5: Correlations between peripheral kynurenine pathway and cerebral kynurenine pathway metabolites. Peripheral kynurenine pathway (KP) activity was estimated by measuring the kynurenine to tryptophan (KYN/TRP) ratio in the lungs of both *Unpredictable Chronic Mild Stress* (UCMS) and non-stressed mice. Quinolinic acid (QUIN) and kynurenic acid (KYNA) levels were determined in amygdala (AMY) and cingulate cortex (CC) as described in "Materials and Methods". (A) Spearman's coefficient and associated p value are reported for each correlation. Bold values indicate a significant correlation ($p<0.05$ Bonferroni-corrected). (B) Significant correlated variables are depicted as dot plots.

Fig. 1

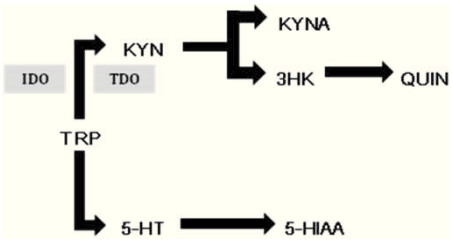
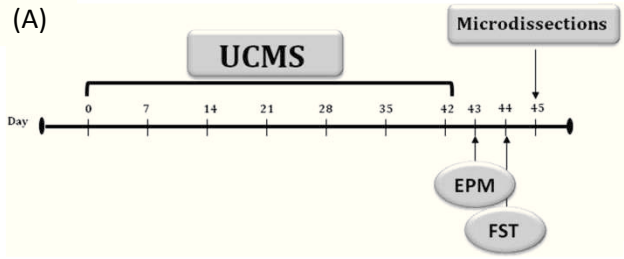
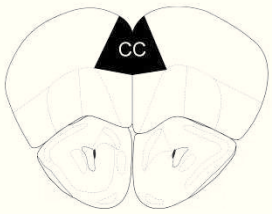


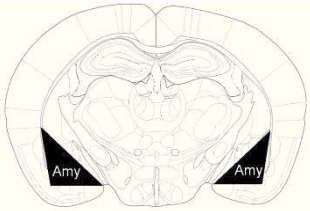
Fig. 2

(A)





Bregma +2,4



Bregma -1,6

(B)

	Day 1	Day 2	Day 3	Day 4	Day 5	Day 6	Day 7
Week 1	Coat state (10h) Damp sawdust (12h30-14h30) Without sawdust (15h30-18h30)	Three changes of sawdust (10h - 11h - Cat fur (15h30-17h)	Bath (10h-11h) Sounds of predators (15h30-16h) Without sawdust (16h-18h)	Restraint (9h30-10h30) 3 changes with rat sawdust (15h - 16h -	Without sawdust (10h-12h30) Reversal of the light-dark cycle	Short succession of light-dark cycles - every 1h (10h-14h)	Without sawdust (12h-14h) Restraint (14h-16h) New sawdust (18h)
Week 2	45° tilt cages (9h-10h) Coat state (11h) Bath (12h30-13h30) Mice, food weighing (15h) Damp sawdust (15h30h-16h30)	Food weighing (24h consumption; 9h) Old mouse sawdust (9h30-11h30) Sounds of predators (12h-12h30) 10sec in water (20°C; 13h) Cat fur (15h-16h)	Reversal of the light-dark cycle Social stress (10h) Souds of predator (11h-11h30) Social stress (14h) Rat sawdust (16h-18h)	Without sawdust (9h-10h30) Restraint (10h30-11h30) New sawdust (14h)	Short succession of light-dark cycles - every 1h (14h-18h)	Short succession of light-dark cycles - every 1h (10h-14h)	Reversal of the light-dark cycle
Week 3	Coat state (10h) Damp sawdust (10h30-12h30) Mice, food weighing (15h) Restraint (15h16h)	Food weighing (24h consumption; 9h) 45° tilt cages (11h-14h) Potent light (17h-18h)	Without sawdust (13h) Social stress (15h)	Reversal of the light-dark cycle	New sawdust (10h) Social stress (15h)	Short succession of light-dark cycles - every 1h (9h-18h)	Cat fur (12h-14h) Social stress (14h) Damp sawdust (15h-
Week 4	Coat state (10h) Rat defecations in cages (10h30) Cat fur (14h) Damp sawdust (15h17h)	Food weighing (24h consumption; 9h) New sawdust (9h) 45° tilt cages (11h-14h) Old rat sawdust (14h)	New sawdust (9h) Bath (10h-11h)	45 ° tilt cages (10h-13h) Sounds of predators (14h-14h30) Damp sawdust (15h30-16h30) Social stress+new sawdust (16h)	Short succession of light-dark cycles - every 1h (9h-18h)	Reversal of the light-dark cycle	45° tilt cages (11h-13h) Without sawdust (13h-15h) Social stress (15h)
Week 5	Coat state (10h) New sawdust (14h) Rat defecations in cages (16h30) Social stress (17h30)	Food weighing (24h consumption; 9h) 45° tilt cages (14h- Social stress (15h) Restraint (15h30-17h30)	10sec in water (20°C; 11h) Restraint (12h30- Cat fur (13h30) Damp sawdust (14h30-16h)	New sawdust (9h) New sawdust (11h30)	Social stress (14h) Damp sawdust (15h- Social stress (16h) New sawdust (16h30)	Reversal of the light-dark cycle	Short succession of light-dark cycles - every 1h (9h-18h)
Week 6	Coat state (10h) Social stress (14h) 45° tilt cages (14h30-17h30)	Food weighing (24h consumption; 9h) 45° tilt cages (10h- Without saw dust (15h)	New sawdust (9h) Potent light (9h-12h) Bath (12h-14) Restraint (14h-16h)	Reversal of the light-dark cycle	Social stress (14h) 45° tilt cages (14h-	Short succession of light-dark cycles - every 1h (9h-	45° tilt cages (14h-16h) Restraint (17h-18h)

Fig. 3

(A)

	UCMS			NON STRESSED		
	EPM		FST	EPM		FST
	Time in open arms (s)	Time in risk assessment (s)	Immobility time (s)	Time in open arms (s)	Time in risk assessment (s)	Immobility time (s)
Peripheral KP activity (KYN/TRP ratio)	r=-0.20 p=0.48	**r=0.57 p=0.032**	**r=0.66 p=0.014**	r=-0.10 p=0.73	r=0.03 p=0.92	r=0.07 p=0.80

(B)

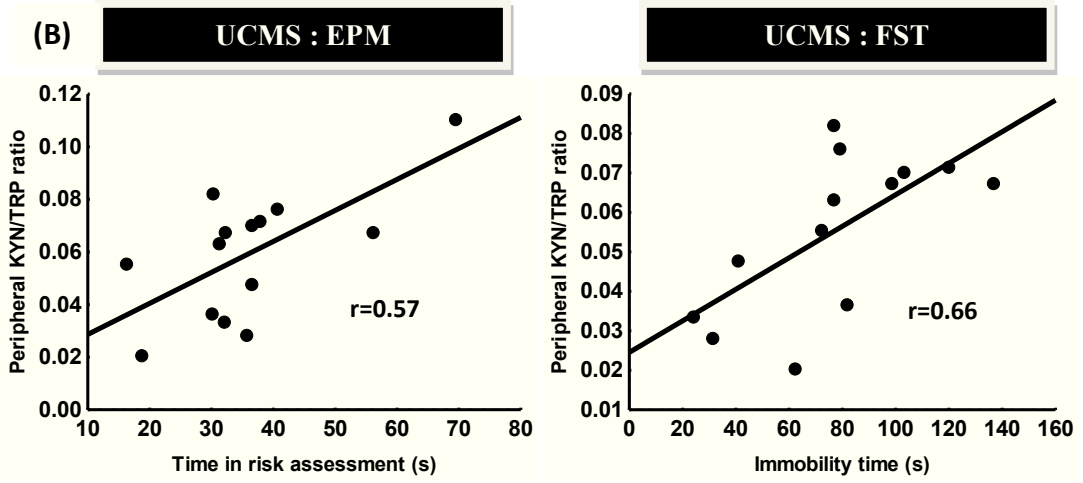


Fig. 4

(A)

	UCMS				NON STRESSED			
	5-HT (pmol/mg)		5-HIAA (pmol/mg)		5-HT (pmol/mg)		5-HIAA (pmol/mg)	
	CC	AMY	CC	AMY	CC	AMY	CC	AMY
Peripheral KP activity (KYN/TRP ratio)	**r=0.56 p=0.04**	r=0.19 p=0.65	**r=0.64 p=0.02**	r=0.33 p=0.27	r=0.07 p=0.80	r=-0.22 p=0.44	r=-0.09 p=0.76	r=-0.08 p=0.78

(B)

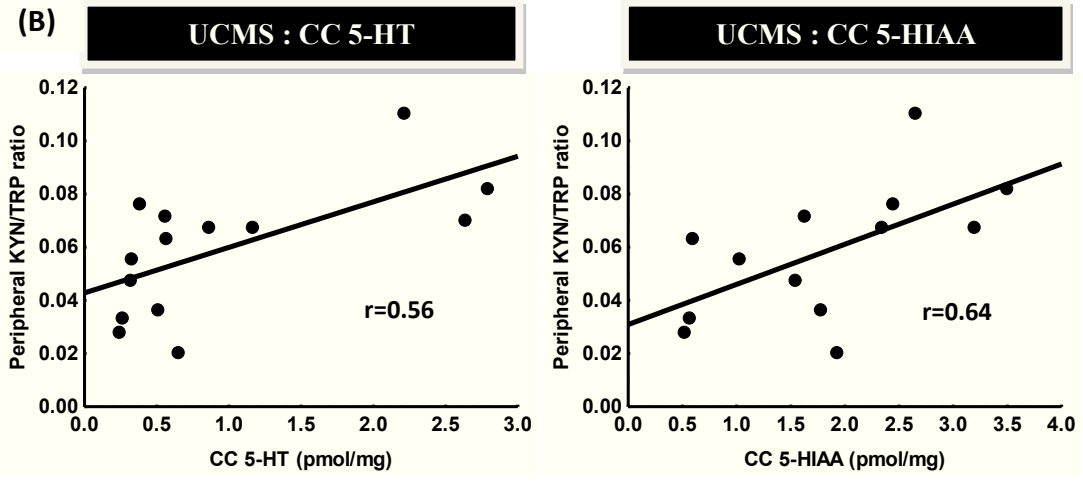
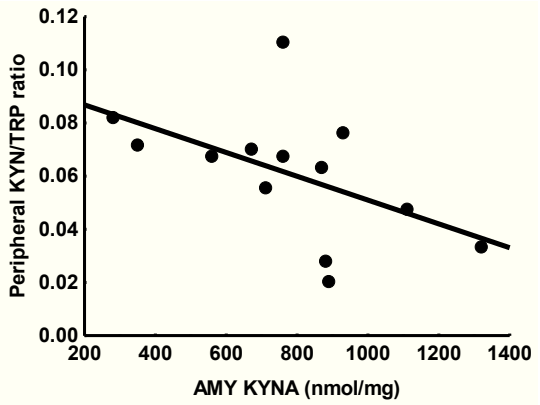


Fig. 5

(A)

	UCMS				NON STRESSED			
	QUIN (nmol/mg)		KYNA (pmol/mg)		QUIN (nmol/mg)		KYNA (pmol/mg)	
	CC	AMY	CC	AMY	CC	AMY	CC	AMY
Peripheral KP activity (KYN/TRP ratio)	r=0.04 p=0.88	r=-0.02 p=0.96	r=-0.44 p=0.15	**r=-0.62 p=0.03**	r=-0.08 p=0.77	r=0.08 p=0.77	r=0.07 p=0.80	r=0.20 p=0.50

(B) **UCMS : AMY KYNA**



3. Résultats complémentaires

A. EFFETS COMPORTEMENTAUX DE L'UCMS

Même si notre analyse est basée sur l'étude des relations entre le métabolisme périphérique de la KYN et l'expression de comportements de type anxio-dépressifs, il peut être intéressant d'apprécier l'effet de l'UCMS sur les variables comportementales utilisées dans cette étude. Les résultats des items comportementaux relevés dans le test de la croix surélevée (EPM) et le test de la nage forcée (FST) sont présentés ci-dessous :

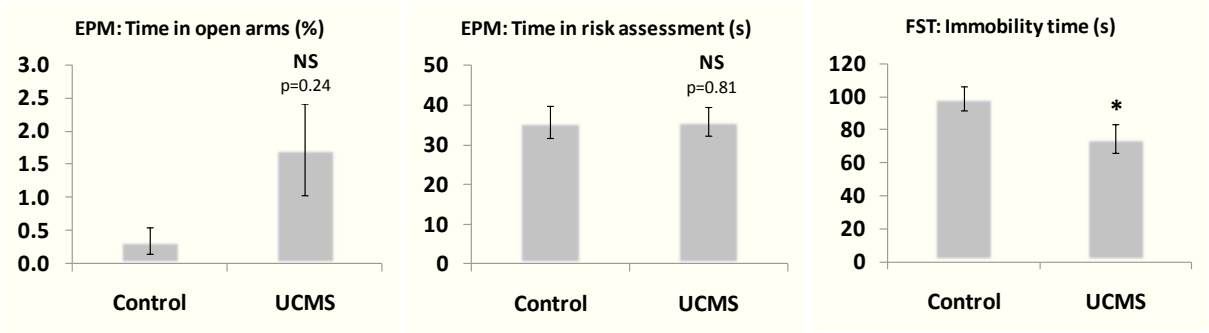


Fig. 35 : ***Effet de l'UCMS sur différentes variables comportementales mesurées dans le test de la coix surélevée (EPM) et le test de la nage forcée (FST).***
*Moy ± sem; Control (n=15) ; UCMS (n=14); *p<0.05*

Le test de Mann-Whitney indique que les deux groupes ne diffèrent pas quant au pourcentage de temps passé dans les bras ouverts et au temps passé à exprimer des comportements de type « risk-assessment » (Voir les valeurs de p sur les graphiques). Par contre, dans le FST, les souris UCMS sont moins immobiles que les souris contrôles (p=0.047 ; PS=0.7).

4. Discussion

A. LES MODIFICATIONS COMPORTEMENTALES INDUITES PAR L'UCMS

D'après les données présentées ci-dessus (Cf. **Fig. 35** ci-dessus), il semble que l'UCMS n'entraîne pas de changements significatifs du comportement dans le test de la croix surélevée. Cependant, il est difficile de pouvoir émettre une conclusion quant à un éventuel effet de l'UCMS sur le niveau d'anxiété des souris compte tenu du très faible taux de sortie dans les bras ouverts – qui est un index d'anxiolyse. En effet, notre pourcentage est anormalement bas (moins de 1%) en comparaison à d'autres études dans lesquelles le pourcentage de temps passé dans les bras ouverts se situe aux alentours de 20% (Griebel, Belzung *et coll.* 2000; Iwata, Kikusui *et coll.* 2007; Lalonde and Strazielle 2008). Ces divergences proviennent vraisemblablement de différences méthodologiques rendant la situation plus ou moins aversive pour les animaux. C'est notamment le cas pour l'intensité lumineuse qui varie de façon importante d'une étude à l'autre et qui semble influencer de façon significative le comportement des animaux dans ce dispositif (Morato and Castrechini 1989; Garcia, Cardenas *et coll.*

2005). Dans notre cas, le taux de sortie dans les bras ouverts chez les souris contrôles est si bas que l'effet plancher ne permet pas la détection d'un effet anxiogénique. Le niveau d'anxiété peut également être apprécié par un autre type de mesures, ayant trait à une analyse plus « éthologique » du comportement : la mesure des comportements de « risk assessment » (Rodgers and Johnson 1995; Rodgers, Cao *et coll.* 1997). Chez les rongeurs, ces comportements font partie du répertoire défensif et permettent d'évaluer le danger d'une situation. Ainsi, plus les animaux expriment ce genre de comportements, plus ils seront qualifiés « d'anxieux ». Nos résultats montrent que l'UCMS ne modifie pas le niveau d'expression des comportements de risk-assessment. A la vue de ces résultats, la première conclusion qui nous vient à l'esprit est que l'UCMS ne perturbe pas le niveau d'anxiété des souris. Par contre, on peut voir que leur comportement dans le test de la nage forcée est altéré : l'UCMS induit une augmentation de l'immobilité. Ce test est sensé mesurer l'état de résignation de l'animal, c'est-à-dire qu'une hausse de l'immobilité est interprétée comme une baisse de la motivation à s'extraire de la situation aversive. Ce test est en général utilisé pour mettre en évidence l'effet antidépresseur d'une molécule après un traitement aigu (effet antidépresseur si l'immobilité est diminuée par le traitement). A partir de la, on peut supposer que « l'état dépressif » induit par l'UCMS entraîne une résignation plus importante et par conséquent augmente l'immobilité des animaux. Cependant, nos données montrent l'inverse c'est-à-dire un effet hyperlocomoteur. Même si d'autres études ont mis en évidence cet effet « à contre-courant » du stress chronique dans d'autres paradigmes expérimentaux (Strekalova and Steinbusch 2010), il est préférable d'inhterpréter avec précaution un tel résultat. Les données présentées dans l'ARTICLE 3 éclairciront ce point étant donné que la durée d'immobilité dans le FST a également été mesurée chez un lot différent de souris UCMS.

B. VOIE KYN ET EXPRESSION DE COMPORTEMENTS ANXIODEPRESSIFS

L'analyse corrélationnelle révèle des résultats très intéressants puisque le ratio KYN/TRP, reflétant l'état d'activation de la voie KYN, est positivement corrélé à l'expression de comportements anxiodépressifs dans l'EPM et le FST, mais ceci n'est observable que chez les individus ayant été confrontés à l'UCMS. Ceci souligne d'abord l'intérêt particulier que peut avoir une approche ciblant l'individu plutôt qu'une approche « par groupe » qui sous-entend que chaque individu de ce groupe est affecté de la même manière par l'UCMS.

Le fait que les corrélations ne s'observent que chez des souris ayant été confrontées au stress chronique suggère que les mécanismes sous-tendant l'expression de ces comportements diffèrent selon que les individus soient stressés ou non. Si l'on se fie à l'abondante littérature existant dans le domaine de la psychopharmacologie, force est de constater que la modulation d'un comportement particulier (anxiété, résignation, agressivité etc) peut être médiée par une multitude de composés ayant des mécanismes d'action pourtant bien distincts. En effet, si l'on prend comme exemple la fréquentation des bras ouverts dans l'EPM, il n'est pas difficile de constater qu'une multitude de drogues est capable de faire varier ce paramètre et ainsi d'avoir un effet anxiolytique ou anxiogénique.

C'est notamment le cas des composés agissant sur les récepteurs aux cannabinoïdes (Biala, Kruk *et coll.* 2009), à la 5-HT (Overstreet, Commissaris *et coll.* 2003), à la nicotine (Salas, Pieri *et coll.* 2003), à la dopamine (Drago, Padungchaichot *et coll.* 1998), au NMDA (Miguel and Nunes-de-Souza 2008), aux benzodiazépines (Reynolds 2008), à la vasopressine (Griebel, Simiand *et coll.* 2002), à la cholécystokinine (Wang, Wong *et coll.* 2005), à la leptine (Liu, Garza *et coll.*) ou à d'autres cytokines (Koo and Duman 2009), au CRF (Griebel, Perrault *et coll.* 1998) etc. Cette liste non exhaustive suggère qu'il existe plusieurs façon de modifier un même *pattern* comportemental exprimé par un individu, et par conséquent qu'il existerait un (ou plusieurs) mécanisme d'action commun à toutes ces molécules, qui, *in fine*, serait le médiateur réel d'expression du comportement. Une telle vision de l'émergence d'un comportement permet alors de supposer qu'un système en particulier puisse être impliqué de façon plus importante dans la régulation d'un comportement et qu'en conséquence il soit plus apte à moduler son expression. À partir de là, on peut alors supposer qu'un médiateur A (Voir **Fig. 36** ci-dessus) régule l'expression d'un comportement particulier (*pattern* comportemental A sur le schéma) en condition 1 (par exemple la condition « contrôle » dans notre étude) mais qu'en condition 2 (condition « UCMS »), ce même comportement ne soit plus régulé principalement par le médiateur A mais par un autre médiateur (B sur le schéma).

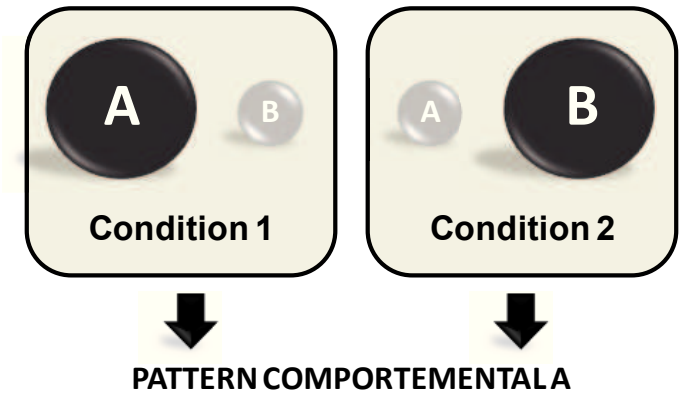


Fig. 36 : ***Hypothèse sur les processus de modulation d'un comportement par deux médiateurs distincts dans deux conditions différentes.***

Une telle hypothèse permettrait par conséquent d'expliquer pourquoi des corrélations entre l'activation de la voie KYN et l'expression de comportements anxio-dépressifs sont observées en condition UCMS mais pas en condition contrôles.

C. EST-CE PERTINENT PAR RAPPORT A LA CLINIQUE ?

Comme cela a été mentionné dans la discussion de l'article, les données obtenues sont en accord avec ce qui a pu être observé dans diverses études menées chez l'Homme dans lesquelles les auteurs observent une corrélation positive entre l'intensité des symptômes anxieux et dépressifs et des marqueurs plasmatiques de l'activation de la voie KYN (ratio KYN/TRP ; concentration en KYN) (Maes, Verkerk *et coll.* 2002; Wichers, Koek *et coll.* 2005; Fitzgerald, Cassidy Eugene *et coll.* 2008; Mackay, Forrest *et coll.* 2008; Swardfager, Herrmann *et coll.* 2009). Cependant, ces études utilisent différentes échelles permettant d'attribuer à chaque patient un score global reflétant l'intensité des troubles dépressifs. Il n'est donc pas seulement question que d'un type d'altérations comportementales mais d'un ensemble d'altérations observé chez les patients, d'où la nuance avec nos résultats qui ne concernent que deux comportements particuliers. L'idéal, pour se rapprocher des résultats cliniques, serait d'utiliser une batterie de tests évaluant différents aspects comportementaux (anxiété,

résignation, agressivité, locomotion etc) et de pouvoir utiliser un système de cotation, à l'image de ce qui est réalisé chez l'Homme, permettant d'apprécier de façon plus intégrative l'intensité des troubles. Un tel procédé permettrait d'obtenir une mesure unique que l'on pourrait alors corréler à divers paramètres physiologiques. C'est ce que nous avons tenté de faire dans l'article 3 en utilisant le « depressive index » comme mesure intégrative de l'effet de l'UCMS sur le comportement des souris.

D. QUELS POURRAIENT ETRE LES MECANISMES SOUS-JACENTS ?

Même s'il n'est pas possible d'arrêter une conclusion précise quant aux mécanismes impliqués dans le lien entre modulation comportementale et activation de la voie KYN, des données de la littérature suggèrent que certains métabolites de la voie pourraient avoir un rôle central dans ce phénomène, en particulier ceux qui produisent des radicaux libres. En effet, en 2007, Bouayed *et coll.* ont mis en évidence chez la souris, l'existence d'un lien linéaire entre le niveau d'anxiété et l'état d'oxydation intracellulaire des granulocytes sanguins, c'est-à-dire que les animaux les plus anxieux présentaient une concentration en radicaux libres plus importante et donc, un état d'oxydation cellulaire plus important (Bouayed, Rammal *et coll.* 2007). Forts de leur découverte, les mêmes auteurs ont voulu voir si ce phénomène était extrapolable à d'autres types de cellules immunitaires sanguines (lymphocytes et monocytes). En plus de répliquer leurs précédents résultats, ils ont observé que les souris les plus anxieuses présentaient aussi des niveaux d'oxydation intracellulaire plus élevés tant dans les lymphocytes que dans les monocytes (Rammal, Bouayed *et coll.* 2008). D'autres travaux montrent des résultats similaires (Hovatta, Tennant *et coll.* 2005; Kromer, Kessler *et coll.* 2005; Ditzen, Jastorff *et coll.* 2006). L'étude d'Hovatta *et al.* montre même que ce lien est observable chez 6 souches de souris consanguines.

Comme je l'ai évoqué dans l'introduction, QUIN et 3HK sont de puissants générateurs de radicaux libres (Voir p104-105 pour le détail de leurs mécanismes d'actions respectifs). Ainsi, étant donné l'accumulation de ces deux métabolites observée chez nos souris UCMS, on peut supposer que l'élévation des processus d'oxydation résultant de cette altération puisse constituer un élément clé expliquant, tout du moins en partie, les corrélations observées dans la présente étude. Si cette hypothèse était exacte, nous devrions observer une corrélation positive entre les concentrations en 3HK ou en QUIN avec l'expression de comportements anxiodépressifs mesurés dans l'EPM et le FST. Or, ni la concentration en 3HK ni la concentration en QUIN ne sont corrélées aux deux paramètres comportementaux étudiés (données non publiées), suggérant que d'autres mécanismes ou d'autres métabolites de la voie KYN générateurs de radicaux libres (tels que 3HA et 5HA) interviennent dans le phénomène.

Notre étude montre également que le ratio KYN/TRP est négativement corrélé à la concentration en KYNA dans l'amygdale des souris UCMS. Ceci est intéressant compte tenu du fait que l'analyse « par groupe » (Voir ARTICLE 1) révèle que l'UCMS induit une baisse de la concentration en KYNA dans l'amygdale. On peut alors penser que la modulation du taux de KYNA dans cette structure joue un rôle important dans la physiopathologie des troubles induits par l'UCMS, tant au niveau neurochimique que

comportemental. En complément à ce résultat, il est important de souligner que les deux paramètres comportementaux étudiés sont négativement corrélés à la concentration en KYNA dans l'amygdale chez les souris UCMS (r=-0.63 et p=0.020 pour la durée d'immobilité dans le FST ; r=-0.58 et p=0.045 pour le temps passé à exprimer des comportements de risk-assessment dans l'EPM) (données non publiées).

KYNA agit en tant qu'antagoniste sur les récepteurs NMDA du glutamate ainsi que sur les récepteurs α7 nicotiniques (à plus faibles concentrations = de l'ordre du nanomolaire). Des études par microdialyse montrent que la variation des concentrations en KYNA constitue un puissant mécanisme de modulation de la concentration en GLU dans le milieu extracellulaire (Carpenedo, Pittaluga *et coll.* 2001; Wu, Pereira *et coll.* 2009): sa diminution entraînant une élévation du GLU alors que son augmentation résulte en une diminution de la concentration en GLU. Nos données pourraient alors suggérer que la concentration en GLU est augmentée dans l'amygdale. Par ailleurs, ceci est en accord avec le fait qu'une augmentation de l'activité de l'amygdale induit une activation des axes du stress (HPA et SAM) (Matheson, Branch *et coll.* 1971; Redgate and Fahringer 1973; Dunn and Whitener 1986) ainsi qu'une augmentation de l'expression de comportements de peur/anxiété (Davis 1992). Au niveau comportemental, des études ont d'ailleurs montré que l'infusion dans l'amygdale d'un antagoniste NMDA (le MK-804) ou bien d'un antagoniste des récepteurs α7 (la mécamylamine) résulte en la diminution de l'expression des comportements de risk-assessment dans l'EPM (Adamec, Burton *et coll.* 1999; Zarrindast, Solati *et coll.* 2008), indiquant que la modulation de KYNA dans l'amygdale est tout à fait capable d'engendrer des changements comportementaux.

<u>À FAIRE</u> :

Administrer divers métabolites tels que 3HK, QUIN ou KYNA directement dans des structures d'intérêt (amygdale, hippocampe, cortex cingulaire, striatum, hypothalamus, noyaux du raphé dorsal) puis en évaluer les effets comportementaux dans divers paradigmes expérimentaux pourrait nous renseigner sur leur implication réelle dans la modulation du comportement. Etant donné que 3HK s'accumule dans l'amygdale et le striatum chez les souris UCMS, il serait intéressant d'administrer ce métabolite dans ces deux structures (par le biais de minipompes osmotiques) durant plusieurs jours (à des concentrations semblables à celles mesurées chez les souris UCMS) puis d'évaluer les effets comportementaux ainsi que les effets cellulaires (nombre/densité des neurones/cellules gliales, marqueurs de dysfonctionnement/mort cellulaire).

III. EFFETS D'UN ANTIDÉPRESSEUR ET D'UN INHIBITEUR DE L'IDO SUR LES ALTÉRATIONS DE LA VOIE KYN INDUITES PAR L'UCMS.

1. Introduction de l'étude

Dans notre dernière étude, nous avons voulu explorer plusieurs aspects de l'implication de la voie KYN dans l'étiopathogénie des troubles dépressifs. Tout d'abord, l'idée principale était d'évaluer l'effet d'un traitement chronique au *1-methyltryptophane* (1MT), un inhibiteur de la voie KYN qui agit en diminuant l'activité de l'enzyme IDO, à la fois sur les altérations de la voie KYN mais aussi sur les altérations comportementales induites par l'UCMS. Le but final étant d'évaluer l'éventuel effet antidépresseur d'un tel traitement et ainsi de confirmer l'implication de l'IDO, et par la même occasion celui de l'inflammation, dans les mécanismes physiopathologiques concomitants à la pathologie. Afin de comparer les effets du 1MT à celui d'un antidépresseur classique dont l'efficacité a été largement prouvée, nous avons administré à un autre groupe d'animaux un traitement chronique à la fluoxétine – un inhibiteur sélectif de la recapture de sérotonine. Ceci nous a également permis d'apprécier l'effet de cet antidépresseur sur les changements de la voie KYN induits par l'UCMS.

Nous avons ainsi pu observer que le 1MT est aussi efficace que la fluoxétine en tant qu'antidépresseur puisqu'il a reversé non seulement presque toutes les altérations comportementales mais aussi l'intégralité des anomalies biochimiques induites par l'UCMS. Nous avons aussi constaté que le retour à la normale du métabolisme de la KYN pouvait constituer un des mécanismes par lesquels le traitement à la fluoxétine exerce ses effets antidépresseurs.

Enfin, nous avons également mis en évidence que l'intensité des changements comportementaux induits par l'UCMS était étroitement corrélé au détournement du métabolisme vers la voie « neurotoxique ».

ARTICLE 3 :

EFFECTS OF THE IDO INHIBITOR 1-METHYLTRYPTOPHAN ON NEUROCHEMICAL ALTERATIONS OF THE KYNURENINE PATHWAY INDUCED BY UCMS IN MICE: COMPARISON WITH THE ANTIDEPRESSANT FLUOXETINE.

Anthony Laugeray, Jean-Marie Launay, Jacques Callebert, Mutlu Oguz, Julien Célestine, Catherine Belzung, Pascal R. Barone.

Neuropsychopharmacology, En préparation.

Effects of the IDO inhibitor 1-methyltryptophan on neurochemical alterations of the kynurenine pathway induced by UCMS in mice: comparison with the antidepressant fluoxetine.

[1] Anthony Laugeray *, [3] Jean-Marie Launay, [3] Jacques Callebert, [4] Mutlu Oguz, [1] Julien Célestine, [1] Catherine Belzung, [2] Pascal R. Barone.

[1] UMRS INSERM U930, CNRS ERL 3106, Université François Rabelais, Tours, France.
[2] Université François Rabelais, Tours, France.
[3] Service de Biochimie, Hôpital Lariboisière, CR Claude Bernard, IFR6, Assistance Publique Hôpitaux de Paris, Paris, France.
[4] Department of Pharmacology, Faculty of Medicine, Kocaeli University, 41380 Kocaeli, Turkey.

Corresponding author : * Anthony Laugeray, INSERM U930 – Bat O – Faculté des Sciences et Techniques - Parc Grandmont, 37200, TOURS.
Tel: +33 (0)2 47 36 69 99; Fax +33 (0)2 47 36 72 85;
Email: alaugeray@yahoo.fr

Keywords: Depression, unpredictable chronic mild stress, tryptophan, kynurenine, fluoxetine, mice.

Running title: Antidepressant effect of IDO inhibition in a murine model of depression

Abbreviations used: UCMS, unpredictable chronic mild stress; TRP, tryptophan; KYN, kynurenine, 5-HT, serotonin; 5-HIAA, 5-hydroxyindoleacetic acid; KP, kynurenine pathway; 3HK, 3-hydroxykynurenine; QUIN, quinolinic acid; KYNA, kynurenic acid, IDO, indoleamine-2,3-dioxygenase; TDO, tryptophan-2,3-dioxygenase; IFN, interferon; CC, cingulate cortex; HIPPO, hippocampus; AMY, amygdala; HPLC, high performance liquid chromatography.

Number of words in the abstract = 227
Number of words in the text = 8204
Number of figures = 7
Number of tables = 3
Number of supplementary material = 0

Abstract

In this work, we show that confronting mice to the Unpredictable Chronic Mild Stress (UCMS) procedure – a validated model of major depression – results not only in the activation of the peripheral kynurenine pathway (KP) but also in KP changes within corticolimbic structures that are likely to modify cerebral functioning. We also investigated the effect of a chronic treatment with the KP inhibitor 1-methyltryptophan (1MT), known to decrease the activity of the indoleamine-2,3-dioxygenase (IDO), one of the two enzymes degrading TRP into kynurenine (KYN), on UCMS-induced alterations of the KP and compared it with the effect of a chronic administration of the antidepressant fluoxetine (Flx). We found that both 1MT and Flx were able to block UCMS-induced alterations of the KP (peripherally and centrally) and more importantly that 1MT was as effective as Flx in reversing UCMS-induced behavioural changes. Interestingly, we found that the levels of some KP metabolites within the brain were correlated to the degree of behavioural alteration induced by UCMS while those of 5-HT metabolites (5-HT, 5-HIAA) were not. Taken together, these results first suggest that inhibition of the KP might be a relevant mechanism of action of antidepressants. Second, our data provide evidence for an antidepressant effect of 1MT and subsequently indicate that accumulation of some KP metabolites into corticolimbic structures is likely to play a key role in the pathophysiology of depressive disorders.

Introduction

Indoleamine-2,3-dioxygenase (IDO; EC 1.13.11.52) is one of the two enzymes metabolizing tryptophan (TRP) along the kynurenine pathway (KP) (for an illustration of the KP, see Figure 1). It is expressed by a variety of cells including dendritic cells, macrophages, esinophils, endothelial cells, neurons and microglia (Mellor and Munn 2004; Odemuyiwa, Ghahary *et coll.* 2004; Guillemin, Brew *et coll.* 2005; Roy, Takikawa *et coll.* 2005; Beutelspacher, Tan *et coll.* 2006) and is induced by several proinflammatory cytokines such as IFNγ, IFNα, IFNβ and TNFα *in vitro* (Wichers, Koek *et coll.* 2005; O'Connor, Andre *et coll.* 2009). Other cytokines such as IL-12, IL-6 and IL-1or lipopolysaccharides are also capable of inducing IDO, although less effectively (Weiss, Murr *et coll.* 1999; Connor, Starr *et coll.* 2008). Therefore, in vivo, enhanced cytokine-induced degradation of TRP is observed whenever the cellular (Th1-type) immune response is induced. In addition to its immunoregulatory function, IDO has been proposed to lie at the interface between chronic inflammatory disease and depression (Dantzer, O'Connor *et coll.* 2008). Reduced circulating tryptophan level and a concomitant increase in KYN have been reported in patients with chronic inflammatory diseases (Widner, Leblhuber *et coll.* 1999; Widner, Leblhuber *et coll.* 2000; Schroecksnadel, Kaser *et coll.* 2003; Schrocksnadel, Wirleitner *et coll.* 2006) and major depression for nearly two decades (Smith 1991; Maes, Verkerk *et coll.* 2002; Widner, Laich *et coll.* 2002; Wichers, Koek *et coll.* 2005). Interestingly, increased IDO activity has been positively correlated with the severity of depressive scores (Capuron, Ravaud *et coll.* 2002; Wichers, Koek *et coll.* 2005). It is now evident that such a phenomenon is related to high level of circulating proinflammatory cytokines classically observed in these patients (Widner, Laich *et coll.* 2002; Wirleitner, Rudzite *et coll.* 2003; Simon, McNamara *et coll.* 2008).

However, not all depressive states are characterized by inflammatory alterations. Instead, some patients rather present disturbances of the Hypothalamic-Pituitary-Adrenal (HPA) axis resulting in elevated basal cortisol levels as well as abnormal cortisol-mediated negative feedback (Holsboer 2001; Carroll, Cassidy et coll. 2007). What is particularly interesting and makes the KP relevant to better understand the pathophysiology of depression is that the second TRP to KYN converting enzyme, tryptophan-2,3-dioxygenase (TDO; EC 1.13.11.11), is strongly activated by cortisol (Salter and Pogson 1985; Comings, Muhleman *et coll.* 1995). As a consequence, it could likely to be as important as IDO explaining the activated state of the KP during depressive disorders. Therefore, by degrading tryptophan along the KP, IDO/TDO may reduce the bioavailability of tryptophan for the synthesis of serotonin, a neurotransmitter that is well known to be involved in mood regulation, and then be responsible for 5-HT-depletion-related symptoms such as those occurring during depression (Konsman, Parnet *et coll.* 2002; Myint and Kim 2003). In support of this, preclinical studies have shown that IDO-mediated activation of the KP by systemic immune challenges resulted in the occurrence of depressive-like behaviors in mice, and more importantly that the IDO inhibitor 1-methyltryptophan (1MT) was able to reverse this effect (O'Connor, Lawson *et coll.* 2008; O'Connor, Lawson *et coll.* 2009). These data strongly suggest that blocking IDO could be useful to alleviate response to stress. However, the precise role of KP activation in depressive states or other stress-related disorders remains under-explored, in particular the way by which it may promote neuropsychiatric symptoms.

Indeed, even if several works have reported a positive correlation between blood KYN/TRP ratio (an informative marker of IDO activity) and the intensity of depressive symptoms in major depression and other diseases with depressive features (Bonaccorso, Marino *et coll.* 2002; Maes, Verkerk *et coll.* 2002; Fitzgerald, Cassidy Eugene *et coll.* 2008; Swardfager, Herrmann *et coll.* 2009), very few is known on the role of the KP in the pathophysiology of depressive disorders. In this realm, preclinical and clinical studies have brought some important clues on how activated KP could generate mood changes. Indeed, it has been shown that several downstream metabolites such as quinolinic (QUIN) and kynurenic (KYNA) acids can modulate stress-related behaviors in rodents obviously by respectively enhancing and reducing extracellular levels of glutamate (Tavares, Schmidt *et coll.* 2005; Wu, Pereira *et coll.* 2009). Given the central role of the glutamatergic system in mood-disorders pathophysiology (Sanacora, Zarate *et coll.* 2008; Hashimoto 2009; Skolnick, Popik *et coll.* 2009), an imbalance between these two compounds might underlie, at least partially, bio-behavioral abnormalities observed in depressed patients. In addition to its effect on glutamatergic neurotransmission, QUIN may induce cell damages through excitotoxic lesiosn and oxidative stress (REFS 37 et 38). Other KP metabolites such as 3-hydroxykynurenine (3HK) have also been shown to be important t generators of free radicals mediating oxidative stress (REFS 39 et 40). Therefore, an accumulation of such compounds in tissues may have disturbing effects on cellular and molecular processes leading to altered neuroplasticity.

Currently, no single brain area has been identified as a primary region affected in depression; however, meta-analyses of altered brain function point toward a corticolimbic circuitry of mood regulation and stress integration that is affected in depression (REFS 41 à 43). This circuitry includes areas of the prefrontal cortex, the cingulated cortex (CC), the hippocampus (HIPPO), anterior thalamic nuclei, the striatum (STR) and the amygdale (AMY), that is why we focused on four rodent equivalent brain areas within this corticolimbic network: CC, AMY, HIPP and STR.

In line with the assumption of a central role of KP metabolites in depression, it was recently demonstrated in humans that CSF levels of QUIN was positively correlated with depressive symptoms (Raison, Dantzer *et coll.* 2009). Moreover, our previous study supports the above hypothesis by showing that mice confronted to the Unpredictable Chronic Mild Stress (UCMS) procedure, a murine model of stress-induced depression, presented region-specific alterations of the balance between QUIN and KYNA pathways which are likely to underlie decreased glutamate levels at the cortical level (cingulate cortex; CC) and raised glutamatergic activity at the subcortical level (amygdala; AMY and striatum; STR) (Laugeray, Launay *et coll.* 2010). All together, these data strongly suggest that KP alterations within corticolimbic structures might be implicated in the modulation of affective states.

To go into detail, it would be interesting to examine the effect of an antidepressant molecule on neurochemical KP alterations induced by chronic stress in mice. With this aim, we investigated the biochemical consequences of a chronic administration of the antidepressant fluoxetine on UCMS-induced alterations of the KP. Moreover, we sought to verify the involvement of the enzyme IDO on bio-behavioral alterations induced by UCMS, that is why we also checked the effects of a chronic treatment with an efficient IDO blocker (1-methyltryptophan; 1MT) (Taher, Piavaux *et coll.* 2008; Baban, Chandler *et coll.*

2009). Biochemical analyses included measurements of TRP-5-HT pathway metabolites, namely TRP, 5-HT and 5-HIAA, and of TRP-KYN pathway metabolites KYN, 3HK, KYNA and QUIN. The concentration of all compounds was determined in the lungs (LUNG) in order to evaluate the peripheral activity of the KP, and in four relevant corticolimbic structures importantly involved in the regulation of stress response and emotional states: cingulate cortex (CC), amygdala (AMY), hippocampus (HIPPO) and striatum (STR).

Materials and methods

Animals

Male BALB/c mice (Centre d'Elevage Janvier, France), aged 7 weeks at their arrival to the laboratory, were used in this study. All animals were kept in the laboratory for 2 weeks before the onset of the experiment. Animals were split into two groups: the non-stressed (control) mice and mice subjected to unpredictable chronic mild stress (UCMS). Non-stressed mice were group-housed in standard laboratory cages (42 x 28 x 18 cm) (4 mice per cage) while UCMS mice were singly-housed in small individual cages (24 x 11 x 12 cm) at the beginning of the UCMS until the end of the study. Non-stressed mice were maintained under standard laboratory conditions (12-h-light:12-hdark cycle, lights on at 08:00 h pm, T=21±1 C) in a separate room. All animals received food and water *ad libitum*. All experiments were conducted following institutional ethics guidelines and were in full accordance with the European Community Council directive 86/609/EEC.

Drugs

The selective serotonin reuptake inhibitor fluoxetine hydrochloride (Flx) was obtained from Sequoia Research Products Ltd (UK) and the IDO inhibitor 1-methyltryptophan (1-MT) was purchased from Sigma-Aldrich (France) and dissolved in saline (NaCl 0.9%) containing 10% dimethyl sulfoxide. Vehicle, Flx (15 mg/kg/day) and 1-MT (70 mg/kg/day) were administered intraperitoneally (i.p.), based on previous experiments (Mutlu, Ulak *et coll.* 2009) and literature data (Taher, Piavaux *et coll.* 2008).

Experimental design

On their arrival, mice were kept undisturbed in the laboratory for two weeks before the beginning of the experiments. A 7-week UCMS procedure was then conducted on half of the mice. The first two weeks of stress were drug-free, and pharmacological treatment started from the third week and continued until the end of the behavioral testing period. Vehicle, Flx and 1-MT were administered i.p. once a day at 1 pm. Experimental groups used in this study were as follow: control/vehicle, control/Flx, control/1MT, UCMS/vehicle, UCMS/Flx and UCMS/1-MT. Each group consisted of 5-12 animals. Fur state was assessed before and after the stress regimen. The day after the coat state evaluation, behavioral tests were carried out as follow: splash test on day 1, novelty suppressed feeding (NSF) test on day 2, forced swim test (FST) on day 3 and resident/intruder (R/I) test on day 4.

In order to go into details in the behavioral analysis, all tests were videotaped and videos were analyzed later thanks to the video tracking system ANY-Maze (Stoelting Co) that allowed us to record a wide range of

parameters such as activity, trajectories, events and social behavior interactions. The other advantage of such an automated system is that mice behavior is measured with a high level of objectivity.

Unpredictable chronic mild stress

The stress regimen was previously described (Surget, Wang *et coll.* 2009; Laugeray, Launay *et coll.* 2010) and is a variant of the chronic mild stress procedure described by Willner in rat (Willner 1997). Briefly, mice were recurrently confronted to various socio-environmental stressors according to a "random" schedule for a total period of 7 weeks. The stressors were: altered bedding (sawdust change, removal of sawdust, damp sawdust, substitution of sawdust with 21°C water, introduction of rat/cat feces); cage tilting (45°); cage exchange (mice were positioned in the cage of another male); altered length and time of light/dark cycle, forced swimming. None of the stressors involved water or food deprivation. In order to prevent habituation and maintain the aspect of unpredictability, the number of stressors and their duration changed every day.

Fur state

Fur state was assessed before and after chronic stress procedure as a marker of the progression of the UCMS-evoked syndrome. The total score of the coat state resulted from the sum of scores obtained from five different body parts: head, neck, dorsal coat, ventral coat, and hindpaws. For each body area, a score of 0 was given for a well-groomed coat and 1 for an unkempt coat. Thus the more elevated is the total score the nastier is the fur. Dirty state is characterized by fluffy, greasy, less dense coat or piloerection. The evaluation was carried out by two observers who were completely unaware of the treatment condition. This physical parameter has been pharmacologically validated (Griebel, Simiand *et coll.* 2002; Ducottet, Griebel *et coll.* 2003; Santarelli, Saxe *et coll.* 2003; Surget, Wang *et coll.* 2009).

Splash test

The splash test consisted of splashing a 10% sucrose solution on the mice dorsal coat in its home cage. Because of its viscosity, the sucrose solution dirties the mouse fur and animals initiate self-care grooming behaviors. Immediately after having been splashed, mice behavior was videotaped during 5 minutes and videos were later analyzed by a single observer unaware of the treatment, using the ANY-Maze software. Latency to groom and time spent grooming were measured. Grooming bouts included nose/face grooming (strokes along the snout), head washing (semicircular movements over the top of the head and behind the ears) and body grooming (body fur licking) (Kalueff and Tuohimaa 2004).

Novelty-suppressed feeding (NSF) test

This test induces a conflict between the drive to eat and the fear of exploring new environments. The procedure used in this study was a modified version of that used by Santarelli *et al*. (Santarelli, Saxe *et coll.* 2003). The apparatus consisted of a wooden box (33 x 33 x 30 cm) with an indirect light (10lx). The floor was made of black plexiglas. Food was removed from mice cages 12h before the test. At the time of testing, a single pellet of regular show was placed at the center of the box. Classically, an animal is placed in a corner

of the box and both the latency to chew the pellet is recorded for 3 min. However, the use of the video-tracking system ANY-Maze (Stoelting Co) allowed us to perform a more detailed analysis of mice behavior. Therefore, other behavioral parameters were measured such as the total distance travelled and immobility time. To control for potential effects on appetite, we measured food consumption over 5 min after mice returned to their home cage.

The forced swim test (FST)

The FST was performed according to standard published procedures with minor modifications (Porsolt, Bertin *et coll.* 1977; Ducottet, Griebel *et coll.* 2003). Mice were introduced into a glass cylinder (12 cm diameter, 25 cm tall) filled to a depth of 10 cm with water (22±1 °C). A 6 minutes test session was conducted and videotaped for a latter analysis with ANY-Maze. The time during which mice were immobile was measured during the last 4 minutes of test. A mouse was considered immobile when it floated passively performing only slight movements of its limbs and tail without any gross head movements that could be judged as searching. "Immobility" included slow drifting on the water surface without any initiation of swimming.

Resident/Intruder test

The resident/intruder (R/I) test was modified from previously described protocols (Mineur, Prasol *et coll.* 2003; Surget, Wang *et coll.* 2009). Control mice were single-housed 24h before testing. UCMS mice were also placed in new cages 24h prior to testing. All mice were tested against a non-aggressive intruder (male A/J mice). The opponent was placed into the home cage of the test animal (resident) so that mice were in opposite corners. Latencies of the first attack and number of attacks were recorded for 5 min. In the event of a lack of attack sequences, we also measured social interaction behaviors expressed by the resident (exploration of the intruder). The social interaction was evaluated in terms of time spent expressing behaviors such as sniffing, adjacent lying, following, crawling under/over the intruder, and mutual grooming.

Determination of a global index of UCMS-induced alterations of behaviour: the "Depressive Index"

In humans, the intensity of depressive symptoms is determined by various scales such as the Hamilton Depression Rating Scale (HDRS), the Montgomery-Asberg Depression Rating Scale (MADRS) or the Beck Depression Inventory (BDI), that are based on the assessment of behavioural items relating to symptoms as various as hopelessness, irritability, cognitions such as guilt or feelings of being punished or physical symptoms such as fatigue and weight loss, etc. A score ranging from 0 to 4 or 0 to 2 is attributed to an individual for each of these items. By adding up all the scores, a total score is attributed to one individual and reflects the intensity of the depressive syndrome.

Similarly, we determined in this study what we called "the Depressive Index", corresponding to an overall stress-induced depressive score, calculated for each individual as follow: regardless of the experimental condition, we transformed all behavioural measures (number of events, distance travelled, latency to do something, time spent doing something) into a relative score ranging from 1 to 5. This score was obtained by

dividing the distribution of our population in five equal parts with 1 or 5 corresponding to individuals within the first or the last quintile depending on the effect of UCMS. For instance, if UCMS significantly increased the expression of one parameter, the animals within the last quintile were assigned a score of 5, the ones within the fourth quintile were assigned a score of 4, the ones within the third quintile were attributed a score of 3 etc. Conversely, if UCMS significantly reduces the expression of another behavioural parameter, the animals within the last quintile were assigned a score of 1, the ones within the fourth quintile a score of 2, the ones within the third quintile a score of 3 etc. Then, the "Depressive Index" is determined by adding up the relative scores obtained by one animal for all the behavioural patterns measured in the study (coat state score, latency to chew, distance travelled and immobility time in the NSF test, immobility time in the FST, latency to groom and time grooming in the splash test and time exploring the intruder in the R/I test). A similar index of stress has already been used in other preclinical studies and presents the advantage to integrate all stress-induced behavioural changes in one measure (Kiank, Entleutner et coll. 2005; Kiank, Holtfreter et coll. 2006). Therefore, it can be used to perform correlation analyses.

Tissue sampling

Brain tissues:

Brain structures were collected 1 day after the end of the behavioural testing period and were then microdissected. Brains were rapidly removed from CO_2-killed mice and placed in ice-cold slurry of 0.9% NaCl. Rostro-caudal sections (2 mm) were quickly obtained on a brain tissue blocker. Four consecutive sections from Bregma + 2.4 to - 3.1 were then microdissected (Paxinos and Franklin 2001). CC was dissected from the first two sections and included prelimbic and cingulate cortices. Dorsal and ventral parts of the STR were obtained from the second slice. AMY was obtained from the third section and HIPPO from the third and the fourth sections. All samples were immediately frozen and stored at -80°C.

Peripheral tissues:

Lungs were removed just after the brain was extracted and immediately frozen and stored at -80°C. This tissue was chosen because of its high level of IDO expression (Moreau, Lestage *et coll.* 2005; Andre, O'Connor *et coll.* 2008).

Biochemical measurements of TRP metabolites.

TRP, 5-HT and 5-HIAA were measured using HPLC, as described by Kema et al. (Kema, Schellings *et coll.* 1993). Metabolites of the kynurenine pathway: KYN, KYNA and 3HK were measured using HPLC, as described by Fujigaki et al (Fujigaki, Saito *et coll.* 1998). QUIN was measured in tissue homogenates using mass-fragmentography as previously reported (Moroni, Lombardi *et coll.* 1984; Heyes and Markey 1988).

Statistics.

As data did not fit homogeny of variance and normality, non-parametric procedures were used to analyze the results. In addition, these tests are especially adapted to the statistical analysis of small samples ($n < 30$) as it

is the case in this study. General comparison among groups was made by Kruskal-Wallis ANOVA. When this test was significant, Mann-Whitney U test was used to compare one group to another. As multiple comparisons were performed (number of comparisons = 5 NSVeh vs. NSFlx; NSVeh vs. NS1MT; NSVeh VS. SVeh; SVeh vs. SFlx and SVeh vs. S1MT), we used the Bonferroni correction to avoid spurious positives. Consequently, all reported p values were Bonferroni corrected (=p/5).

As significance test only gives the probability of obtaining the observed effect and not how large the effect is, we also reported estimates of effect sizes using a robust index: the probability of superiority (PS), also called "probabilistic index" or "measure of stochastic superiority" (Grissom and Kim 2001; Delaney and Vargha 2002; Acion, Peterson *et coll.* 2006; Kraemer and Kupfer 2006). Briefly, PS is the probability that a randomly sampled score from one population is larger than a randomly sampled score from another population. It is calculated as follow: $PS = U/mn$, where U is the Mann-Whitney U statistic, m is the number of individuals in the first sample, and n is the number of individuals in the second sample. PS values, ranging from 0.5 to 1, allow putting in evidence a small effect (from 0.5 to 0.64), a medium effect (from 0.65 to 0.71) or a large effect (from 0.72 to 1) (Grissom and Kim 2001). An effect was considered significant when (1) $p < 0.05$ and (2) $PS > 0.64$. Spearman's rank correlations were calculated to describe associations between metabolites of interest and behavioural parameters. Given that calculating multiple correlations increases the risk of a type I error, i.e., to erroneously conclude the presence of a significant correlation, all reported p-value were Bonferroni-corrected (=p/8) (Curtin and Schulz 1998).All data were analyzed with Statistica 8 software.

Results

Physical state and behavioural tests

All behavioural results are summarized in Table 1.

Coat state

After 7 weeks of UCMS, the ANOVA of Kruskal-Wallis revealed a significant difference between all groups (H=16.53; p=0.0001). UCMS resulted in a significant increase of the total score of the coat state (p=0.00043; PS=0.93 - large effect). Fluoxetine and 1-MT were both able to partially reverse the UCMS-induced degradation of mice coat state (p=0.033; PS=0.76 – large effect, and p=0.011; PS=0.76 – large effect). No effects of both treatments were observed in non-stressed mice.

NSF test

The Kruskal-Wallis test showed that one group differed significantly from the others regarding the latency to consume the pellet (H=19.7; p=0.001), the distance travelled in the apparatus (H=38.51; p=0.0001) and the immobility time (H=23.68; p=0.0001). The Mann-Whitney test revealed that fluoxetine was able to change control mice behaviour in the NSF test as the latency to chew the pellet and the distance travelled in the apparatus were significantly decreased (p=0.022; PS=0.84 – large effect; p=0.000005; PS=0.999 – large

effect), whereas the immobility time was increased in comparison to vehicle-treated mice (p=0.001; PS=0.92 – large effect). The UCMS significantly reduced the distance travelled in the apparatus (p=0.010; PS=0.87 – large effect) and increased the immobility time (p=0.030; PS=0.77 – large effect). Both the chronic treatment with fluoxetine (p=0.00054; PS= 0.95 – large effect; p=0.048; PS=0.72 – large effect) and 1MT (p=0.00005; PS=0.99 – large effect; p=0.021; PS=0.78 – large effect) reversed these changes. Moreover, neither the UCMS procedure nor the drugs tested produced a significant change in the home food consumption during the 5 min following the NSF test (data not shown), suggesting that the feeding drive subsequent to a 12-h deprivation was not different between experimental groups.

Splash test

The ANOVA of Kruskal –Wallis showed that there were differences between all groups regarding the latency to groom and the time spent grooming in the splash test (H=16.67; p=0.005 and H=21.7; p=0.0001 respectively). Mann-Whitney comparisons indicated that vehicle-treated UCMS mice had an increased latency to groom in comparison to vehicle-treated control mice (p=0.0021; PS=0.92 – large effect), and also that neither fluoxetine nor 1-MT were able to counteract this effect (p=0.28 and p=0.23 respectively). Regarding the time spent grooming, Mann-Whitney test revealed that fluoxetine-treated control mice spent less time grooming than vehicle-treated control mice (p=0.043; PS=0.81 – large effect). In addition, Mann-Whitney comparisons revealed that vehicle-treated UCMS mice spent significantly less time grooming than vehicle treated control mice (p=0.008), and that neither fluoxetine nor 1-MT could reverse this alteration (p=0.20 and p=0.74 respectively).

FST

Kruskal-Wallis test showed that one of the groups was significantly different from the others (H=15.02; P=0.01). Indeed, Mann-Whitney test revealed that vehicle treated UCMS mice were less immobile than vehicle treated control mice (p=0.0013; PS=0.96 – Large effect). Interestingly, even if fluoxetine-treated UCMS mice tended to be more active than vehicle-treated UCMS mice, this result was not significant (p=0.17). On the contrary, 1-MT treatment could reverse the UCMS-induced reduction of immobility (p=0.044: PS=0.81 – large effect).

R/I test

Of all mice, only 9 expressed aggressive behaviour towards the intruder. That is why aggressive-related parameters are not presented in Table 1. However, we measured the time during which the resident explored the intruder and Kruskal-Wallis ANOVA revealed a significant difference between groups (H=33.05; p=0.0001). We could therefore observe that vehicle-treated UCMS mice spent significantly more time exploring the intruder than vehicle-treated control mice (p=0.00046; PS=0.95 – large effect), and that this alteration was reversed by both fluoxetine (p=0.049; PS=0.71 – medium effect) and 1-MT (p=0.042; PS=0.73 – large effect) treatments.

Depressive Index (DI)

ANOVA of Kruskall-Wallis revealed a significant difference between all groups (H=25.87, p=0.0001). Mann-Whitney comparisons showed that vehicle-treated UCMS mice had a higher DI than vehicle-treated control mice (p=0.00006; PS=0.98 – large effect). Treatment with Flx and 1MT were both able to reverse this alteration (respectively p=0.004; PS=0.91 – large effect and p=0.00016; PS=0.96 – large effect). No differences were observed between fluoxetine-treated control mice or 1MT-treated control mice and vehicle-treated control mice (respectively p=0.19 and p=0.14).

Biochemical results

TRP - 5-HT pathway (Table 2)

There were no differences between all groups regarding the concentration of TRP in LUNG (H=10.94; p=0.17), AMY (H=0.90; p=0.82), CC (H=1.98; p=0.57) and STR (H=2.02; p=0.57) and HIPPO (H=10.06; p=0.08). Regarding 5-HT concentrations, Kruskal-Wallis analysis showed that groups were not significantly different in AMY (H=8.42; p=0.13), CC (H=10.7; p=0.06) and STR (H=2.22; p=0.82) but that one group was different from the others in HIPPO (H=12.84; p=0.024). Mann-Whitney test indicated that vehicle-treated UCMS mice presented reduced levels of 5-HT in HIPPO (p=0.028; PS=0.84 – large effect) and that fluoxetine and 1-MT were both able to partially reverse this effect (p=0.010; PS=0.88 – Large effect and p=0.039; PS=0.84 – large effect). Interestingly, no significant effects of both treatments were observed in control mice. Considering 5-HIAA concentrations, Kruskal-Wallis ANOVA did not reveal any differences between groups in AMY (H=5.15; p=0.16), CC (H=3.05; p=0.38), HIPPO (H=10.04; p=0.074) and STR (H=0.65; p=0.88).

TRP-KYN pathway (Fig. 2 to 6)

At the peripheral level

Changes of the peripheral KP (LUNG) are presented in Fig. 2. Significant differences between groups were detected for the level of KYN (H=33.3; p=0.0001), K/T ratio (H=31.3; p=0.0001), 3HK (H=38.9; p=0.0001), KYNA (H=29.6; p=0.0001), QUIN (H=35.9; p=0.0001) and KYNA/QUIN ratio (H=19.7; p0.001).

KP changes induced by UCMS*:* UCMS increased the level of KYN (p=0.045; PS=0.71 – medium effect), 3HK (p=0.0033; PS=0.999 – large effect), QUIN (p=0.0033; PS=0.999 – large effect), and the K/T ratio (p=0.048; PS=0.7 – medium effect). Conversely, the KYNA/QUIN ratio was decreased by UCMS (p=0.0066; PS= 0.98 – large effect) while the level of KYNA were not changed (p=0.77).

Effects of Flx and 1MT on UCMS-induced KP alterations*:* The treatment with Flx efficiently prevented all these changes (K/T p=0.0033; PS=0.999 – large effect; KYN p0.003; PS=0.999 – large effect; 3HK p=0.003; PS=0.999 – large effect; QUIN p=0.0066; PS=0.98 – large effect and KYNA/QUIN p=0.023; PS=0.94), so does the treatment with 1MT (K/T p=0.00051; PS=0.999 – large effect; KYN p=0.00023; PS0.999 – large effect; 3HK p=0.00023; PS=0.999 – large effect; QUIN p=0.00023; PS=0.999 – large effect and KYNA/QUIN p=0.00045; PS=0.98 – large effect). Regarding the level of KYNA, it was found to be

unchanged in Flx-treated UCMS mice (p=0.19) while that of 1MT- treated UCMS mice was significantly reduced (p=0.00023; PS=0.999 – large effect) in comparison to vehicle-treated UCMS mice.

***Effects of Flx and 1MT on the KP in control mice**:* It is interesting to note that both Flx and 1MT were able to induce KP changes in control mice: Flx decreased the level of KYN (p=0.0092; PS=0.96 – large effect), 3HK (p=0.0092; PS=0.96 – large effect) and the K/T ratio (p=0.0046; PS=0.98) in vehicle-treated control mice whereas the level of KYNA (p=0.22), QUIN (p=0.83) and the KYNA/QUIN ratio (p=0.58) remained unaltered. Similarly, the chronic treatment with 1MT induced decreases of KYN (p=0.013; PS=0.99 – large effect), KYNA (p=0.046; PS=0.94 – large effect), 3HK (p=0.013; PS=0.99 – large effect), QUIN (p=0.025; PS=0.99 – large effect), the K/T ratio (p=0.0096; PS= 0.99 – large effect). However, 1MT did not alter the KYNA/QUIN ratio (p=0.97).

At the cerebral level

In the AMY (Figure 3): Kruskal-Wallis ANOVA revealed that all groups differed significantly for the level of KYN (H=18.3; p=0.002), KYNA (H=26.8; p=0.0001), 3HK (H=31.6; p=0.0001), QUIN (H=32.1; p=0.0001) and for the KYNA/QUIN ratio (H=29.3; p=0.0001). Regarding, the K/T ratio, no difference was observed (H=6.5; p=0.26).

***KP changes induced by UCMS**:* We can see on Fig. 3 that UCMS did not change the level of KYN (p=0.15) and the K/T ratio (p=0.17). Even if a trend towards an increase of QUIN was obtained, the tendency was not significant (p=0.075). UCMS significantly elevated the level of 3HK (p=0.0078; PS=0.99 – large effect) whereas the level KYNA and the KYNA/QUIN ratio were both reduced (respectively p=0.0078; PS=0.99 – large effect and p=0.0078; PS=0.99 – large effect).

***Effects of Flx and 1MT on UCMS-induced KP alterations**:* Fig. 3 also shows that Flx treatment could reverse the UCMS-induced increase in 3HK (p=0.020; PS=0.99 – large effect) and the UCMS-induced decrease of KYNA (p=0.020; PS=0.99 – large effect). However, no effect of Flx was observed on the reduction of the KYNA/QUIN ratio caused by UCMS (p=0.11). We also observed that 1MT could also reverse some KP alterations induced by UCMS: 1MT blocked the increase of 3HK (p=0.00077; PS=0.999 – large effect) but failed to reverse the reduction of KYNA (p=0.28). Interestingly, 1MT treatment significantly reduced the level of QUIN in UCMS mice in comparison to vehicle-treated UCMS mice (p=0.00077; PS=0.999 – large effect). In addition, 1MT was able to reverse the diminution of the KYNA/QUIN ratio induced by UCMS (p=0.00077; PS=0.999 – large effect). We can also see that 1MT did not change neither the level of KYN (p=0.11) nor the K/T ratio (p=0.28) in UCMS mice when compared to vehicle-treated UCMS mice.

***Effects of Flx and 1MT on the KP in control mice**:* Once again, it is important to note that both Flx and 1MT were found to modify the content of some KP metabolites in control mice: 1MT significantly reduced KYN (p=0.025; PS=0.97 – large effect), 3HK (p=0.013; PS=0.99 – large effect), KYNA (p=0.013; PS=0.99 – large effect) and QUIN (p=0.013; PS=0.99 – large effect) while it did not change neither the K/T ratio (p=0.34) nor the KYNA/QUIN ratio (p=0.27) (Fig. 3). Flx treatment did not change the level of KYN

(p=0.52), 3HK (p=0.98), KYNA (p=0.12), the K/T ratio (p=0.37), but was able to increase the level of QUIN (p=0.0049; PS=0.99 – large effect) and to reduce the KYAN/QUIN ratio (p=0.0049; PS=0.99 – large effect).

In the CC (Figure 4): Kruskal-Wallis ANOVA revealed that all groups differed significantly for the level of KYN (H=20.6; p=0.001), 3HK (H=22.2; p=0.0001), QUIN (H=26.8; p=0.0001) and for the KYNA/QUIN ratio (H=23.1; p=0.0001).No differences were observed neither for the K/T ratio (H=5.12; p=0.40) nor for the level of KYNA (H=4.5; p=0.47).

***KP changes induced by UCMS**:* Fig. 4 illustrates the effect of UCMS on CC KP changes. UCMS did not change the level of KYN (p=0.57), KYNA (p=0.57), the K/T ratio (p=0.15) and the KYNA/QUIN ratio (p=0.29). However, UCMS induced a reduction of the level 3HK (p=0.020; PS=0.99 – large effect) and QUIN (p=0.02; PS=0.99 – large effect).

***Effects of Flx and 1MT on UCMS-induced KP alterations**:* Fig. 4 also shows that Flx was not able to reverse the UCMS-induced reduction in 3HK (p=0.22). Similar result was obtained for the UCMS-induced reduction of QUIN (p=0.72). 1MT was also unable to reverse these alterations, we even observed that 1MT worsen the effect of UCMS on 3HK and QUIN levels as their concentrations were significantly reduced compared to vehicle-treated UCMS mice (respectively p= 0.0033; PS= 0.99 – large effect; and p=0.023; PS=0.93 – large effect).

***Effects of Flx and 1MT on the KP in control mice**:* Flx significantly reduced the level of 3HK in control mice (p=0.020; PS=0.99 – large effect) but did not affect the level of KYN (p=0.07), KYNA (p=0.19), QUIN (p=0.15), the K/T ratio (p=0.15) and the KYNA/QUIN ratio (p=0.84) (Fig. 4). On the contrary, 1MT was found to reduce the level of KYN (p=0.047; PS=0.98 – large effect), 3HK (p=0.047; 0.98 – large effect), QUIN (p=0.047; PS=0.98 – large effect). 1MT also increased the KYNA/QUIN ratio (p=0.047; PS=0.99 – large effect) but did not change the K/T ratio (p=0.26).

In the HIPPO (Figure 5): All groups were found to be significantly different in their levels of KYN (H=36.7; p=0.0001), 3HK (H=16.6; p=0.005), QUIN (H=34.1; p=0.0001), KYNA (H=15.7; p=0.007) as well as the K/T (H=28.1; p=0.0001) and KYNA/QUIN (H=34.8; p=0.0001) ratios.

***KP changes induced by UCMS**:* Fig. 5 shows the effect of UCMS on hippocampal KP changes. Only the KYNA/QUIN ratio was found to be altered (reduction) by UCMS (p=0.04; PS=0.92 – large effect) as KYN (p=0.31), 3HK (p=0.59), KYNA (p=0.37), QUIN (p=0.065) and the K/T ratio (p=0.37) were not changed.

***Effects of Flx and 1MT on UCMS-induced KP alterations**:* However, we can see (Fig. 5) that Flx-treated UCMS mice had lowered levels of KYN (p=0.0033; PS=0.99 – large effect), a reduced K/T ratio (p=0.0066; PS=0.98 – large effect) and an increased KYNA/QUIN ratio (p=0.0033; PS=0.99 – large effect) when compared to vehicle-treated UCMS mice. Similarly, 1MT-treated UCMS mice expressed reduced levels of KYN (p=0.00023; PS=0.999 – large effect), 3HK (p=0.022; PS=0.88 – large effect), KYNA (p=0.042; PS=0.86 – large effect), QUIN (p=0.00023; PS=0.999 – large effect) and a reduced K/T ratio (p=0.0067; PS=0.98 – large effect) in comparison to vehicle-treated UCMS mice. They also had an increased KYNA/QUIN ratio (p=0.00023; PS=0.999 – large effect).

***Effects of Flx and 1MT on the KP in control mice**:* Fig. 5 also shows that Flx reduced KYN (p=0.003; PS=0.99 – large effect) and the K/T ratio (p=0.045; PS=0.89 – large effect), but did not change the levels of

other KP metabolites (p=0.11 for 3HK; p=0.44 for KYNA; p=0.38 for QUIN and p=0.14 for the KYNA/QUIN ratio). As opposed to Flx, 1MT induced a reduction of KYN (p=0.022; PS=0.99 – large effect), 3HK (p=0.049; PS=0.93 – large effect), KYNA (p=0.043; PS=0.95 – large effect), QUIN (p=0.022; PS=0.99 – large effect), the K/T ratio (p=0.049; PS=0.93 – large effect) but did not change the KYNA/QUIN ratio (p=0.12).

In the STR (Figure 6): According to the ANOVA of Kruskal-Wallis, all groups differed significantly regarding the level of KYN (H=23.4; p=0.0001), 3HK (H=34.2; p=0.0001), QUIN (H=27.9; p=0.0001), KYNA (H=19.4; p=0.001) as well as the K/T (H=19.5; p=0.001) and KYNA/QUIN (H=25.9; p=0.0001) ratios.

***KP changes induced by UCMS**:* Fig. 6 illustrates the effect of UCMS on striatal KP changes. No effects of UCMS were observed on KYN (p=0.44), K/T ratio (p=0.37) and QUIN levels (p=0.98) while KYNA and the KYNA/QUIN ratio were found to be lowered (respectively p=0.0033; PS=0.999 – large effect and p=0.04; PS=0.92 – large effect). We also showed that the level of 3HK was increased by UCMS (p=0.0033; PS=0.99 – large effect).

***Effects of Flx and 1MT on UCMS-induced KP alterations**:* Whereas Flx failed to reverse all UCMS-induced KP changes (Fig. 6), UCMS mice chronically treated with 1MT presented reduced levels of KYN (p=0.022; PS=0.89 – large effect), 3HK (p=0.00023, PS=0.999 – large effect), QUIN (p=0.00023; PS=0.999 – large effect) and also a lowered K/T ratio (p=0.0069; PS=0.92 – large effect) in comparison to vehicle-treated UCMS mice. Moreover, 1MT was able to increase the KYNA/QUIN ratio (p=0.0027; PS=0.95 – large effect). The level of KYNA was not significantly different in 1MT-treated UCMS mice than in vehicle-treated UCMS mice (p=0.57).

***Effects of Flx and 1MT on the KP in control mice**:* Fig. 6 also shows that Flx reduced KYN (p=0.0099; PS=0.97 – large effect) and KYNA (p=0.0049; PS=0.999 – large effect) levels in control mice, but did not change those of 3HK (p=0.44) and QUIN (p=0.90). In addition, Flx did not change K/T (p=0.14) and KYNA/QUIN ratios (p=0.060). On the contrary, the chronic treatment with 1MT lowered the level of 3HK (p=0.013; PS=0.99 – large effect), KYNA (p=0.013, PS=0.99 – large effect) and QUIN (p=0.013; PS=0.99 – large effect) without modifying the level of KYN (p=0.15), the K/T (p=0.11) and KYNA/QUIN (p=0.11) ratios.

Correlation between stress-related behaviours (Depressive Index) and 5-HT-KYN metabolites

Table 3 indicates how both the 5-HT and KYN pathways are correlated with behavioural changes induced by UCMS.

In the AMY: We can see that 3HK and KYNA/QUIN ratio were the only two biochemical parameters to be related to our depressive index (DI): they were respectively positively and negatively correlated to the DI (r=0.65; p=0.017 and r=-0.96; p=0.0061). No correlations were observed between DI and other KP metabolites or 5-HT pathway products.

In the CC: Only the level of KYN was found to be positively correlated to the DI (r=0.74; p=0.0019). They were no correlations between DI and other KP or 5-HT metabolites.

In the HIPPO: The level of KYN and QUIN were positively correlated to the DI (respectively r=0.63; p=0.011 and r=0.64; p=0.0084) while the KYNA/QUIN ratio was negatively correlated to the DI (r=-0.71; p=0.0013). Other parameters were not correlated to the DI.

In the STR: Once again, KYN and the KYNA/QUIN ratio were respectively positively (r=0.58; p=0.030) and negatively correlated to the DI (r=-0.61; p=0.016). We also observed a positive correlation with the level of 3HK (r=0.66; p=0.0042).

In the LUNG: The KYNA/QUIN was found to be negatively correlated to the DI (r=-0.67; p=0.0038) while the level of KYN, 3HK and QUIN were all positively correlated to the DI (respectively r=0.54; p=0.049 – r=0.65; p=0.0068 and r=0.69; p=0.0023).

Discussion

In the present study, we have demonstrated for the first time (1) that the antidepressant fluoxetine (Flx) is able to block both the peripheral KP activation and almost all cerebral UCMS-induced changes of the KP, (2) that the IDO-inhibitor 1MT is also capable of reducing biochemical alterations induced by UCMS and more importantly (3) that the IDO-blocker 1MT is as effective as Flx in reversing behavioural changes resulting from UCMS exposure. Finally, (4) we also show that both peripheral and cerebral KP changes might be directly involved in the modulation of stress-induced depressive-like states in UCMS mice. Results are summarized in Fig. 7.

UCMS induces KP alterations but does not modify 5-HT pathway.

In a previous study, we have shown that confronting mice to the UCMS model of depression resulted in both peripheral and cerebral KP changes (Laugeray, Launay *et coll.* 2010). On the one hand, peripheral KP was found to be activated and diverted towards the synthesis of the neurotoxic compound 3HK. On the other hand, KYN was found to be preferentially metabolized in 3HK in subcortical structures in UCMS mice (AMY and STR) while the contrary occurred at the cortical level (CC): the synthesis of 3HK was reduced. In the present work we confirmed these findings by showing, once again, that UCMS results in the activation of the peripheral KP (KYN and K/T ratio increased) and in the accumulation of peripheral 3HK. We significantly extended these results by demonstrating that UCMS also induces a rise in QUIN synthesis (not measured in our first study), providing the first evidence that chronic psychogenic stress induces accumulation of toxic KP metabolites in periphery. Regarding the effect of UCMS on the cerebral KP, we observe the same pattern of KP alterations than that of our first study: increased levels of 3HK in AMY and STR associated with a reduction of KYNA, and reduced levels of 3HK in CC. Interestingly, the level of QUIN is not modified by UCMS in three of the four corticolimbic structures studied here. Of note, the content of QUIN is reduced in CC in UCMS mice.

However, if the ratio between KYNA and QUIN is taken into account, our results show that UCMS induces a metabolic "shunt" towards the synthesis of 3HK and QUIN as the KYNA/QUIN ratio is found to be decreased both at the peripheral and cerebral level (only in AMY, STR and HIPPO). Considering the mechanism of action of these two compounds (QUIN=increase of glutamate levels and KYNA=decrease of

glutamate levels) and that this ratio has been previously described as a critical determinant of neuronal excitability and viability (Wu, Guidetti *et coll.* 2000), one can assume that such imbalances between QUIN and KYNA might underlie an increased excitogenic effect in amygdala and striatum and a reduced excitogenic effect in the cingulate cortex. Such a hypothesis could be particularly relevant if we consider human brain-imaging data showing that glutamatergic neurotransmission is reduced in prefrontal cortex (Feyissa, Chandran *et coll.* 2009) and increased in amygdala (Karolewicz, Szebeni *et coll.* 2009) in depressed patients.

If we look at the effect of UCMS on the 5-HT pathway, it is interesting to see that no alterations are observed in any of the cerebral structures except in the hippocampus where the level of 5-HT is found to be significantly decreased by chronic stress. Even if this finding is in agreement with several reports obtained in our lab (Vancassel, Leman *et coll.* 2008; Yalcin, Coubard *et coll.* 2008), this is not in accordance with our previous study in which no difference in the level of 5-HT was observed in the hippocampus (Laugeray, Launay *et coll.* 2010). One possible explanation for this could be related to the higher intensity of the UCMS protocol used in the present study. Indeed, we did not carry out daily intraperitoneal injections in our first work, and, because such a routine is known to be very stressful for animals (Drude, Olfe et coll. 2009), our first protocol was probably less stressful for mice and consequently could contribute to these discrepancies.

Fluoxetine is able to reverse UCMS-induced alterations

As expected, our data indicate that a chronic treatment with Flx – a clinically proven antidepressant - successfully reversed almost all behavioural alterations induced by UCMS. It is interesting to note that these effects happen concomitantly to KP changes but not to 5-HT pathway changes. This result suggests that UCMS-induced behavioural changes would be mediated, at least partially, by peripheral and/or cerebral KP alterations rather than by abnormalities in cerebral 5-HT contents. At the peripheral level, Flx potently reversed the activation of the KP by reducing KYN and K/T ratio to the level of vehicle-treated control mice. Two distinct mechanisms could explain such an effect. First, it has been reported that Flx has negative immunomodulatory effects by reducing the level of circulating proinflammatory cytokines such as IL-6 (Sacre, Medghalchi et coll. 2010) and IFNγ (Tsao, Lin et coll. 2006). Given that IDO is activated by these mediators, it is possible that the reversal of KP alterations is the result of the anti-inflammatory effect of Flx. The second mechanism by which Flx could block KP activation is related to TDO, the other TRP to KYN converting enzyme. Indeed, Bano et *al.* have demonstrated that acute administration of Flx could efficiently decrease the activity of TDO in rats by inhibiting the binding between the apoenzyme form of TDO and its cofactor (Bano, Morgan *et coll.* 1999; Bano and Sherkheli 2003). Sherkheli et *al.* have reported similar effects of an acute injection of Flx in both male and female rats at 10 and 30 mg/kg doses (Sherkheli and Bano 2003). Therefore, such an inhibitory effect of Flx might constitute a key mechanism by which this molecule could reverse KP activation induced by UCMS. In addition, there is another way for Flx to exert such an effect: by reversing changes in plasmatic glucocorticoïds induced by UCMS. Indeed, a chronic treatment with Flx has been shown to restore HPA axis function in UCMS mice, the consequence of which is the reinstatement of physiological levels of circulating corticosterone (Belzung and Surget 2008).

Corticosterone being a determinant activator of the KP through TDO, a Flx-mediated diminution of corticosterone levels could be responsible for the reversal of KP activation observed in this study.
Our results also show that chronic treatment with Flx is able to prevent tissue accumulation of downstream KP metabolites in a structure dependent manner (UCMS-induced changes are restored in AMY and HIPPO but not in CC and STR), without altering the level of KYN nor the K/T ratio. Once again, two mechanisms are likely to explain these results. This first one is related to the effect of Flx on peripheral KYN contents. Indeed, we show here that Flx treatment diminishes peripheral KYN that is the main source of cerebral KYN (Stone 1993). Therefore, a lowered KYN supply into the brain might be the cause of the decrease of KP metabolites observed after a chronic treatment with Flx. Data obtained in control mice chronically treated with Flx are in agreement with such a hypothesis as peripheral KYN levels are also reduced in those mice. However, the fact that cerebral KYNA levels are not reduced (as expected if the above hypothesis is true) strongly suggests that another mechanism is involved. Maybe the anti-inflammatory effect of Flx could be implicated .Indeed, Flx has been shown to reduce the level of proinflammatory cytokines (Kubera, Lin et coll. 2001). Given that some KP enzymes such as kynurenine monooxygenase (responsible for 3HK synthesis from KYN) are known to be activated by proinflammatory cytokines (Chiarugi, Calvani *et coll.* 2001), Flx might prevent UCMS-induced alterations of KP metabolites by locally decreasing the synthesis of proinflammatory mediators. Taken together, our data indicate that a chronic treatment with the classical antidepressant fluoxetine prevents both peripheral and cerebral alterations of the KP, but our findings don't allow concluding on the respective role of IDO or TDO in these inhibitory mechanisms.

1-methyltryptophan is also able to reverse alterations induced by the UCMS

The main finding of this study is undoubtedly that the IDO blocker 1MT seems to be as effective as Flx to reverse UCMS-induced behavioural alterations. Indeed, this result clearly demonstrates firstly that KP is a key component of the pathogenesis of depressive symptoms and secondly that IDO is a critical and specific molecular mediator of depressive-like behaviour given that 1MT does not affect the activity of TDO (Suzuki, Tone *et coll.* 2001). Previous studies have already brought evidence for such a determinant role of 1MT in the modulation of depressive-like states. Indeed, O'Connor *et al.* have shown that blocking IDO by 1MT could partially reverse LPS-induced expression of depressive-like behaviour in the FST in mice (O'Connor, Lawson *et coll.* 2008). In another study, these authors have shown similar results by using a model of depressive syndrome based on chronic inflammation (O'Connor, Lawson *et coll.* 2009). Taken together, these findings strongly suggest that IDO activation is an important pathological mechanism involved in inflammation-induced depressive-like states. Also in line with this are the results of Kiank *et al.* showing that 1MT is able to prevent behavioural alterations induced by five days of combined acoustic and immobilization stress (2h twice a day) in BALB/c mice (Kiank, Voss et coll. 2009). In a more recent work, the same authors have shown that stress-induced IDO up-regulation was also blocked by anti-TNFα and anti-IFNγ treatment indicating that these cytokines are involved in stress-induced activation of the KP (Kiank, Zeden *et coll.* 2010). Given that we used the same train of mice and also that our stress protocol used similar stressors (psychogenic), we can assume that UCMS-induced KP activation could be related to increased

levels of TNFα and/or IFNγ. If true, such a pathological mechanism would be in accordance with the above mentioned hypothesis concerning the anti-inflammatory effect of Flx that would be responsible for the reversal of KP alterations. Interestingly, we also show that 1MT induces KP changes in control mice without promoting modifications of behaviour. This finding suggests that KP activation could be involved in depressive-like states only during specific conditions i.e. sustained inflammatory and/or neuroendocrine disturbances, resulting in increased synthesis of neuroactive KP metabolites. This hypothesis is supported by the fact that the behavioural response to exogenously administered KYN in naïve mice is dose-dependent (O'Connor, Lawson *et coll.* 2008), implying a possible threshold requirement for the activation of IDO and subsequent induction of depressive-like behaviours.

KYNA/QUIN ratio is inversely correlated to UCMS-generated behavioural alterations

One way by which activation of the KP may alter physiological systems underlying the expression of depressive-like behaviours is the synthesis of neuroactive metabolites such as the free radical generator 3HK, the pro-glutamatergic QUIN and the anti-glutamategic KYNA. Indeed, modulating glutamatergic levels may induce behavioural changes either by directly acting on glutamate receptors (Cortese, Mitchell *et coll.* 2010) or by indirectly influencing the release of other neurotransmitters (Pinheiro and Mulle 2008). Moreover, it is recognized that accumulation of free radicals is also related to behavioural alterations through the increase in oxidative stress (Rammal, Bouayed *et coll.* 2008). In addition to promote glutamate release, QUIN also induces oxidative stress (Rios and Santamaria 1991; Behan, McDonald *et coll.* 1999; Guidetti and Schwarcz 1999; Chiarugi, Meli *et coll.* 2001). As a consequence, QUIN accumulation in tissues is likely to be toxic for cerebral cells and in turn can be responsible for behavioural alterations. In line with such an assumption, we report in this study a robust and reliable inverse correlation between the KYNA/QUIN ratio and UCMS-induced alterations of behaviour. Such a correlation is observed in three of the four corticolimbic structures investigated, and indicates that during UCMS condition, the “hijacking” of the balance between QUIN and KYNA towards the former is associated with a more significant depressive-like state. This finding seems to be particularly relevant in the context of depression considering the fact that similar results were obtained in depressed patients in whom CSF levels of QUIN was reported to be positively correlated with the intensity of depressive symptoms (Raison, Dantzer *et coll.* 2009).

In conclusion, the present study identifies IDO as a determinant mediator of chronic stress-induced depressive-like states. We have also brought evidence that depressive syndrome is associated with an increase in degradation of TRP along the KP resulting in tissue accumulation of neuroactive compounds capable of triggering behavioural changes. In addition, we can assume that the antidepressant effect of Flx could be mediated, at least in part, by preventing both peripheral and cerebral KP alterations. But most importantly, our findings indicate that blocking the TRP degrading enzyme IDO can counteract UCMS-induced behavioural changes as well as classical antidepressants and might consequently constitute an effective therapeutic strategy for patients suffering from depressive disorders.

Financial Disclosures

Anthony Laugeray, Jean-Marie Launay, Jacques Callebert, Mutlu Oguz, Julien Célestine and Pascal Barone report no biomedical financial interests or potential conflicts of interests. Catherine Belzung is a consultant for Takeda.

REFERENCES

Acion L, Peterson JJ, Temple S, Arndt S (2006). Probabilistic index: an intuitive non-parametric approach to measuring the size of treatment effects. Stat Med 25(4): 591-602.

Andre C, O'Connor JC, Kelley KW, Lestage J, Dantzer R, Castanon N (2008). Spatio-temporal differences in the profile of murine brain expression of proinflammatory cytokines and indoleamine 2,3-dioxygenase in response to peripheral lipopolysaccharide administration. J Neuroimmunol 200(1-2): 90-99.

Baban B, Chandler PR, Sharma MD, Pihkala J, Koni PA, Munn DH, et al (2009). IDO activates regulatory T cells and blocks their conversion into Th17-like T cells. J Immunol 183(4): 2475-2483.

Bano S, Morgan CJ, Badawy AA, Buckland PR, Guffin PM (1999). Inhibition of rat liver tryptophan pyrrolase activity by fluoxetine. Pak J Pharm Sci 12(2): 11-16.

Bano S, Sherkheli MA (2003). Inhibition of tryptophan - pyrrolase activity and elevation of brain tryptophan concentration by fluoxetine in rats. J Coll Physicians Surg Pak 13(1): 5-10.

Behan WM, McDonald M, Darlington LG, Stone TW (1999). Oxidative stress as a mechanism for quinolinic acid-induced hippocampal damage: protection by melatonin and deprenyl. Br J Pharmacol 128(8): 1754-1760.

Belzung C, Surget A (2008). Unpredictable chronic mild stress in mice. In: Kalueff. AV, Laporte. JL (eds). Experimental Models in Neurobehavioral Research. Nova Science: New York.

Beutelspacher SC, Tan PH, McClure MO, Larkin DF, Lechler RI, George AJ (2006). Expression of indoleamine 2,3-dioxygenase (IDO) by endothelial cells: implications for the control of alloresponses. Am J Transplant 6(6): 1320-1330.

Bonaccorso S, Marino V, Puzella A, Pasquini M, Biondi M, Artini M, et al (2002). Increased depressive ratings in patients with hepatitis C receiving interferon-alpha-based immunotherapy are related to interferon-alpha-induced changes in the serotonergic system. J Clin Psychopharmacol 22(1): 86-90.

Capuron L, Ravaud A, Neveu PJ, Miller AH, Maes M, Dantzer R (2002). Association between decreased serum tryptophan concentrations and depressive symptoms in cancer patients undergoing cytokine therapy. Mol Psychiatry 7(5): 468-473.

Carroll BJ, Cassidy F, Naftolowitz D, Tatham NE, Wilson WH, Iranmanesh A, et al (2007). Pathophysiology of hypercortisolism in depression. Acta Psychiatr Scand Suppl(433): 90-103.

Chiarugi A, Calvani M, Meli E, Traggiai E, Moroni F (2001a). Synthesis and release of neurotoxic kynurenine metabolites by human monocyte-derived macrophages. J Neuroimmunol 120(1-2): 190-198.

Chiarugi A, Meli E, Moroni F (2001b). Similarities and differences in the neuronal death processes activated by 3OH-kynurenine and quinolinic acid. J Neurochem 77(5): 1310-1318.

Comings DE, Muhleman D, Dietz G, Sherman M, Forest GL (1995). Sequence of human tryptophan 2,3-dioxygenase (TDO2): presence of a glucocorticoid response-like element composed of a GTT repeat and an intronic CCCCT repeat. Genomics 29(2): 390-396.

Connor TJ, Starr N, O'Sullivan JB, Harkin A (2008). Induction of indolamine 2,3-dioxygenase and kynurenine 3-monooxygenase in rat brain following a systemic inflammatory challenge: a role for IFN-gamma? Neurosci Lett 441(1): 29-34.

Cortese BM, Mitchell TR, Galloway MP, Prevost KE, Fang J, Moore GJ, et al (2010). Region-specific alteration in brain glutamate: Possible relationship to risk-taking behavior. Physiol Behav 99(4): 445-450.

Curtin F, Schulz P (1998). Multiple correlations and Bonferroni's correction. Biol Psychiatry 44(8): 775-777.

Dantzer R, O'Connor JC, Freund GG, Johnson RW, Kelley KW (2008). From inflammation to sickness and depression: when the immune system subjugates the brain. Nat Rev Neurosci 9(1): 46-56.

Delaney HD, Vargha A (2002). Comparing several robust tests of stochastic equality with ordinally scaled variables and small to moderate sized samples. Psychol Methods 7(4): 485-503.

Drude S, Olfe J, Geissler A, Domanska G, Schuett C, Kiank C (2009). Modulation of HPA-axis responsiveness by laboratory stress or shipment of mice alters experimental data. Brain Behav Immun 23(Supplement 2): S33-S34.

Ducottet C, Griebel G, Belzung C (2003). Effects of the selective nonpeptide corticotropin-releasing factor receptor 1 antagonist antalarmin in the chronic mild stress model of depression in mice. Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry 27(4): 625-631.

Feyissa AM, Chandran A, Stockmeier CA, Karolewicz B (2009). Reduced levels of NR2A and NR2B subunits of NMDA receptor and PSD-95 in the prefrontal cortex in major depression. Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry 33(1): 70-75.

Fitzgerald P, Cassidy Eugene M, Clarke G, Scully P, Barry S, Quigley Eamonn MM, et al (2008). Tryptophan catabolism in females with irritable bowel syndrome: relationship to interferon-gamma, severity of symptoms and psychiatric co-morbidity. Neurogastroenterol Motil 20(12): 1291-1297.

Fujigaki S, Saito K, Takemura M, Fujii H, Wada H, Noma A, et al (1998). Species differences in L-tryptophan-kynurenine pathway metabolism: quantification of anthranilic acid and its related enzymes. Arch Biochem Biophys 358(2): 329-335.

Griebel G, Simiand J, Serradeil-Le Gal C, Wagnon J, Pascal M, Scatton B, et al (2002). Anxiolytic- and antidepressant-like effects of the non-peptide vasopressin V1b receptor antagonist, SSR149415, suggest an innovative approach for the treatment of stress-related disorders. Proc Natl Acad Sci U S A 99(9): 6370-6375.

Grissom RJ, Kim JJ (2001). Review of assumptions and problems in the appropriate conceptualization of effect size. Psychol Methods 6(2): 135-146.

Guidetti P, Schwarcz R (1999). 3-Hydroxykynurenine potentiates quinolinate but not NMDA toxicity in the rat striatum. Eur J Neurosci 11(11): 3857-3863.

Guillemin GJ, Brew BJ, Noonan CE, Takikawa O, Cullen KM (2005). Indoleamine 2,3 dioxygenase and quinolinic acid immunoreactivity in Alzheimer's disease hippocampus. Neuropathol Appl Neurobiol 31(4): 395-404.

Hashimoto K (2009). Emerging role of glutamate in the pathophysiology of major depressive disorder. Brain Res Rev.

Heyes MP, Markey SP (1988). Quantification of quinolinic acid in rat brain, whole blood, and plasma by gas chromatography and negative chemical ionization mass spectrometry: effects of systemic L-tryptophan administration on brain and blood quinolinic acid concentrations. Anal Biochem 174(1): 349-359.

Holsboer F (2001). Stress, hypercortisolism and corticosteroid receptors in depression: implications for therapy. J Affect Disord 62(1-2): 77-91.

Kalueff AV, Tuohimaa P (2004). Grooming analysis algorithm for neurobehavioural stress research. Brain Res Brain Res Protoc 13(3): 151-158.

Karolewicz B, Szebeni K, Gilmore T, Maciag D, Stockmeier CA, Ordway GA (2009). Elevated levels of NR2A and PSD-95 in the lateral amygdala in depression. Int J Neuropsychopharmacol 12(2): 143-153.

Kema IP, Schellings AM, Hoppenbrouwers CJ, Rutgers HM, de Vries EG, Muskiet FA (1993). High performance liquid chromatographic profiling of tryptophan and related indoles in body fluids and tissues of carcinoid patients. Clin Chim Acta 221(1-2): 143-158.

Kiank C, Entleutner M, Furll B, Holtfreter B, Heidecke C, Wilke C, et al (2005). Chronic psychological stress severely impairs innate and adaptive immune competence and induces sickness behavior in mice. Brain Behav Immun 20(4): 359-368.

Kiank C, Holtfreter B, Starke A, Mundt A, Wilke C, Schutt C (2006). Stress susceptibility predicts the severity of immune depression and the failure to combat bacterial infections in chronically stressed mice. Brain Behav Immun 20(4): 359-368.

Kiank C, Voss S, Starcke A, Zeden JP, domanska G, Fusch G, et al (2009). Proinflammatory cytokines mediate acute stress-induced loss of intestinal barrier function in the terminal ileum which enhances tryptophan catabolism in BALB/C mice. Brain Behav Immun 22(4).

Kiank C, Zeden JP, Drude S, Domanska G, Fusch G, Otten W, et al (2010). Psychological stress-induced, IDO1-dependent tryptophan catabolism: implications on immunosuppression in mice and humans. PLoS One 5(7): e11825.

Konsman JP, Parnet P, Dantzer R (2002). Cytokine-induced sickness behaviour: mechanisms and implications. Trends Neurosci 25(3): 154-159.

Kraemer HC, Kupfer DJ (2006). Size of treatment effects and their importance to clinical research and practice. Biol Psychiatry 59(11): 990-996.

Kubera M, Lin AH, Kenis G, Bosmans E, van Bockstaele D, Maes M (2001). Anti-Inflammatory effects of antidepressants through suppression of the interferon-gamma/interleukin-10 production ratio. J Clin Psychopharmacol 21(2): 199-206.

Laugeray A, Launay JM, Callebert J, Surget A, Belzung C, Barone PR (2010). Peripheral and cerebral metabolic abnormalities of the tryptophan-kynurenine pathway in a murine model of major depression. Behav Brain Res 210(1): 84-91.

Maes M, Verkerk R, Bonaccorso S, Ombelet W, Bosmans E, Scharpe S (2002). Depressive and anxiety symptoms in the early puerperium are related to increased degradation of tryptophan into kynurenine, a phenomenon which is related to immune activation. Life Sci 71(16): 1837-1848.

Mellor AL, Munn DH (2004). IDO expression by dendritic cells: tolerance and tryptophan catabolism. Nat Rev Immunol 4(10): 762-774.

Mineur YS, Prasol DJ, Belzung C, Crusio WE (2003). Agonistic behavior and unpredictable chronic mild stress in mice. Behav Genet 33(5): 513-519.

Moreau M, Lestage J, Verrier D, Mormede C, Kelley KW, Dantzer R, et al (2005). Bacille Calmette-Guerin inoculation induces chronic activation of peripheral and brain indoleamine 2,3-dioxygenase in mice. J Infect Dis 192(3): 537-544.

Moroni F, Lombardi G, Carla V, Moneti G (1984). The excitotoxin quinolinic acid is present and unevenly distributed in the rat brain. Brain Res 295(2): 352-355.

Mutlu O, Ulak G, Laugeray A, Belzung C (2009). Effects of neuronal and inducible NOS inhibitor 1-[2-(trifluoromethyl) phenyl] imidazole (TRIM) in unpredictable chronic mild stress procedure in mice. Pharmacol Biochem Behav 92(1): 82-87.

Myint AM, Kim YK (2003). Cytokine-serotonin interaction through IDO: a neurodegeneration hypothesis of depression. Med Hypotheses 61(5-6): 519-525.

O'Connor JC, Andre C, Wang Y, Lawson MA, Szegedi SS, Lestage J, et al (2009a). Interferon-gamma and tumor necrosis factor-alpha mediate the upregulation of indoleamine 2,3-dioxygenase and the induction of depressive-like behavior in mice in response to bacillus Calmette-Guerin. J Neurosci 29(13): 4200-4209.

O'Connor JC, Lawson MA, Andre C, Briley EM, Szegedi SS, Lestage J, et al (2009b). Induction of IDO by bacille Calmette-Guerin is responsible for development of murine depressive-like behavior. J Immunol 182(5): 3202-3212.

O'Connor JC, Lawson MA, Andre C, Moreau M, Lestage J, Castanon N, et al (2008). Lipopolysaccharide-induced depressive-like behavior is mediated by indoleamine 2,3-dioxygenase activation in mice. Mol Psychiatry.

Odemuyiwa SO, Ghahary A, Li Y, Puttagunta L, Lee JE, Musat-Marcu S, et al (2004). Cutting edge: human eosinophils regulate T cell subset selection through indoleamine 2,3-dioxygenase. J Immunol 173(10): 5909-5913.

Paxinos G, Franklin K (2001). The Mouse Brain in Stereotoxic Coordinates. Academic Press: San Diego, CA.

Pinheiro PS, Mulle C (2008). Presynaptic glutamate receptors: physiological functions and mechanisms of action. Nat Rev Neurosci 9(6): 423-436.

Porsolt RD, Bertin A, Jalfre M (1977). Behavioral despair in mice: a primary screening test for antidepressants. Arch Int Pharmacodyn Ther 229(2): 327-336.

Raison CL, Dantzer R, Kelley KW, Lawson MA, Woolwine BJ, Vogt G, et al (2009). CSF concentrations of brain tryptophan and kynurenines during immune stimulation with IFN-alpha: relationship to CNS immune responses and depression. Mol Psychiatry.

Rammal H, Bouayed J, Younos C, Soulimani R (2008). Evidence that oxidative stress is linked to anxiety-related behaviour in mice. Brain Behav Immun 22(8): 1156-1159.

Rios C, Santamaria A (1991). Quinolinic acid is a potent lipid peroxidant in rat brain homogenates. Neurochem Res 16(10): 1139-1143.

Roy EJ, Takikawa O, Kranz DM, Brown AR, Thomas DL (2005). Neuronal localization of indoleamine 2,3-dioxygenase in mice. Neurosci Lett 387(2): 95-99.

Sacre S, Medghalchi M, Gregory B, Brennan F, Williams R (2010). Fluoxetine and citalopram exhibit potent antiinflammatory activity in human and murine models of rheumatoid arthritis and inhibit toll-like receptors. Arthritis Rheum 62(3): 683-693.

Salter M, Pogson CI (1985). The role of tryptophan 2,3-dioxygenase in the hormonal control of tryptophan metabolism in isolated rat liver cells. Effects of glucocorticoids and experimental diabetes. Biochem J 229(2): 499-504.

Sanacora G, Zarate CA, Krystal JH, Manji HK (2008). Targeting the glutamatergic system to develop novel, improved therapeutics for mood disorders. Nat Rev Drug Discov 7(5): 426-437.

Santarelli L, Saxe M, Gross C, Surget A, Battaglia F, Dulawa S, et al (2003). Requirement of hippocampal neurogenesis for the behavioral effects of antidepressants. Science 301(5634): 805-809.

Schrocksnadel K, Wirleitner B, Winkler C, Fuchs D (2006). Monitoring tryptophan metabolism in chronic immune activation. Clin Chim Acta 364(1-2): 82-90.

Schroecksnadel K, Kaser S, Ledochowski M, Neurauter G, Mur E, Herold M, et al (2003). Increased degradation of tryptophan in blood of patients with rheumatoid arthritis. J Rheumatol 30(9): 1935-1939.

Sherkheli MA, Bano S (2003). Similar pattern of inhibition of tryptophan pyrrolase activity by fluoxetine hydrochloride in both sexes of rats. Pak J Pharm Sci 16(2): 51-58.

Simon NM, McNamara K, Chow CW, Maser RS, Papakostas GI, Pollack MH, et al (2008). A detailed examination of cytokine abnormalities in Major Depressive Disorder. Eur Neuropsychopharmacol 18(3): 230-233.

Skolnick P, Popik P, Trullas R (2009). Glutamate-based antidepressants: 20 years on. Trends Pharmacol Sci 30(11): 563-569.

Smith RS (1991). The macrophage theory of depression. Med Hypotheses 35(4): 298-306.

Stone TW (1993). Neuropharmacology of quinolinic and kynurenic acids. Pharmacol Rev 45(3): 309-379.

Surget A, Wang Y, Leman S, Ibarguen-Vargas Y, Edgar N, Griebel G, et al (2009). Corticolimbic transcriptome changes are state-dependent and region-specific in a rodent model of depression and of antidepressant reversal. Neuropsychopharmacology 34(6): 1363-1380.

Suzuki S, Tone S, Takikawa O, Kubo T, Kohno I, Minatogawa Y (2001). Expression of indoleamine 2,3-dioxygenase and tryptophan 2,3-dioxygenase in early concepti. Biochem J 355(Pt 2): 425-429.

Swardfager W, Herrmann N, Dowlati Y, Oh PI, Kiss A, Walker SE, et al (2009). Indoleamine 2,3-dioxygenase activation and depressive symptoms in patients with coronary artery disease. Psychoneuroendocrinology.

Taher YA, Piavaux BJ, Gras R, van Esch BC, Hofman GA, Bloksma N, et al (2008). Indoleamine 2,3-dioxygenase-dependent tryptophan metabolites contribute to tolerance induction during allergen immunotherapy in a mouse model. J Allergy Clin Immunol 121(4): 983-991 e982.

Tavares RG, Schmidt AP, Abud J, Tasca CI, Souza DO (2005). In vivo quinolinic acid increases synaptosomal glutamate release in rats: reversal by guanosine. Neurochem Res 30(4): 439-444.

Tsao CW, Lin YS, Chen CC, Bai CH, Wu SR (2006). Cytokines and serotonin transporter in patients with major depression. Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry 30(5): 899-905.

Vancassel S, Leman S, Hanonick L, Denis S, Roger J, Nollet M, et al (2008). n-3 polyunsaturated fatty acid supplementation reverses stress-induced modifications on brain monoamine levels in mice. J Lipid Res 49(2): 340-348.

Weiss G, Murr C, Zoller H, Haun M, Widner B, Ludescher C, et al (1999). Modulation of neopterin formation and tryptophan degradation by Th1- and Th2-derived cytokines in human monocytic cells. Clin Exp Immunol 116(3): 435-440.

Wichers MC, Koek GH, Robaeys G, Verkerk R, Scharpe S, Maes M (2005). IDO and interferon-alpha-induced depressive symptoms: a shift in hypothesis from tryptophan depletion to neurotoxicity. Mol Psychiatry 10(6): 538-544.

Widner B, Laich A, Sperner-Unterweger B, Ledochowski M, Fuchs D (2002). Neopterin production, tryptophan degradation, and mental depression--what is the link? Brain Behav Immun 16(5): 590-595.

Widner B, Leblhuber F, Walli J, Tilz GP, Demel U, Fuchs D (1999). Degradation of tryptophan in neurodegenerative disorders. Adv Exp Med Biol 467: 133-138.

Widner B, Leblhuber F, Walli J, Tilz GP, Demel U, Fuchs D (2000). Tryptophan degradation and immune activation in Alzheimer's disease. J Neural Transm 107(3): 343-353.

Willner P (1997). Validity, reliability and utility of the chronic mild stress model of depression: a 10-year review and evaluation. Psychopharmacology (Berl) 134(4): 319-329.

Wirleitner B, Rudzite V, Neurauter G, Murr C, Kalnins U, Erglis A, et al (2003). Immune activation and degradation of tryptophan in coronary heart disease. Eur J Clin Invest 33(7): 550-554.

Wu HQ, Guidetti P, Goodman JH, Varasi M, Ceresoli-Borroni G, Speciale C, et al (2000). Kynurenergic manipulations influence excitatory synaptic function and excitotoxic vulnerability in the rat hippocampus in vivo. Neuroscience 97(2): 243-251.

Wu HQ, Pereira EF, Bruno JP, Pellicciari R, Albuquerque EX, Schwarcz R (2009). The Astrocyte-Derived alpha7 Nicotinic Receptor Antagonist Kynurenic Acid Controls Extracellular Glutamate Levels in the Prefrontal Cortex. J Mol Neurosci.

Yalcin I, Coubard S, Bodard S, Chalon S, Belzung C (2008). Effects of 5,7-dihydroxytryptamine lesion of the dorsal raphe nucleus on the antidepressant-like action of tramadol in the unpredictable chronic mild stress in mice. Psychopharmacology (Berl) 200(4): 497-507.

Figures legend

Figure 1: Simplified representation of the metabolism of tryptophan. TRP = tryptophan; 5-HTP = 5-hydroxytryptophan; 5-HT = serotonin; 5-HIAA = 5-hydroxyindoleacetic acid; MEL = melatonin; KYN = kynurenine; TDO = tryptophan-2,3-dioxygenase; IDO = indoleamine-2,3-dioxygenase; 3HK = 3-hydroxykynurenine; AA = anthranilic acid; 5HAA = 5-hydroxyanthranilic acid; 3HAA = 3-hydroxyanthranilic acid; QUIN = quinolinic acid; KYNA = Kynurenic acid; NAD = nicotinamide adenosine dinucleotide. Surrounded compounds = metabolites measured in this study.

Figure 2: Effect of UCMS and chronic treatment with fluoxetine or 1-methyltryptophan on kynurenine pathway metabolites in the lungs. Data are the median ± SIQR (semi interquartile range). N=5-9/group. KYN = kynurenine; K/T = kynurenine to tryptophan ratio; 3HK = 3-hydroxykynurenine; QUIN = quinolinic acid, KYNA = Kynurenic acid. Multiple comparisons were performed. Consequently, significant p values were corrected (divided by 5 as we did 5 comparisons) according the method of Bonferroni. * $p<0.05$; ** $p<0.01$ and *** $p<0.005$ in comparison to vehicle-treated control mice. + $p<0.05$ and +++ $p<0.005$ in comparison to vehicle-treated UCMS mice.

Figure 3: Effect of UCMS and chronic treatment with fluoxetine or 1-methyltryptophan on kynurenine pathway metabolites in amygdala (AMY). Data are the median ± SIQR (semi interquartile range). N=5-9/group. KYN = kynurenine; K/T = kynurenine to tryptophan ratio; 3HK = 3-hydroxykynurenine; QUIN = quinolinic acid, KYNA = Kynurenic acid. Multiple comparisons were performed. Consequently, significant p values were corrected (divided by 5 as we did 5 comparisons) according the method of Bonferroni. * $p<0.05$; ** $p<0.01$ and *** $p<0.005$ in comparison to vehicle-treated control mice. + $p<0.05$ and +++ $p<0.005$ in comparison to vehicle-treated UCMS mice.

Figure 4: Effect of UCMS and chronic treatment with fluoxetine or 1-methyltryptophan on kynurenine pathway metabolites in cingulate cortex (CC). Data are the median ± SIQR (semi interquartile range). N=5-9/group. KYN = kynurenine; K/T = kynurenine to tryptophan ratio; 3HK = 3-hydroxykynurenine; QUIN = quinolinic acid, KYNA = Kynurenic acid. Multiple comparisons were performed. Consequently, significant p values were corrected (divided by 5 as we did 5 comparisons) according the method of Bonferroni. * $p<0.05$; ** $p<0.01$ and *** $p<0.005$ in comparison to vehicle-treated control mice. + $p<0.05$ and +++ $p<0.005$ in comparison to vehicle-treated UCMS mice.

Figure 5: Effect of UCMS and chronic treatment with fluoxetine or 1-methyltryptophan on kynurenine pathway metabolites in hippocampus (HIPPO). Data are the median ± SIQR (semi interquartile range). N=5-9/group. KYN = kynurenine; K/T = kynurenine to tryptophan ratio; 3HK = 3-hydroxykynurenine; QUIN = quinolinic acid, KYNA = Kynurenic acid. Multiple comparisons were performed. Consequently, significant p values were corrected (divided by 5 as we did 5 comparisons) according the method of Bonferroni. * $p<0.05$; ** $p<0.01$ and *** $p<0.005$ in comparison to vehicle-treated control mice. + $p<0.05$ and +++ $p<0.005$ in comparison to vehicle-treated UCMS mice.

Figure 6: Effect of UCMS and chronic treatment with fluoxetine or 1-methyltryptophan on kynurenine pathway metabolites in striatum (STR). Data are the median ± SIQR (semi interquartile range). N=5-9/group. KYN = kynurenine; K/T = kynurenine to tryptophan ratio; 3HK = 3-

hydroxykynurenine; QUIN = quinolinic acid, KYNA = Kynurenic acid. Multiple comparisons were performed. Consequently, significant p values were corrected (divided by 5 as we did 5 comparisons) according the method of Bonferroni. * $p<0.05$; ** $p<0.01$ and *** $p<0.005$ in comparison to vehicle-treated control mice. + $p<0.05$ and +++ $p<0.005$ in comparison to vehicle-treated UCMS mice.

Figure 7: Peripheral and brain kynurenine pathway alterations induced by UCMS in mice and reversal by chronic treatment with 1-methyltryptophan or fluoxetine. KYN = kynurenine; K/T = kynurenine to tryptophan ratio; 3HK = 3-hydroxykynurenine; QUIN = quinolinic acid, KYNA = Kynurenic acid. Arrows indicate the direction of the UCMS effect in corresponding tissues. UCMS induced an accelerated use of TRP along the KP in periphery (LUNG). In brain, KP was affected by UCMS in a region-dependent manner: QUIN pathway being favoured in the lungs (LUNG), amygdala (AMY), hippocampus (HIPPO) and striatum (STR). Most alterations were prevented not only by fluoxetine but also by 1-methyltryptophan.

Table 1:

Table 1 - Effects of UCMS, fluoxetine and 1-methyltryptophan on behavioural parameters

	Coat state	NSF test			FST	Splash test		R/I test	Stress index
	Total score	Latency to chew (s)	Distance travelled (m)	Immobility time (s)	Immobility time (s)	Latency to groom (s)	Time grooming (s)	Time exploring the intruder (s)	Score of behavioural alterations induced by UCMS
NSVeh	1±0.25	53.7±43.6	11.4±1.6	61±20	157±13	31±20	59±31	62±18	22.5±3.5
NSFlx	0.75±0.5	31.5±7.9 *	5.3±1.2 ***	111±30 ***	149±29	85±48	25±16 *	60±16	25±1.75
NS1MT	0.75±0.25	163±106	13.8+2.19	41±18	119±29	63±17	62±11	58±2	25.5±3.1
Sveh	2±0.44 ***	67.7±39.5	7.2±1.8 *	101±20 *	86±21 ***	168±40 ***	10±13 **	149±35 ***	35±2 ***
SFlx	1.5±0.25 +	77.5±13.8	12.4±1.1 +++	78±9 +	108±28	135±64	30±25	121±26 +	28±2.2 +++
S1MT	1.5±0.5 +	70.2±13.4	13.6±2.1 +++	73±7 +	125±18 +	88±87	9±13	106±41 +	27±1.5 +++

* p<0.05 in comparison to "NSVeh"; ** p<0.01 in comparison to "NSVeh"; *** p<0.005 in comparison to "NSVeh"
+ p<0.05 in comparison to "SVeh"; ++ p<0.01 in comparison to "SVeh"; +++ p<0.005 in comparison to "SVeh"

Data are the median ± SIQR (semi-interquartile range). NSF test = Novelty Suppression of Feeding test; FST = Forced Swim Test; R/I test = Resident/Intruder test; NSVeh = vehicle-treated control mice; NSFlx = fluoxetine-treated control mice, NS1MT = 1MT-treated control mice; SVeh = vehicle-treated UCMS mice; SFlx = fluoxetine-treated UCMS mice and S1MT = 1MT-treated UCMS mice. Multiple comparisons were performed. Consequently, significant p values were corrected (divided by 5 as we performed 5 comparisons) according to the method of Bonferroni: * p<0.05; ** p<0.01 and *** p<0.005 in comparison to NSVeh. + p<0.05 and +++ p<0.005 in comparison to SVeh.

Table 2:

Table 2- Effects of the UCMS, fluoxetine and 1-methyltryptophan on the tryptophan-serotonin pathway

	TRP (pmol/mg)					5-HT (fmol/mg)				5-HIAA (pmol/mg)			
	LUNG	CC	AMY	HIPPO	STR	CC	AMY	HIPPO	STR	CC	AMY	HIPPO	STR
NSVeh	78±12	130±59	96±33	36±3	32±15	820±188	930±376	76±28	99±45	4.3±2.3	7.2±2.8	2.9±0.9	2.9±0.5
NSFlx	106±10	193±152	191±162	29±4	70±40	570±238	352±403	20±37	107±51	3.5±2.1	8.1±3.7	1.5±0.4	2.9±0.9
NS1MT	87±4	63±52	117±33	34±7	43±9	273±95	403±378	62±33	65±48	2.8±1.7	6.9±3.1	2±0.4	2.9±0.8
Sveh	83±3	85±30	79±16	22±4	43±9	444±77	271±140	20±13 *	82±22	2.4±0.8	4.1±1	1.9±0.3	3.1±1.1
SFlx	73±6	62±30	111±61	35±9	31±15	341±145	760±470	83±18 +	77±33	2.6±2.3	6.5±2.2	1.6±0.9	2.7±0.9
S1MT	77±11	115±32	80±25	29±4	60±20	530±245	634±303	70±16 +	72±14	3.5±1.1	4.7±3.3	2.1±0.3	2.9±1.5

* p<0.05 in comparison to "NSVeh"; + p<0.05 in comparison to "SVeh"

Data are the median ± SIQR (semi-interquartile range). TRP = tryptophan; 5-HT = serotonin; 5-HIAA = 5-hydroxyindoleacetic acid; NSVeh = vehicle-treated control mice; NSFlx = fluoxetine-treated control mice, NS1MT = 1MT-treated control mice; SVeh = vehicle-treated UCMS mice; SFlx = fluoxetine-treated UCMS mice and S1MT = 1MT-treated UCMS mice. LUNG = lungs; CC = cingulate cortex; AMY = amygdala; HIPPO = hippocampus and STR = striatum. Multiple comparisons were performed. Consequently, significant p values were corrected (divided by 5 as we performed 5 comparisons) according to the method of Bonferroni:* p<0.05 in comparison to NSVeh and + p<0.05 in comparison to SVeh.

Table 3:

Table 3 - Correlations between our Depressive Index and tryptophan-serotonin vs tryptophan-kynurenine pathway metabolites in UCMS mice

AMY								
	K/T	**KYN**	**3HK**	**QUIN**	**KYNA/QUIN**	**5-HT**	**5-HIAA**	**5-HIAA/5-HT**
Depressive index	r=0.43	r=0.39	r=0.65 *	r=0.56	r=-0.69 **	r=-0.32	r=-0.42	r=0.09
CC								
	K/T	**KYN**	**3HK**	**QUIN**	**KYNA/QUIN**	**5-HT**	**5-HIAA**	**5-HIAA/5-HT**
Depressive index	r=0.011	r=0.74 ***	r=0.30	r=0.27	r=-0.32	r=-0.16	r=-0.10	r=0.10
HIPPO								
	K/T	**KYN**	**3HK**	**QUIN**	**KYNA/QUIN**	**5-HT**	**5-HIAA**	**5-HIAA/5-HT**
Depressive index	r=0.51	r=0.63 *	r=0.09	r=0.64 **	r=-0.71 ***	r=-0.34	r=0.11	r=0.41
STR								
	K/T	**KYN**	**3HK**	**QUIN**	**KYNA/QUIN**	**5-HT**	**5-HIAA**	**5-HIAA/5-HT**
Depressive index	r=0.48	r=0.58 *	r=0.66 ***	r=0.51	r=-0.61 *	r=0.13	r=0.03	r=-0.07
LUNG								
	K/T	**KYN**	**3HK**	**QUIN**	**KYNA/QUIN**			
Depressive index	r=0.52	r=0.54 *	r=0.65 ***	r=0.69 ***	r=-0.67 ***			

* p<0.05; ** p<0.01; *** p<0.005; All p values are Bonferroni corrected.

Spearman's coefficient "r" and associated p value are reported for each correlation. Grey surrounding values indicate a significant correlation. Given that 8 biochemical parameters were correlated to the Depressive Index (see Materials and Methods for a description), all significant p values were divided by 8 according to the method of Bonferroni: * p<0.05; ** p<0.01 and *** p<0.005. AMY = amygdala; CC = cingulate cortex; HIPPO = hippocampus; STR = striatum; LUNG = lungs; K/T = kynurenine to tryptophan ratio; KYN = kynurenine; 3HK = 3-hydroxykynurenine; QUIN = quinolinic acid; KYNA/QUIN = kynurenic acid to quinolinic acid ratio; 5-HT = serotonin; 5-HIAA = 5-hydroxyindoleacetic acid; 5-HIAA/5-HT = 5-hydroxyindoleacetic acid to serotonin ratio.

Fig. 1:

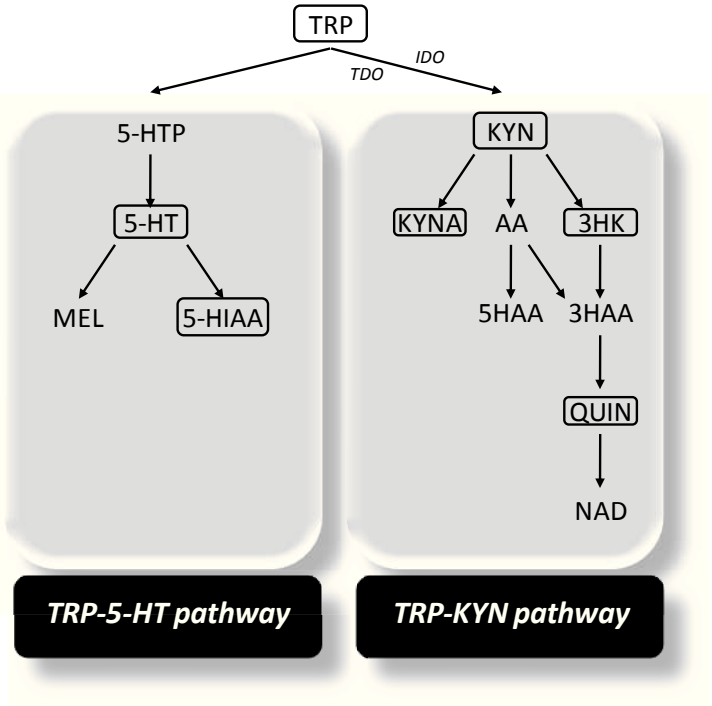

TRP
IDO
TDO
5-HTP
5-HT
MEL
5-HIAA
KYN
KYNA
AA
3HK
5HAA
3HAA
QUIN
NAD
TRP-5-HT pathway
TRP-KYN pathway

Fig. 2:

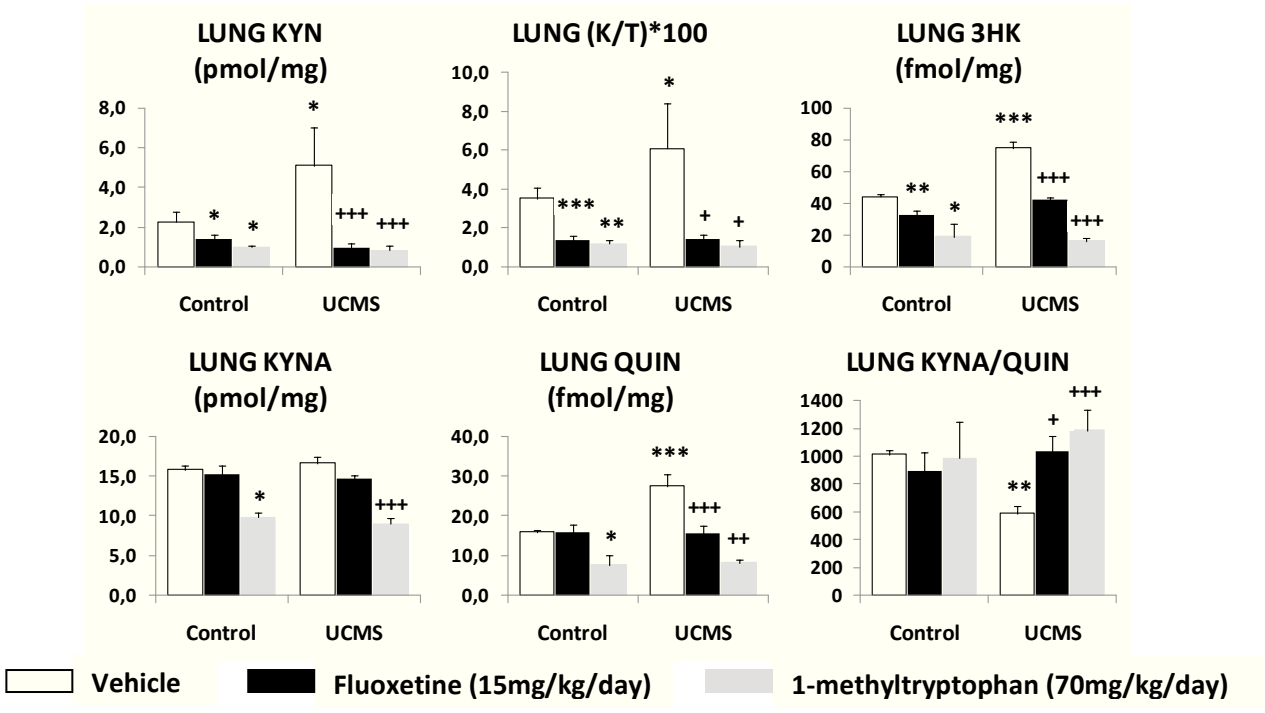

LUNG KYN (pmol/mg)
LUNG (K/T)*100
LUNG 3HK (fmol/mg)
LUNG KYNA (pmol/mg)
LUNG QUIN (fmol/mg)
LUNG KYNA/QUIN
Control
UCMS
Vehicle
Fluoxetine (15mg/kg/day)
1-methyltryptophan (70mg/kg/day)

Fig. 3:

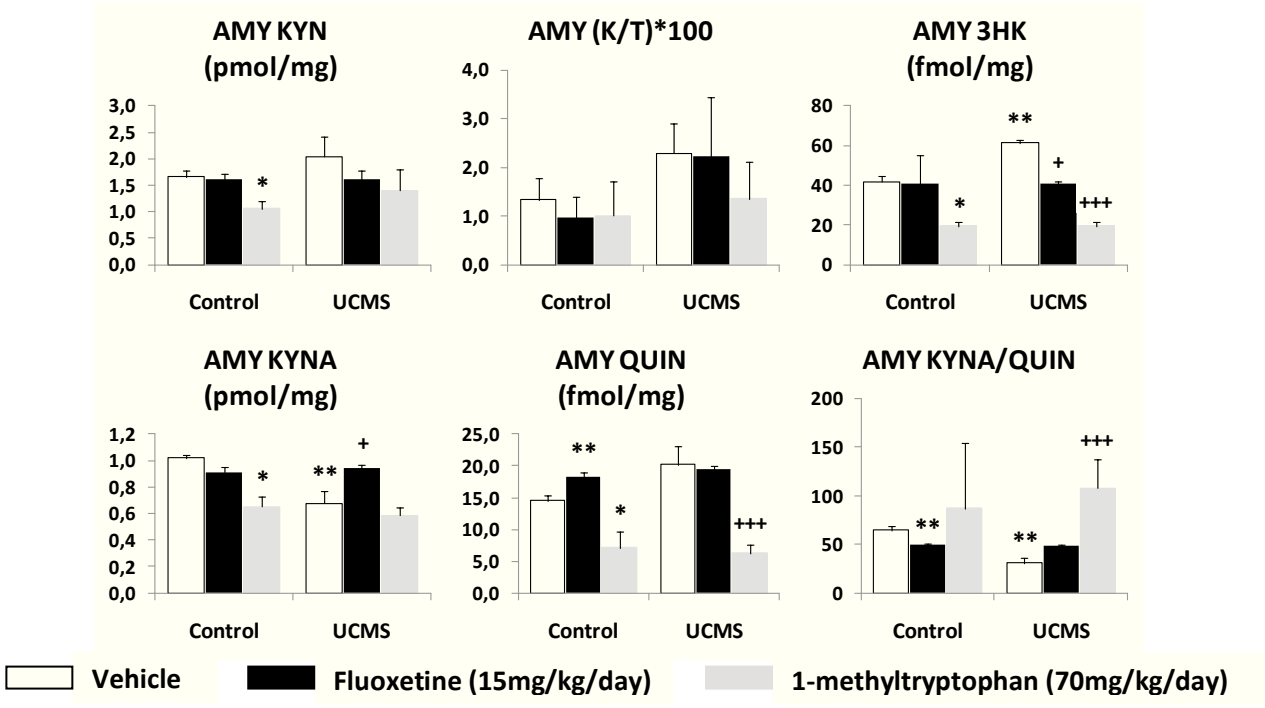

AMY KYN (pmol/mg)
AMY (K/T)*100
AMY 3HK (fmol/mg)
AMY KYNA (pmol/mg)
AMY QUIN (fmol/mg)
AMY KYNA/QUIN
Control
UCMS
Vehicle
Fluoxetine (15mg/kg/day)
1-methyltryptophan (70mg/kg/day)

Fig. 4:

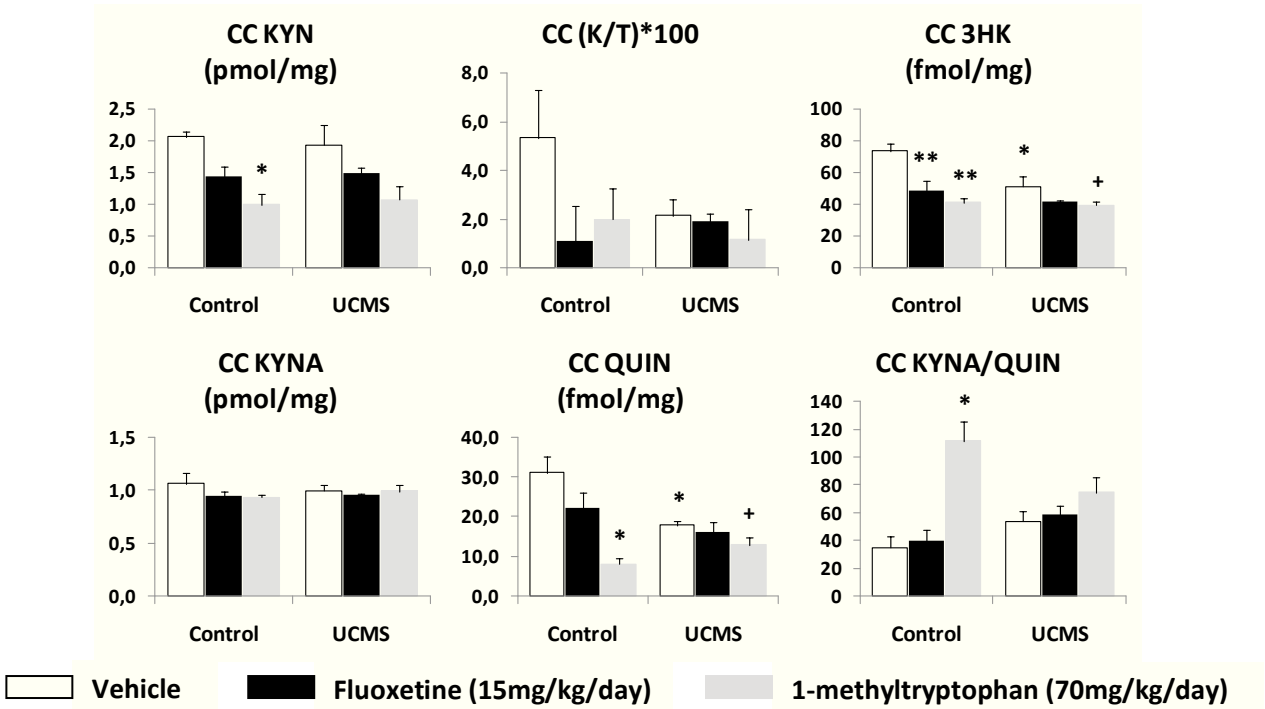

CC KYN (pmol/mg)
CC (K/T)*100
CC 3HK (fmol/mg)
CC KYNA (pmol/mg)
CC QUIN (fmol/mg)
CC KYNA/QUIN
Control
UCMS
Vehicle
Fluoxetine (15mg/kg/day)
1-methyltryptophan (70mg/kg/day)

Fig. 5:

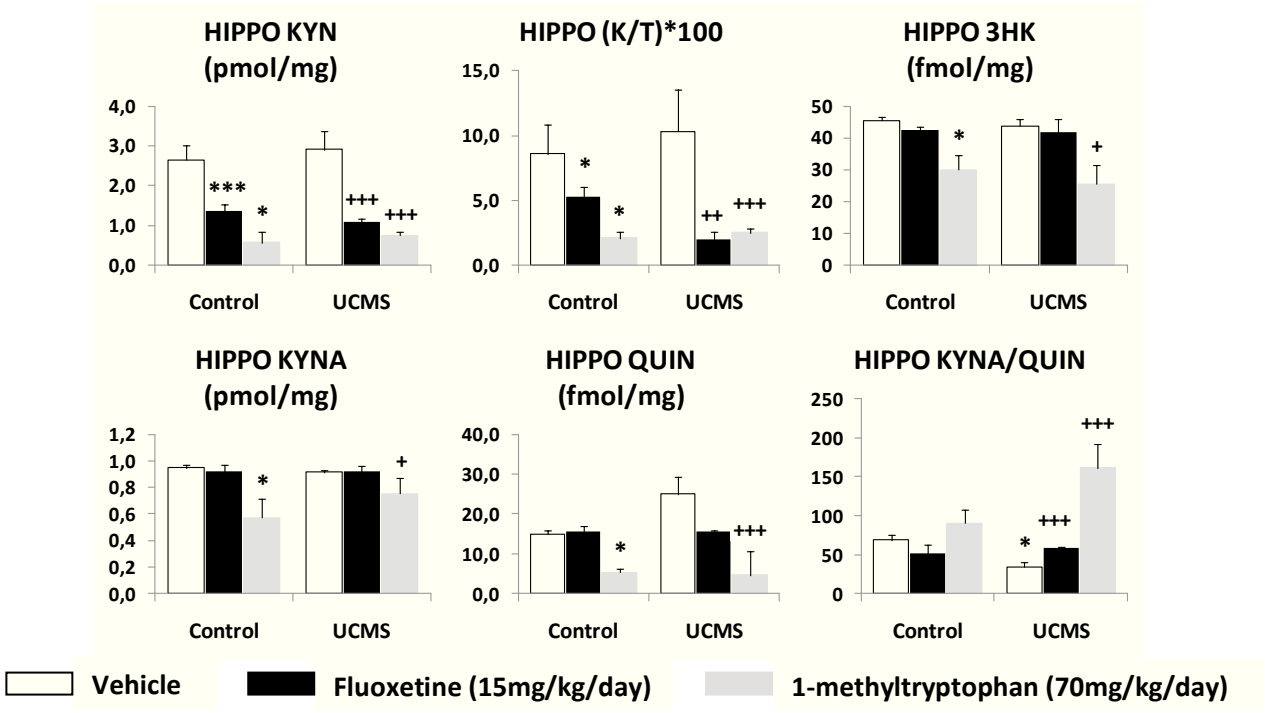

HIPPO KYN (pmol/mg)
HIPPO (K/T)*100
HIPPO 3HK (fmol/mg)
HIPPO KYNA (pmol/mg)
HIPPO QUIN (fmol/mg)
HIPPO KYNA/QUIN
Control
UCMS
Vehicle
Fluoxetine (15mg/kg/day)
1-methyltryptophan (70mg/kg/day)

Fig. 6:

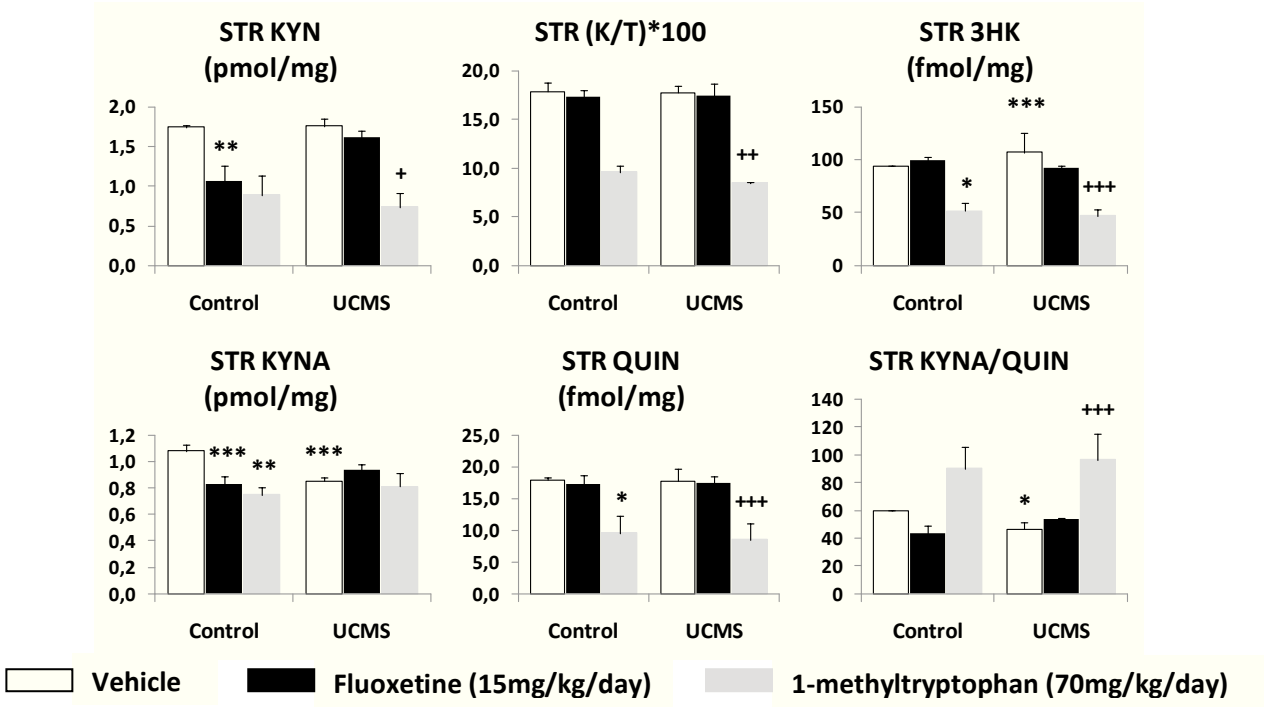
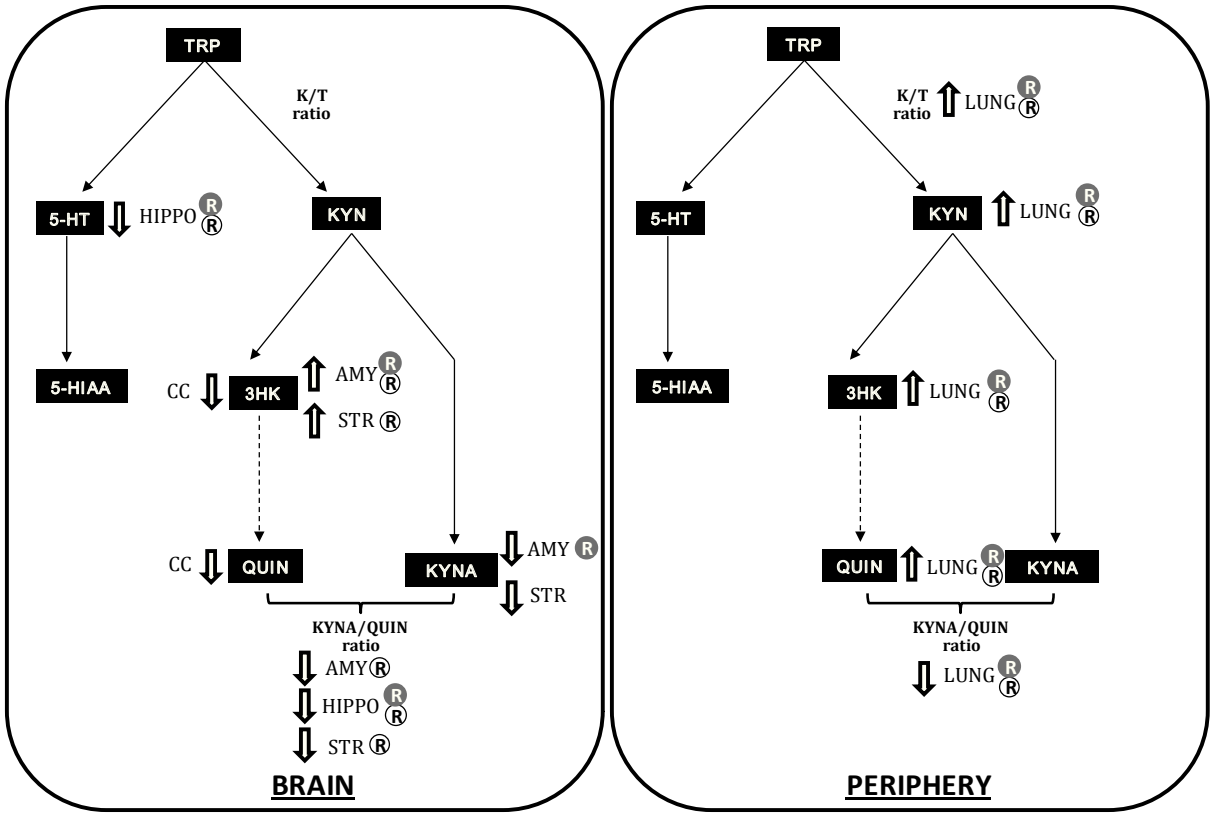

STR KYN (pmol/mg)
STR (K/T)*100
STR 3HK (fmol/mg)
STR KYNA (pmol/mg)
STR QUIN (fmol/mg)
STR KYNA/QUIN
Control
UCMS
Vehicle
Fluoxetine (15mg/kg/day)
1-methyltryptophan (70mg/kg/day)

Fig. 7:



Ⓡ **Reversed by 1-methyltryptophan** Ⓡ **Reversed by fluoxetine**

3. *Discussion*

Cette étude est sans nul doute la plus importante de ce travail de thèse, et ce pour plusieurs raisons. Tout d'abord, la plupart des résultats biochimiques obtenus lors de notre première étude (ARTICLE 1) ont été reproduits (Voir **Fig. 37** ci-dessous), augmentant la fiabilité de nos résultats. Ainsi, nous sommes en mesure d'affirmer de façon plus définitive que l'exposition répétée à des facteurs de stress de nature psycho-émotionnels induit une réorganisation du métabolisme de la KYN aboutissant à l'accumulation de métabolites potentiellement toxiques à la fois dans les tissus périphériques et dans certains structures du SNC. Ensuite parce qu'elle montre pour la première fois que le retour à la normale de ces anomalies est susceptible de participer à l'effet thérapeutique des antidépresseurs de type IRSS. Et enfin, parce qu'elle démontre que le blocage de l'enzyme IDO, l'une des deux enzymes responsables de l'utilisation du TRP au sein de la voie KYN, est aussi efficace qu'un traitement à la fluoxétine (IRSS) pour diminuer l'intensité des symptômes induits par notre modèle animal de dépression : l'UCMS. L'IDO étant activée par des processus inflammatoires, ce travail permet également d'accréditer indirectement la thèse d'une inflammation concomitante à l'état dépressif.

Afin d'éviter les redondances avec les éléments de discussion liés au premier article, je m'efforcerai, dans les lignes qui suivent, de ne discuter que les aspects novateurs de la présente étude c'est-à-dire tout ce qui a trait aux effets de la fluoxétine et du 1MT.

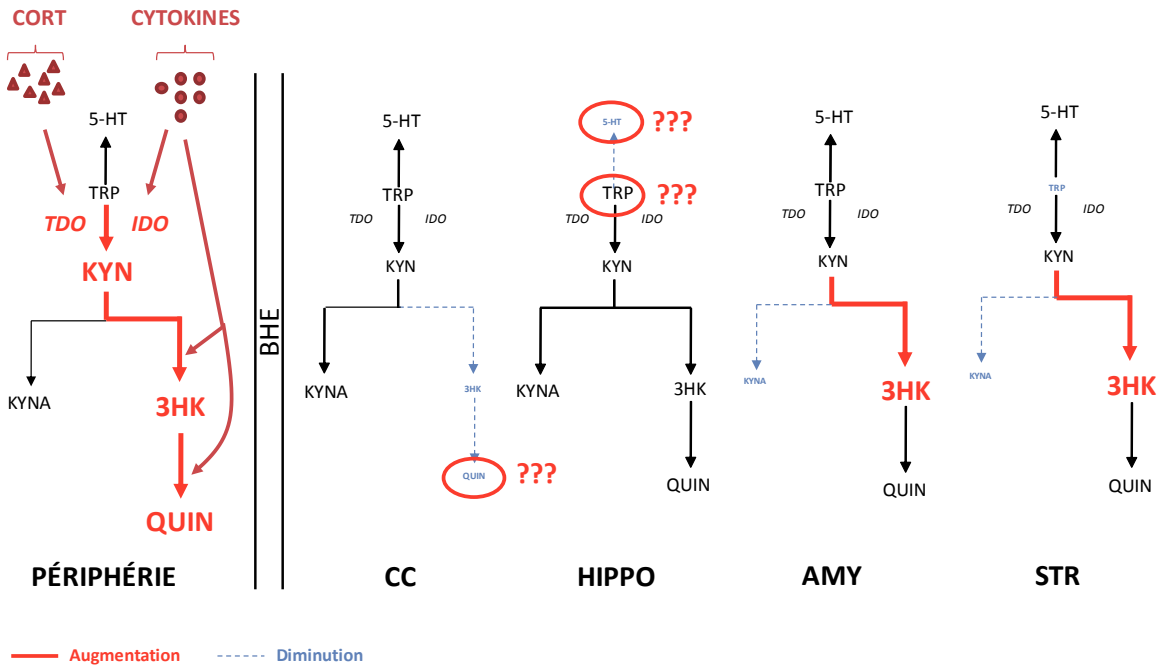


Fig. 37 : ***Réplication des effets de l'UCMS sur les métabolismes périphérique et central de la kynurénine.***

A. REPRODUCTIBILITE DES EFFETS DE L'UCMS

Au niveau biochimique : On peut voir sur le schéma ci-dessus, qui montre les effets de l'UCMS sur les métabolismes périphérique et central du TRP, que la plupart des altérations ont été retrouvées. Les cercles rouges désignent les seules discordances relevées. En effet, on constate que l'UCMS a diminué la concentration en 5-HT dans l'hippocampe alors que le TRP, diminué dans notre première expérience, ne semble pas altéré cette fois-ci (même s'il y a une forte tendance à la diminution : $p_{corrigé}$=0.075). Il est difficile de connaître les causes de ces divergences. Une explication possible, avancée dans l'article, est la différence d'intensité entre nos deux protocoles de stress. En effet, lors de notre première expérimentation, aucun traitement n'avait été administré alors que dans la présente expérience les animaux ont tous reçu une injection intrapéritonéale quotidienne pendant plusieurs semaines ce qui pourrait avoir augmenté l'état de stress lié au protocole. Si cela était vérifié, il serait alors intéressant de constater que les altérations de la voie KYN ne sont que peu sensibles à ce genre de différence et sont, par conséquent, observées de façon plus systématique en réponse à un protocole de stress chronique de type UCMS d'intensité variable. Cependant, le seul moyen de montrer ceci serait de réaliser plusieurs protocoles – chacun d'intensité différente – et de voir si ces mêmes modifications de la voie KYN apparaissent dans tous les cas.

Plus gênant est l'effet de l'UCMS sur la concentration en QUIN dans le cortex cingulaire. En effet, celui-ci est l'opposé de ce que nous avons obtenu dans notre première expérience. Il est par conséquent délicat d'émettre une hypothèse fiable quant aux conséquences de l'UCMS sur cette variable.

Au niveau comportemental : Les seuls paramètres comportementaux analysés dans nos deux expériences ont été l'état du pelage ainsi que la durée d'immobilité dans le FST. En ce qui concerne l'effet de l'UCMS sur ces deux paramètres, il est intéressant de noter la similitude de nos résultats. Si ceci n'est pas surprenant pour l'état du pelage – la dégradation de l'état du pelage suite à un stress chronique a été observée dans de nombreuses études - il n'en est pas de même pour l'immobilité dans le FST. En effet, nos données indiquent clairement que l'UCMS diminue l'immobilité ce qui est particulièrement intéressant compte tenu de l'interprétation de ce comportement classiquement réalisée dans ce paradigme. A l'origine, ce test a été développé chez le rat par Roger Porsolt après qu'il ait constaté que ces derniers, lorsqu'ils étaient placés dans une enceinte remplie d'eau, présentaient au bout d'un certain temps un comportement d'immobilité pouvant apparaitre plus ou moins rapidement selon les individus. Le même type de comportement pouvait être observé chez la souris. À partir de la, il a été supposé que la latence des animaux à être immobile était liée à une attitude de résignation/perte de motivation à s'extraire d'une situation sans issue, que l'on voit souvent apparaître dans la littérature sous le terme « *behavioural despair* ». Par la suite, il a été montré que divers antidépresseurs diminuaient la durée d'immobilité chez la souris (Porsolt, Bertin *et coll.* 1977), effet interprété comme une augmentation de la motivation/combativité face à une situation dont on ne peut s'extraire.

Compte tenu de ces arguments, le stress chronique, supposé induire un état dépressif, devrait alors engendrer une élévation de la durée d'immobilité. Or, le fait que nous ayons observé à deux reprises

l'effet inverse remet clairement en question, non pas l'utilité de ce test pour *screener* des composés éventuellement antidépresseurs, mais plutôt l'interprétation comportementale qui en est faite. D'ailleurs, il est important de noter que d'autres études ont reporté, à plusieurs reprises (différentes études), une diminution de l'immobilité dans le FST après un stress chronique (Hata, Nishikawa *et coll.* 1999; Hata, Nishikawa *et coll.* 2001; Nishikawa, Hata *et coll.* 2004). A la lueur de ces données, il parait important de revoir l'interprétation du comportement d'immobilité dans ce paradigme expérimental, qui semble d'ailleurs pouvoir être influencé par des divergences méthodologiques telles que la température de l'eau ou bien l'intensité lumineuse (Petit-Demouliere, Chenu *et coll.* 2005; Strekalova, Spanagel *et coll.* 2005).

B. RESTORATION DU METABOLISME DE LA KYN : UN NOUVEAU MECANISME D'ACTION DE LA FLUOXETINE?

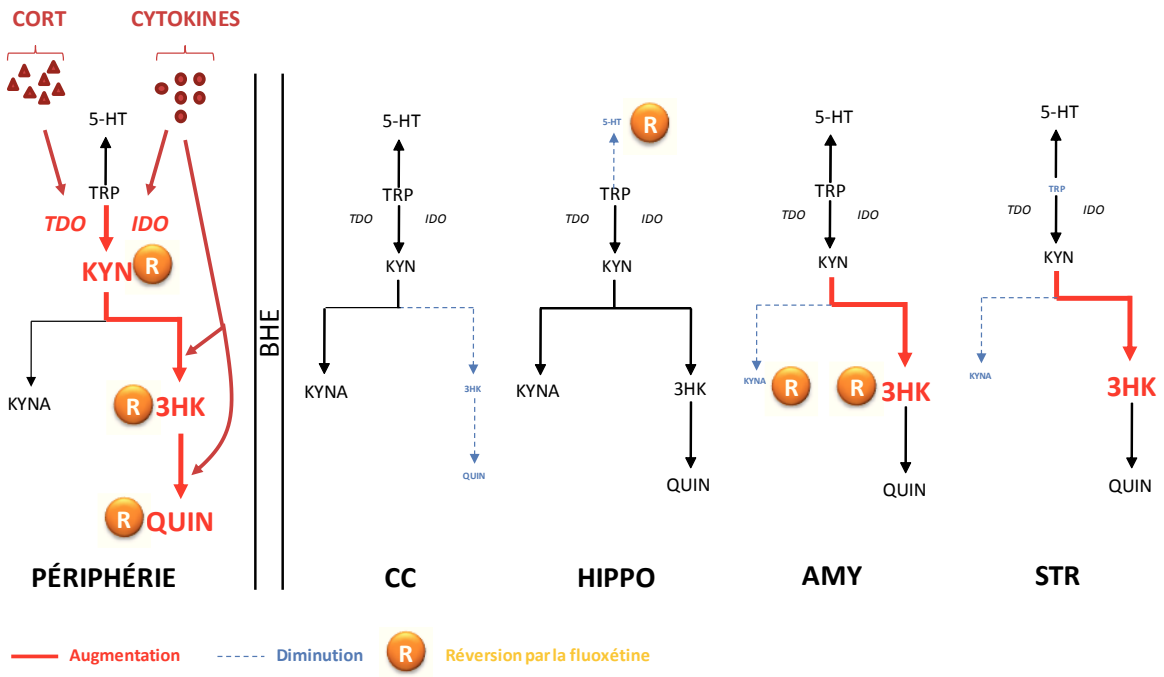


Fig. 38 : ***Effets d'un traitement chronique à la fluoxétine sur les altérations périphériques et centrales du métabolisme de la KYN induites par l'UCMS.***

Nos données montrent clairement que le traitement chronique à la fluoxétine réverse la plupart des altérations induites par l'UCMS (Voir **Fig. 38** ci-dessus), excepté les anomalies observées dans le striatum et le cortex cingulaire. Le retour à la normale est plus frappant dans l'amygdale et en périphérie (poumons).

L'action de la fluoxétine en tant qu'inhibiteur de la recapture de 5-HT a été découverte dans les années 70, mais il a fallu attendre 1987 pour que la *fluoxetine hydrochloride* (prozac) soit commercialisée officiellement en tant qu'antidépresseur (Wong, Perry *et coll.* 2005). Cependant, la fluoxétine, tout comme plusieurs de ses homologues antidépresseurs, agit également en tant qu'inhibiteur de la TDO (Bano and Sherkheli 2003), principale enzyme de régulation du métabolisme du TRP en condition

non-inflammatoire (Kanai, Funakoshi *et coll.* 2009). La mise en évidence de cet effet a alors donné lieu à l'hypothèse selon laquelle l'effet thérapeutique de la fluoxétine pourrait résulter non seulement de la hausse de 5-HT cérébrale par inhibition de sa recapture au niveau du transporteur mais aussi par l'augmentation de la biodisponibilité plasmatique du TRP faisant suite à l'inhibition de la TDO hépatique. Cependant, une telle hypothèse implique que la fluoxétine ait une action directe sur l'enzyme, ce qui n'est vraisemblablement pas le cas. Plusieurs arguments tendent d'ailleurs à le démontrer. Tout d'abord, des travaux menés dans les années 80 ont montré qu'une vingtaine de molécules ayant des propriétés antidépressives était capable d'inhiber la TDO (Badawy and Evans 1981; Badawy and Evans 1982) ce qui suggère que ces molécules agiraient par le biais d'un mécanisme commun, comme par exemple la diminution des taux circulants de GC. Ensuite, une étude de Samsonova *et coll.* a démontré que l'imipramine – une des molécules capables d'inhiber la TDO – n'a aucun effet sur l'activité de l'enzyme chez des rats adrénalectomisés (Samsonova and Lapin 1973), confortant l'idée que le mécanisme commun par lequel agissent les antidépresseurs est la restauration de la libération de GC. Ainsi, compte tenu de la capacité de la fluoxétine à reverser les altérations de l'axe HPA induites par l'UCMS (Surget, Tanti *et coll.* Soumis), on peut supposer que les effets biochimiques observés dans notre étude (réversion de la plupart des altérations de la voie KYN induites par le stress chronique) résultent de ce phénomène. Cependant, plusieurs choses ne sont pas en accord avec cette théorie. Tout d'abord, le fait que la libération de corticostérone soit augmentée uniquement durant une période de 2h au cours du cycle circadien [Voir Fig. 30 et (Surget, Tanti *et coll.* Soumis)] nous fait nous interroger quant à la réelle implication de cette enzyme dans la réversion du détournement métabolique induit par l'UCMS. D'autre part, aucune étude n'a montré que les GC pouvaient activer les enzymes responsables de la synthèse de 3HK et de QUIN. Pourtant, nos données indiquent que l'UCMS augmente leur concentration périphérique. Par contre, il a été montré que les cytokines proinflammatoires étaient capables d'une telle activation, ce qui suggère par conséquent un rôle prépondérant de l'enzyme IDO. Cette hypothèse est renforcée par le fait que la fluoxetine possède d'importantes propriétés anti-inflammatoires médiées entre autres par l'inhibition de la production de TNFα et d'IL_{-6} (Sacre, Medghalchi *et coll.* 2010). D'autres études ont également montré la capacité d'un traitement chronique à la fluoxétine à réduire les concentrations plasmatiques en IFNγ (Tsao, Lin *et coll.* 2006). Ces cytokines étant de puissants inducteurs de l'enzyme IDO, il est possible que l'action de la fluoxétine soit médiée, tout du moins en partie, par le rétablissement d'une production normale en cytokines proinflammatoires.

C. INHIBITEURS DE LA VOIE KYN : NOUVEAUX ANTIDEPRESSEURS?

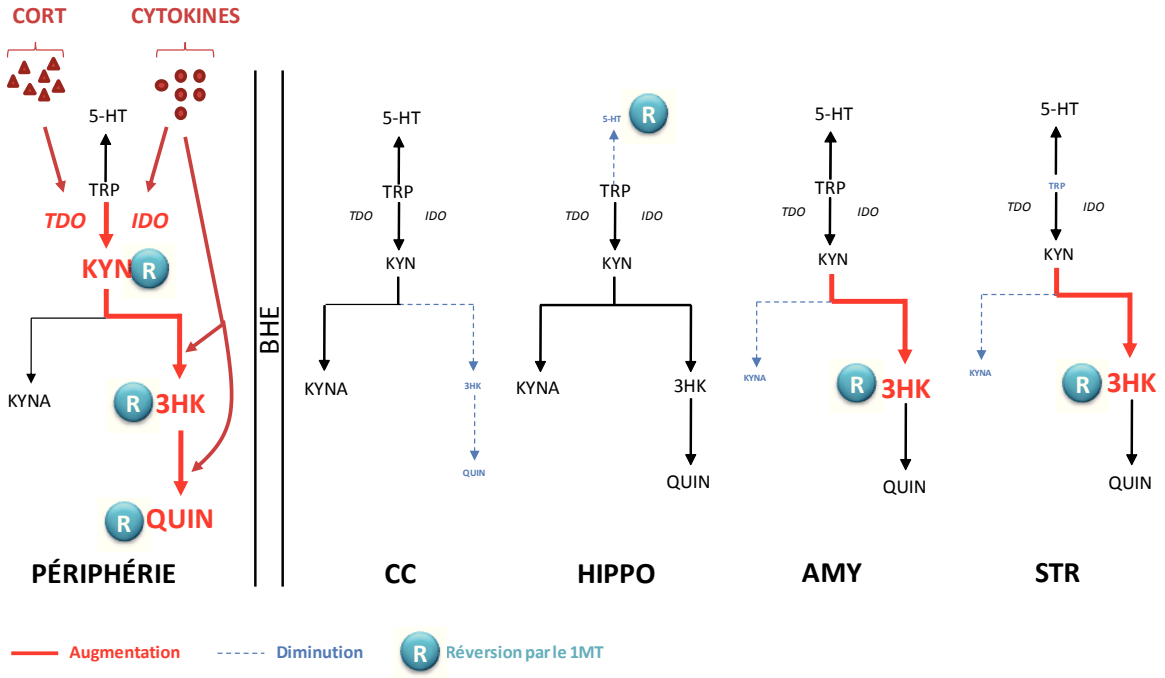


Fig. 39 : ***Effets d'un traitement chronique au 1MT sur les altérations périphériques et centrales du métabolisme de la KYN induites par l'UCMS.***

L'administration chronique d'un inhibiteur de l'IDO s'est révélée aussi efficace qu'un traitement à la fluoxétine pour restaurer les altérations biochimiques et comportementales engendrées par l'UCMS. Tout comme la fluoxétine, le 1MT reverse efficacement le détournement du métabolisme vers la voie de synthèse de 3HK/QUIN en périphérie mais pas les anomalies biochimiques induites au niveau du cortex cingulaire. Dans l'hippocampe, les effets sont également les mêmes. Dans l'amygdale, cependant, la fluoxétine a reversé l'intégralité des altérations (KYNA et 3HK) alors que le 1MT a seulement reversé l'augmentation de 3HK. De la même manière, l'effet des deux molécules est sensiblement différent dans le striatum (Voir **Fig. 39** ci-dessus).

Ces données confirment non seulement le rôle central de l'IDO dans la physiopathologie des troubles induits par l'UCMS mais aussi l'implication majeure de l'inflammation dans ces processus, l'IDO étant activée essentiellement par les cytokines proinflammatoires.

De tels résultats sont à mettre en parallèle avec les données issues des travaux d'O'Connor *et al.* utilisant un modèle d'inflammation chronique résultant de l'infection par le BCG (O'Connor, Lawson *et coll.* 2009). En effet, une des caractéristiques de ce modèle est d'induire un état « depressive-like », différent de l'état de maladie, chez les animaux infectés qui semble être concomitant à la production d'IFNγ dont l'une des propriétés est d'induire l'enzyme IDO et ainsi de détourner le métabolisme du TRP au sein de la voie KYN. Dans ce travail, les auteurs utilisent deux approches pour montrer l'importance de l'IDO dans l'installation de l'état depressive-like chez les souris infectés : l'approche pharmacologique à consisté à administrer quotidiennement (pendant 21j) du 1MT (le traitement débute 1 semaine avant l'infection par le BCG) et l'approche génétique a consisté à utiliser des souris

KO IDO$^{-/-}$. Dans les deux cas, les auteurs observent que les souris sont résistantes à l'état depressive-like donnant un crédit particulier à l'IDO en tant que facteur potentiellement à l'origine des troubles dépressifs. Leurs résultats ont révélé d'autres informations beaucoup plus importantes démontrant clairement que l'activation de l'IDO est **LE** facteur inducteur des troubles dépressifs chez les souris infectées. En effet, ils observèrent chez les souris infectées au BCG que le traitement au 1MT, bien qu'ayant reversé les altérations comportementales, n'a pas modifié les concentrations périphériques et centrales en cytokines proinflammatoires (ARNm de TNFα et IFNγ). Ce résultat est d'une importance cruciale car il montre que ce ne sont pas les cytokines qui sont à l'origine de l'état depressive-like mais bel et bien l'activation de la voie KYN par l'IDO. Dans leur discussion, les auteurs de cette étude indiquent aussi que l'activation de la voie KYN par l'IDO est beaucoup plus importante en périphérie que dans le SNC, ce qui corrobore, dans un certain sens, nos données montrant clairement une activation périphérique mais pas d'activation centrale. Cette petite divergence provient certainement du fait que le facteur inducteur est d'origine inflammatoire alors que dans nos travaux le facteur inducteur est d'ordre psychoémotionnel et induit par conséquent une réponse inflammatoire moins importante.

Prises conjointement, nos données et celles de O'Connor suggèrent que l'inhibition de la voie KYN chez les patients dépressifs pourrait constituer une nouvelle stratégie thérapeutique permettant de diminuer les symptômes dépressifs.

À FAIRE :

Dans l'optique de mieux caractériser le rôle des métabolites d la KYN dans la physiopathologie du syndrome induit par l'UCMS, il serait d'un intérêt particulier de vérifier si les altérations observées au cours de nos expériences sont susceptibles d'entraîner des dysfonctionnements cellulaires, liés par exemple aux propriétés pro-oxydantes de 3HK et QUIN. Pour cela, nous pourrions, en association avec les dosages des métabolites de la KYN, évaluer « l'état d'oxydation » de structures corticolimbiques d'intérêt chez des souris UCMS. Pour vérifier que la réorganisation métabolique de la voie KYN est responsable d'une hausse du stress oxydant, un groupe de souris UCMS devra recevoir une administration intrapéritonéale quotidienne de KYN.

D'autre part, il serait intéressant de tester les effets d'un traitement chronique par d'autres inhibiteurs de l'IDO tels que l'exiguamine ou des hydroxyamidines (Yue, Douty et coll. 2009).

*****

DISCUSSION GÉNÉRALE

*****

« Au bout de tout savoir et de tout accroissement de notre savoir, il n'y a pas un point final, mais plutôt un point d'interrogation. »

Herman Hesse

Au cours de ce travail de thèse, nous avons voulu évaluer l'implication de la voie de la KYN dans la physiopathologie et le traitement des troubles dépressifs par l'utilisation d'un modèle de dépression, l'UCMS. Jusqu'à présent, l'hypothèse d'un rôle de cette voie métabolique dans la dépression se basait essentiellement sur des études menées chez l'Homme utilisant des dosages plasmatiques et, plus récemment, des dosages effectués dans le LCR. Cependant, ces données ne fournissent que très peu d'indications sur l'implication réelle de la KYN et ses métabolites dans la neurobiologie de la dépression. En effet, compte tenu de la capacité de certains métabolites de la voie KYN à moduler des systèmes de neurotransmission tels que le système dopaminergique ou le système glutamatergique, ou encore de leur faculté à perturber le fonctionnement cellulaire, il paraissait plus approprié d'utiliser un modèle animal de dépression afin d'explorer les altérations induites dans des structures ayant un rôle central dans la physiopathologie de la dépression telles que l'amygdale, l'hippocampe, le cortex cingulaire et le striatum.

Nos données ont fait émerger plusieurs résultats intéressants. Tout d'abord, nous avons pu montrer que l'UCMS affecte de façon différentielle le métabolisme de la KYN selon qu'il se déroule en périphérie ou dans le SNC. En effet, en périphérie, la synthèse de KYN est augmentée alors que ce n'est pas le cas dans le SNC, ce qui suggère des mécanismes de régulation différents entre périphérie et SNC. En plus de dévier le métabolisme du TRP vers la synthèse de KYN, l'UCMS a détourné l'utilisation métabolique de la KYN vers la voie de synthèse de 3HK et de QUIN, entraînant l'accumulation de composés potentiellement toxiques susceptibles d'altérer le fonctionnement cellulaire. Dans le SNC, l'UCMS a également détourné le métabolisme de la KYN mais le scénario est sensiblement différent puisque l'effet est différent selon les structures étudiées.

De façon intéressante, nous avons également mis en évidence un lien entre l'activation de la voie KYN chez les souris UCMS et l'expression de patterns comportementaux de type anxio-dépressifs, confortant les résultats obtenus en clinique non seulement chez des patients souffrant de dépression majeure mais aussi chez des patients atteints de pathologies diverses s'accompagnant de troubles dépressifs. Cependant, il est difficile de tirer des conclusions sur les liens de cause à effet existant entre les altérations comportementales et les changements métaboliques observés.
Enfin, et c'est vraisemblablement le résultat le plus éloquent de ce travail de thèse, nous avons montré que le rétablissement des altérations de la voie KYN pourrait sous-tendre l'amélioration observée au niveau comportemental, en d'autres termes que bloquer l'activation de la voie KYN pourrait constituer une nouvelle stratégie thérapeutique permettant de diminuer l'intensité des symptômes dépressifs.

I. RÉFLEXION SUR LE MODÈLE UCMS

En plus d'apporter de nouveaux arguments quant à l'implication de la voie KYN dans la physiopathologie de la dépression, nos données permettent également d'accroître la validité du

modèle UCMS en tant que modèle de dépression majeure. Comme cela a été présenté dans l'introduction du manuscrit, un modèle animal de pathologie humaine se doit de respecter au mieux plusieurs critères de validité : 1) ***la validité descriptive*** (ou phénoménologique) qui représente l'analogie entre les réponses mesurées chez l'animal et les différentes altérations de la pathologie humaine (neuroanatomiques, neurochimiques, endocriniennes, comportementales, cognitives) ; 2) ***la validité prédictive*** qui est liée à la capacité des traitements efficaces dans la pathologie humaine de réduire les altérations observées chez l'animal. 3) ***la validité de construction*** qui stipule que les facteurs étiologiques de la pathologie humaine doivent également être à l'origine de l'état pathologique induit par le modèle. On peut également citer un autre critère qu'un modèle animal doit essayer de respecter et qui n'a pas été présenté dans la partie introduction : le critère de fiabilité, lié à la reproductibilité des résultats.

1. Altérations chez l'Homme = altérations dans le modèle animal ?

La multitude de travaux réalisée jusqu'à aujourd'hui montre que ce modèle est vraisemblablement l'un des plus pertinents pour étudier la physiopathologie des troubles dépressifs, notamment car il utilise un des principaux facteurs étiologiques de la dépression : l'exposition chronique à des facteurs de stress, lui conférant ainsi une bonne validité de construction. L'UCMS a une très bonne validité descriptive puisqu'il induit un syndrome complexe, analogue aux symptômes de la dépression majeure chez l'Homme. Cela inclut tout d'abord plusieurs types d'altérations physiques, comportementales ou cognitives : anhédonie, modification de la réactivité émotionnelle, modification des interactions sociales, réduction de la prise de poids, diminution de la motivation à réaliser des activités quotidiennes. On trouve également d'autres types de changements pertinents comme des anomalies neurobiologiques telles qu'une modification des niveaux de monoamines dans plusieurs régions cérébrales (Vancassel, Leman *et coll.* 2008; Yalcin, Coubard *et coll.* 2008), une diminution de la prolifération cellulaire et de la neurogenèse hippocampique (Mineur, Belzung *et coll.* 2007; Surget, Saxe *et coll.* 2008; Surget, Tanti *et coll.* Soumis) et des modifications endocriniennes (changements des niveaux des glucocorticoïdes, non suppression de la dexaméthasone) (Detanico, Piato *et coll.* 2009; Palumbo, Canzobre *et coll.* 2010; Surget, Tanti *et coll.* Soumis). L'un des arguments les plus éloquents quant à la pertinence de ce modèle pour étudier les bases neurobiologiques de la dépression a été obtenu récemment grâce à une étude de comparaison entre les changements transcriptionnels induits par l'UCMS chez la souris (adultes mâles BALB/c) et ceux se produisant lors d'un épisode dépressif chez l'Homme, dans le cortex cingulaire et dans l'amygdale (Sibille, Wang *et coll.* 2009). Cette étude a montré qu'un nombre important de patients présentent, en particulier dans l'amygdale, des changements d'expression du génome hautement corrélés à ceux des souris UCMS. Les analyses réalisées témoignent en effet de réseaux de co-expression hautement conservés et homogènes qui suggèrent l'existence d'une « signature transcriptionnelle » de la dépression qui semble être phylogénétiquement conservée.

Les données obtenues dans les différents travaux réalisés au cours de cette thèse apportent de nouveaux éléments quant au respect du critère de validité descriptive. Tout d'abord, nos résultats indiquent que l'UCMS induit une diminution des taux cérébraux de 5-HT (l'hippocampe) (ARTICLE 3), ce qui est partiellement en accord avec ce qui a pu être observé dans la pathologie humaine (Birkmayer and Riederer 1975). Cependant, il est important de noter que nous n'avons observé aucune altération des concentrations cérébrales en 5-HT dans notre première expérience (ARTICLE 1) ce qui pourrait suggérer que ce genre d'altération est protocole-dépendant (le protocole de l'article 3 étant plus intense que celui utilisé dans l'article 1). D'autre part, certains de nos résultats augmentent la validité du modèle UCMS en montrant non seulement que la voie KYN périphérique est activée par l'UCMS mais aussi que cette activation est corrélée à l'expression de comportements anxio-dépressifs, de telles données ayant été reportées dans des études menées chez des patients dépressifs (Wichers, Koek *et coll.* 2005).

D'autre part, l'administration chronique de plusieurs types d'antidépresseurs est en général capable de rétablir la plupart des modifications bio-comportementales, permettant à l'UCMS de satisfaire le critère de prédictibilité. Le respect de ce critère est encore plus renforcé par le fait que les changements induits par les antidépresseurs ne se manifestent qu'après une administration chronique et non après une administration aigue (Belzung and Surget 2008). Nos données confortent ceci étant donné que la fluoxétine a été capable de reverser la plupart des altérations bio-comportementales induites par l'UCMS.

Un autre point sur lequel nos travaux apportent des précisions est le critère de fiabilité/reproductibilité du modèle. Celui-ci est connu comme étant le point faible des modèles de stress chronique (Willner 2005), et, à ce titre, l'UCMS n'y fait pas défaut. En effet, notre démarche expérimentale nous a mené à réaliser deux protocoles de stress chronique sur des souris appartenant à une même souche (BALB/c). Par conséquent, nous avons eu l'occasion de tester la fiabilité de certaines altérations induites par chacun des protocoles, et il s'avère que la reproductibilité diffère selon les variables étudiées. D'un point de vue comportemental, seules deux variables ont été étudiées dans les deux expériences : l'état du pelage et la durée d'immobilité dans le FST. Le premier paramètre est sans nul doute celui qui est le plus reproductible d'une étude à l'autre, l'effet de l'UCMS (dégradation) étant observable assez rapidement (environ 1 semaine après le début du protocole) et de façon très nette (selon la souche). Comme je l'ai dit un peu plus tôt dans la discussion, l'effet de l'UCMS dans le FST mis en évidence par nos études pourrait sembler contre-intuitif compte tenu de l'interprétation du comportement classiquement réalisée dans ce paradigme. Cependant, nous avons observé à deux reprises cet effet de l'UCMS, et qui plus est, l'effet a été reversé à la fois par la fluoxétine et par le 1MT dans notre deuxième expérience (ARTICLE 3), ce qui accorde tout de même une certaine crédibilité aux résultats.

Un autre aspect qui mérite, à mon sens d'être discuté, est l'intérêt de ne faire qu'un ou deux tests comportementaux pour évaluer les effets d'un protocole d'UCMS. En effet, chez l'Homme, les outils

principalement utilisés pour évaluer l'état dépressif d'un individu sont les différentes échelles d'évaluation (BDI, MADRS, HDRS…) qui consistent en l'attribution d'un score global qui, quand il est supérieur à un « seuil » est caractéristique d'un état dépressif. Mais, si notre curiosité nous pousse à aller voir comment sont faites ces échelles, on peut se rendre compte qu'elles évaluent plusieurs dimensions de la condition de l'individu : psychiques, physiques, cognitives, affectives et émotionnelles. En préclinique, ne faire qu'un ou deux tests comportementaux revient à restreindre l'évaluation des effets du stress chronique à un nombre très limité de dimensions et augmente ainsi la probabilité de conclure à tort à une absence d'effet. Prenons pour exemple les deux protocoles d'UCMS réalisés dans ce travail de thèse, l'évaluation de leurs effets respectifs d'un point de vue comportemental a été très différente : dans le premier nous n'avons utilisé que deux tests (EPM et FST) (ARTICLES 1 et 2) alors que lors du deuxième (ARTICLE 3), nous en avons utilisé 4 (FST, NSF, splash test et R/I test). Si l'on compare globalement les effets de l'UCMS, il apparaît, même si rien ne permet de l'affirmer, un effet plus robuste du protocole 2. Il serait alors intéressant de standardiser la réalisation d'un panel de tests, un peu à l'image de ce que nous avons fait dans notre dernière étude (ARTICLE 3). Cela permettrait d'ailleurs de pouvoir utiliser un système de cotation de l'intensité des altérations induites par l'UCMS – tel que le « depressive index » utilisé dans l'article - se résumant à un seul et même score, permettant ainsi de pouvoir réaliser plus facilement des études corrélationnelles. En effet, le fait d'avoir moins de vaeriables amène à réaliser moins de corrélation et par conséquent à réduire la correction statistique.

2. Quelles critiques du modèle UCMSpeut-on formuler ?

Même si les arguments en faveur de l'utilisation de ce modèle pour améliorer la compréhension de la neurobiologie de la dépression sont nombreux, il n'en demeure pas moins qu'il présente tout de même un certain nombre d'inconvénients dont certains seront évoqués dans les lignes qui suivent. Tout d'abord, la mise en place de ce modèle est assez couteuse en termes de temps et demande un investissement conséquent de la part des expérimentateurs compte tenu du nombre important de stresseurs qui peut être réalisé certains jours (jusqu'à 10-15).

Ensuite, il semble que certaines altérations induites par l'UCMS ne soient pas maintenues après la fin du protocole : une étude menée au laboratoire a montré que la diminution de la consommation de sucrose observée chez les souris stressées (un indice d'anhédonie) revenait à la normale une fois la procédure d'UCMS achevée (Pothion, Bizot *et coll.* 2004), ce qui n'est pas cohérent avec ce que l'on observe chez l'Homme (un état anhédonique stable dans le temps). Dans le même ordre d'idée, j'ai pu constater dans une expérience alternative, que l'importance de certaines altérations induites par l'UCMS est fonction du nombre de stresseurs administrés. En effet, on peut voir sur le graphique ci-dessous (**Fig. 40** ci-dessous) que la diminution de préférence à la saccharine (indice d'anhédonie) semble varier conjointement au nombre de stresseurs administrés par semaine lors d'un protocole de 7

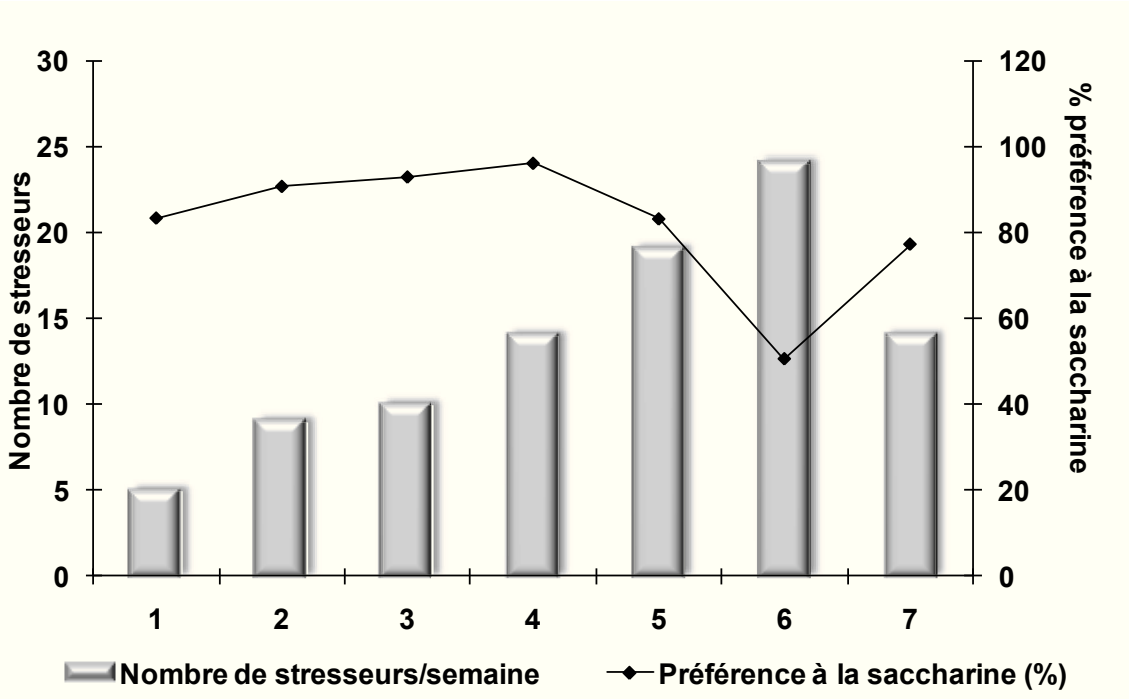


Fig. 40 : ***Influence du nombre de stresseurs par semaine sur un indice d'anhédonie : le pourcentage de préférence à la saccharine.***

semaines. Ce qui semble être en accord avec les résultats de Pothion *et coll*. (Pothion, Bizot *et coll.* 2004).

Un autre point négatif du modèle peut-être lié aux variations lignées-dépendantes. En effet, plusieurs études menées au laboratoire mettent en évidence d'importantes divergences des effets de l'UCMS en fonction de la lignée de souris utilisée (Pothion, Bizot *et coll.* 2004; Ibarguen-Vargas, Surget *et coll.* 2008; Yalcin, Belzung *et coll.* 2008). Même si de telles différences peuvent être utiles pour étudier l'impact des gènes sur la résilience/vulnérabilité au stress par exemple, une telle caractéristique peut véritablement restreindre l'exploitation d'un tel modèle dans les études basées sur des animaux génétiquement modifiés à partir de souches peu sensibles à l'UCMS. Dans le même esprit, une autre ombre au tableau est liée aux effets que l'on peut qualifier de « protocole-dépendants » c'est-à-dire qui sont vraisemblablement liés à l'intensité de la procédure utilisée. A ce niveau, nous avons pu constater par le biais d'une expérience non présentée dans ce manuscrit, qu'une

souche de souris (SWISS) décrite comme « peu-sensible » aux effets de l'UCMS (Yalcin, Belzung *et coll.* 2008) pouvait devenir « sensible » à condition de durcir l'intensité du protocole de stress chronique. Dans le cas présent, les individus avaient été confrontés à un stress prénatal (confrontation des mères à une semaine de stress chronique de type UCMS lors de la dernière semaine de gestation) puis à un stress chronique de 6 semaines classique à l'âge adulte (7 semaines).

3. Que peut-il être fait pour améliorer ce modèle ?

Une des principales améliorations qui pourraient être apportées au modèle UCMS est la standardisation de la procédure de stress. Actuellement, la procédure d'administration des stresseurs varie sur de nombreux points d'un protocole à l'autre (durée totale, fréquence des stresseurs, durée pendant laquelle est administré un stresseur, séquence de combinaison de stresseurs etc) et est par conséquent source de variabilité dans la réponse bio-comportementale des animaux y étant confrontés. L'utilisation d'un protocole « standard », c'est-à-dire respectant un planning précisément défini, pourrait permettre de diminuer la variabilité des altérations biochimiques et comportementales liée aux différences d'intensité des protocoles. Malgré cela, il demeurera toujours une variabilité due aux animaux eux-mêmes, faisant intervenir différents facteurs de prédisposition mentionnés dans la partie « Individualité dans la réponse au stress » de l'introduction.

Si l'on se focalise sur la variabilité liée aux animaux eux-mêmes, il est important de noter que certaines améliorations ont déjà été apportées, permettant de diminuer l'impact de la variabilité sur les résultats expérimentaux. Par exemple une étude menée au laboratoire a montré que l'UCMS pouvait générer des profils d'altérations opposés chez les souris BALB/c et chez les souris C57BL/6 (en termes d'activité de l'axe HPA), les premières présentant une hyperactivité de l'axe HPA alors que les C57BL/6 présenteraient plutôt une hypoactivité (Ibarguen-Vargas, Surget *et coll.* 2008), ce qui rappelle étrangement l'hyperactivité de l'axe HPA observée dans la forme mélancolique de la dépression majeure et l'hypoactivité associée à la forme atypique (Gold, Gabry *et coll.* 2002). Ainsi, l'utilisation de différentes souches pourrait permettre d'étudier les correspondances entre les profils des lignées de souris et les sous-types de dépression.

Cependant, certaines améliorations peuvent encore être apportées à ce niveau. En effet, même si l'utilisation de souches de souris « inbred » permet de diminuer la variabilité liée aux différences génétiques, il n'en demeure pas moins que même au sein de ces souches, il existe d'importantes différences interindividuelles résiduelles vraisemblablement liées aux différentes stratégies de coping utilisées par les animaux lorsqu'ils sont confrontés à une situation génératrice de stress (stratégie proactive *vs*. réactive) (Koolhaas, de Boer *et coll.* 2010). Les animaux réactifs étant différents des animaux proactifs en termes de régulation des axes du stress (HPA et surtout SAM), cela suggère l'importance de sélectionner les animaux préalablement de façon à diminuer la variabilité due aux différentes stratégies de *coping* des animaux. Les multiples travaux de Jaap Koolhaas illustrent tout à fait l'intérêt d'une telle procédure de sélection.

II. ACTIVATION PERIPHERIQUE DE LA VOIE KYN : IMPLICATIONS PHYSIOPATHOLOGIQUES

1. Pourquoi le TRP n'est pas un bon antidépresseur

Plusieurs arguments ont contribué à utiliser le tryptophane en tant qu'antidépresseur. Tout d'abord à cause de l'hypothèse monoaminergique de la dépression qui a placé durant des décennies la déficience en monoamines, et en particulier en 5-HT, en première place des mécanismes sous-tendant les troubles dépressifs. D'ailleurs, de nombreux travaux ont montré que la concentration en TRP est diminuée dans le plasma des patients souffrant de dépression majeure ainsi que chez des patients atteints par des troubles de moindre intensité (Coppen, Eccleston *et coll.* 1973; Cowen, Parry-Billings *et coll.* 1989; Capuron, Ravaud *et coll.* 2002). Le TRP étant le seul précurseur de la synthèse de 5-HT, il a été supposé qu'une augmentation de l'apport en TRP pourrait combler, au moins en partie, la déficience en 5-HT observée chez ces patients. Ainsi, de nombreuses études cliniques ont eu pour but d'évaluer les effets antidépresseurs d'un traitement chronique au L-TRP mais sans résultats réellement décisifs : même si son efficacité semble être vraisemblablement supérieure à celle d'un placebo, certains travaux montrant une efficacité supérieure à celle des antidépresseurs plus classiques comme les ISRS, alors que d'autres n'indiquent aucune différence [Voir pour revue (Shaw, Turner *et coll.* 2002; Shaw, Turner *et coll.* 2002)]. Un des problèmes posés par une administration chronique en TRP provient de l'enzyme tryptophane-hydroxylase (TPH) permettant la synthèse de 5-HTP (précurseur de la 5-HT). En effet, la TPH peut être inhibée par le stress, la résistance à l'insuline, la déficience en vitamine B6, l'insuffisance en magnésium ou encore par de fortes concentrations en TRP (Maes, Jacobs *et coll.* 1990). De plus, la TPH est une enzyme limitante, c'est-à-dire qu'au-delà d'une certaine concentration, l'apport supplémentaire en TRP n'augmentera plus la production de 5-HT (Zhang, Beaulieu *et coll.* 2004). Pour contourner ce problème, il a été proposé d'administrer aux patients du 5-HTP plutôt que du TRP, afin de s'affranchir des problèmes liés à la régulation de la TPH. Mais la encore, les études réalisées ne permettent pas de conclure clairement quant à l'efficacité du 5-HTP à diminuer les symptômes dépressifs. Turner *et al*, ont réalisé une revue de la littérature et ont étudié les données issues de 27 études ayant évalué l'efficacité du 5-HTP en tant qu'antidépresseur (N=990 patients). Étant donné l'hétérogénéité de ces études en termes de durée, de doses utilisées ou tout simplement de divergence de protocole, une approche par méta-analyse n'a pu être réalisée. Les auteurs ont cependant mené une analyse descriptive et ont observé que sur 11 de ces études (réalisées en double aveugle), 7 reportaient une efficacité supérieure du 5-HTP en comparaison au placebo [Voir pour revue (Turner, Loftis *et coll.* 2006)].

Si l'on fait le bilan de tous ces travaux, il apparaît qu'augmenter l'apport en TRP ou en 5-HTP ne constitue pas une stratégie adéquate pour alléger la symptomatologie dépressive. Mais est-ce vraiment étonnant ? A la lueur des dernières données concernant l'utilisation du TRP au sein de la voie KYN, on

peut aisément comprendre pourquoi ces stratégies ne sont pas efficaces. Tout d'abord, il est maintenant évident que l'accélération du métabolisme du TRP au sein de la voie KYN est une caractéristique observable chez certaines catégories de patients dépressifs. A partir de cet état de fait, que se passe-t-il chez ces mêmes patients quand un traitement chronique avec du TRP leur est administré ? L'activation des enzymes TDO et IDO par le cortisol et les cytokines suggère qu'à l'évidence, la majeure partie du TRP va être utilisée au sein de la voie KYN, diminuant éventuellement le pool de TRP nécessaire à la synthèse de la 5-HT au niveau du SNC (Voir **Fig. 41** ci-après). Cependant, chez les patients ne présentant pas d'activation de la voie KYN, il est plus probable que le TRP administré soit utilisé de façon plus importante pour produire de la 5-HT et ainsi pourrait éventuellement réduire les symptômes dépressifs.

Dans ce contexte, la stratégie consistant à utiliser du 5-HTP à la place du TRP pourrait bien s'avérer plus efficace pour plusieurs raisons. La première est que, tout comme dans la situation présentée ci-dessus, le 5-HTP permettrait d'augmenter les taux de 5-HT dans le cerveau des patients ne présentant pas d'activation de la voie KYN, aboutissant vraisemblablement à un résultat similaire à celui obtenu avec le TRP. Cependant, chez les patients chez lesquels la voie KYN est activée, le 5-HTP pourrait tout de même s'avérer efficace compte tenu de sa capacité à inhiber l'enzyme TDO et donc à diminuer l'utilisation du TRP au sein de la voie KYN.

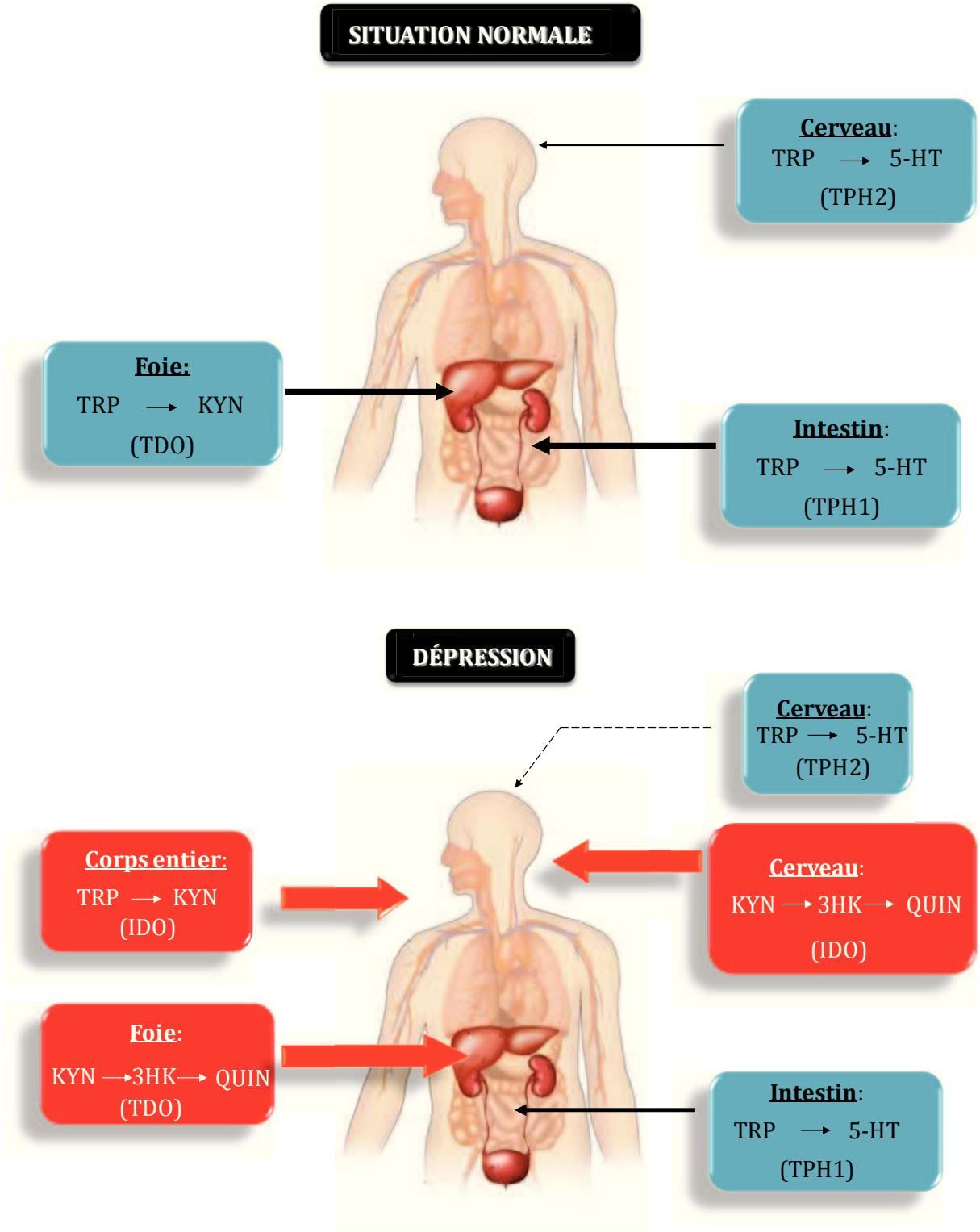


Fig. 41 : ***Détournement périphérique et central du métabolisme du tryptophane chez les patients dépressifs***.

2. Voie KYN, dépression et dysfonctionnements cardio-vasculaires

Plusieurs études suggèrent l'existence d'un lien bidirectionnel entre les troubles dépressifs et les troubles cardio-vasculaires [Voir pour revue (Isingrini, Desmidt *et coll.* 2009)]. L'endothélium vasculaire joue un rôle clé dans le maintien de l'homéostasie vasculaire en libérant de nombreuses substances participant entre autre aux mécanismes de relaxation/constriction, de prolifération des cellules musculaires lisses, d'inflammation et de thrombose. Parmi les facteurs libérés par les cellules endothéliales, l'un des médiateurs les plus importants dans le maintien de l'homéostasie est le NO. Ce dernier possède d'importantes propriétés vasodilatatrices, anti-thrombotiques et anti-inflammatoires. Dans la plupart des pathologies vasculaires, l'équilibre entre facteurs vasodilatateurs et vasoconstricteurs semble être rompu vraisemblablement par une diminution de la fonction vasodilatatrice de l'endothélium (Vanhoutte 1995). Des travaux menés au laboratoire montrent que l'UCMS induit une diminution de la relaxation vasculaire dépendante du NO, suggérant une diminution de la biodisponibilité en NO. Un tel mécanisme pathologique pourrait bien être relié aux altérations du métabolisme de la KYN observés dans nos expériences. En effet, nous avons observé que l'UCMS induisait non seulement l'activation de la voie KYN en périphérie mais aussi l'accumulation de composés potentiellement toxiques tels que QUIN et 3HK (ARTICLES 1 et 3). En parallèle, il a été montré que le NO joue un rôle important en tant qu'inhibiteur de l'enzyme IDO et permet par conséquent de limiter l'activation de la voie KYN ainsi que l'accumulation de composés toxiques. Par conséquent, une baisse de la disponibilité en NO pourrait expliquer, en partie tout du moins, les concentrations élevées en 3HK et QUIN que nous avons observées chez nos souris UCMS. Une telle hypothèse est confortée par le fait que les cellules de l'endothélium vasculaire ainsi que les péricytes expriment l'IDO ainsi que certaines enzymes du métabolisme de la KYN.

En contre partie, des travaux ont mis en évidence que certains métabolites de la KYN, tels que QUIN et PIC, stimulent la production de NO, en particulier par un phénomène d'activation des enzymes NOS. En effet, des travaux ont observé une hausse d'environ 400% de l'activité NOS suite à une injection de QUIN dans le striatum de rats (Perez-Severiano, Escalante *et coll.* 1998; Ryu, Choi *et coll.* 2006). D'autres auteurs ont montré que PIC induisait une hausse de l'expression du gène de la iNOS (Melillo, Cox *et coll.* 1994). Même si ces travaux n'impliquent pas directement la NOS endothéliale, il se pourrait que l'augmentation des concentrations en 3HK et QUIN observée chez nos souris UCMS constituent un mécanisme de compensation dont le but serait de combler une baisse de la concentration en NO.

Cependant, d'autres hypothèses peuvent être formulées quant à l'implication du métabolisme de la KYN dans les relations existant entre dépression et dysfonctionnement cardiovasculaire. En effet, il est probable que l'accumulation périphérique de métabolites générateurs de radicaux libres, tels que 3HK et QUIN, soient responsables d'une hausse du stress oxydant qui est l'un des plus importants mécanismes à l'origine du dysfonctionnement endothélial (Madamanchi, Vendrov *et coll.* 2005). Il est bien évident que d'autres systèmes générateurs de stress oxydant sont impliqués dans ce type d'altérations mais une étude récente de Pawlak *et coll.* montre que les concentrations plasmatiques en KYN et en 3HK sont positivement corrélées à certains facteurs de dysfonctionnement endothélial tels

que le facteur von Willbrand (respectivement $p<0.05$ et $p<0.0001$) et le taux de thrombomoduline (respectivement $p<0.05$ et $p<0.01$). Dans cette même étude, les auteurs ont également observé que le taux de 3HK est positivement corrélé à la concentration sICAM-1 ($p<0.01$) (un molécule d'adhésion permettant aux cellules immunitaires de s'accrocher aux cellules endothéliales lors de processus inflammatoires) (Pawlak, Domaniewski *et coll.* 2009). Ces données suggèrent que le détournement du métabolisme du TRP vers 1) la voie de synthèse de la KYN et 2) vers la voie de synthèse de 3HK et QUIN, tel qu'il est observé chez les patients dépressifs (Raison, Dantzer *et coll.* 2010) ainsi que chez des souris confrontées à l'UCMS (ARTICLES 1 et 3), joue un rôle clé dans les mécanismes sous-tendant le dysfonctionnement endothélial à l'origine de la plupart des troubles cardiovasculaires.

D'autres travaux supportent une telle hypothèse, en particulier l'étude menée par Pertovaara *et al.* montrant que l'activité IDO est positivement corrélée à un facteur de risque cardiovasculaire - la distance intima-média carotidienne - chez 544 femmes âgées de 24 à 39 ans (Pertovaara, Raitala *et coll.* 2007). Plus tard, ce résultat fut confirmé chez 921 Hommes/femmes agés de 46 à 79 ans (Niinisalo, Raitala *et coll.* 2008).

III. CERVEAU ET TROUBLES DE L'HUMEUR : QUELS RÔLES POUR LA VOIE KYN ?

A l'heure actuelle, relativement peu d'études permettent d'apprécier l'implication du métabolisme cérébral de la KYN dans la régulation de l'humeur. De ce point de vue, ce travail de thèse aura eu vocation à fournir les premières données suggérant le rôle central que cette voie pourrait avoir dans la physiopathologie de la dépression.

Nos travaux suggèrent fortement que l'inflammation est un facteur essentiel intervenant dans l'étiologie des troubles de l'humeur, avec comme médiateur central le détournement du métabolisme du TRP vers la synthèse de KYN et de ses métabolites. Les travaux de O'Connor *et coll.* présentés un peu plus tôt dans la discussion confortent sérieusement ce lien entre inflammation, dépression et voie de la KYN (Moreau, Lestage *et coll.* 2005; Moreau, Andre *et coll.* 2008; O'Connor, Lawson *et coll.* 2008; O'Connor, Andre *et coll.* 2009; O'Connor, Lawson *et coll.* 2009). Cependant, des données concernant l'implication du métabolisme cérébral de la KYN manquent cruellement, tant chez l'Homme que chez l'animal. A ma connaissance, deux études seulement ont cherché à mettre en évidence un lien entre altérations de la voie KYN cérébrale et troubles de l'humeur. La première est celle de Raison *et coll.*, déjà mentionnée dans ce manuscrit, montrant que l'intensité des symptômes dépressifs est positivement corrélée à la concentration en QUIN dans le LCR (Raison, Borisov *et coll.* 2009). La seconde révèle des informations plus précises quant à la nature du lien existant entre altérations de l'humeur et modifications cérébrales du métabolisme de la KYN, en utilisant la spectrométrie par résonance magnétique *in vivo* du proton (SRM). Cette technique permet, de par la nature des informations qu'elle procure, de quantifier une souffrance cellulaire par l'analyse de certains

métabolites, dont les principaux sont le N-acétylaspartate, la choline, la créatine, le lactate et le myo-inositol. Ainsi, Gabbay *et al.* ont observé, chez des adolescents souffrant de dépression majeure, un taux de choline et de créatine élevé au niveau du noyau caudé gauche (Gabbay, Hess *et coll.* 2007). Dans une autre étude ils ont mesuré les concentrations intrastriatales de certains métabolites de la KYN et ont observé une corrélation positive entre les taux de choline et de KYN d'une part et les taux de choline et de 3HA d'autre part (Gabbay, Liebes *et coll.*). Cependant, il est important de noter que ces corrélations n'étaient observées que chez les patients mélancoliques. Ces données indiquent une augmentation du métabolisme de la KYN vers la voie « neurotoxique », et suggèrent par ailleurs une implication des métabolites de cette voie dans la perturbation du métabolisme local observée par SRM.

1. Modulation des systèmes de neurotransmission

La dopamine **:** Durant des années, le traitement de la dépression à consisté à cibler les systèmes sérotoninergique et noradrénergique de façon à augmenter leurs concentrations intracérébrales. Les systèmes dopaminergiques mésolimbique et mésocorticolimbique confèrent aux stimuli environnementaux une connotation appétitive et sont, par conséquent, fortement impliqués dans la régulation des phénomènes motivationnels et hédoniques (Wise 2009). Bien qu'une perte de la motivation, de l'élan vital ainsi qu'une anhédonie soient deux des plus importants symptômes caractérisant un état dépressif (Snaith 1993), le rôle de ce neurotransmeteur dans la physiopathologie de la dépression a été relativement peu étudié (Yadid and Friedman 2008). Pour autant, nombreux sont les arguments mettant en évidence le rôle central de la transmission dopaminergique dans les troubles de l'humeur [Voir pour revue (Yadid and Friedman 2008)]. Ainsi, il semble que l'augmentation pharmacologique des taux cérébraux de dopamine, résultant par exemple de l'administration d'inhibiteurs de la recapture de dopamine, ait une action antidépressive chez l'Homme (Kapur and Mann 1992; El-Mallakh 2000). Chez l'animal, la concentration en dopamine dans le striatum apparaît comme étant étroitement associée à l'aspect motivationnel de différents patterns comportementaux (par exemple la motivation à explorer un nouvel environnement) (Mallo, Alttoa *et coll.* 2007; Alttoa, Seeman *et coll.* 2009). Ces données vont de pair avec le fait que la concentration extracellulaire en dopamine ainsi que sa libération ont été trouvés significativement diminués dans le striatum ventral (noyau accumbens) de rats de la souche Flinders Sensitive Line (modèle de dépression) (Yadid, Nakash *et coll.* 2000). L'ensemble de ces données suggère qu'une diminution de la concentration en dopamine dans le striatum, en particulier dans le noyau accumbens, constitue un des mécanismes sous-tendant la perte de motivation et de plaisir observée au cours d'un épisode dépressif.

De façon intéressante, il a été montré à plusieurs reprises que KYNA était capable de moduler la concentration en dopamine chez des animaux naïfs. En effet, une étude de Borland *et al.* a mis en évidence, *in vivo*, que la perfusion dans le striatum de KYNA a entraîné une diminution significative de la concentration locale en dopamine (Borland and Michael 2004). Dans le même esprit, une étude

utilisant la microdialyse a clairement démontré le rôle majeur de KYNA dans la régulation des concentrations intrastriatales de dopamine chez le rat (Amori, Wu *et coll.* 2009). Dans ce travail les auteurs ont infusé un inhibiteur de l'enzyme responsable de la synthèse de KYNA : la *kynurenine aminotransferase* (KAT), et ont observé que la concentration en dopamine locale a été multipliée par 15. A l'inverse, d'autres auteurs ont montré que l'infusion de KYNA, à des concentrations physiologiques de l'ordre du nanomolaire, induisait une diminution de la concentration locale en dopamine chez des rats anesthésiés (Rassoulpour, Wu *et coll.* 2005). Ces résultats indiquent que la concentration en dopamine dans le striatum est dépendante de la concentration locale en KYNA. Ceci est particulièrement intéressant compte tenu de la diminution des taux de KYNA induite par l'UCMS obtenue dans nos deux études (ARTICLES 1 et 3). Si l'on considère les résultats présentés ci-dessus, une telle diminution de KYNA serait associée à une augmentation de la concentration en dopamine locale, ce qui est en contradiction avec ce que l'on peut observer dans la littérature quant aux effets du stress chronique sur la concentration en dopamine dans le striatum (Lucas, Wang *et coll.* 2007; Salas and De Biasi 2008). Cependant, un élément méthodologie important est susceptible d'expliquer une telle divergence, puisque, lors de nos diverses expériences, nous avons prélevé le striatum dans son entier, et non la partie ventrale seulement, ce qui aurait été plus pertinent compte tenu de l'implication de cette région dans les processus motivationnels.

Le glutamate : Il paraît aujourd'hui évident que QUIN et KYNA sont capables de moduler la neurotransmission glutamatergique par plusieurs moyens : action au niveau du récepteur NMDA, action au niveau des systèmes de recapture du glutamate (Voir introduction p103-105). Ces deux composés étant produits au sein de deux voies distinctes, un déséquilibre de la balance, par exemple vers la voie QUIN, pourrait résulter soit en une augmentation de l'excitation neuronale locale, soit en une augmentation des processus de toxicité cellulaire (excitoxicité, génération de ROS). Même si nos données ne montrent pas clairement d'augmentation de la concentration en QUIN dans les tissus du SNC suite à l'UCMS, il n'en demeure pas moins que l'équilibre entre QUIN et KYNA semble être dévié en faveur de QUIN (ARTICLE 3) dans la plupart des structures étudiées (AMY, HIPPO et STR). Ceci pourrait bien avoir des répercussions sur le fonctionnement intrinsèque de ces structures en entraînant une prédominance des effets pro-glutamatergiques (augmentation de l'excitation neuronale, toxicité). Il est intéressant de noter qu'une telle hypothèse est en accord avec l'hypothèse glutamatergique de la dépression selon laquelle les patients dépressifs présenteraient des taux élevés de glutamate dans certaines régions cérébrales (Sanacora, Gueorguieva *et coll.* 2004; Bhagwagar, Wylezinska *et coll.* 2007). Nos résultats montrent également que l'administration d'un antidépresseur de type IRSS réverse partiellement le déséquilibre entre les voies QUIN et KYNA suggérant ainsi qu'un des mécanismes d'action de ces composés pourrait être un effet anti-glutamatergique médié par un retour à la normal de l'équilibre QUIN-KYNA. L'administration d'un inhibiteur de l'IDO a également des effets antidépresseurs qui pourraient aussi être médiés par la restauration de cet équilibre. Des travaux menés chez l'Homme montrent que la kétamine (antagoniste NMDA) produit un important

effet antidépresseur avec un effet quasiment immédiat (Berman, Cappiello *et coll.* 2000; Cryan and O'Leary 2010), ou encore que le riluzole (bloqueur des canaux sodiques voltage-dépendants qui diminue la libération de glutamate) a d'intéressantes propriétés antidépressives (Zarate, Payne *et coll.* 2004; Sanacora, Kendell *et coll.* 2007). Ainsi, le fait de diminuer la concentration en glutamate soit en favorisant la synthèse de KYNA, soit en inhibant la voie de synthèse de QUIN, pourrait bien constituer une nouvelle piste thérapeutique permettant de diminuer les symptômes dépressifs.

2. Dépression, KYN et cellules gliales

Les cellules gliales semblent jouer un rôle important dans la physiopathologie des troubles dépressifs. En effet, plusieurs études ont mis en évidence des anomalies structurales et fonctionnelles de certains types de cellules gliales chez les patients dépressifs [Voir pour revue (Rajkowska and Miguel-Hidalgo 2007)]. En 2002, Bowley *et al.* ont montré que le nombre de cellules gliales était significativement réduit dans l'amygdale des patients dépressifs majeurs (Bowley, Drevets *et coll.* 2002). Un peu plus tard, il a été observé chez ces patients une baisse de la densité gliale dans l'amygdale, vraisemblablement due à une diminution du nombre d'oligodendrocytes, le nombre d'astrocytes n'étant vraisemblablement pas affecté (Hamidi, Drevets *et coll.* 2004). Les auteurs ont d'ailleurs conclu que la réduction oligodendrocytaire était à l'origine de la diminution de densité gliale observée dans cette structure. Cependant, la possibilité qu'une perte astrocytaire soit également impliquée dans la baisse de la densité gliale été renforcée récemment par une étude comparant la densité astrocytaire dans l'amygdale des patients dépressifs majeurs à celle de patients bipolaires, schizophrènes et contrôles (Altshuler, Abulseoud *et coll.* 2010). Les auteurs ont observé que la densité astrocytaire était significativement réduite chez les patients dépressifs majeurs. De telles données sont intéressantes et peuvent être mises en relation avec nos résultats montrant une diminution de la concentration en KYNA dans l'amygdale suite à l'UCMS. En effet, deux études de Guillemin *et coll.* ont montré que les astrocytes produisent majoritairement KYNA à partir de KYN et relativement peu de 3HK et de QUIN car ils ne possèdent pas l'enzyme *kynurenine-hydroxylase* (Guillemin, Kerr *et coll.* 2001; Guillemin, Smythe *et coll.* 2005). En parallèle, les auteurs montrent aussi que QUIN est majoritairement produit par les cellules de la microglie (Guillemin, Smythe *et coll.* 2005). L'équilibre QUIN - KYNA pourrait alors être sous-tendu l'équilibre astroglie – microglie. Dans ce cas, une diminution de la densité astrogliale pourrait engendrer une baisse de la synthèse de KYNA, et une hausse de la densité microgliale pourrait être associée à une production de QUIN plus importante. De façon générale, nous montrons dans nos travaux que le ratio KYNA/QUIN est diminué dans certaines structures du système limbique, en particulier dans l'amygdale et le striatum. Compte tenu du fait que la synthèse de ces métabolites se déroule essentiellement dans les cellules gliales, ces données pourraient sous-tendre des altérations gliales en réponse à l'UCMS. Dans ce cas, il est particulièrement intéressant de constater que le stress chronique induit une diminution de la densité astrogliale (Gosselin, Gibney *et coll.* 2009) associée à une hausse de la densité microgliale dans l'amygdale, le cortex cingulaire et l'hippocampe (Tynan, Naicker *et coll.* 2010) chez le rat. Selon l'hypothèse

mentionnée ci-dessus, de telles altérations gliales pourraient corroborer nos observations montrant un effet perturbateur de l'UCMS sur l'équilibre KYNA-QUIN en particulier dans l'amygdale, le cortex cingulaire et le striatum.

Enfin, certains travaux ont mis en évidence qu'une altération oligodendrocytaire amygdalienne pouvait être impliquée dans la physiopathologie de la dépression (Hamidi, Drevets *et coll.* 2004). Cette hypothèse est intéressante compte tenu de nos résultats (KYN est préférentiellement métabolisée au sein de la voie QUIN) mais aussi de la capacité de QUIN à perturber le fonctionnement de ces cellules (Cammer 2001; Cammer 2002). Et ceci est d'autant plus intéressant si l'on tient compte des données de Surget *et coll.* qui montrent que l'UCMS induit, spécifiquement dans l'amygdale, une diminution de l'expression de plusieurs gènes impliqués dans l'activité oligodendrocytaire (Surget, Wang *et coll.* 2009).

3. La dépression : une maladie inflammatoire ?

De plus en plus de données rendent compte de l'importance des phénomènes inflammatoires dans étiologie et la pathogénie de la dépression, en particlier : l'augmentation des niveaux circulants de certaines cytokines proinflammatoires telles l'IL-1, l'IL-2, l'IL-6, l'IL-8, l'IL12, l'IFNγ ou le TNFα (Schiepers, Wichers *et coll.* 2005), les signes d'activation des lymphocytes T (c'est-à-dire la hausse des marqueurs d'activation = CD25+ et l'élévation des niveaux de récepteurs solubles à l'IL-2 = sIL-2Rs) (Maes, Bosmans *et coll.* 1990), l'augmentation des concentrations en diverses protéines de la phase aigüe telles l'α1-antitrypsine, l'haptoglobine et la protéine C-réactive (Berk, Wadee *et coll.* 1997; Maes, Delange *et coll.* 1997). D'autres données ciblant le mécanisme d'action des antidépresseurs viennent agrémenter cette hypothèse en montrant que la plupart des traitements antidépresseurs, pharmacologiques ou non, ont des propriétés anti-inflammatoires (Sluzewska, Rybakowski *et coll.* 1995; Levine, Barak *et coll.* 1999; Lanquillon, Krieg *et coll.* 2000; Kenis and Maes 2002; Hestad, Tonseth *et coll.* 2003; Tuglu, Kara *et coll.* 2003; Sacre, Medghalchi *et coll.* 2010). De la même manière, des études menées chez l'animal mettent en avant le rôle antidépresseur de certains traitements antagonisant l'action des cytokines inflammatoires : par exemple, l'administration intracérébrale d'IL-1ra (antagoniste des récepteurs à l'IL-1) prévient certains déficits comportementaux induits par un isolement prolongé chez le rat (Pugh, Nguyen *et coll.* 1999). De plus, l'administration d'anticorps anti-TNFα s'est révélée aussi efficace que les antidépresseurs classiques à diminuer l'immobilité dans le FST (Reynolds, Ignatowski *et coll.* 2004). De tels résultats ont également pu être observés en clinique : deux antagonistes du TNFα (l'étanercept et l'infliximab) se sont avérés efficaces à diminuer la sévérité des symptômes dépressifs chez des patients souffrant de diverses maladies auto-immunes (Mathias, Colwell *et coll.* 2000; Lichtenstein, Bala *et coll.* 2002).

D'autres arguments issus de la clinique suggèrent qu'un retour à la normale du fonctionnement des cellules immunitaires est une condition *sine qua non* pour qu'un traitement antidépresseur soit pleinement efficace. En effet, certains auteurs ont montré que des patients dépressifs majeurs,

résistants aux traitements par inhibiteurs sélectifs de la recapture de 5-HT (IRSS), présentent d'importantes concentrations plasmatiques en cytokines inflammatoires (IL6 et TNFα) contrairement aux patients pour lesquels le traitement s'est avéré efficace (O'Brien, Scully *et coll.* 2007). Ce résultat, répliqué un peu plus tard par le même groupe (Dinan, Siggins *et coll.* 2009), confère ainsi un poids important à l'hypothèse du remaniement immunitaire au cours de la dépression majeure, en supposant que la diminution des symptômes dépressifs nécessite la diminution des taux de cytokines circulantes. Ceci est également suggéré par les travaux d'Eller *et coll.* qui montrent que des concentrations plasmatiques élevées en cytokines proinflammatoires (TNFα) prédisent l'absence de réponse au traitement par escitalopram (Eller, Vasar *et coll.* 2008).

Indirectement, les résultats obtenus au cours de cette thèse apportent un crédit supplémentaire à l'hypothèse inflammatoire de la dépression puisque nous montrons que le simple fait d'inhiber l'IDO – une enzyme activée par les cytokines proinflammatoires – permet de rétablir la plupart des altérations comportementales et biochimiques engendrées par un modèle animal de dépression : l'UCMS (ARTICLE 3).

L'idée d'une origine inflammatoire de la dépression est aussi en accord avec l'importante comorbidité des troubles dépressifs avec des désordres tels que les troubles cardio-vasculaires, le diabète, la sclérose multiple, l'infection par le virus HIV, le syndrome du côlon irritable (colopathie fonctionnelle) et l'arthrite rhumatoïde qui ont pour la plupart une origine inflammatoire (Maes 1995; Yirmiya, Weidenfeld *et coll.* 1999). Il est intriguant de constater que lors de ces affections, l'intensité des symptômes dépressifs est positivement corrélée à l'état d'activation de la voie KYN (mesuré par le ratio KYN/TRP) (Fitzgerald, Cassidy Eugene *et coll.* 2008; Swardfager, Herrmann *et coll.* 2009).

4. Le métabolisme de la KYN : un lien entre stress, dépression, et démence ?

Le lien entre stress et dépression est relativement bien établi dans la littérature scientifique mais il est quasiment toujours abordé sous l'angle neuroendocrine alors que le dérèglement des axes du stress ne suffit pas à expliquer l'intégralité de ce lien. En effet, on sait que l'exposition prolongée au stress entraîne une hyperactivité de l'axe HPA vraisemblablement provoquée par un défaut de régulation au niveau du SNC. La conséquence est une perturbation du cycle circadien de libération de GC dans la circulation sanguine qui peut aboutir à une libération excessive en GC. Ces derniers sont capables d'affecter la neuroplasticité et la cytoarchitecture cérébrale en induisant des phénomènes d'excitotoxicité dépendante du glutamate et des canaux calciques (Magarinos and McEwen 1995; Sapolsky 2003), de diminuer l'expression de facteurs neurotrophiques (BDNF, VEGF) et anti-apoptotiques (Bcl2), ou encore d'atténuer l'activité d'enzymes antioxydantes et ainsi favoriser l'action toxique des radicaux libres (McIntosh, Cortopassi *et coll.* 1998; Sapolsky 1999). Même si ces perturbations sont couramment observées chez certains patients dépressifs, cela ne signifie en aucun cas qu'une altération de l'axe HPA est à l'origine des troubles dépressifs car les GC ne suffisent pas à

expliquer la physiopathologie du syndrome dépressif. D'ailleurs, les patients atteints du syndrome de Cushing (hyperactivité de l'axe HPA) ne présentent pas tous de tels troubles de l'humeur. De même, les patients souffrant de dépression atypique semblent, au contraire, présenter un syndrome dépressif associé à une hypoactivité de l'axe HPA (Gold, Gabry *et coll.* 2002). Dans ce contexte, il semble que l'inflammation soit un des facteurs clés, susceptible d'unifier bon nombre d'altérations observées en réponse à un stress chronique ainsi que chez les patients dépressifs. Cette hypothèse est d'autant plus plausible qu'un accroissement des processus inflammatoires est présent tant dans les troubles mélancoliques qu'atypiques (Anisman, Ravindran *et coll.* 1999). D'ailleurs, certaines études ont permis de mieux comprendre comment stress psychologique, immunité/inflammation et dépression peuvent être reliés. En effet, Bierhaus *et coll*. ont mis en évidence un rôle fondamental des catécholamines, et en particulier de la NA, dans l'activation du *Nuclear Factor Kappa B* (NF-κB), un facteur de transcription fortement impliqué dans la mise en place d'une réaction inflammatoire, et par conséquent, capable d'induire la production de nombreuses cytokines proinflammatoires (Bierhaus, Wolf *et coll.* 2003). La sécrétion de catécholamines étant augmentée à chaque demande de l'organisme en réponse à des situations génératrices de stress, l'activation de ce facteur pourrait bien constituer un élément clé du déséquilibre entre cytokines pro- vs. anti-inflammatoires observé dans les modèles animaux de dépression ainsi que chez les patients dépressifs. D'ailleurs, une étude récente menée chez l'animal a montré que l'inhibition de NF-κB permet de reverser les altérations comportementales ainsi que la diminution de la neurogénèse hippocampique induits par une procédure de stress chronique (Koo, Russo *et coll.* 2010).

C'est parce qu'il est à l'interface de ces deux systèmes, neuroendocrinien et immunitaire, et surtout parce que certains de ses métabolites sont de puissants neurotoxiques, que le métabolisme de la KYN est particulièrement intéressant pour expliquer, tout du moins en partie, le lien entre stress – dépression et démence. Ainsi la voie KYN pourrait constituer une sorte d'effecteur commun aux composantes neuroendocrine et immunitaire de la réponse au stress. Sous l'effet d'une exposition chronique au cortisol et/ou aux cytokines proinflammatoires, le métabolisme de la KYN pourrait favoriser l'accumulation de composés susceptibles de perturber le fonctionnement des systèmes de neurotransmission, les mécanismes de plasticité synaptique, et les mécanismes de survie/mort cellulaire liés au stress oxydant. C'est ce que suggèrent les travaux du groupe de Bryan Leonard dans lesquels il observe que la succession des épisodes dépressifs entraîne une déficience de la voie « neuroprotectrice » (synthèse de KYNA) non régularisée après traitement par IRSS chez les patients ayant subi plus de deux épisodes dépressifs majeurs (Myint, Kim *et coll.* 2006). Il pose ainsi la question de l'implication des métabolites de la KYN dans le continuum stress-dépression-démence, l'accumulation de composés toxiques au fil des épisodes dépressifs pouvant constituer les premières briques des processus à l'origine d'une démence tels que des processus de neurodégénerescence.

La principale cause de démence dégénérative est la démence sénile – la maladie d'Alzheimer (MA) – caractérisée par une diminution des performances cognitives et en particulier de la mémoire (Selkoe

1999). L'existence d'un lien entre dépression et MA fait encore aujourd'hui l'objet d'un important débat. Certains auteurs proposent que la dépression constitue un facteur de risque voire un prodrome de la MA (Yaffe, Blackwell *et coll.* 1999; Jorm 2000) contrairement à d'autres qui pensent que la dépression concomitante à la MA est une conséquence de la perception du déclin des fonctions cognitives (Holtzer, Scarmeas *et coll.* 2005). Cependant, dans les deux cas, l'état pathologique s'accompagne de perturbations cognitives et psychoaffectives sous-tendues par un dysfonctionnement des systèmes neuroendocrine et inflammatoire, qui, en termes de fonctionnement de la voie KYN se traduit par un processus d'activation. Ce détournement métabolique, favorisant l'accumulation de composés toxiques dans l'organisme, est observé au cours des états pathologiques liés à ces deux affections. Il est alors légitime d'imaginer que ce processus puisse constituer un substratum commun à la physiopathologie des états dépressifs et de la MA. Les résultats obtenus par Widner *et coll.* constituent d'ailleurs de solides arguments confortant cette hypothèse. En effet, dans un premier temps, il constate que des patients âgés de 57 à 91 ans (sans pathologies apparentes) présentent une dégradation accrue du TRP plasmatique en KYN par rapport à des patients dont la moyenne d'âge est de 38,4 ans (Widner, Leblhuber *et coll.* 2000). Il montre aussi dans ce travail que les scores obtenus par les patients au MMS sont corrélés au ratio KYN/TRP, suggérant qu'au cours du vieillissement normal, l'activation de la voie KYN (augmentant avec l'âge) est négativement corrélée aux performances cognitives. Toujours dans la même étude, Widner a évalué les concentrations plasmatiques en TRP, KYN et certains marqueurs d'inflammation (néoptérine et IL-2) chez des patients Alzheimer et a montré que l'utilisation du TRP au sein de la voie KYN est accrue de façon plus importante encore que chez les patients âgés non-Alzheimer (Widner, Leblhuber *et coll.* 2000). Le ratio KYN/TRP étant toujours corrélé à l'importance du déclin cognitif ainsi qu'à l'augmentation des titres des marqueurs de l'inflammation.

*****

CONCLUSION ET PERSPECTIVES

*****

« Ceux qui prétendent détenir la vérité sont ceux qui ont abandonné la poursuite du chemin vers elle. La vérité ne se possède pas, elle se cherche. »

Albert Jacquard

L'implication du métabolisme du TRP au sein de la voie KYN dans la dépression est désormais relativement bien documentée compte tenu du nombre important d'études, menées ces 10-15 dernières années, rapportant une association entre l'activation de cette voie et la survenue de symptômes dépressifs. Cependant, malgré cette accumulation de données, on comprend encore bien mal son rôle réel dans les déficits biochimiques et comportementaux observés chez les patients dépressifs. L'attention est principalement focalisée sur les métabolites issus de la dégradation de la KYN dont les mécanismes d'action cellulaires ont été largement caractérisés *in vitro* et *in vivo*. Ces derniers seraient ainsi capables de moduler l'activité des neurones en agissant sur les systèmes de neurotransmission ou encore en accélérant les processus d'oxydation des lipides, des protéines et de l'ADN. Les altérations induites par ces métabolites peuvent également aboutir à des processus de dégénérescence neuronale. Compte tenu de leur « neuroactivité », il paraît important d'étudier plus précisément les conséquences d'un dyfonctionnement du métabolisme de la KYN au sein du SNC et en particulier au niveau des structures des circuits coticolimbiques dont l'implication dans les troubles dépressifs a été bien décrite. Chez l'Homme, l'avancée des recherches est ralentie par la difficulté à travailler sur des tissus cérébraux, c'est pourquoi un tel objectif ne peut être atteint que par l'utilisation de modèles animaux. Même si certaines avancées ont déjà été réalisées à ce niveau, en particulier par l'équipe de Robert Dantzer qui utilise un modèle de dépression basé sur l'exposition à un stresseur biogénique (inflammation chronique), aucune étude n'avait, jusqu'ici, utilisé de modèle basé sur l'exposition chronique à des stresseurs psychogéniques. C'est ce que nous nous sommes proposé de réaliser au cours de ce travail de thèse.

Pour cela, nous avons utilisé le modèle UCMS qui constitue l'un des modèles les plus pertinents pour étudier les mécanismes biologiques qui sous-tendent la symptomatologie dépressive. Ce modèle est basé sur l'exposition quotidienne et imprédictible à des facteurs de stress socio-environnementaux durant une période de plusieurs semaines, qui aboutit à l'installation d'un syndrome de type dépressif. Comme aucune étude n'avait utilisé ce modèle jusqu'alors, il nous a fallu procéder par étape.

Pour cela, notre premier objectif a été de caractériser les effets de l'UCMS sur le métabolisme de la KYN afin de vérifier si les altérations observées en clinique étaient également présentes chez la souris après plusieurs semaines d'UCMS. Nous avons ainsi pu montrer une « réorganisation » du métabolisme périphérique du TRP se traduisant par une activation de la voie KYN semblable à ce que l'on peut observer chez l'Homme (ARTICLE 1 et 3). Nous avons également pu montrer que la KYN synthétisée est préférentiellement métabolisée en 3HK et QUIN, deux métabolites ayant des propriétés toxiques, susceptibles d'induire des dommages oxydatifs. La manipulation pharmacologique de cette voie nous a permis de montrer que cette réorgation métabolique est vraisemblablement d'origine inflammatoire étant donné que l'administration de 1MT, un inhibiteur de l'enzyme IDO dont l'activité est augmentée par les cytokines inflammatoires, reverse l'activation de la voie KYN ainsi que l'accumulation de 3HK et QUIN induits par la procédure d'UCMS (ARTICLE

3). Au niveau du SNC, nos résultats mettent en évidence un effet « structure-dépendant » de l'UCMS sur le métabolisme de la KYN. L'équilibre entre QUIN et KYNA étant dévié vers QUIN dans l'amygdale et le striatum et vers KYNA dans le cortex cingulaire. L'hippocampe étant relativement peu affecté. Avec ces résultats, nous montrons pour la première fois que le stress chronique affecte de façon différentielle le métabolisme de la KYN au niveau de structures corticolimbiques impliquées dans l'étiopathogénie des troubles dépressifs. De façon intéressante, nous montrons aussi que le traitement au 1MT réverse presque intégralement les changements biochimiques induits par l'UCMS à ce niveau, ce qui suggère que l'IDO est impliquée dans ces phénomènes.

Notre deuxième objectif était ciblé sur les liens exisatnt entre l'activation de la voie et l'expression de comportements de type anxio-dépressifs. À ce niveau, nous avons pu mettre en évidence un certain nombre d'analogies entre l'état dépressif clinique et l'état pathologique induit par le modèle UCMS. En effet, à l'image de ce que l'on peut constater chez l'Homme, il semble que l'activation de la voie KYN périphérique soit positivement corrélée à l'intensité des altérations comportementales induites par l'UCMS (ARTICLES 2 et 3). Nous montrons aussi que l'inhibition de l'IDO par le 1MT permet de reverser la plupart des modifications comportementales induites par le stress chronique. Ce résultat est certainement le plus important de ce travail de thèse puisqu'il démontre que l'activation de l'IDO est un processus clé dans la mise en place de l'état « dépressif-like ». De telles données posent alors la question des mécanismes par lesquels l'activation de la voie KYN peut influencer l'expression de comportements anxiodépressifs. Comme nous l'avons vu, l'hypothèse la plus probable est liée aux propriétés toxiques de certains des métabolites de la KYN, qui en cas d'accumulation dans les tissus pourraient perturber le fonctionnement des réseaux de neurones qui participent à la régulation de l'humeur.

Nos troisième et quatrième objectifs visaient d'une part à vérifier si les antidépresseurs de type ISRS tels que la fluoxétine exercent un effet sur cette voie métabolique, et d'autre part à évaluer si le blocage de l'enzyme IDO pourrait contribuer à réduire l'intensité des troubles induits par l'UCMS. De ce point de vue, nos résultats mettent en évidence une implication déterminante de la voie KYN dans l'apparition des symptômes anxio-dépressifs compte tenu du fait que l'inhibition de l'IDO par le 1MT s'est avérée être aussi efficace que le blocage de la recapture de 5-HT par la fluoxétine à reverser les changements comportementaux induits par l'UCMS (ARTICLE 3). Ainsi, ces données étayent considérablement l'hypothèse inflammatoire de la dépression étant donné que les principaux activateurs de l'IDO sont les cytokines proinflammatoires.

<u>Quelques pistes à suivre…</u>

À la lecture de l'ensemble des arguments mentionné dans ce manuscrit, il ressort un lien étroit entre stress chronique, dépression et processus pathologiques impliqués dans des phénomènes de neurodégénérescence. Ce lien pourrait bien être le détournement du métabolisme du TRP au sein de la voie KYN puisqu'il est observable dans l'ensemble des conditions pathologiques mentionnées ci-

dessus. En cas de suractivation, le métabolisme de la KYN est capable de générer des composés toxiques pour les cellules, susceptibles d'entraîner une « usure » accélérée des tissus et plonger ainsi un individu dans la pathologie. De telles caractéristiques pathologiques sont intéressantes d'un point de vue théorique car elles sont en accord avec le concept de « charge allostatique » largement développé par Bruce McEwen, qui désigne les conséquences biologiques liées au fait de s'adapter aux facteurs générateurs de stress (McEwen 1998; McEwen 2004; McEwen 2005). C'est-à-dire que chaque fois qu'un individu doit s'adapter à une situation stressante, son organisme paie un « coût » pour qu'une certaine stabilité soit maintenue. Trop de sollicitations de ces systèmes ou une incapacité à « éteindre » ces systèmes est à l'origine de perturbations du fonctionnement cellulaire pouvant aller jusqu'à la mort des cellules. Compte tenu de la capacité de la voie KYN à être activée par les médiateurs du stress (GC, catécholamines et cytokines), on peut supposer que l'accumulation des métabolites de la KYN constitue un des mécanismes contribuant au « coût » payé par l'organisme pour s'adapter au stress.

Ainsi, des travaux futurs devront déterminer si la modification des niveaux de ces métabolites au niveau du SNC joue un rôle perturbateur sur le foncionnement cellulaire et si c'est le cas, quels sont les mécanismes impliqués. Compte tenu des propriétés oxydantes de 3HK et QUIN, une hypothèse plausible serait que leur accumulation (induite par l'UCMS) dans des structures clés du système limbique puisse contribuer de façon significative à l'augmentation des processus pro-oxydants et ainsi altérer localement le fonctionnement cellulaire. Dans le but de vérifier cette hypothèse, nous avons développé, en collaboration avec le Pr Olivier Hérault (*EA3855: Microenvironnement de l'Hématopoïèse et Cellules Souches, Tours)* et le Dr Gilles Guillemin (*Université de New South Wales, Sydney, Australie*) un projet de recherche dont l'objectif principal est de vérifier si les altérations de la voie KYN induites par l'UCMS peuvent altérer significativement l'équilibre entre processus pro-*vs.* antioxydants dans des régions cérébrales fortement impliquées dans la régulation de l'humeur et la réponse au stress (Voir annexe 3 pour une description détaillée du projet). En parallèle, il pourrait être intéressant d'évaluer les effets cellulaires, moléculaires et comportementaux d'une administration chronique de 3HK et/ou de QUIN dans certaines structures cérébrales (l'amygdale par exemple) par le biais de minipompes osmotiques, de façon à vérifier si l'élévation des taux de ces métabolites induit une hausse des processus oxydants concomittante ou non à des modifications comportementales.

De telles expériences pourraient nous renseigner précisément sur l'implication exacte de la voie KYN dans la physiopathologie des troubles dépressifs et par conséquent sur la comorbidité des symptômes dépressifs avec diverses pathologies à composante inflammatoire au cours desquelles cette voie métabolique est activée telles que le diabète, l'obésité, les troubles cardio-vasculaires, la polyarthrite rhumatoïde, la maladie d'Alzheimer etc.

Références bibliographiques

Acion, L., J. J. Peterson, et al. (2006). "Probabilistic index: an intuitive non-parametric approach to measuring the size of treatment effects." Stat Med **25**(4): 591-602.

Adamec, R. E., P. Burton, et al. (1999). "Unilateral block of NMDA receptors in the amygdala prevents predator stress-induced lasting increases in anxiety-like behavior and unconditioned startle--effective hemisphere depends on the behavior." Physiol Behav **65**(4-5): 739-51.

Adell, A., J. M. Casanovas, et al. (1997). "Comparative study in the rat of the actions of different types of stress on the release of 5-HT in raphe nuclei and forebrain areas." Neuropharmacology **36**(4-5): 735-41.

Adell, A., C. Garcia-Marquez, et al. (1988). "Chronic stress increases serotonin and noradrenaline in rat brain and sensitizes their responses to a further acute stress." J Neurochem **50**(6): 1678-81.

Ader, R. and N. Cohen (1975). "Behaviorally conditioned immunosuppression." Psychosom Med **37**(4): 333-40.

Agelaki, S., C. Tsatsanis, et al. (2002). "Corticotropin-releasing hormone augments proinflammatory cytokine production from macrophages in vitro and in lipopolysaccharide-induced endotoxin shock in mice." Infect Immun **70**(11): 6068-74.

Aghajanian, G. K. and I. M. Asher (1971). "Histochemical fluorescence of raphe neurons: selective enhancement by tryptophan." Science **172**(988): 1159-61.

Agid, O., B. Shapira, et al. (1999). "Environment and vulnerability to major psychiatric illness: a case control study of early parental loss in major depression, bipolar disorder and schizophrenia." Mol Psychiatry **4**(2): 163-72.

Airan, R. D., L. A. Meltzer, et al. (2007). "High-speed imaging reveals neurophysiological links to behavior in an animal model of depression." Science **317**(5839): 819-23.

Aisa, B., R. Tordera, et al. (2008). "Effects of maternal separation on hypothalamic-pituitary-adrenal responses, cognition and vulnerability to stress in adult female rats." Neuroscience **154**(4): 1218-26.

Alberati-Giani, D., P. Malherbe, et al. (1997). "Differential regulation of indoleamine 2,3-dioxygenase expression by nitric oxide and inflammatory mediators in IFN-gamma-activated murine macrophages and microglial cells." J Immunol **159**(1): 419-26.

Alberati-Giani, D., P. Ricciardi-Castagnoli, et al. (1996). "Regulation of the kynurenine metabolic pathway by interferon-gamma in murine cloned macrophages and microglial cells." J Neurochem **66**(3): 996-1004.

Alonso, R., G. Griebel, et al. (2004). "Blockade of CRF(1) or V(1b) receptors reverses stress-induced suppression of neurogenesis in a mouse model of depression." Mol Psychiatry **9**(3): 278-86, 224.

Altamura, C. A., M. C. Mauri, et al. (1993). "Plasma and platelet excitatory amino acids in psychiatric disorders." Am J Psychiatry **150**(11): 1731-3.

Altshuler, L. L., O. A. Abulseoud, et al. (2010). "Amygdala astrocyte reduction in subjects with major depressive disorder but not bipolar disorder." Bipolar Disord **12**(5): 541-9.

Alttoa, A., P. Seeman, et al. (2009). "Rats with persistently high exploratory activity have both higher extracellular dopamine levels and higher proportion of D(2) (High) receptors in the striatum." Synapse **63**(5): 443-6.

Amaral, D. G. and M. P. Witter (1989). "The three-dimensional organization of the hippocampal formation: a review of anatomical data." Neuroscience **31**(3): 571-91.

Amat, J., P. Matus-Amat, et al. (1998). "Escapable and inescapable stress differentially alter extracellular levels of 5-HT in the basolateral amygdala of the rat." Brain Res **812**(1-2): 113-20.

Amat, J., P. Matus-Amat, et al. (1998). "Escapable and inescapable stress differentially and selectively alter extracellular levels of 5-HT in the ventral hippocampus and dorsal periaqueductal gray of the rat." Brain Res **797**(1): 12-22.

Amemiya, C. T., N. R. Saha, et al. (2007). "Evolution and development of immunological structures in the lamprey." Curr Opin Immunol **19**(5): 535-41.

American Psychiatric Association (1994). Diagnostic and Statistical Manual of Mental Disorders, Fourth Edition. Washington DC, American Psychiatric Press.

Amin, A. H., T. B. Crawford, et al. (1954). "The distribution of substance P and 5-hydroxytryptamine in the central nervous system of the dog." J Physiol **126**(3): 596-618.

Amori, L., P. Guidetti, et al. (2009). "On the relationship between the two branches of the kynurenine pathway in the rat brain in vivo." J Neurochem **109**(2): 316-25.

Amori, L., H. Q. Wu, et al. (2009). "Specific inhibition of kynurenate synthesis enhances extracellular dopamine levels in the rodent striatum." Neuroscience **159**(1): 196-203.
Anden, N. E., A. Dahlstrom, et al. (1965). "Mapping out of catecholamine and 5-hydroxytryptamine neurons innervating the telencephalon and diencephalon." Life Sci **4**(13): 1275-9.
Anderson, C. M. and R. A. Swanson (2000). "Astrocyte glutamate transport: review of properties, regulation, and physiological functions." Glia **32**(1): 1-14.
Anderson, I. M., M. Parry-Billings, et al. (1990). "Decreased plasma tryptophan concentration in major depression: relationship to melancholia and weight loss." J Affect Disord **20**(3): 185-91.
Ando, T., R. F. Brown, et al. (2000). "Bacterial translocation can increase plasma corticosterone and brain catecholamine and indoleamine metabolism." Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol **279**(6): R2164-72.
Andre, C., J. C. O'Connor, et al. (2008). "Spatio-temporal differences in the profile of murine brain expression of proinflammatory cytokines and indoleamine 2,3-dioxygenase in response to peripheral lipopolysaccharide administration." J Neuroimmunol **200**(1-2): 90-9.
Anisman, H. (2009). "Cascading effects of stressors and inflammatory immune system activation: implications for major depressive disorder." J Psychiatry Neurosci **34**(1): 4-20.
Anisman, H., S. Hayley, et al. (2001). "Psychogenic, neurogenic, and systemic stressor effects on plasma corticosterone and behavior: mouse strain-dependent outcomes." Behav Neurosci **115**(2): 443-54.
Anisman, H., J. Irwin, et al. (1979). "Deficits of escape performance following catecholamine depletion: implications for behavioral deficits induced by uncontrollable stress." Psychopharmacology (Berl) **64**(2): 163-70.
Anisman, H. and Z. Merali (2003). "Cytokines, stress and depressive illness: brain-immune interactions." Ann Med **35**(1): 2-11.
Anisman, H., Z. Merali, et al. (2008). "Neurotransmitter, peptide and cytokine processes in relation to depressive disorder: comorbidity between depression and neurodegenerative disorders." Prog Neurobiol **85**(1): 1-74.
Anisman, H., A. V. Ravindran, et al. (1999). "Endocrine and cytokine correlates of major depression and dysthymia with typical or atypical features." Mol Psychiatry **4**(2): 182-8.
Asberg, M., L. Bertilsson, et al. (1984). "CSF monoamine metabolites in melancholia." Acta Psychiatr Scand **69**(3): 201-19.
Asberg, M., P. Thoren, et al. (1976). ""Serotonin depression"--a biochemical subgroup within the affective disorders?" Science **191**(4226): 478-80.
Ashcroft, G. W., D. Eccleston, et al. (1965). "5-hydroxyindole metabolism in rat brain. A study of intermediate metabolism using the technique of tryptophan loading. I. Methods." J Neurochem **12**(6): 483-92.
Ashcroft, G. W. and A. I. Glen (1974). "Mood and neuronal functions: a modified amine hypothesis for the etiology of affective illness." Adv Biochem Psychopharmacol **11**(0): 335-9.
Aso, E., A. Ozaita, et al. (2008). "BDNF impairment in the hippocampus is related to enhanced despair behavior in CB1 knockout mice." J Neurochem **105**(2): 565-72.
Atlan, H. (1998). La fin du "tout génétique"? Vers de nouveaux paradigmes en biologie.
Aubert, A. (2001). "Emotionality, cognition, and social status in house mice." Advances in ethology **36**(117).
Auer, D. P., B. Putz, et al. (2000). "Reduced glutamate in the anterior cingulate cortex in depression: an in vivo proton magnetic resonance spectroscopy study." Biol Psychiatry **47**(4): 305-13.
Avitsur, R., J. L. Stark, et al. (2002). "Social disruption-induced glucocorticoid resistance: kinetics and site specificity." J Neuroimmunol **124**(1-2): 54-61.
Avitsur, R., J. L. Stark, et al. (2002). "Social stress alters splenocyte phenotype and function." J Neuroimmunol **132**(1-2): 66-71.
Baban, B., P. R. Chandler, et al. (2009). "IDO activates regulatory T cells and blocks their conversion into Th17-like T cells." J Immunol **183**(4): 2475-83.
Babcock, T. A. and J. M. Carlin (2000). "Transcriptional activation of indoleamine dioxygenase by interleukin 1 and tumor necrosis factor alpha in interferon-treated epithelial cells." Cytokine **12**(6): 588-94.
Bach-Mizrachi, H., M. D. Underwood, et al. (2006). "Neuronal tryptophan hydroxylase mRNA expression in the human dorsal and median raphe nuclei: major depression and suicide." Neuropsychopharmacology **31**(4): 814-24.

Bach-Mizrachi, H., M. D. Underwood, et al. (2008). "Elevated expression of tryptophan hydroxylase-2 mRNA at the neuronal level in the dorsal and median raphe nuclei of depressed suicides." Mol Psychiatry **13**(5): 507-13, 465.

Badawy, A. A. (1977). "The functions and regulation of tryptophan pyrrolase." Life Sci **21**(6): 755-68.

Badawy, A. A. and M. Evans (1981). "Inhibition of rat liver tryptophan pyrrolase activity and elevation of brain tryptophan concentration by administration of antidepressants." Biochem Pharmacol **30**(11): 1211-6.

Badawy, A. A. and M. Evans (1982). "Inhibition of rat liver tryptophan pyrrolase activity and elevation of brain tryptophan concentration by acute administration of small doses of antidepressants." Br J Pharmacol **77**(1): 59-67.

Baldwin, D. and S. Rudge (1995). "The role of serotonin in depression and anxiety." Int Clin Psychopharmacol **9 Suppl 4**: 41-5.

Bals-Kubik, R., A. Ableitner, et al. (1993). "Neuroanatomical sites mediating the motivational effects of opioids as mapped by the conditioned place preference paradigm in rats." J Pharmacol Exp Ther **264**(1): 489-95.

Banks, W. A., L. Ortiz, et al. (1991). "Human interleukin (IL) 1 alpha, murine IL-1 alpha and murine IL-1 beta are transported from blood to brain in the mouse by a shared saturable mechanism." J Pharmacol Exp Ther **259**(3): 988-96.

Bano, S., C. J. Morgan, et al. (1999). "Inhibition of rat liver tryptophan pyrrolase activity by fluoxetine." Pak J Pharm Sci **12**(2): 11-6.

Bano, S. and M. A. Sherkheli (2003). "Inhibition of tryptophan - pyrrolase activity and elevation of brain tryptophan concentration by fluoxetine in rats." J Coll Physicians Surg Pak **13**(1): 5-10.

Bao, A. M., G. Meynen, et al. (2008). "The stress system in depression and neurodegeneration: focus on the human hypothalamus." Brain Res Rev **57**(2): 531-53.

Bar, K. J., W. Greiner, et al. (2004). "The influence of major depression and its treatment on heart rate variability and pupillary light reflex parameters." J Affect Disord **82**(2): 245-52.

Baran, H., K. Jellinger, et al. (1999). "Kynurenine metabolism in Alzheimer's disease." J Neural Transm **106**(2): 165-81.

Baratte, S., A. Molinari, et al. (1998). "Temporal and spatial changes of quinolinic acid immunoreactivity in the gerbil hippocampus following transient cerebral ischemia." Brain Res Mol Brain Res **59**(1): 50-7.

Barberis, C., B. Mouillac, et al. (1998). "Structural bases of vasopressin/oxytocin receptor function." J Endocrinol **156**(2): 223-9.

Barden, N. (1996). "Modulation of glucocorticoid receptor gene expression by antidepressant drugs." Pharmacopsychiatry **29**(1): 12-22.

Barden, N. (2004). "Implication of the hypothalamic-pituitary-adrenal axis in the physiopathology of depression." J Psychiatry Neurosci **29**(3): 185-93.

Barefoot, J. C. and M. Schroll (1996). "Symptoms of depression, acute myocardial infarction, and total mortality in a community sample." Circulation **93**(11): 1976-80.

Barker, D. J., P. D. Gluckman, et al. (1993). "Fetal nutrition and cardiovascular disease in adult life." Lancet **341**(8850): 938-41.

Barkus, C., S. B. McHugh, et al. (2009). "Hippocampal NMDA receptors and anxiety: At the interface between cognition and emotion." Eur J Pharmacol.

Barnard, C. J., J. M. Behnke, et al. (1998). "Maternal effects on the development of social rank and immunity trade-offs in male laboratory mice (Mus musculus)." Proc Biol Sci **265**(1410): 2087-93.

Barnard, C. J. and N. Luo (2002). "Acquisition of dominance status affects maze learning in mice." Behav Processes **60**(1): 53-59.

Barnes, R. F., R. C. Veith, et al. (1983). "High levels of plasma catecholamines in dexamethasone-resistant depressed patients." Am J Psychiatry **140**(12): 1623-5.

Bartolomucci, A., V. Carola, et al. (2010). "Increased vulnerability to psychosocial stress in heterozygous serotonin transporter knockout mice." Dis Model Mech.

Bauer, M. E., P. Perks, et al. (2001). "Restraint stress is associated with changes in glucocorticoid immunoregulation." Physiol Behav **73**(4): 525-32.

Beadle, G. W., H. K. Mitchell, et al. (1947). "Kynurenine as an Intermediate in the Formation of Nicotinic Acid from Tryptophane by Neurospora." Proc Natl Acad Sci U S A **33**(6): 155-8.

Behan, W. M., M. McDonald, et al. (1999). "Oxidative stress as a mechanism for quinolinic acid-induced hippocampal damage: protection by melatonin and deprenyl." Br J Pharmacol **128**(8): 1754-60.

Bell, C., J. Abrams, et al. (2001). "Tryptophan depletion and its implications for psychiatry." Br J Psychiatry **178**: 399-405.
Belmaker, R. H. and G. Agam (2008). "Major depressive disorder." N Engl J Med **358**(1): 55-68.
Belzung, C. and A. Surget (2008). Unpredictable chronic mild stress in mice. Experimental models in neurobehavioral research. A. Kalueff and J. LaPorte. New York, Nova Science**:** 79-112.
Belzung, C. and A. Surget (2008). Unpredictable chronic mild stress in mice. Experimental Models in Neurobehavioral Research. A. V. Kalueff. and J. L. Laporte. New York, Nova Science.
Belzung, C. and A. Surget (*In press.*). Unpredictable chronic mild stress in mice. Experimental models in neurobehavioral research. K. AV. and L. JL. New York, Nova Science.
Bennett, A. J., K. P. Lesch, et al. (2002). "Early experience and serotonin transporter gene variation interact to influence primate CNS function." Mol Psychiatry **7**(1): 118-22.
Benus, R. F., B. Bohus, et al. (1991). "Heritable variation for aggression as a reflection of individual coping strategies." Experientia **47**(10): 1008-19.
Berczi, I., L. Bertok, et al. (2000). "Natural immunity and neuroimmune host defense." Ann N Y Acad Sci **917**: 248-57.
Berk, M., A. A. Wadee, et al. (1997). "Acute phase proteins in major depression." J Psychosom Res **43**(5): 529-34.
Berman, R. M., A. Cappiello, et al. (2000). "Antidepressant effects of ketamine in depressed patients." Biol Psychiatry **47**(4): 351-4.
Berton, O., C. A. McClung, et al. (2006). "Essential role of BDNF in the mesolimbic dopamine pathway in social defeat stress." Science **311**(5762): 864-8.
Bessa, J. M., D. Ferreira, et al. (2009). "The mood-improving actions of antidepressants do not depend on neurogenesis but are associated with neuronal remodeling." Mol Psychiatry **14**(8): 764-73, 739.
Beutelspacher, S. C., P. H. Tan, et al. (2006). "Expression of indoleamine 2,3-dioxygenase (IDO) by endothelial cells: implications for the control of alloresponses." Am J Transplant **6**(6): 1320-30.
Beyer, C. E., Q. Lin, et al. (2009). "Preclinical characterization of WAY-211612: a dual 5-HT uptake inhibitor and 5-HT (1A) receptor antagonist and potential novel antidepressant." Br J Pharmacol **157**(2): 307-19.
Bhagwagar, Z., S. Hafizi, et al. (2003). "Increase in concentration of waking salivary cortisol in recovered patients with depression." Am J Psychiatry **160**(10): 1890-1.
Bhagwagar, Z., M. Wylezinska, et al. (2007). "Reduction in occipital cortex gamma-aminobutyric acid concentrations in medication-free recovered unipolar depressed and bipolar subjects." Biol Psychiatry **61**(6): 806-12.
Bhatnagar, S., C. Vining, et al. (2004). "Regulation of chronic stress-induced changes in hypothalamic-pituitary-adrenal activity by the basolateral amygdala." Ann N Y Acad Sci **1032**: 315-9.
Biala, G., M. Kruk, et al. (2009). "Effects of the cannabinoid receptor ligands on anxiety-related effects of d-amphetamine and nicotine in the mouse elevated plus maze test." J Physiol Pharmacol **60**(2): 113-22.
Bickerdike, M. J., I. K. Wright, et al. (1993). "Social isolation attenuates rat forebrain 5-HT release induced by KCI stimulation and exposure to a novel environment." Behav Pharmacol **4**(3): 231-236.
Bierhaus, A., J. Wolf, et al. (2003). "A mechanism converting psychosocial stress into mononuclear cell activation." Proc Natl Acad Sci U S A **100**(4): 1920-5.
Birkmayer, W. and P. Riederer (1975). "Biochemical post-mortem findings in depressed patients." J Neural Transm **37**(2): 95-109.
Blanchard, R. J., K. J. Flannelly, et al. (1988). "Life-span studies of dominance and aggression in established colonies of laboratory rats." Physiol Behav **43**(1): 1-7.
Bland, S. T., D. Hargrave, et al. (2003). "Stressor controllability modulates stress-induced dopamine and serotonin efflux and morphine-induced serotonin efflux in the medial prefrontal cortex." Neuropsychopharmacology **28**(9): 1589-96.
Blandina, P., G. Cherici, et al. (1995). "Release of glutamate from striatum of freely moving rats by pros-methylimidazoleacetic acid." J Neurochem **64**(2): 788-93.
Blasberg, R. and A. Lajtha (1966). "Heterogeneity of the mediated transport systems of amino acid uptake in brain." Brain Res **1**(1): 86-104.
Blier, P. and C. de Montigny (1980). "Effect of chronic tricylic antidepressant treatment on the serotoninergic autoreceptor: a microiontophoretic study in the rat." Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol **314**(2): 123-8.

Boadle-Biber, M. C. (1993). "Regulation of serotonin synthesis." Prog Biophys Mol Biol **60**(1): 1-15.
Boldrini, M., M. D. Underwood, et al. (2008). "Serotonin-1A autoreceptor binding in the dorsal raphe nucleus of depressed suicides." J Psychiatr Res **42**(6): 433-42.
Bonaccorso, S., V. Marino, et al. (2002). "Increased depressive ratings in patients with hepatitis C receiving interferon-alpha-based immunotherapy are related to interferon-alpha-induced changes in the serotonergic system." J Clin Psychopharmacol **22**(1): 86-90.
Bonaccorso, S., A. Puzella, et al. (2001). "Immunotherapy with interferon-alpha in patients affected by chronic hepatitis C induces an intercorrelated stimulation of the cytokine network and an increase in depressive and anxiety symptoms." Psychiatry Res **105**(1-2): 45-55.
Bordelon, Y. M., M. F. Chesselet, et al. (1997). "Energetic dysfunction in quinolinic acid-lesioned rat striatum." J Neurochem **69**(4): 1629-39.
Borland, L. M. and A. C. Michael (2004). "Voltammetric study of the control of striatal dopamine release by glutamate." J Neurochem **91**(1): 220-9.
Botting, N. P. (1995). "Chemistry and neurochemistry of the kynurenine pathway
of tryptophan metabolism." Chemical Society Reviews 401-412.
Bouayed, J., H. Rammal, et al. (2007). "Positive correlation between peripheral blood granulocyte oxidative status and level of anxiety in mice." Eur J Pharmacol **564**(1-3): 146-9.
Bowley, M. P., W. C. Drevets, et al. (2002). "Low glial numbers in the amygdala in major depressive disorder." Biol Psychiatry **52**(5): 404-12.
Boyce, S., D. Smith, et al. (2001). "Intra-amygdala injection of the substance P [NK(1) receptor] antagonist L-760735 inhibits neonatal vocalisations in guinea-pigs." Neuropharmacology **41**(1): 130-7.
Braidy, N., R. Grant, et al. (2009). "Mechanism for quinolinic acid cytotoxicity in human astrocytes and neurons." Neurotox Res **16**(1): 77-86.
Braidy, N., R. Grant, et al. (2010). "Neuroprotective effects of naturally occurring polyphenols on quinolinic acid-induced excitotoxicity in human neurons." FEBS J **277**(2): 368-82.
Breard, M., M. A. Sari, et al. (2007). "The endogenous neurotransmitter, serotonin, modifies neuronal nitric oxide synthase activities." Free Radic Res **41**(4): 413-23.
Bremner, J. D., M. Narayan, et al. (2000). "Hippocampal volume reduction in major depression." Am J Psychiatry **157**(1): 115-8.
Brody, A. L., S. Saxena, et al. (1999). "Brain metabolic changes in major depressive disorder from pre- to post-treatment with paroxetine." Psychiatry Res **91**(3): 127-39.
Broug-Holub, E., J. H. Persoons, et al. (1998). "Effects of stress on alveolar macrophages: a role for the sympathetic nervous system." Am J Respir Cell Mol Biol **19**(5): 842-8.
Brown, D. H., J. Sheridan, et al. (1993). "Regulation of mycobacterial growth by the hypothalamus-pituitary-adrenal axis: differential responses of Mycobacterium bovis BCG-resistant and -susceptible mice." Infect Immun **61**(11): 4793-800.
Burke, F., R. G. Knowles, et al. (1995). "The role of indoleamine 2,3-dioxygenase in the anti-tumour activity of human interferon-gamma in vivo." Int J Cancer **60**(1): 115-22.
Byrne, G. I., L. K. Lehmann, et al. (1986). "Induction of tryptophan degradation in vitro and in vivo: a gamma-interferon-stimulated activity." J Interferon Res **6**(4): 389-96.
Cabrera, J., R. J. Reiter, et al. (2000). "Melatonin reduces oxidative neurotoxicity due to quinolinic acid: in vitro and in vivo findings." Neuropharmacology **39**(3): 507-14.
Cairncross, K. D., B. Cox, et al. (1977). "Modification by anti-depressant drugs of plasma corticosterone levels in the stressed bulbectomized rat [proceedings]." Br J Pharmacol **61**(1): 144P.
Cairncross, K. D., A. Wren, et al. (1977). "Effects of olfactory bulbectomy and domicile on stress-induced corticosterone release in the rat." Physiol Behav **19**(4): 485-7.
Cameron, H. A. and E. Gould (1994). "Adult neurogenesis is regulated by adrenal steroids in the dentate gyrus." Neuroscience **61**(2): 203-9.
Cammer, W. (2001). "Oligodendrocyte killing by quinolinic acid in vitro." Brain Res **896**(1-2): 157-60.
Cammer, W. (2002). "Apoptosis of oligodendrocytes in secondary cultures from neonatal rat brains." Neurosci Lett **327**(2): 123-7.
Canli, T., K. Omura, et al. (2005). "Beyond affect: a role for genetic variation of the serotonin transporter in neural activation during a cognitive attention task." Proc Natl Acad Sci U S A **102**(34): 12224-9.
Cannon, W. (1953). Bodily changes in pain, fear, hunger and rage. Boston, McGrath.

Capuron, L. and A. Ravaud (1999). "Prediction of the depressive effects of interferon alfa therapy by the patient's initial affective state." N Engl J Med **340**(17): 1370.
Capuron, L., A. Ravaud, et al. (2002). "Association between decreased serum tryptophan concentrations and depressive symptoms in cancer patients undergoing cytokine therapy." Mol Psychiatry **7**(5): 468-73.
Carlezon, W. A., Jr., C. Beguin, et al. (2006). "Depressive-like effects of the kappa-opioid receptor agonist salvinorin A on behavior and neurochemistry in rats." J Pharmacol Exp Ther **316**(1): 440-7.
Carlin, J. M., E. C. Borden, et al. (1989). "Interferon-induced indoleamine 2,3-dioxygenase activity in human mononuclear phagocytes." J Leukoc Biol **45**(1): 29-34.
Carlson, P. J., J. B. Singh, et al. (2006). "Neural circuitry and neuroplasticity in mood disorders: insights for novel therapeutic targets." NeuroRx **3**(1): 22-41.
Carpenedo, R., A. Pittaluga, et al. (2001). "Presynaptic kynurenate-sensitive receptors inhibit glutamate release." Eur J Neurosci **13**(11): 2141-7.
Carpenter, L. L., G. M. Anderson, et al. (1998). "Tryptophan depletion during continuous CSF sampling in healthy human subjects." Neuropsychopharmacology **19**(1): 26-35.
Carr, L., A. Tucker, et al. (2003). "In vivo administration of L-dopa or dopamine decreases the number of splenic IFN gamma-producing cells." J Neuroimmunol **137**(1-2): 87-93.
Carroll, B. J., F. Cassidy, et al. (2007). "Pathophysiology of hypercortisolism in depression." Acta Psychiatr Scand Suppl(433): 90-103.
Casady, R. L. and A. N. Taylor (1976). "Effect of electrical stimulation of the hippocampus upon corticosteroid levels in the freely-behaving, non-stressed rat." Neuroendocrinology **20**(1): 68-78.
Cases, O., I. Seif, et al. (1995). "Aggressive behavior and altered amounts of brain serotonin and norepinephrine in mice lacking MAOA." Science **268**(5218): 1763-6.
Caspi, A., K. Sugden, et al. (2003). "Influence of life stress on depression: moderation by a polymorphism in the 5-HTT gene." Science **301**(5631): 386-9.
Celada, P., M. Puig, et al. (2004). "The therapeutic role of 5-HT1A and 5-HT2A receptors in depression." J Psychiatry Neurosci **29**(4): 252-65.
Ceresoli-Borroni, G., P. Guidetti, et al. (2007). "Perinatal kynurenine 3-hydroxylase inhibition in rodents: pathophysiological implications." J Neurosci Res **85**(4): 845-54.
Ceresoli-Borroni, G., P. Guidetti, et al. (1999). "Acute and chronic changes in kynurenate formation following an intrastriatal quinolinate injection in rats." J Neural Transm **106**(3-4): 229-42.
Champagne, F. A., D. D. Francis, et al. (2003). "Variations in maternal care in the rat as a mediating influence for the effects of environment on development." Physiol Behav **79**(3): 359-71.
Chao, C. C., S. Hu, et al. (1996). "Glia: the not so innocent bystanders." J Neurovirol **2**(4): 234-9.
Chaouloff, F. (1993). "Physiopharmacological interactions between stress hormones and central serotonergic systems." Brain Res Brain Res Rev **18**(1): 1-32.
Chaouloff, F., O. Berton, et al. (1999). "Serotonin and stress." Neuropsychopharmacology **21**(2 Suppl): 28S-32S.
Chaput, Y., C. de Montigny, et al. (1991). "Presynaptic and postsynaptic modifications of the serotonin system by long-term administration of antidepressant treatments. An in vivo electrophysiologic study in the rat." Neuropsychopharmacology **5**(4): 219-29.
Chen, B., D. Dowlatshahi, et al. (2001). "Increased hippocampal BDNF immunoreactivity in subjects treated with antidepressant medication." Biol Psychiatry **50**(4): 260-5.
Chen, N., T. Luo, et al. (1999). "Subtype-specific enhancement of NMDA receptor currents by mutant huntingtin." J Neurochem **72**(5): 1890-8.
Cheng, G. J., J. L. Morrow-Tesch, et al. (1990). "Immunosuppression in mice induced by cold water stress." Brain Behav Immun **4**(4): 278-91.
Chiarugi, A., M. Calvani, et al. (2001). "Synthesis and release of neurotoxic kynurenine metabolites by human monocyte-derived macrophages." J Neuroimmunol **120**(1-2): 190-8.
Chiarugi, A., R. Carpenedo, et al. (1996). "Kynurenine disposition in blood and brain of mice: effects of selective inhibitors of kynurenine hydroxylase and of kynureninase." J Neurochem **67**(2): 692-8.
Chiarugi, A., E. Meli, et al. (2001). "Similarities and differences in the neuronal death processes activated by 3OH-kynurenine and quinolinic acid." J Neurochem **77**(5): 1310-8.
Choi, D. W., J. Y. Koh, et al. (1988). "Pharmacology of glutamate neurotoxicity in cortical cell culture: attenuation by NMDA antagonists." J Neurosci **8**(1): 185-96.

Chon, S. Y., H. H. Hassanain, et al. (1995). "Involvement of two regulatory elements in interferon-gamma-regulated expression of human indoleamine 2,3-dioxygenase gene." J Interferon Cytokine Res **15**(6): 517-26.
Choudary, P. V., M. Molnar, et al. (2005). "Altered cortical glutamatergic and GABAergic signal transmission with glial involvement in depression." Proc Natl Acad Sci U S A **102**(43): 15653-8.
Chourbaji, S., N. Pfeiffer, et al. (2010). "The suitability of 129SvEv mice for studying depressive-like behaviour: both males and females develop learned helplessness." Behav Brain Res.
Chourbaji, S., C. Zacher, et al. (2005). "Learned helplessness: validity and reliability of depressive-like states in mice." Brain Res Brain Res Protoc **16**(1-3): 70-8.
Coffey, C. E., W. E. Wilkinson, et al. (1993). "Quantitative cerebral anatomy in depression. A controlled magnetic resonance imaging study." Arch Gen Psychiatry **50**(1): 7-16.
Collingridge, G. L. and R. A. Lester (1989). "Excitatory amino acid receptors in the vertebrate central nervous system." Pharmacol Rev **41**(2): 143-210.
Comings, D. E., D. Muhleman, et al. (1995). "Sequence of human tryptophan 2,3-dioxygenase (TDO2): presence of a glucocorticoid response-like element composed of a GTT repeat and an intronic CCCCT repeat." Genomics **29**(2): 390-6.
Connick, J., G. Lombardi, et al. (1988). "Decrease in rat cerebral quinolinic acid concentration following chronic hydrocortisone treatment." Neurosci Lett **88**(2): 216-20.
Connick, J. H. and T. W. Stone (1988). "Quinolinic acid effects on amino acid release from the rat cerebral cortex in vitro and in vivo." Br J Pharmacol **93**(4): 868-76.
Connor, T. J., N. Starr, et al. (2008). "Induction of indolamine 2,3-dioxygenase and kynurenine 3-monooxygenase in rat brain following a systemic inflammatory challenge: a role for IFN-gamma?" Neurosci Lett **441**(1): 29-34.
Consoli, S. M. (1993). "[Stress and the cardiovascular system]." Encephale **19 Spec No 1**: 163-70.
Coppen, A., E. G. Eccleston, et al. (1973). "Total and free tryptophan concentration in the plasma of depressive patients." Lancet **2**(7820): 60-3.
Cortese, B. M., T. R. Mitchell, et al. (2010). "Region-specific alteration in brain glutamate: Possible relationship to risk-taking behavior." Physiol Behav **99**(4): 445-450.
Cortese, B. M. and K. L. Phan (2005). "The role of glutamate in anxiety and related disorders." CNS Spectr **10**(10): 820-30.
Costa, E., S. Garattini, et al. (1960). "Interactions between reserpine, chlorpromazine, and imipramine." Experientia **16**: 461-3.
Cowen, P. J., M. Parry-Billings, et al. (1989). "Decreased plasma tryptophan levels in major depression." J Affect Disord **16**(1): 27-31.
Cozzi, A., S. Attucci, et al. (1997). "Type 2 metabotropic glutamate (mGlu) receptors tonically inhibit transmitter release in rat caudate nucleus: in vivo studies with (2S,1'S,2'S,3'R)-2-(2'-carboxy-3'-phenylcyclopropyl)glycine, a new potent and selective antagonist." Eur J Neurosci **9**(7): 1350-5.
Cryan, J. F. and C. Mombereau (2004). "In search of a depressed mouse: utility of models for studying depression-related behavior in genetically modified mice." Mol Psychiatry **9**(4): 326-57.
Cryan, J. F. and O. F. O'Leary (2010). "Neuroscience. A glutamate pathway to faster-acting antidepressants?" Science **329**(5994): 913-4.
Cullinan, W. E., J. P. Herman, et al. (1995). "Pattern and time course of immediate early gene expression in rat brain following acute stress." Neuroscience **64**(2): 477-505.
Cullinan, W. E., J. P. Herman, et al. (1993). "Ventral subicular interaction with the hypothalamic paraventricular nucleus: evidence for a relay in the bed nucleus of the stria terminalis." J Comp Neurol **332**(1): 1-20.
Cunningham, E. T., Jr. and E. B. De Souza (1993). "Interleukin 1 receptors in the brain and endocrine tissues." Immunol Today **14**(4): 171-6.
Curtin, F. and P. Schulz (1998). "Multiple correlations and Bonferroni's correction." Biol Psychiatry **44**(8): 775-7.
Curzon, G. (1979). "Relationships between plasma, CSF and brain tryptophan." J Neural Transm Suppl(15): 81-92.
Curzon, G. and P. K. Bridges (1970). "Tryptophan metabolism in depression." J Neurol Neurosurg Psychiatry **33**(5): 698-704.
Czeh, B., T. Michaelis, et al. (2001). "Stress-induced changes in cerebral metabolites, hippocampal volume, and cell proliferation are prevented by antidepressant treatment with tianeptine." Proc Natl Acad Sci U S A **98**(22): 12796-801.

D'Haenen, H., A. Bossuyt, et al. (1992). "SPECT imaging of serotonin2 receptors in depression." Psychiatry Res **45**(4): 227-37.
Dahlstroem, A. and K. Fuxe (1964). "A Method for the Demonstration of Monoamine-Containing Nerve Fibres in the Central Nervous System." Acta Physiol Scand **60**: 293-4.
Danesch, U., B. Gloss, et al. (1987). "Glucocorticoid induction of the rat tryptophan oxygenase gene is mediated by two widely separated glucocorticoid-responsive elements." EMBO J **6**(3): 625-30.
Dantzer, R., J. C. O'Connor, et al. (2008). "From inflammation to sickness and depression: when the immune system subjugates the brain." Nat Rev Neurosci **9**(1): 46-56.
David, D. J., B. A. Samuels, et al. (2009). "Neurogenesis-dependent and -independent effects of fluoxetine in an animal model of anxiety/depression." Neuron **62**(4): 479-93.
Davis, M. (1992). "The role of the amygdala in fear and anxiety." Annu Rev Neurosci **15**: 353-75.
Dayas, C. V., K. M. Buller, et al. (1999). "Neuroendocrine responses to an emotional stressor: evidence for involvement of the medial but not the central amygdala." Eur J Neurosci **11**(7): 2312-22.
de Araujo, I. E., A. J. Oliveira-Maia, et al. (2008). "Food reward in the absence of taste receptor signaling." Neuron **57**(6): 930-41.
De Boer, S. F., J. L. Slangen, et al. (1988). "Adaptation of plasma catecholamine and corticosterone responses to short-term repeated noise stress in rats." Physiol Behav **44**(2): 273-80.
de Kloet, E. R., M. Joels, et al. (2005). "Stress and the brain: from adaptation to disease." Nat Rev Neurosci **6**(6): 463-75.
de Kloet, E. R., J. M. Reul, et al. (1990). "Corticosteroids and the brain." J Steroid Biochem Mol Biol **37**(3): 387-94.
Deak, T., J. L. Meriwether, et al. (1997). "Evidence that brief stress may induce the acute phase response in rats." Am J Physiol **273**(6 Pt 2): R1998-2004.
Delaney, H. D. and A. Vargha (2002). "Comparing several robust tests of stochastic equality with ordinally scaled variables and small to moderate sized samples." Psychol Methods **7**(4): 485-503.
Delgado, P. L., D. S. Charney, et al. (1989). "Neuroendocrine and behavioral effects of dietary tryptophan restriction in healthy subjects." Life Sci **45**(24): 2323-32.
Demyttenaere, K. and J. De Fruyt (2003). "Getting what you ask for: on the selectivity of depression rating scales." Psychother Psychosom **72**(2): 61-70.
DeRijk, R. H., J. Petrides, et al. (1996). "Changes in corticosteroid sensitivity of peripheral blood lymphocytes after strenuous exercise in humans." J Clin Endocrinol Metab **81**(1): 228-35.
Detanico, B. C., A. L. Piato, et al. (2009). "Antidepressant-like effects of melatonin in the mouse chronic mild stress model." Eur J Pharmacol **607**(1-3): 121-5.
Detke, M. J., M. Rickels, et al. (1995). "Active behaviors in the rat forced swimming test differentially produced by serotonergic and noradrenergic antidepressants." Psychopharmacology (Berl) **121**(1): 66-72.
Dhabhar, F. S. (1998). "Stress-induced enhancement of cell-mediated immunity." Ann N Y Acad Sci **840**: 359-72.
Dhabhar, F. S. and B. S. McEwen (1996). "Stress-induced enhancement of antigen-specific cell-mediated immunity." J Immunol **156**(7): 2608-15.
Dhabhar, F. S. and B. S. McEwen (1999). "Enhancing versus suppressive effects of stress hormones on skin immune function." Proc Natl Acad Sci U S A **96**(3): 1059-64.
Dhabhar, F. S., A. H. Miller, et al. (1995). "Effects of stress on immune cell distribution. Dynamics and hormonal mechanisms." J Immunol **154**(10): 5511-27.
Dhabhar, F. S., A. R. Satoskar, et al. (2000). "Stress-induced enhancement of skin immune function: A role for gamma interferon." Proc Natl Acad Sci U S A **97**(6): 2846-51.
Dhaenen, H. (2001). "Imaging the serotonergic system in depression." Eur Arch Psychiatry Clin Neurosci **251 Suppl 2**: II76-80.
Dinan, T., L. Siggins, et al. (2009). "Investigating the inflammatory phenotype of major depression: Focus on cytokines and polyunsaturated fatty acids." J Psychiatr Res **43**(4): 471-476.
Dinan, T. G., E. Lavelle, et al. (1999). "Desmopressin normalizes the blunted adrenocorticotropin response to corticotropin-releasing hormone in melancholic depression: evidence of enhanced vasopressinergic responsivity." J Clin Endocrinol Metab **84**(6): 2238-40.
Diorio, D., V. Viau, et al. (1993). "The role of the medial prefrontal cortex (cingulate gyrus) in the regulation of hypothalamic-pituitary-adrenal responses to stress." J Neurosci **13**(9): 3839-47.
Ditzen, C., A. M. Jastorff, et al. (2006). "Protein biomarkers in a mouse model of extremes in trait anxiety." Mol Cell Proteomics **5**(10): 1914-20.

Dong, H. W., G. D. Petrovich, et al. (2001). "Topography of projections from amygdala to bed nuclei of the stria terminalis." Brain Res Brain Res Rev **38**(1-2): 192-246.
Drago, J., P. Padungchaichot, et al. (1998). "Dopamine receptors and dopamine transporter in brain function and addictive behaviors: insights from targeted mouse mutants." Dev Neurosci **20**(2-3): 188-203.
Drenth, J. P., S. H. Van Uum, et al. (1995). "Endurance run increases circulating IL-6 and IL-1ra but downregulates ex vivo TNF-alpha and IL-1 beta production." J Appl Physiol **79**(5): 1497-503.
Drevets, W. C. (1999). "Prefrontal cortical-amygdalar metabolism in major depression." Ann N Y Acad Sci **877**: 614-37.
Drevets, W. C. (2000). "Neuroimaging studies of mood disorders." Biol Psychiatry **48**(8): 813-29.
Drevets, W. C., E. Frank, et al. (2000). "Serotonin type-1A receptor imaging in depression." Nucl Med Biol **27**(5): 499-507.
Drevets, W. C., J. L. Price, et al. (2008). "Brain structural and functional abnormalities in mood disorders: implications for neurocircuitry models of depression." Brain Struct Funct **213**(1-2): 93-118.
Drevets, W. C. and M. E. Raichle (1992). "Neuroanatomical circuits in depression: implications for treatment mechanisms." Psychopharmacol Bull **28**(3): 261-74.
Drevets, W. C., M. E. Thase, et al. (2007). "Serotonin-1A receptor imaging in recurrent depression: replication and literature review." Nucl Med Biol **34**(7): 865-77.
Drewes, L. R., W. P. Conway, et al. (1977). "Blood-brain amino acid transport and content during anoxia and reoxygenation." Am J Physiol **233**(4): E326-30.
Drews, C. (1993). "The concept and definition of dominance in animal behaviour." Behavior **125**: 3-4.
Drude, S., J. Olfe, et al. (2009). "Modulation of HPA-axis responsiveness by laboratory stress or shipment of mice alters experimental data." Brain Behav Immun **23**(Supplement 2): S33-S34.
Ducottet, C., G. Griebel, et al. (2003). "Effects of the selective nonpeptide corticotropin-releasing factor receptor 1 antagonist antalarmin in the chronic mild stress model of depression in mice." Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry **27**(4): 625-31.
Duman, R. S. (2004). "Depression: a case of neuronal life and death?" Biol Psychiatry **56**(3): 140-5.
Dunn, A. J., A. H. Swiergiel, et al. (2005). "Cytokines as mediators of depression: what can we learn from animal studies?" Neurosci Biobehav Rev **29**(4-5): 891-909.
Dunn, J. D. and J. Whitener (1986). "Plasma corticosterone responses to electrical stimulation of the amygdaloid complex: cytoarchitectural specificity." Neuroendocrinology **42**(3): 211-7.
Dupont, R. M., T. L. Jernigan, et al. (1995). "Magnetic resonance imaging and mood disorders. Localization of white matter and other subcortical abnormalities." Arch Gen Psychiatry **52**(9): 747-55.
Dwivedi, Y., H. S. Rizavi, et al. (2003). "Altered gene expression of brain-derived neurotrophic factor and receptor tyrosine kinase B in postmortem brain of suicide subjects." Arch Gen Psychiatry **60**(8): 804-15.
Ebbesen, P., J. A. Villadsen, et al. (1991). "Effect of subordinance, lack of social hierarchy, and restricted feeding on murine survival and virus leukemia." Exp Gerontol **26**(5): 479-86.
Eisch, A. J., H. A. Cameron, et al. (2008). "Adult neurogenesis, mental health, and mental illness: hope or hype?" J Neurosci **28**(46): 11785-91.
Eison, A. S. and M. S. Eison (1994). "Serotonergic mechanisms in anxiety." Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry **18**(1): 47-62.
El-Mallakh, R. S. (2000). "An open study of methylphenidate in bipolar depression." Bipolar Disord **2**(1): 56-9.
Elenkov, I. J. and G. P. Chrousos (1999). "Stress Hormones, Th1/Th2 patterns, Pro/Anti-inflammatory Cytokines and Susceptibility to Disease." Trends Endocrinol Metab **10**(9): 359-368.
Elhwuegi, A. S. (2004). "Central monoamines and their role in major depression." Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry **28**(3): 435-51.
Elkis, H., L. Friedman, et al. (1996). "Increased prefrontal sulcal prominence in relatively young patients with unipolar major depression." Psychiatry Res **67**(2): 123-34.
Eller, T., V. Vasar, et al. (2008). "Pro-inflammatory cytokines and treatment response to escitalopram in major depressive disorder." Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry **32**(2): 445-50.
Ellinger, A. (1904). "Die entstehung der kynurensaure." Physiol. Chem **43**: 325-37.
Ely, D. L. and J. P. Henry (1978). "Neuroendocrine response patterns in dominant and subordinate mice." Horm Behav **10**(2): 156-69.

Eriksson, P. S., E. Perfilieva, et al. (1998). "Neurogenesis in the adult human hippocampus." Nat Med **4**(11): 1313-7.
Esler, M., G. Jennings, et al. (1988). "Assessment of human sympathetic nervous system activity from measurements of norepinephrine turnover." Hypertension **11**(1): 3-20.
Esler, M., J. Turbott, et al. (1982). "The peripheral kinetics of norepinephrine in depressive illness." Arch Gen Psychiatry **39**(3): 295-300.
Everly, G. (1985). Occupational health promotion. Occupational stress. G. Everly and R. Feldman. New York**:** 49-73.
Fava, M. and K. S. Kendler (2000). "Major depressive disorder." Neuron **28**(2): 335-41.
Febbraio, M. A. and B. K. Pedersen (2002). "Muscle-derived interleukin-6: mechanisms for activation and possible biological roles." FASEB J **16**(11): 1335-47.
Feksa, L. R., A. Latini, et al. (2008). "Tryptophan administration induces oxidative stress in brain cortex of rats." Metab Brain Dis **23**(2): 221-33.
Feksa, L. R., A. Latini, et al. (2006). "Promotion of oxidative stress by L-tryptophan in cerebral cortex of rats." Neurochem Int **49**(1): 87-93.
Feldman, S. and N. Conforti (1981). "Amygdalectomy Inhibits adrenocortical responses to somatosensory and olfactory stimulation." Neuroendocrinology **32**(6): 330-4.
Feldman, S., N. Conforti, et al. (1994). "Differential effect of amygdaloid lesions on CRF-41, ACTH and corticosterone responses following neural stimuli." Brain Res **658**(1-2): 21-6.
Fendler, K., G. Karmos, et al. (1961). "The effect of hippocampal lesion on pituitary-adrenal function." Acta Physiol Acad Sci Hung **20**: 293-7.
Fernstrom, J. D. (1983). "Role of precursor availability in control of monoamine biosynthesis in brain." Physiol Rev **63**(2): 484-546.
Fernstrom, J. D. and M. J. Hirsch (1977). "Brain serotonin synthesis: reduction in corn-malnourished rats." J Neurochem **28**(4): 877-9.
Fernstrom, J. D. and R. J. Wurtman (1971). "Brain serotonin content: increase following ingestion of carbohydrate diet." Science **174**(13): 1023-5.
Ferragud, A., A. Haro, et al. (2010). "Enhanced habit-based learning and decreased neurogenesis in the adult hippocampus in a murine model of chronic social stress." Behav Brain Res **210**(1): 134-9.
Feyissa, A. M., A. Chandran, et al. (2009). "Reduced levels of NR2A and NR2B subunits of NMDA receptor and PSD-95 in the prefrontal cortex in major depression." Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry **33**(1): 70-5.
Feyissa, A. M., W. L. Woolverton, et al. (2010). "Elevated level of metabotropic glutamate receptor 2/3 in the prefrontal cortex in major depression." Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry **34**(2): 279-83.
Figueiredo, H. F., B. L. Bodie, et al. (2003). "Stress integration after acute and chronic predator stress: differential activation of central stress circuitry and sensitization of the hypothalamo-pituitary-adrenocortical axis." Endocrinology **144**(12): 5249-58.
Figueiredo, H. F., A. Bruestle, et al. (2003). "The medial prefrontal cortex differentially regulates stress-induced c-fos expression in the forebrain depending on type of stressor." Eur J Neurosci **18**(8): 2357-64.
Filliol, D., S. Ghozland, et al. (2000). "Mice deficient for delta- and mu-opioid receptors exhibit opposing alterations of emotional responses." Nat Genet **25**(2): 195-200.
Fischette, C. T., B. R. Komisaruk, et al. (1980). "Differential fornix ablations and the circadian rhythmicity of adrenal corticosteroid secretion." Brain Res **195**(2): 373-87.
Fitzgerald, P., M. Cassidy Eugene, et al. (2008). "Tryptophan catabolism in females with irritable bowel syndrome: relationship to interferon-gamma, severity of symptoms and psychiatric co-morbidity." Neurogastroenterol Motil **20**(12): 1291-7.
Fleshner, M., L. E. Goehler, et al. (1995). "Interleukin-1 beta induced corticosterone elevation and hypothalamic NE depletion is vagally mediated." Brain Res Bull **37**(6): 605-10.
Flint, M. S., J. M. Valosen, et al. (2001). "Restraint stress applied prior to chemical sensitization modulates the development of allergic contact dermatitis differently than restraint prior to challenge." J Neuroimmunol **113**(1): 72-80.
Floresco, S. B., C. L. Todd, et al. (2001). "Glutamatergic afferents from the hippocampus to the nucleus accumbens regulate activity of ventral tegmental area dopamine neurons." J Neurosci **21**(13): 4915-22.

Fontana, A., E. Weber, et al. (1984). "Synthesis of interleukin 1/endogenous pyrogen in the brain of endotoxin-treated mice: a step in fever induction?" J Immunol **133**(4): 1696-8.
Forget, A., E. Skamene, et al. (1981). "Differences in response among inbred mouse strains to infection with small doses of Mycobacterium bovis BCG." Infect Immun **32**(1): 42-7.
Forrest, C. M., G. M. Mackay, et al. (2004). "Tryptophan loading induces oxidative stress." Free Radic Res **38**(11): 1167-71.
Forrest, C. M., G. M. Mackay, et al. "Blood levels of kynurenines, interleukin-23 and soluble human leucocyte antigen-G at different stages of Huntington's disease." J Neurochem **112**(1): 112-22.
Foster, J. A. and G. MacQueen (2008). "Neurobiological factors linking personality traits and major depression." Can J Psychiatry **53**(1): 6-13.
Fraguas, R., D. V. Iosifescu, et al. (2007). "Major depressive disorder with anger attacks and cardiovascular risk factors." Int J Psychiatry Med **37**(1): 99-111.
Francesconi, R. P., A. E. Boyd, 3rd, et al. (1972). "Human tryptophan and tyrosine metabolism: effects of acute exposure to cold stress." J Appl Physiol **33**(2): 165-9.
Frank, E., D. J. Kupfer, et al. (1990). "Three-year outcomes for maintenance therapies in recurrent depression." Arch Gen Psychiatry **47**(12): 1093-9.
Frank, E. and M. E. Thase (1999). "Natural history and preventative treatment of recurrent mood disorders." Annu Rev Med **50**: 453-68.
Friberg, M., R. Jennings, et al. (2002). "Indoleamine 2,3-dioxygenase contributes to tumor cell evasion of T cell-mediated rejection." Int J Cancer **101**(2): 151-5.
Fride, E. and M. Weinstock (1984). "The effects of prenatal exposure to predictable or unpredictable stress on early development in the rat." Dev Psychobiol **17**(6): 651-60.
Frodl, T., E. M. Meisenzahl, et al. (2004). "Hippocampal and amygdala changes in patients with major depressive disorder and healthy controls during a 1-year follow-up." J Clin Psychiatry **65**(4): 492-9.
Froger, N., A. M. Gardier, et al. (2001). "5-hydroxytryptamine (5-HT)1A autoreceptor adaptive changes in substance P (neurokinin 1) receptor knock-out mice mimic antidepressant-induced desensitization." J Neurosci **21**(20): 8188-97.
Frommberger, U. H., J. Bauer, et al. (1997). "Interleukin-6-(IL-6) plasma levels in depression and schizophrenia: comparison between the acute state and after remission." Eur Arch Psychiatry Clin Neurosci **247**(4): 228-33.
Frost, R. A., G. J. Nystrom, et al. (2002). "Lipopolysaccharide regulates proinflammatory cytokine expression in mouse myoblasts and skeletal muscle." Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol **283**(3): R698-709.
Fuchs, E. and G. Flugge (2002). "Social stress in tree shrews: effects on physiology, brain function, and behavior of subordinate individuals." Pharmacol Biochem Behav **73**(1): 247-58.
Fujigaki, S., K. Saito, et al. (2001). "Lipopolysaccharide induction of indoleamine 2,3-dioxygenase is mediated dominantly by an IFN-gamma-independent mechanism." Eur J Immunol **31**(8): 2313-8.
Fujigaki, S., K. Saito, et al. (1998). "Species differences in L-tryptophan-kynurenine pathway metabolism: quantification of anthranilic acid and its related enzymes." Arch Biochem Biophys **358**(2): 329-35.
Fukui, S., R. Schwarcz, et al. (1991). "Blood-brain barrier transport of kynurenines: implications for brain synthesis and metabolism." J Neurochem **56**(6): 2007-17.
Furay, A. R., A. E. Bruestle, et al. (2008). "The role of the forebrain glucocorticoid receptor in acute and chronic stress." Endocrinology **149**(11): 5482-90.
Fuxe, K. (1965). "Evidence for the Existence of Monoamine Neurons in the Central Nervous System. Iv. Distribution of Monoamine Nerve Terminals in the Central Nervous System." Acta Physiol Scand Suppl: SUPPL 247:37+.
Gabbay, V., D. A. Hess, et al. (2007). "Lateralized caudate metabolic abnormalities in adolescent major depressive disorder: a proton MR spectroscopy study." Am J Psychiatry **164**(12): 1881-9.
Gabbay, V., R. G. Klein, et al. (2009). "Immune system dysregulation in adolescent major depressive disorder." J Affect Disord **115**(1-2): 177-82.
Gabbay, V., L. Liebes, et al. "The kynurenine pathway in adolescent depression: preliminary findings from a proton MR spectroscopy study." Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry **34**(1): 37-44.
Gainetdinov, R. R., W. C. Wetsel, et al. (1999). "Role of serotonin in the paradoxical calming effect of psychostimulants on hyperactivity." Science **283**(5400): 397-401.

Gal, E. M. and A. D. Sherman (1980). "L-kynurenine: its synthesis and possible regulatory function in brain." Neurochem Res **5**(3): 223-39.
Gallagher, B. B., H. F. Flanigin, et al. (1987). "The effect of electrical stimulation of medial temporal lobe structures in epileptic patients upon ACTH, prolactin, and growth hormone." Neurology **37**(2): 299-303.
Garcia, A. M., F. P. Cardenas, et al. (2005). "Effect of different illumination levels on rat behavior in the elevated plus-maze." Physiol Behav **85**(3): 265-70.
Gass, P., H. M. Reichardt, et al. (2001). "Mice with targeted mutations of glucocorticoid and mineralocorticoid receptors: models for depression and anxiety?" Physiol Behav **73**(5): 811-25.
Gilbertson, M. W., M. E. Shenton, et al. (2002). "Smaller hippocampal volume predicts pathologic vulnerability to psychological trauma." Nat Neurosci **5**(11): 1242-7.
Gillespie, C. F. and C. B. Nemeroff (2005). "Hypercortisolemia and depression." Psychosom Med **67 Suppl 1**: S26-8.
Gillman, P. K., J. R. Bartlett, et al. (1981). "Indolic substances in plasma, cerebrospinal fluid, and frontal cortex of human subjects infused with saline or tryptophan." J Neurochem **37**(2): 410-7.
Gispen-de Wied, C. C., H. G. Westenberg, et al. (1992). "Stimulation of the pituitary-adrenal axis with a low dose [Arg8]-vasopressin in depressed patients and healthy subjects." Eur Neuropsychopharmacol **2**(4): 411-9.
Gizatullin, R., G. Zaboli, et al. (2006). "Haplotype analysis reveals tryptophan hydroxylase (TPH) 1 gene variants associated with major depression." Biol Psychiatry **59**(4): 295-300.
Gizatullin, R., G. Zaboli, et al. (2008). "The tryptophan hydroxylase (TPH) 2 gene unlike TPH-1 exhibits no association with stress-induced depression." J Affect Disord **107**(1-3): 175-9.
Gold, P. W. and G. P. Chrousos (1999). "The endocrinology of melancholic and atypical depression: relation to neurocircuitry and somatic consequences." Proc Assoc Am Physicians **111**(1): 22-34.
Gold, P. W. and G. P. Chrousos (2002). "Organization of the stress system and its dysregulation in melancholic and atypical depression: high vs low CRH/NE states." Mol Psychiatry **7**(3): 254-75.
Gold, P. W., K. E. Gabry, et al. (2002). "Divergent endocrine abnormalities in melancholic and atypical depression: clinical and pathophysiologic implications." Endocrinol Metab Clin North Am **31**(1): 37-62, vi.
Gold, P. W., F. K. Goodwin, et al. (1988). "Clinical and biochemical manifestations of depression. Relation to the neurobiology of stress (1)." N Engl J Med **319**(6): 348-53.
Gold, P. W., F. K. Goodwin, et al. (1988). "Clinical and biochemical manifestations of depression. Relation to the neurobiology of stress (2)." N Engl J Med **319**(7): 413-20.
Gold, P. W., M. L. Wong, et al. (2005). "Cardiac implications of increased arterial entry and reversible 24-h central and peripheral norepinephrine levels in melancholia." Proc Natl Acad Sci U S A **102**(23): 8303-8.
Goldstein, L. E., M. C. Leopold, et al. (2000). "3-Hydroxykynurenine and 3-hydroxyanthranilic acid generate hydrogen peroxide and promote alpha-crystallin cross-linking by metal ion reduction." Biochemistry **39**(24): 7266-75.
Goodwin, F. K. and W. E. Bunney, Jr. (1971). "Depressions following reserpine: a reevaluation." Semin Psychiatry **3**(4): 435-48.
Gornikiewicz, A., T. Sautner, et al. (2000). "Catecholamines up-regulate lipopolysaccharide-induced IL-6 production in human microvascular endothelial cells." FASEB J **14**(9): 1093-100.
Goshen, I., T. Kreisel, et al. (2007). "Brain interleukin-1 mediates chronic stress-induced depression in mice via adrenocortical activation and hippocampal neurogenesis suppression." Mol Psychiatry.
Gosselin, R. D., S. Gibney, et al. (2009). "Region specific decrease in glial fibrillary acidic protein immunoreactivity in the brain of a rat model of depression." Neuroscience **159**(2): 915-25.
Gould, E., P. Tanapat, et al. (1998). "Proliferation of granule cell precursors in the dentate gyrus of adult monkeys is diminished by stress." Proc Natl Acad Sci U S A **95**(6): 3168-71.
Graeff, F. G. (1997). "Serotonergic systems." Psychiatr Clin North Am **20**(4): 723-39.
Grahame-Smith, D. G. (1964). "Tryptophan hydroxylation in brain." Biochem Biophys Res Commun **16**(6): 586-92.
Gramsbergen, J. B., P. S. Hodgkins, et al. (1997). "Brain-specific modulation of kynurenic acid synthesis in the rat." J Neurochem **69**(1): 290-8.
Greenberg, B. D., Q. Li, et al. (2000). "Association between the serotonin transporter promoter polymorphism and personality traits in a primarily female population sample." Am J Med Genet **96**(2): 202-16.

Griebel, G., C. Belzung, et al. (2000). "Differences in anxiety-related behaviours and in sensitivity to diazepam in inbred and outbred strains of mice." Psychopharmacology (Berl) **148**(2): 164-70.
Griebel, G., G. Perrault, et al. (1998). "Characterization of the behavioral profile of the non-peptide CRF receptor antagonist CP-154,526 in anxiety models in rodents. Comparison with diazepam and buspirone." Psychopharmacology (Berl) **138**(1): 55-66.
Griebel, G., J. Simiand, et al. (2002). "Anxiolytic- and antidepressant-like effects of the non-peptide vasopressin V1b receptor antagonist, SSR149415, suggest an innovative approach for the treatment of stress-related disorders." Proc Natl Acad Sci U S A **99**(9): 6370-5.
Griebel, G., J. Simiand, et al. (2002). "4-(2-Chloro-4-methoxy-5-methylphenyl)-N-[(1S)-2-cyclopropyl-1-(3-fluoro-4- methylphenyl)ethyl]5-methyl-N-(2-propynyl)-1, 3-thiazol-2-amine hydrochloride (SSR125543A), a potent and selective corticotrophin-releasing factor(1) receptor antagonist. II. Characterization in rodent models of stress-related disorders." J Pharmacol Exp Ther **301**(1): 333-45.
Griebel, G., J. Stemmelin, et al. (2005). "Effects of the cannabinoid CB1 receptor antagonist rimonabant in models of emotional reactivity in rodents." Biol Psychiatry **57**(3): 261-7.
Grimm, M. S., J. T. Emerman, et al. (1996). "Effects of social housing condition and behavior on growth of the Shionogi mouse mammary carcinoma." Physiol Behav **59**(4-5): 633-42.
Grippo, A. J., J. Francis, et al. (2005). "Neuroendocrine and cytokine profile of chronic mild stress-induced anhedonia." Physiol Behav **84**(5): 697-706.
Grissom, R. J. and J. J. Kim (2001). "Review of assumptions and problems in the appropriate conceptualization of effect size." Psychol Methods **6**(2): 135-46.
Guidetti, P., G. P. Bates, et al. (2006). "Elevated brain 3-hydroxykynurenine and quinolinate levels in Huntington disease mice." Neurobiol Dis **23**(1): 190-7.
Guidetti, P., R. E. Luthi-Carter, et al. (2004). "Neostriatal and cortical quinolinate levels are increased in early grade Huntington's disease." Neurobiol Dis **17**(3): 455-61.
Guidetti, P., E. Okuno, et al. (1997). "Characterization of rat brain kynurenine aminotransferases I and II." J Neurosci Res **50**(3): 457-65.
Guidetti, P., P. H. Reddy, et al. (2000). "Early kynurenergic impairment in Huntington's disease and in a transgenic animal model." Neurosci Lett **283**(3): 233-5.
Guidetti, P. and R. Schwarcz (1999). "3-Hydroxykynurenine potentiates quinolinate but not NMDA toxicity in the rat striatum." Eur J Neurosci **11**(11): 3857-63.
Guillemin, G. J., B. J. Brew, et al. (2005). "Indoleamine 2,3 dioxygenase and quinolinic acid immunoreactivity in Alzheimer's disease hippocampus." Neuropathol Appl Neurobiol **31**(4): 395-404.
Guillemin, G. J., S. J. Kerr, et al. (2005). "Involvement of quinolinic acid in AIDS dementia complex." Neurotox Res **7**(1-2): 103-23.
Guillemin, G. J., S. J. Kerr, et al. (2001). "Kynurenine pathway metabolism in human astrocytes: a paradox for neuronal protection." J Neurochem **78**(4): 842-53.
Guillemin, G. J., V. Meininger, et al. (2005). "Implications for the kynurenine pathway and quinolinic acid in amyotrophic lateral sclerosis." Neurodegener Dis **2**(3-4): 166-76.
Guillemin, G. J., D. G. Smith, et al. (2003). "Expression of the kynurenine pathway enzymes in human microglia and macrophages." Adv Exp Med Biol **527**: 105-12.
Guillemin, G. J., G. Smythe, et al. (2005). "Expression of indoleamine 2,3-dioxygenase and production of quinolinic acid by human microglia, astrocytes, and neurons." Glia **49**(1): 15-23.
Guinjoan, S. M., J. L. Bernabo, et al. (1995). "Cardiovascular tests of autonomic function and sympathetic skin responses in patients with major depression." J Neurol Neurosurg Psychiatry **59**(3): 299-302.
Gulaj, E., K. Pawlak, et al. "Kynurenine and its metabolites in Alzheimer's disease patients." Adv Med Sci: 1-8.
Haddjeri, N., P. Blier, et al. (1995). "Noradrenergic modulation of central serotonergic neurotransmission: acute and long-term actions of mirtazapine." Int Clin Psychopharmacol **10 Suppl 4**: 11-7.
Haddjeri, N., P. Blier, et al. (1998). "Acute and long-term actions of the antidepressant drug mirtazapine on central 5-HT neurotransmission." J Affect Disord **51**(3): 255-66.
Haddjeri, N., C. de Montigny, et al. (1999). "Modulation of the firing activity of rat serotonin and noradrenaline neurons by (+/-)pindolol." Biol Psychiatry **45**(9): 1163-9.
Haenisch, B., A. Bilkei-Gorzo, et al. (2009). "Knockout of the norepinephrine transporter and pharmacologically diverse antidepressants prevent behavioral and brain neurotrophin alterations in two chronic stress models of depression." J Neurochem **111**(2): 403-16.

Hamidi, M., W. C. Drevets, et al. (2004). "Glial reduction in amygdala in major depressive disorder is due to oligodendrocytes." Biol Psychiatry **55**(6): 563-9.
Handley, S. L. (1995). "5-Hydroxytryptamine pathways in anxiety and its treatment." Pharmacol Ther **66**(1): 103-48.
Hardisty, R. M. and R. S. Stacey (1955). "5-Hydroxytryptamine in normal human platelets." J Physiol **130**(3): 711-20.
Hartai, Z., A. Juhasz, et al. (2007). "Decreased serum and red blood cell kynurenic acid levels in Alzheimer's disease." Neurochem Int **50**(2): 308-13.
Hashimoto, K. (2009). "Emerging role of glutamate in the pathophysiology of major depressive disorder." Brain Res Rev.
Hashimoto, K., A. Sawa, et al. (2007). "Increased levels of glutamate in brains from patients with mood disorders." Biol Psychiatry **62**(11): 1310-6.
Hashimoto, M., T. Watanabe, et al. (2001). "Modulating effects of prenatal stress on hyperthermia induced in adult rat offspring by restraint or LPS-induced stress." Physiol Behav **73**(1-2): 125-32.
Hashimoto, S., T. Inoue, et al. (1999). "Effects of conditioned fear stress on serotonin neurotransmission and freezing behavior in rats." Eur J Pharmacol **378**(1): 23-30.
Hassanain, H. H., S. Y. Chon, et al. (1993). "Differential regulation of human indoleamine 2,3-dioxygenase gene expression by interferons-gamma and -alpha. Analysis of the regulatory region of the gene and identification of an interferon-gamma-inducible DNA-binding factor." J Biol Chem **268**(7): 5077-84.
Hata, T., H. Nishikawa, et al. (2001). "Anxiety-like behavior in elevated plus-maze tests in repeatedly cold-stressed mice." Jpn J Pharmacol **85**(2): 189-96.
Hata, T., H. Nishikawa, et al. (1999). "Depressive state with anxiety in repeated cold-stressed mice in forced swimming tests." Jpn J Pharmacol **79**(2): 243-9.
Hauser, P., J. Khosla, et al. (2002). "A prospective study of the incidence and open-label treatment of interferon-induced major depressive disorder in patients with hepatitis C." Mol Psychiatry **7**(9): 942-7.
Hayaishi, O. and M. Nozaki (1969). "Nature and mechanisms of oxygenases." Science **164**(878): 389-96.
Heim, C. and C. B. Nemeroff (1999). "The impact of early adverse experiences on brain systems involved in the pathophysiology of anxiety and affective disorders." Biol Psychiatry **46**(11): 1509-22.
Henn, F. A. and B. Vollmayr (2004). "Neurogenesis and depression: etiology or epiphenomenon?" Biol Psychiatry **56**(3): 146-50.
Herman, J. P. and W. E. Cullinan (1997). "Neurocircuitry of stress: central control of the hypothalamo-pituitary-adrenocortical axis." Trends Neurosci **20**(2): 78-84.
Herman, J. P., W. E. Cullinan, et al. (1995). "Contribution of the ventral subiculum to inhibitory regulation of the hypothalamo-pituitary-adrenocortical axis." J Neuroendocrinol **7**(6): 475-82.
Herman, J. P., C. M. Dolgas, et al. (1998). "Ventral subiculum regulates hypothalamo-pituitary-adrenocortical and behavioural responses to cognitive stressors." Neuroscience **86**(2): 449-59.
Herman, J. P., H. Figueiredo, et al. (2003). "Central mechanisms of stress integration: hierarchical circuitry controlling hypothalamo-pituitary-adrenocortical responsiveness." Front Neuroendocrinol **24**(3): 151-80.
Herman, J. P. and N. K. Mueller (2006). "Role of the ventral subiculum in stress integration." Behav Brain Res **174**(2): 215-24.
Herman, J. P., M. M. Ostrander, et al. (2005). "Limbic system mechanisms of stress regulation: hypothalamo-pituitary-adrenocortical axis." Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry **29**(8): 1201-13.
Herman, J. P., M. K. Schafer, et al. (1989). "Evidence for hippocampal regulation of neuroendocrine neurons of the hypothalamo-pituitary-adrenocortical axis." J Neurosci **9**(9): 3072-82.
Hestad, K. A., S. Tonseth, et al. (2003). "Raised plasma levels of tumor necrosis factor alpha in patients with depression: normalization during electroconvulsive therapy." J ECT **19**(4): 183-8.
Heuser, I. (1998). "Anna-Monika-Prize paper. The hypothalamic-pituitary-adrenal system in depression." Pharmacopsychiatry **31**(1): 10-3.
Heuser, I. J., U. Schweiger, et al. (1996). "Pituitary-adrenal-system regulation and psychopathology during amitriptyline treatment in elderly depressed patients and normal comparison subjects." Am J Psychiatry **153**(1): 93-9.
Heyes, M. P. (1996). "The kynurenine pathway and neurologic disease. Therapeutic strategies." Adv Exp Med Biol **398**: 125-9.

Heyes, M. P., C. L. Achim, et al. (1996). "Human microglia convert l-tryptophan into the neurotoxin quinolinic acid." Biochem J **320 (Pt 2)**: 595-7.
Heyes, M. P., B. Brew, et al. (1991). "Cerebrospinal fluid quinolinic acid concentrations are increased in acquired immune deficiency syndrome." Adv Exp Med Biol **294**: 687-90.
Heyes, M. P., B. J. Brew, et al. (1991). "Quinolinic acid in cerebrospinal fluid and serum in HIV-1 infection: relationship to clinical and neurological status." Ann Neurol **29**(2): 202-9.
Heyes, M. P., B. J. Brew, et al. (1992). "Inter-relationships between quinolinic acid, neuroactive kynurenines, neopterin and beta 2-microglobulin in cerebrospinal fluid and serum of HIV-1-infected patients." J Neuroimmunol **40**(1): 71-80.
Heyes, M. P., R. J. Ellis, et al. (2001). "Elevated cerebrospinal fluid quinolinic acid levels are associated with region-specific cerebral volume loss in HIV infection." Brain **124**(Pt 5): 1033-42.
Heyes, M. P. and S. P. Markey (1988). "Quantification of quinolinic acid in rat brain, whole blood, and plasma by gas chromatography and negative chemical ionization mass spectrometry: effects of systemic L-tryptophan administration on brain and blood quinolinic acid concentrations." Anal Biochem **174**(1): 349-59.
Heyes, M. P. and T. S. Nowak, Jr. (1990). "Delayed increases in regional brain quinolinic acid follow transient ischemia in the gerbil." J Cereb Blood Flow Metab **10**(5): 660-7.
Heyes, M. P., D. Rubinow, et al. (1989). "Cerebrospinal fluid quinolinic acid concentrations are increased in acquired immune deficiency syndrome." Ann Neurol **26**(2): 275-7.
Heyes, M. P., K. Saito, et al. (1992). "Quinolinic acid and kynurenine pathway metabolism in inflammatory and non-inflammatory neurological disease." Brain **115 (Pt 5)**: 1249-73.
Heyes, M. P., K. Saito, et al. (1998). "Sources of the neurotoxin quinolinic acid in the brain of HIV-1-infected patients and retrovirus-infected macaques." FASEB J **12**(10): 881-96.
Hickie, I., S. Naismith, et al. (2005). "Reduced hippocampal volumes and memory loss in patients with early- and late-onset depression." Br J Psychiatry **186**: 197-202.
Higuchi, K. and O. Hayaishi (1967). "Enzymic formation of D-kynurenine from D-tryptophan." Arch Biochem Biophys **120**(2): 397-403.
Hill, M. N. and B. B. Gorzalka (2005). "Is there a role for the endocannabinoid system in the etiology and treatment of melancholic depression?" Behav Pharmacol **16**(5-6): 333-52.
Hilmas, C., E. F. Pereira, et al. (2001). "The brain metabolite kynurenic acid inhibits alpha7 nicotinic receptor activity and increases non-alpha7 nicotinic receptor expression: physiopathological implications." J Neurosci **21**(19): 7463-73.
Hirata, F. and O. Hayaishi (1971). "Possible participation of superoxide anion in the intestinal tryptophan 2,3-dioxygenase reaction." J Biol Chem **246**(24): 7825-6.
Hitchcock, M. J. and E. Katz (1988). "Purification and characterization of tryptophan dioxygenase from Streptomyces parvulus." Arch Biochem Biophys **261**(1): 148-60.
Hoes, M. J. (1982). "Monoamines in Psychiatry: the role of serotonin in depression, anxiety and stress." Acta Psychiatr Belg **82**(3): 287-309.
Holick, K. A., D. C. Lee, et al. (2008). "Behavioral effects of chronic fluoxetine in BALB/cJ mice do not require adult hippocampal neurogenesis or the serotonin 1A receptor." Neuropsychopharmacology **33**(2): 406-17.
Holmans, P., M. M. Weissman, et al. (2007). "Genetics of recurrent early-onset major depression (GenRED): final genome scan report." Am J Psychiatry **164**(2): 248-58.
Holmes, A., M. Heilig, et al. (2003). "Neuropeptide systems as novel therapeutic targets for depression and anxiety disorders." Trends Pharmacol Sci **24**(11): 580-8.
Holsboer, F. (2000). "The corticosteroid receptor hypothesis of depression." Neuropsychopharmacology **23**(5): 477-501.
Holsboer, F. (2001). "Stress, hypercortisolism and corticosteroid receptors in depression: implications for therapy." J Affect Disord **62**(1-2): 77-91.
Holtzer, R., N. Scarmeas, et al. (2005). "Depressive symptoms in Alzheimer's disease: natural course and temporal relation to function and cognitive status." J Am Geriatr Soc **53**(12): 2083-9.
Hosoi, J., T. Tsuchiya, et al. (1998). "Modification of LC phenotype and suppression of contact hypersensitivity response by stress." J Cutan Med Surg **3**(2): 79-84.
Hovatta, I., R. S. Tennant, et al. (2005). "Glyoxalase 1 and glutathione reductase 1 regulate anxiety in mice." Nature **438**(7068): 662-6.
Hsieh, M. H., D. R. McQuoid, et al. (2002). "Hippocampal volume and antidepressant response in geriatric depression." Int J Geriatr Psychiatry **17**(6): 519-25.

Huang, M., X. Pang, et al. (2003). "Stress-induced interleukin-6 release in mice is mast cell-dependent and more pronounced in Apolipoprotein E knockout mice." Cardiovasc Res **59**(1): 241-9.
Hurwitz, T. A., C. Clark, et al. (1990). "Regional cerebral glucose metabolism in major depressive disorder." Can J Psychiatry **35**(8): 684-8.
Husain, M. M., W. M. McDonald, et al. (1991). "A magnetic resonance imaging study of putamen nuclei in major depression." Psychiatry Res **40**(2): 95-9.
Hutchison, J. B., A. Wozniak, et al. (1999). "Steroid metabolising enzymes in the determination of brain gender." J Steroid Biochem Mol Biol **69**(1-6): 85-96.
Ibarguen-Vargas, Y., A. Surget, et al. (2008). "Multifaceted strain-specific effects in a mouse model of depression and of antidepressant reversal." Psychoneuroendocrinology **33**(10): 1357-68.
Ibarguen-Vargas, Y., A. Surget, et al. (2009). "Deficit in BDNF does not increase vulnerability to stress but dampens antidepressant-like effects in the unpredictable chronic mild stress." Behav Brain Res **202**(2): 245-51.
Irwin, M., T. L. Smith, et al. (1987). "Low natural killer cytotoxicity in major depression." Life Sci **41**(18): 2127-33.
Ising, M. and F. Holsboer (2007). "CRH-sub-1 receptor antagonists for the treatment of depression and anxiety." Exp Clin Psychopharmacol **15**(6): 519-28.
Isingrini, E., T. Desmidt, et al. (2009). "Endothelial dysfunction: A potential therapeutic target for geriatric depression and brain amyloid deposition in Alzheimer's disease?" Curr Opin Investig Drugs **10**(1): 46-55.
Ito, H., R. Kawashima, et al. (1996). "Hypoperfusion in the limbic system and prefrontal cortex in depression: SPECT with anatomic standardization technique." J Nucl Med **37**(3): 410-4.
Iwata, E., T. Kikusui, et al. (2007). "Fostering and environmental enrichment ameliorate anxious behavior induced by early weaning in Balb/c mice." Physiol Behav **91**(2-3): 318-24.
Jhamandas, K. H., R. J. Boegman, et al. (1998). "Role of zinc in blockade of excitotoxic action of quinolinic acid by picolinic acid." Amino Acids **14**(1-3): 257-61.
Jiang, W., Y. Zhang, et al. (2005). "Cannabinoids promote embryonic and adult hippocampus neurogenesis and produce anxiolytic- and antidepressant-like effects." J Clin Invest **115**(11): 3104-16.
Johnson, J. D., K. A. O'Connor, et al. (2002). "Prior stressor exposure sensitizes LPS-induced cytokine production." Brain Behav Immun **16**(4): 461-76.
Jorm, A. F. (2000). "Is depression a risk factor for dementia or cognitive decline? A review." Gerontology **46**(4): 219-27.
Joseph, M. H. and B. V. Kadam (1979). "Kynurenine: penetration to the brain, effect on brain tryptophan and 5-hydroxytryptamine metabolism and binding to plasma albumin [proceedings]." Br J Pharmacol **66**(3): 483P-484P.
Kadoya, A., S. Tone, et al. (1992). "Gene structure of human indoleamine 2,3-dioxygenase." Biochem Biophys Res Commun **189**(1): 530-6.
Kaihara, M., J. M. Price, et al. (1956). "The conversion of kynurenic acid to quinaldic acid by humans and rats." J Biol Chem **223**(2): 705-8.
Kalueff, A. V. and P. Tuohimaa (2004). "Grooming analysis algorithm for neurobehavioural stress research." Brain Res Brain Res Protoc **13**(3): 151-8.
Kam, J. C., S. J. Szefler, et al. (1993). "Combination IL-2 and IL-4 reduces glucocorticoid receptor-binding affinity and T cell response to glucocorticoids." J Immunol **151**(7): 3460-6.
Kanai, M., H. Funakoshi, et al. (2009). "Tryptophan 2,3-dioxygenase is a key modulator of physiological neurogenesis and anxiety-related behavior in mice." Mol Brain **2**(1): 8.
Kanai, M., T. Nakamura, et al. (2009). "Identification and characterization of novel variants of the tryptophan 2,3-dioxygenase gene: differential regulation in the mouse nervous system during development." Neurosci Res **64**(1): 111-7.
Kanai, Y., H. Segawa, et al. (2000). "Amino acid transporters: molecular structure and physiological roles." Nephrol Dial Transplant **15 Suppl 6**: 9-10.
Kapur, S. and J. J. Mann (1992). "Role of the dopaminergic system in depression." Biol Psychiatry **32**(1): 1-17.
Karege, F., G. Bondolfi, et al. (2005). "Low brain-derived neurotrophic factor (BDNF) levels in serum of depressed patients probably results from lowered platelet BDNF release unrelated to platelet reactivity." Biol Psychiatry **57**(9): 1068-72.

Karolewicz, B., K. Szebeni, et al. (2009). "Elevated levels of NR2A and PSD-95 in the lateral amygdala in depression." Int J Neuropsychopharmacol **12**(2): 143-53.
Karst, H., S. Berger, et al. (2005). "Mineralocorticoid receptors are indispensable for nongenomic modulation of hippocampal glutamate transmission by corticosterone." Proc Natl Acad Sci U S A **102**(52): 19204-7.
Kawai, J., E. Okuno, et al. (1988). "Organ distribution of rat kynureninase and changes of its activity during development." Enzyme **39**(4): 181-9.
Kee, N., C. M. Teixeira, et al. (2007). "Preferential incorporation of adult-generated granule cells into spatial memory networks in the dentate gyrus." Nat Neurosci **10**(3): 355-62.
Keilp, J. G., M. Gorlyn, et al. (2006). "Aggressiveness, not impulsiveness or hostility, distinguishes suicide attempters with major depression." Psychol Med **36**(12): 1779-88.
Kellendonk, C., F. Tronche, et al. (2002). "Analysis of glucocorticoid receptor function in the mouse by gene targeting." Ernst Schering Res Found Workshop(40): 305-18.
Kema, I. P., A. M. Schellings, et al. (1993). "High performance liquid chromatographic profiling of tryptophan and related indoles in body fluids and tissues of carcinoid patients." Clin Chim Acta **221**(1-2): 143-58.
Kempermann, G. (2008). "The neurogenic reserve hypothesis: what is adult hippocampal neurogenesis good for?" Trends Neurosci **31**(4): 163-9.
Kempermann, G., J. Krebs, et al. (2008). "The contribution of failing adult hippocampal neurogenesis to psychiatric disorders." Curr Opin Psychiatry **21**(3): 290-5.
Kendler, K. S. (2001). "Twin studies of psychiatric illness: an update." Arch Gen Psychiatry **58**(11): 1005-14.
Kendler, K. S., L. J. Eaves, et al. (1996). "The identification and validation of distinct depressive syndromes in a population-based sample of female twins." Arch Gen Psychiatry **53**(5): 391-9.
Kendler, K. S., R. C. Kessler, et al. (1995). "Stressful life events, genetic liability, and onset of an episode of major depression in women." Am J Psychiatry **152**(6): 833-42.
Kendler, K. S., J. W. Kuhn, et al. (2004). "Childhood sexual abuse, stressful life events and risk for major depression in women." Psychol Med **34**(8): 1475-82.
Kenis, G. and M. Maes (2002). "Effects of antidepressants on the production of cytokines." Int J Neuropsychopharmacol **5**(4): 401-12.
Kerr, S. J., P. J. Armati, et al. (1998). "Chronic exposure of human neurons to quinolinic acid results in neuronal changes consistent with AIDS dementia complex." AIDS **12**(4): 355-63.
Kessler, M., T. Terramani, et al. (1989). "A glycine site associated with N-methyl-D-aspartic acid receptors: characterization and identification of a new class of antagonists." J Neurochem **52**(4): 1319-28.
Kessler, R. C., P. Berglund, et al. (2003). "The epidemiology of major depressive disorder: results from the National Comorbidity Survey Replication (NCS-R)." JAMA **289**(23): 3095-105.
Khan, J. A., F. Forouhar, et al. (2007). "Nicotinamide adenine dinucleotide metabolism as an attractive target for drug discovery." Expert Opin Ther Targets **11**(5): 695-705.
Khaspekov, L., E. Kida, et al. (1989). "Neurotoxic effect induced by quinolinic acid in dissociated cell culture of mouse hippocampus." J Neurosci Res **22**(2): 150-7.
Kiank, C., M. Entleutner, et al. (2005). "Chronic psychological stress severely impairs innate and adaptive immune competence and induces sickness behavior in mice." Brain Behav Immun **20**(4): 359-368.
Kiank, C., B. Holtfreter, et al. (2006). "Stress susceptibility predicts the severity of immune depression and the failure to combat bacterial infections in chronically stressed mice." Brain Behav Immun **20**(4): 359-68.
Kiank, C., S. Voss, et al. (2009). "Proinflammatory cytokines mediate acute stress-induced loss of intestinal barrier function in the terminal ileum which enhances tryptophan catabolism in BALB/C mice." Brain Behav Immun **22**(4).
Kiank, C., J. P. Zeden, et al. (2010). "Psychological stress-induced, IDO1-dependent tryptophan catabolism: implications on immunosuppression in mice and humans." PLoS One **5**(7): e11825.
Kido, R. (1984). "Kynurenine aminotransferase activity in human and other mammalian tissues, in Progress on Tryptophane and Serotonin Research." Berlin-New York: 651-656.
Kim, J. S., W. Schmid-Burgk, et al. (1982). "Increased serum glutamate in depressed patients." Arch Psychiatr Nervenkr **232**(4): 299-304.

Kimball, S. R., A. Abbas, et al. (2008). "Melatonin represses oxidative stress-induced activation of the MAP kinase and mTOR signaling pathways in H4IIE hepatoma cells through inhibition of Ras." J Pineal Res **44**(4): 379-86.
Kirby, L. G., A. R. Allen, et al. (1995). "Regional differences in the effects of forced swimming on extracellular levels of 5-hydroxytryptamine and 5-hydroxyindoleacetic acid." Brain Res **682**(1-2): 189-96.
Kirsch, I. (2009). "Antidepressants and the placebo response." Epidemiol Psichiatr Soc **18**(4): 318-22.
Kirsch, I., B. J. Deacon, et al. (2008). "Initial severity and antidepressant benefits: a meta-analysis of data submitted to the Food and Drug Administration." PLoS Med **5**(2): e45.
Kitamura, H., A. Konno, et al. (1997). "Immobilization stress increases hepatic IL-6 expression in mice." Biochem Biophys Res Commun **238**(3): 707-11.
Klein, J. (1986). Natural history of the histocompatibility complex. New York., Wiley.
Knigge, K. M. (1961). "Adrenocortical response to stress in rats with lesions in hippocampus and amygdala." Proc Soc Exp Biol Med **108**: 18-21.
Knoll, A. T. and W. A. Carlezon, Jr. (2010). "Dynorphin, stress, and depression." Brain Res **1314**: 56-73.
Knott, P. J. and G. Curzon (1974). "Effect of increased rat brain tryptophan on 5-hydroxytryptamine and 5-hydroxyindolyl acetic acid in the hypothalamus and other brain regions." J Neurochem **22**(6): 1065-71.
Koehl, M., A. Barbazanges, et al. (1997). "Prenatal stress induces a phase advance of circadian corticosterone rhythm in adult rats which is prevented by postnatal stress." Brain Res **759**(2): 317-20.
Koehl, M., M. Darnaudery, et al. (1999). "Prenatal stress alters circadian activity of hypothalamo-pituitary-adrenal axis and hippocampal corticosteroid receptors in adult rats of both gender." J Neurobiol **40**(3): 302-15.
Koff, W. C., A. V. Fann, et al. (1986). "Catecholamine-induced suppression of interleukin-1 production." Lymphokine Res **5**(4): 239-47.
Kohl, C., T. Walch, et al. (2005). "Measurement of tryptophan, kynurenine and neopterin in women with and without postpartum blues." J Affect Disord **86**(2-3): 135-42.
Kolber, B. J., M. P. Boyle, et al. (2010). "Transient early-life forebrain corticotropin-releasing hormone elevation causes long-lasting anxiogenic and despair-like changes in mice." J Neurosci **30**(7): 2571-81.
Konan, K. V. and M. W. Taylor (1996). "Importance of the two interferon-stimulated response element (ISRE) sequences in the regulation of the human indoleamine 2,3-dioxygenase gene." J Biol Chem **271**(32): 19140-5.
Konsman, J. P., P. Parnet, et al. (2002). "Cytokine-induced sickness behaviour: mechanisms and implications." Trends Neurosci **25**(3): 154-9.
Koo, J. W. and R. S. Duman (2009). "Interleukin-1 receptor null mutant mice show decreased anxiety-like behavior and enhanced fear memory." Neurosci Lett **456**(1): 39-43.
Koo, J. W., S. J. Russo, et al. (2010). "Nuclear factor-kappaB is a critical mediator of stress-impaired neurogenesis and depressive behavior." Proc Natl Acad Sci U S A **107**(6): 2669-74.
Koolhaas, J. M. (2008). "Coping style and immunity in animals: making sense of individual variation." Brain Behav Immun **22**(5): 662-7.
Koolhaas, J. M., S. F. de Boer, et al. (2010). "Neuroendocrinology of coping styles: Towards understanding the biology of individual variation." Front Neuroendocrinol.
Koolhaas, J. M., S. F. De Boer, et al. (1997). "Social stress in rats and mice." Acta Physiol Scand Suppl **640**: 69-72.
Koolhaas, J. M., S. M. Korte, et al. (1999). "Coping styles in animals: current status in behavior and stress-physiology." Neurosci Biobehav Rev **23**(7): 925-35.
Kraemer, H. C. and D. J. Kupfer (2006). "Size of treatment effects and their importance to clinical research and practice." Biol Psychiatry **59**(11): 990-6.
Kramer, M. S., N. Cutler, et al. (1998). "Distinct mechanism for antidepressant activity by blockade of central substance P receptors." Science **281**(5383): 1640-5.
Krishnan, K. R., W. M. McDonald, et al. (1992). "Magnetic resonance imaging of the caudate nuclei in depression. Preliminary observations." Arch Gen Psychiatry **49**(7): 553-7.
Krishnan, V. and E. J. Nestler (2008). "The molecular neurobiology of depression." Nature **455**(7215): 894-902.

Kromer, S. A., M. S. Kessler, et al. (2005). "Identification of glyoxalase-I as a protein marker in a mouse model of extremes in trait anxiety." J Neurosci **25**(17): 4375-84.
Kronfol, Z., J. Silva, Jr., et al. (1983). "Impaired lymphocyte function in depressive illness." Life Sci **33**(3): 241-7.
Kubera, M., A. Basta-Kaim, et al. (1998). "Effect of mild chronic stress, as a model of depression, on the immunoreactivity of C57BL/6 mice." Int J Immunopharmacol **20**(12): 781-9.
Kubera, M., A. H. Lin, et al. (2001). "Anti-Inflammatory effects of antidepressants through suppression of the interferon-gamma/interleukin-10 production ratio." J Clin Psychopharmacol **21**(2): 199-206.
Kubera, M., A. Symbirtsev, et al. (1996). "Effect of chronic treatment with imipramine on interleukin 1 and interleukin 2 production by splenocytes obtained from rats subjected to a chronic mild stress model of depression." Pol J Pharmacol **48**(5): 503-6.
Kugaya, A. and G. Sanacora (2005). "Beyond monoamines: glutamatergic function in mood disorders." CNS Spectr **10**(10): 808-19.
Kumar, A., A. Newberg, et al. (1993). "Regional cerebral glucose metabolism in late-life depression and Alzheimer disease: a preliminary positron emission tomography study." Proc Natl Acad Sci U S A **90**(15): 7019-23.
Labeur, M. S., E. Arzt, et al. (1995). "Long-term intracerebroventricular corticotropin-releasing hormone administration induces distinct changes in rat splenocyte activation and cytokine expression." Endocrinology **136**(6): 2678-88.
Lai, T., M. E. Payne, et al. (2000). "Reduction of orbital frontal cortex volume in geriatric depression." Biol Psychiatry **48**(10): 971-5.
Lake, C. R., D. Pickar, et al. (1982). "High plasma norepinephrine levels in patients with major affective disorder." Am J Psychiatry **139**(10): 1315-8.
Lalonde, R. and C. Strazielle (2008). "Relations between open-field, elevated plus-maze, and emergence tests as displayed by C57/BL6J and BALB/c mice." J Neurosci Methods **171**(1): 48-52.
Lanfumey, L., R. Mongeau, et al. (2008). "Corticosteroid-serotonin interactions in the neurobiological mechanisms of stress-related disorders." Neurosci Biobehav Rev **32**(6): 1174-84.
Lanquillon, S., J. C. Krieg, et al. (2000). "Cytokine production and treatment response in major depressive disorder." Neuropsychopharmacology **22**(4): 370-9.
Lapin, I. P. (1978). "Stimulant and convulsive effects of kynurenines injected into brain ventricles in mice." J Neural Transm **42**(1): 37-43.
Lapin, I. P. (1981). "Kynurenines and seizures." Epilepsia **22**(3): 257-65.
Lapin, I. P. (1996). "Anxiogenic activity of quinolinic acid and kynurenine in the social interaction test in mice." Journal of Psychopharmacology **10**(3): 246-9.
Lapin, I. P. (2003). "Neurokynurenines (NEKY) as common neurochemical links of stress and anxiety." Adv Exp Med Biol **527**: 121-5.
Lathe, R. (2004). "The individuality of mice." Genes Brain Behav **3**(6): 317-27.
Laugeray, A., J. M. Launay, et al. (*In preparation*). "Effects of the antidepressant fluoxetine on neurochemical alterations of the kynurenine pathway induced by UCMS in mice: comparison with the IDO inhibitor 1-methyl-tryptohane."
Laugeray, A., J. M. Launay, et al. (2010). "Peripheral and cerebral metabolic abnormalities of the tryptophan-kynurenine pathway in a murine model of major depression." Behav Brain Res **210**(1): 84-91.
Laugeray, A., J. M. Launay, et al. (*Submitted*). "Evidence for a key role of the peripheral kynurenine pathway in the modulation of anxiety- and depression-like behaviours in mice: focus on individual differences."
Leathwood, P. (1987). "Food-composition, changes in brain serotonin synthesis and appetite for protein and carbohydrate." Appetite **8**(3): 202-5.
Lee, T., T. Jarome, et al. (2009). "Chronic stress selectively reduces hippocampal volume in rats: a longitudinal magnetic resonance imaging study." Neuroreport **20**(17): 1554-8.
Lees, G. J. (1993). "The possible contribution of microglia and macrophages to delayed neuronal death after ischemia." J Neurol Sci **114**(2): 119-22.
Leipnitz, G., C. Schumacher, et al. (2005). "Quinolinic acid reduces the antioxidant defenses in cerebral cortex of young rats." Int J Dev Neurosci **23**(8): 695-701.
LeMay, L. G., A. J. Vander, et al. (1990). "The effects of psychological stress on plasma interleukin-6 activity in rats." Physiol Behav **47**(5): 957-61.

Lenczowski, M. J., R. M. Bluthe, et al. (1999). "Central administration of rat IL-6 induces HPA activation and fever but not sickness behavior in rats." Am J Physiol **276**(3 Pt 2): R652-8.
Leonard, B. E. (2001). "Stress, norepinephrine and depression." J Psychiatry Neurosci **26 Suppl**: S11-6.
Leonard, B. E. (2006). "HPA and immune axes in stress: involvement of the serotonergic system." Neuroimmunomodulation **13**(5-6): 268-76.
Leonard, B. E. and A. Myint (2009). "The psychoneuroimmunology of depression." Hum Psychopharmacol **24**(3): 165-75.
Lesch, K. P., D. Bengel, et al. (1996). "Association of anxiety-related traits with a polymorphism in the serotonin transporter gene regulatory region." Science **274**(5292): 1527-31.
Leshner, A. I. and S. M. Schwartz (1977). "Neonatal corticosterone treatment increases submissiveness in adulthood in mice." Physiol Behav **19**(1): 163-5.
Lestage, J., D. Verrier, et al. (2002). "The enzyme indoleamine 2,3-dioxygenase is induced in the mouse brain in response to peripheral administration of lipopolysaccharide and superantigen." Brain Behav Immun **16**(5): 596-601.
Levi, L. (1997). "Psychosocial environmental factors and psychosocially mediated effects of physical environmental factors." Scand J Work Environ Health **23 Suppl 3**: 47-52.
Levine, J., Y. Barak, et al. (1999). "Cerebrospinal cytokine levels in patients with acute depression." Neuropsychobiology **40**(4): 171-6.
Levine, J., K. Panchalingam, et al. (2000). "Increased cerebrospinal fluid glutamine levels in depressed patients." Biol Psychiatry **47**(7): 586-93.
Levinson, D. F., O. V. Evgrafov, et al. (2007). "Genetics of recurrent early-onset major depression (GenRED): significant linkage on chromosome 15q25-q26 after fine mapping with single nucleotide polymorphism markers." Am J Psychiatry **164**(2): 259-64.
Levitan, R. D., A. Lesage, et al. (1997). "Reversed neurovegetative symptoms of depression: a community study of Ontario." Am J Psychiatry **154**(7): 934-40.
Li, J., Y. Wang, et al. (2006). "Association between tryptophan hydroxylase gene polymorphisms and attention deficit hyperactivity disorder in Chinese Han population." Am J Med Genet B Neuropsychiatr Genet **141B**(2): 126-9.
Li, J. M., L. D. Kong, et al. (2003). "Behavioral and biochemical studies on chronic mild stress models in rats treated with a Chinese traditional prescription Banxia-houpu decoction." Life Sci **74**(1): 55-73.
Li, S., C. Wang, et al. (2008). "Chronic mild stress impairs cognition in mice: from brain homeostasis to behavior." Life Sci **82**(17-18): 934-42.
Lichtenstein, G. R., M. Bala, et al. (2002). "Infliximab improves quality of life in patients with Crohn's disease." Inflamm Bowel Dis **8**(4): 237-43.
Lightman, S. L. (2008). "The neuroendocrinology of stress: a never ending story." J Neuroendocrinol **20**(6): 880-4.
Linthorst, A. C., C. Flachskamm, et al. (1995). "Effect of bacterial endotoxin and interleukin-1 beta on hippocampal serotonergic neurotransmission, behavioral activity, and free corticosterone levels: an in vivo microdialysis study." J Neurosci **15**(4): 2920-34.
Lippmann, M., A. Bress, et al. (2007). "Long-term behavioural and molecular alterations associated with maternal separation in rats." Eur J Neurosci **25**(10): 3091-8.
Lipton, S. A. (1998). "Neuronal injury associated with HIV-1: approaches to treatment." Annu Rev Pharmacol Toxicol **38**: 159-77.
Liu, D., J. Diorio, et al. (1997). "Maternal care, hippocampal glucocorticoid receptors, and hypothalamic-pituitary-adrenal responses to stress." Science **277**(5332): 1659-62.
Liu, J., J. C. Garza, et al. "Acute administration of leptin produces anxiolytic-like effects: a comparison with fluoxetine." Psychopharmacology (Berl) **207**(4): 535-45.
Liu, Z., F. Zhu, et al. (2006). "Association of corticotropin-releasing hormone receptor1 gene SNP and haplotype with major depression." Neurosci Lett **404**(3): 358-62.
Lloyd, A. J., I. N. Ferrier, et al. (2004). "Hippocampal volume change in depression: late- and early-onset illness compared." Br J Psychiatry **184**: 488-95.
Lombardi, G. and F. Moroni (1992). "GM1 ganglioside reduces ischemia-induced excitatory amino acid output: a microdialysis study in the gerbil hippocampus." Neurosci Lett **134**(2): 171-4.
Long, J. B., W. W. Youngblood, et al. (1982). "A microassay for simultaneous measurement of in vivo rates of tryptophan hydroxylation and levels of serotonin in discrete brain nuclei." J Neurosci Methods **6**(1-2): 45-58.

Lorrain, D. S., C. S. Baccei, et al. (2003). "Effects of ketamine and N-methyl-D-aspartate on glutamate and dopamine release in the rat prefrontal cortex: modulation by a group II selective metabotropic glutamate receptor agonist LY379268." Neuroscience **117**(3): 697-706.

Louis, C., J. Stemmelin, et al. (2008). "Additional evidence for anxiolytic- and antidepressant-like activities of saredutant (SR48968), an antagonist at the neurokinin-2 receptor in various rodent-models." Pharmacol Biochem Behav **89**(1): 36-45.

Lucas, L. R., C. J. Wang, et al. (2007). "Effects of immobilization stress on neurochemical markers in the motivational system of the male rat." Brain Res **1155**: 108-15.

Lysle, D. T., J. E. Cunnick, et al. (1990). "Stressor-induced alteration of lymphocyte proliferation in mice: evidence for enhancement of mitogenic responsiveness." Brain Behav Immun **4**(4): 269-77.

Ma, X. M., A. Levy, et al. (1997). "Emergence of an isolated arginine vasopressin (AVP) response to stress after repeated restraint: a study of both AVP and corticotropin-releasing hormone messenger ribonucleic acid (RNA) and heteronuclear RNA." Endocrinology **138**(10): 4351-7.

Ma, X. M. and S. L. Lightman (1998). "The arginine vasopressin and corticotrophin-releasing hormone gene transcription responses to varied frequencies of repeated stress in rats." J Physiol **510 (Pt 2)**: 605-14.

Maccari, S., P. V. Piazza, et al. (1995). "Adoption reverses the long-term impairment in glucocorticoid feedback induced by prenatal stress." J Neurosci **15**(1 Pt 1): 110-6.

Mackay, G. M., C. M. Forrest, et al. (2008). "Kynurenine Metabolites and Inflammation Markers in Depressed Patients Treated with Fluoxetine or Counselling." Clin Exp Pharmacol Physiol.

MacMillan, S., P. R. Szeszko, et al. (2003). "Increased amygdala: hippocampal volume ratios associated with severity of anxiety in pediatric major depression." J Child Adolesc Psychopharmacol **13**(1): 65-73.

Macqueen, G. and T. Frodl (2010). "The hippocampus in major depression: evidence for the convergence of the bench and bedside in psychiatric research?" Mol Psychiatry.

MacQueen, G. M., S. Campbell, et al. (2003). "Course of illness, hippocampal function, and hippocampal volume in major depression." Proc Natl Acad Sci U S A **100**(3): 1387-92.

Madamanchi, N. R., A. Vendrov, et al. (2005). "Oxidative stress and vascular disease." Arterioscler Thromb Vasc Biol **25**(1): 29-38.

Madras, B. K., E. L. Cohen, et al. (1974). "Relevance of free tryptophan in serum to tissue tryptophan concentrations." Metabolism **23**(12): 1107-16.

Maes, M. (1995). "Evidence for an immune response in major depression: a review and hypothesis." Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry **19**(1): 11-38.

Maes, M. (1999). "Major depression and activation of the inflammatory response system." Adv Exp Med Biol **461**: 25-46.

Maes, M. (2010). "An intriguing and hitherto unexplained co-occurrence: Depression and chronic fatigue syndrome are manifestations of shared inflammatory, oxidative and nitrosative (IO&NS) pathways." Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry.

Maes, M., E. Bosmans, et al. (1990). "Immune disturbances during major depression: upregulated expression of interleukin-2 receptors." Neuropsychobiology **24**(3): 115-20.

Maes, M., J. Delange, et al. (1997). "Acute phase proteins in schizophrenia, mania and major depression: modulation by psychotropic drugs." Psychiatry Res **66**(1): 1-11.

Maes, M., P. Galecki, et al. (2010). "A review on the oxidative and nitrosative stress (O&NS) pathways in major depression and their possible contribution to the (neuro)degenerative processes in that illness." Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry.

Maes, M., M. P. Jacobs, et al. (1990). "Suppressant effects of dexamethasone on the availability of plasma L-tryptophan and tyrosine in healthy controls and in depressed patients." Acta Psychiatr Scand **81**(1): 19-23.

Maes, M., M. P. Jacobs, et al. (1990). "Effects of dexamethasone on the availability of L-tryptophan and on the insulin and FFA concentrations in unipolar depressed patients." Biol Psychiatry **27**(8): 854-62.

Maes, M., P. Ruckoanich, et al. (2010). "Multiple aberrations in shared inflammatory and oxidative & nitrosative stress (IO&NS) pathways explain the co-association of depression and cardiovascular disorder (CVD), and the increased risk for CVD and due mortality in depressed patients." Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry.

Maes, M., R. Verkerk, et al. (2002). "Depressive and anxiety symptoms in the early puerperium are related to increased degradation of tryptophan into kynurenine, a phenomenon which is related to immune activation." Life Sci **71**(16): 1837-48.
Maes, M., A. Wauters, et al. (1996). "Lower serum L-tryptophan availability in depression as a marker of a more generalized disorder in protein metabolism." Neuropsychopharmacology **15**(3): 243-51.
Magarinos, A. M. and B. S. McEwen (1995). "Stress-induced atrophy of apical dendrites of hippocampal CA3c neurons: involvement of glucocorticoid secretion and excitatory amino acid receptors." Neuroscience **69**(1): 89-98.
Magarinos, A. M., B. S. McEwen, et al. (1996). "Chronic psychosocial stress causes apical dendritic atrophy of hippocampal CA3 pyramidal neurons in subordinate tree shrews." J Neurosci **16**(10): 3534-40.
Magarinos, A. M., G. Somoza, et al. (1987). "Glucocorticoid negative feedback and glucocorticoid receptors after hippocampectomy in rats." Horm Metab Res **19**(3): 105-9.
Mague, S. D., A. M. Pliakas, et al. (2003). "Antidepressant-like effects of kappa-opioid receptor antagonists in the forced swim test in rats." J Pharmacol Exp Ther **305**(1): 323-30.
Makino, S., P. W. Gold, et al. (1994). "Corticosterone effects on corticotropin-releasing hormone mRNA in the central nucleus of the amygdala and the parvocellular region of the paraventricular nucleus of the hypothalamus." Brain Res **640**(1-2): 105-12.
Malkesman, O., D. S. Pine, et al. (2009). "Animal models of suicide-trait-related behaviors." Trends Pharmacol Sci **30**(4): 165-73.
Mallo, T., A. Alttoa, et al. (2007). "Rats with persistently low or high exploratory activity: behaviour in tests of anxiety and depression, and extracellular levels of dopamine." Behav Brain Res **177**(2): 269-81.
Mann, J. J. (2003). "Neurobiology of suicidal behaviour." Nat Rev Neurosci **4**(10): 819-28.
Marco, E. M., W. Adriani, et al. (2009). "Detrimental psychophysiological effects of early maternal deprivation in adolescent and adult rodents: altered responses to cannabinoid exposure." Neurosci Biobehav Rev **33**(4): 498-507.
Marshall, P. S. (1993). "Allergy and depression: a neurochemical threshold model of the relation between the illnesses." Psychol Bull **113**(1): 23-43.
Martin-Soelch, C. (2009). "Is depression associated with dysfunction of the central reward system?" Biochem Soc Trans **37**(Pt 1): 313-7.
Martin, A., M. P. Heyes, et al. (1992). "Progressive slowing of reaction time and increasing cerebrospinal fluid concentrations of quinolinic acid in HIV-infected individuals." J Neuropsychiatry Clin Neurosci **4**(3): 270-9.
Martin, M., C. Ledent, et al. (2002). "Involvement of CB1 cannabinoid receptors in emotional behaviour." Psychopharmacology (Berl) **159**(4): 379-87.
Martin, P., P. Soubrie, et al. (1990). "Reversal of helpless behavior by serotonin uptake blockers in rats." Psychopharmacology (Berl) **101**(3): 403-7.
Martinot, J. L., P. Hardy, et al. (1990). "Left prefrontal glucose hypometabolism in the depressed state: a confirmation." Am J Psychiatry **147**(10): 1313-7.
Mason, J. W. (1959). "Plasma 17-hydroxycorticosteroid levels during electrical stimulation of the amygdaloid complex in conscious monkeys." Am J Physiol **196**(1): 44-8.
Mason, J. W. (1968). "A review of psychoendocrine research on the pituitary-adrenal cortical system." Psychosom Med **30**(5): Suppl:576-607.
Matheson, G. K., B. J. Branch, et al. (1971). "Effects of amygdaloid stimulation on pituitary-adrenal activity in conscious cats." Brain Res **32**(1): 151-67.
Mathew, S. J., R. B. Price, et al. (2008). "Recent advances in the neurobiology of anxiety disorders: implications for novel therapeutics." Am J Med Genet C Semin Med Genet **148C**(2): 89-98.
Mathias, S. D., H. H. Colwell, et al. (2000). "Health-related quality of life and functional status of patients with rheumatoid arthritis randomly assigned to receive etanercept or placebo." Clin Ther **22**(1): 128-39.
Matsuo, H., S. Tsukada, et al. (2000). "Expression of a system L neutral amino acid transporter at the blood-brain barrier." Neuroreport **11**(16): 3507-11.
Mauri, M. C., A. Ferrara, et al. (1998). "Plasma and platelet amino acid concentrations in patients affected by major depression and under fluvoxamine treatment." Neuropsychobiology **37**(3): 124-9.
Mayberg, H. S. (1997). "Limbic-cortical dysregulation: a proposed model of depression." J Neuropsychiatry Clin Neurosci **9**(3): 471-81.

Mayberg, H. S. (2003). "Modulating dysfunctional limbic-cortical circuits in depression: towards development of brain-based algorithms for diagnosis and optimised treatment." Br Med Bull **65**: 193-207.
Mc, M. R. and J. L. Oncley (1958). "The specific binding of L-tryptophan to serum albumin." J Biol Chem **233**(6): 1436-47.
McCauley, J., D. E. Kern, et al. (1997). "Clinical characteristics of women with a history of childhood abuse: unhealed wounds." JAMA **277**(17): 1362-8.
McEwen, B. S. (1998). "Stress, adaptation, and disease. Allostasis and allostatic load." Ann N Y Acad Sci **840**: 33-44.
McEwen, B. S. (1999). "Stress and hippocampal plasticity." Annu Rev Neurosci **22**: 105-22.
McEwen, B. S. (2004). "Protection and damage from acute and chronic stress: allostasis and allostatic overload and relevance to the pathophysiology of psychiatric disorders." Ann N Y Acad Sci **1032**: 1-7.
McEwen, B. S. (2005). "Glucocorticoids, depression, and mood disorders: structural remodeling in the brain." Metabolism **54**(5 Suppl 1): 20-3.
McIntosh, L. J., K. M. Cortopassi, et al. (1998). "Glucocorticoids may alter antioxidant enzyme capacity in the brain: kainic acid studies." Brain Res **791**(1-2): 215-22.
McMenamy, R. H. (1965). "Binding of indole analogues to human serum albumin. Effects of fatty acids." J Biol Chem **240**(11): 4235-43.
Meaney, M. J. (2001). "Maternal care, gene expression, and the transmission of individual differences in stress reactivity across generations." Annu Rev Neurosci **24**: 1161-92.
Medzhitov, R. and C. Janeway, Jr. (2000). "Innate immune recognition: mechanisms and pathways." Immunol Rev **173**: 89-97.
Melillo, G., G. W. Cox, et al. (1994). "Regulation of nitric-oxide synthase mRNA expression by interferon-gamma and picolinic acid." J Biol Chem **269**(11): 8128-33.
Mellor, A. L. and D. H. Munn (2004). "IDO expression by dendritic cells: tolerance and tryptophan catabolism." Nat Rev Immunol **4**(10): 762-74.
Merali, Z., P. Kent, et al. (2006). "Corticotropin-releasing hormone, arginine vasopressin, gastrin-releasing peptide, and neuromedin B alterations in stress-relevant brain regions of suicides and control subjects." Biol Psychiatry **59**(7): 594-602.
Merali, Z., S. Lacosta, et al. (1997). "Effects of interleukin-1beta and mild stress on alterations of norepinephrine, dopamine and serotonin neurotransmission: a regional microdialysis study." Brain Res **761**(2): 225-35.
Merali, Z., C. Levac, et al. (2003). "Validation of a simple, ethologically relevant paradigm for assessing anxiety in mice." Biol Psychiatry **54**(5): 552-65.
Meynen, G., U. A. Unmehopa, et al. (2006). "Increased arginine vasopressin mRNA expression in the human hypothalamus in depression: A preliminary report." Biol Psychiatry **60**(8): 892-5.
Micale, V., A. Tamburella, et al. (2008). "Behavioral effects of saredutant, a tachykinin NK2 receptor antagonist, in experimental models of mood disorders under basal and stress-related conditions." Pharmacol Biochem Behav **90**(3): 463-9.
Michel, T. M., S. Frangou, et al. (2007). "Evidence for oxidative stress in the frontal cortex in patients with recurrent depressive disorder--a postmortem study." Psychiatry Res **151**(1-2): 145-50.
Michelson, D., C. Stratakis, et al. (1996). "Bone mineral density in women with depression." N Engl J Med **335**(16): 1176-81.
Miczek, K. A., S. C. Maxson, et al. (2001). "Aggressive behavioral phenotypes in mice." Behav Brain Res **125**(1-2): 167-81.
Miguel, T. T. and R. L. Nunes-de-Souza (2008). "Anxiogenic-like effects induced by NMDA receptor activation are prevented by inhibition of neuronal nitric oxide synthase in the periaqueductal gray in mice." Brain Res **1240**: 39-46.
Mill, J. and A. Petronis (2007). "Molecular studies of major depressive disorder: the epigenetic perspective." Mol Psychiatry **12**(9): 799-814.
Miller, A. H., V. Maletic, et al. (2009). "Inflammation and its discontents: the role of cytokines in the pathophysiology of major depression." Biol Psychiatry **65**(9): 732-41.
Miller, C. L., I. C. Llenos, et al. (2008). "Alterations in kynurenine precursor and product levels in schizophrenia and bipolar disorder." Neurochem Int **52**(6): 1297-303.

Miller, C. L., I. C. Llenos, et al. (2006). "Upregulation of the initiating step of the kynurenine pathway in postmortem anterior cingulate cortex from individuals with schizophrenia and bipolar disorder." Brain Res **1073-1074**: 25-37.
Minden, S. L. and R. B. Schiffer (1990). "Affective disorders in multiple sclerosis. Review and recommendations for clinical research." Arch Neurol **47**(1): 98-104.
Mineur, Y. S., C. Belzung, et al. (2007). "Functional implications of decreases in neurogenesis following chronic mild stress in mice." Neuroscience **150**(2): 251-9.
Mineur, Y. S., D. J. Prasol, et al. (2003). "Agonistic behavior and unpredictable chronic mild stress in mice." Behav Genet **33**(5): 513-9.
Mirza, Y., J. Tang, et al. (2004). "Reduced anterior cingulate cortex glutamatergic concentrations in childhood major depression." J Am Acad Child Adolesc Psychiatry **43**(3): 341-8.
Mitani, H., Y. Shirayama, et al. (2006). "Correlation between plasma levels of glutamate, alanine and serine with severity of depression." Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry **30**(6): 1155-8.
Mizoguchi, K., A. Ishige, et al. (2003). "Chronic stress attenuates glucocorticoid negative feedback: involvement of the prefrontal cortex and hippocampus." Neuroscience **119**(3): 887-97.
Mizoguchi, K., M. Yuzurihara, et al. (2001). "Chronic stress differentially regulates glucocorticoid negative feedback response in rats." Psychoneuroendocrinology **26**(5): 443-59.
Moller, S. E. (1990). "5-HT uptake inhibitors and tricyclic antidepressants: relation between tryptophan availability and clinical response in depressed patients." Eur Neuropsychopharmacol **1**(1): 41-4.
Moller, S. E., P. Bech, et al. (1990). "Plasma ratio tryptophan/neutral amino acids in relation to clinical response to paroxetine and clomipramine in patients with major depression." J Affect Disord **18**(1): 59-66.
Monleon, S., P. D'Aquila, et al. (1995). "Attenuation of sucrose consumption in mice by chronic mild stress and its restoration by imipramine." Psychopharmacology (Berl) **117**(4): 453-7.
Moore, P., H. P. Landolt, et al. (2000). "Clinical and physiological consequences of rapid tryptophan depletion." Neuropsychopharmacology **23**(6): 601-22.
Moraska, A., J. Campisi, et al. (2002). "Elevated IL-1beta contributes to antibody suppression produced by stress." J Appl Physiol **93**(1): 207-15.
Morato, S. and P. Castrechini (1989). "Effects of floor surface and environmental illumination on exploratory activity in the elevated plus-maze." Braz J Med Biol Res **22**(6): 707-10.
Moreau, M., C. Andre, et al. (2008). "Inoculation of Bacillus Calmette-Guerin to mice induces an acute episode of sickness behavior followed by chronic depressive-like behavior." Brain Behav Immun **22**(7): 1087-95.
Moreau, M., J. Lestage, et al. (2005). "Bacille Calmette-Guerin inoculation induces chronic activation of peripheral and brain indoleamine 2,3-dioxygenase in mice." J Infect Dis **192**(3): 537-44.
Moreno, F. A., D. Parkinson, et al. (2010). "CSF neurochemicals during tryptophan depletion in individuals with remitted depression and healthy controls." Eur Neuropsychopharmacol **20**(1): 18-24.
Morita, T., K. Saito, et al. (2001). "3-Hydroxyanthranilic acid, an L-tryptophan metabolite, induces apoptosis in monocyte-derived cells stimulated by interferon-gamma." Ann Clin Biochem **38**(Pt 3): 242-51.
Morley-Fletcher, S., M. Darnaudery, et al. (2004). "Chronic treatment with imipramine reverses immobility behaviour, hippocampal corticosteroid receptors and cortical 5-HT(1A) receptor mRNA in prenatally stressed rats." Neuropharmacology **47**(6): 841-7.
Mormede, P., H. Courvoisier, et al. (2002). "Molecular genetic approaches to investigate individual variations in behavioral and neuroendocrine stress responses." Psychoneuroendocrinology **27**(5): 563-83.
Mormede, P., R. Dantzer, et al. (1988). "Influence of stressor predictability and behavioral control on lymphocyte reactivity, antibody responses and neuroendocrine activation in rats." Physiol Behav **43**(5): 577-83.
Moroni, F., A. Cozzi, et al. (2005). "Kynurenine 3-mono-oxygenase inhibitors reduce glutamate concentration in the extracellular spaces of the basal ganglia but not in those of the cortex or hippocampus." Neuropharmacology **48**(6): 788-95.
Moroni, F., A. Cozzi, et al. (1998). "Presynaptic mGlu1 type receptors potentiate transmitter output in the rat cortex." Eur J Pharmacol **347**(2-3): 189-95.
Moroni, F., G. Lombardi, et al. (1984). "The excitotoxin quinolinic acid is present and unevenly distributed in the rat brain." Brain Res **295**(2): 352-5.

Moroni, F., G. Lombardi, et al. (1984). "The excitotoxin quinolinic acid is present in the brain of several mammals and its cortical content increases during the aging process." Neurosci Lett **47**(1): 51-5.
Moroni, F., P. Russi, et al. (1988). "Presence of kynurenic acid in the mammalian brain." J Neurochem **51**(1): 177-80.
Moser, M., M. Lehofer, et al. (1998). "Increased heart rate in depressed subjects in spite of unchanged autonomic balance?" J Affect Disord **48**(2-3): 115-24.
Moser, M. B. and E. I. Moser (1998). "Functional differentiation in the hippocampus." Hippocampus **8**(6): 608-19.
Muller, M. B., S. Zimmermann, et al. (2003). "Limbic corticotropin-releasing hormone receptor 1 mediates anxiety-related behavior and hormonal adaptation to stress." Nat Neurosci **6**(10): 1100-7.
Munn, D. H., E. Shafizadeh, et al. (1999). "Inhibition of T cell proliferation by macrophage tryptophan catabolism." J Exp Med **189**(9): 1363-72.
Murgatroyd, C., A. V. Patchev, et al. (2009). "Dynamic DNA methylation programs persistent adverse effects of early-life stress." Nat Neurosci **12**(12): 1559-66.
Murphy, D. L., Q. Li, et al. (2001). "Genetic perspectives on the serotonin transporter." Brain Res Bull **56**(5): 487-94.
Murphy, F. C., K. A. Smith, et al. (2002). "The effects of tryptophan depletion on cognitive and affective processing in healthy volunteers." Psychopharmacology (Berl) **163**(1): 42-53.
Murray, C. J. and A. D. Lopez (1997). "Alternative projections of mortality and disability by cause 1990-2020: Global Burden of Disease Study." Lancet **349**(9064): 1498-504.
Murray, J. E. (1973). "Carrier-mediated transfer of amino acids from blood to brain. An in vivo study in the rat." Neurology **23**(9): 940-4.
Musso, T., G. L. Gusella, et al. (1994). "Interleukin-4 inhibits indoleamine 2,3-dioxygenase expression in human monocytes." Blood **83**(5): 1408-11.
Mutlu, O., G. Ulak, et al. (2009). "Effects of neuronal and inducible NOS inhibitor 1-[2-(trifluoromethyl) phenyl] imidazole (TRIM) in unpredictable chronic mild stress procedure in mice." Pharmacol Biochem Behav **92**(1): 82-7.
Muzio, M. and A. Mantovani (2000). "Toll-like receptors." Microbes Infect **2**(3): 251-5.
Myint, A. M. and Y. K. Kim (2003). "Cytokine-serotonin interaction through IDO: a neurodegeneration hypothesis of depression." Med Hypotheses **61**(5-6): 519-25.
Myint, A. M., Y. K. Kim, et al. (2006). "Kynurenine pathway in major depression: Evidence of impaired neuroprotection." J Affect Disord.
Myint, A. M., B. E. Leonard, et al. (2005). "Th1, Th2, and Th3 cytokine alterations in major depression." J Affect Disord **88**(2): 167-73.
Naber, P. A. and M. P. Witter (1998). "Subicular efferents are organized mostly as parallel projections: a double-labeling, retrograde-tracing study in the rat." J Comp Neurol **393**(3): 284-97.
Naito, J., I. Ishiguro, et al. (1987). "Determination of kynurenine in serum by high-performance liquid chromatography after enzymatic conversion to 3-hydroxykynurenine." Anal Biochem **161**(1): 16-9.
Nakagami, Y., H. Saito, et al. (1996). "3-Hydroxykynurenine toxicity on the rat striatum in vivo." Jpn J Pharmacol **71**(2): 183-6.
Nakai, M., Z. H. Qin, et al. (1999). "Free radical scavenger OPC-14117 attenuates quinolinic acid-induced NF-kappaB activation and apoptosis in rat striatum." Brain Res Mol Brain Res **64**(1): 59-68.
Nakao, N. and P. Brundin (1997). "Effects of alpha-phenyl-tert-butyl nitrone on neuronal survival and motor function following intrastriatal injections of quinolinate or 3-nitropropionic acid." Neuroscience **76**(3): 749-61.
Negus, R. P., G. W. Stamp, et al. (1997). "Quantitative assessment of the leukocyte infiltrate in ovarian cancer and its relationship to the expression of C-C chemokines." Am J Pathol **150**(5): 1723-34.
Nemeroff, C. B. (1996). "The corticotropin-releasing factor (CRF) hypothesis of depression: new findings and new directions." Mol Psychiatry **1**(4): 336-42.
Nemeroff, C. B., E. Widerlov, et al. (1984). "Elevated concentrations of CSF corticotropin-releasing factor-like immunoreactivity in depressed patients." Science **226**(4680): 1342-4.
Nemeth, H., J. Toldi, et al. (2005). "Role of kynurenines in the central and peripheral nervous systems." Curr Neurovasc Res **2**(3): 249-60.
Nemeth, H., J. Toldi, et al. (2006). "Kynurenines, Parkinson's disease and other neurodegenerative disorders: preclinical and clinical studies." J Neural Transm Suppl(70): 285-304.

Nespor, K. and A. Scheansova (2008). "[Hostility as the risk factor for many health problems and its management]." Cas Lek Cesk **147**(12): 633-5.
Nestler, E. J. and S. E. Hyman "Animal models of neuropsychiatric disorders." Nat Neurosci **13**(10): 1161-9.
Netea, M. G., B. J. Kullberg, et al. (2000). "Circulating cytokines as mediators of fever." Clin Infect Dis **31 Suppl 5**: S178-84.
Newton, S. S., J. Thome, et al. (2002). "Inhibition of cAMP response element-binding protein or dynorphin in the nucleus accumbens produces an antidepressant-like effect." J Neurosci **22**(24): 10883-90.
Nibuya, M., S. Morinobu, et al. (1995). "Regulation of BDNF and trkB mRNA in rat brain by chronic electroconvulsive seizure and antidepressant drug treatments." J Neurosci **15**(11): 7539-47.
Nibuya, M., E. J. Nestler, et al. (1996). "Chronic antidepressant administration increases the expression of cAMP response element binding protein (CREB) in rat hippocampus." J Neurosci **16**(7): 2365-72.
Niinisalo, P., A. Raitala, et al. (2008). "Indoleamine 2,3-dioxygenase activity associates with cardiovascular risk factors: the Health 2000 study." Scand J Clin Lab Invest **68**(8): 767-70.
Nisapakultorn, K., J. Makrudthong, et al. (2009). "Indoleamine 2,3-dioxygenase expression and regulation in chronic periodontitis." J Periodontol **80**(1): 114-21.
Nishikawa, H., T. Hata, et al. (2004). "A role for corticotropin-releasing factor in repeated cold stress-induced anxiety-like behavior during forced swimming and elevated plus-maze tests in mice." Biol Pharm Bull **27**(3): 352-6.
Noack, H., J. Lindenau, et al. (1998). "Differential expression of superoxide dismutase isoforms in neuronal and glial compartments in the course of excitotoxically mediated neurodegeneration: relation to oxidative and nitrergic stress." Glia **23**(4): 285-97.
Nukina, H., N. Sudo, et al. (2001). "Restraint stress elevates the plasma interleukin-6 levels in germ-free mice." J Neuroimmunol **115**(1-2): 46-52.
Nukina, H., N. Sudo, et al. (1998). "The restraint stress-induced elevation in plasma interleukin-6 negatively regulates the plasma TNF-alpha level." Neuroimmunomodulation **5**(6): 323-7.
O'Brien, S. M., P. Scully, et al. (2007). "Plasma cytokine profiles in depressed patients who fail to respond to selective serotonin reuptake inhibitor therapy." J Psychiatr Res **41**(3-4): 326-31.
O'Connor, J. C., C. Andre, et al. (2009). "Interferon-gamma and tumor necrosis factor-alpha mediate the upregulation of indoleamine 2,3-dioxygenase and the induction of depressive-like behavior in mice in response to bacillus Calmette-Guerin." J Neurosci **29**(13): 4200-9.
O'Connor, J. C., M. A. Lawson, et al. (2009). "Induction of IDO by bacille Calmette-Guerin is responsible for development of murine depressive-like behavior." J Immunol **182**(5): 3202-12.
O'Connor, J. C., M. A. Lawson, et al. (2008). "Lipopolysaccharide-induced depressive-like behavior is mediated by indoleamine 2,3-dioxygenase activation in mice." Mol Psychiatry.
O'Connor, K. A., J. D. Johnson, et al. (2003). "Inescapable shock induces resistance to the effects of dexamethasone." Psychoneuroendocrinology **28**(4): 481-500.
O'Mahony, S. M., J. R. Marchesi, et al. (2009). "Early life stress alters behavior, immunity, and microbiota in rats: implications for irritable bowel syndrome and psychiatric illnesses." Biol Psychiatry **65**(3): 263-7.
O'Neill, L. A. and C. A. Dinarello (2000). "The IL-1 receptor/toll-like receptor superfamily: crucial receptors for inflammation and host defense." Immunol Today **21**(5): 206-9.
O'Regan, D., C. J. Kenyon, et al. (2008). "Prenatal dexamethasone 'programmes' hypotension, but stress-induced hypertension in adult offspring." J Endocrinol **196**(2): 343-52.
Odemuyiwa, S. O., A. Ghahary, et al. (2004). "Cutting edge: human eosinophils regulate T cell subset selection through indoleamine 2,3-dioxygenase." J Immunol **173**(10): 5909-13.
Ogawa, T., W. R. Matson, et al. (1992). "Kynurenine pathway abnormalities in Parkinson's disease." Neurology **42**(9): 1702-6.
Oka, T., K. Oka, et al. (2001). "Mechanisms and mediators of psychological stress-induced rise in core temperature." Psychosom Med **63**(3): 476-86.
Okamoto, H., S. Yamamoto, et al. (1967). "On the submitochondrial localization of l-kynurenine-3-hydroxylase." Biochem Biophys Res Commun **26**(3): 309-14.
Okuda, S., N. Nishiyama, et al. (1996). "Hydrogen peroxide-mediated neuronal cell death induced by an endogenous neurotoxin, 3-hydroxykynurenine." Proc Natl Acad Sci U S A **93**(22): 12553-8.

Okuda, S., N. Nishiyama, et al. (1998). "3-Hydroxykynurenine, an endogenous oxidative stress generator, causes neuronal cell death with apoptotic features and region selectivity." J Neurochem **70**(1): 299-307.
Okuno, E., M. Nakamura, et al. (1991). "Two kynurenine aminotransferases in human brain." Brain Res **542**(2): 307-12.
Okuno, E., W. Schmidt, et al. (1991). "Measurement of rat brain kynurenine aminotransferase at physiological kynurenine concentrations." J Neurochem **57**(2): 533-40.
Oldendorf, W. H. and J. Szabo (1976). "Amino acid assignment to one of three blood-brain barrier amino acid carriers." Am J Physiol **230**(1): 94-8.
Ortega-Corona, B. G., J. Carranza, et al. (1981). "Brain monoamine oxidase activity after in vivo-chronic iprindole treatment." Pharmacol Biochem Behav **15**(6): 951-4.
Ostrander, M. M., Y. M. Ulrich-Lai, et al. (2006). "Hypoactivity of the hypothalamo-pituitary-adrenocortical axis during recovery from chronic variable stress." Endocrinology **147**(4): 2008-17.
Overmier, J. B. and M. E. Seligman (1967). "Effects of inescapable shock upon subsequent escape and avoidance responding." J Comp Physiol Psychol **63**(1): 28-33.
Overstreet, D. H., R. C. Commissaris, et al. (2003). "Involvement of 5-HT1A receptors in animal tests of anxiety and depression: evidence from genetic models." Stress **6**(2): 101-10.
Owe-Young, R., N. L. Webster, et al. (2008). "Kynurenine pathway metabolism in human blood-brain-barrier cells: implications for immune tolerance and neurotoxicity." J Neurochem **105**(4): 1346-57.
Owen, N., T. Poulton, et al. (2003). "Socioeconomic status, C-reactive protein, immune factors, and responses to acute mental stress." Brain Behav Immun **17**(4): 286-95.
Owens, M. J. and C. B. Nemeroff (1994). "Role of serotonin in the pathophysiology of depression: focus on the serotonin transporter." Clin Chem **40**(2): 288-95.
Pacak, K. and M. Palkovits (2001). "Stressor specificity of central neuroendocrine responses: implications for stress-related disorders." Endocr Rev **22**(4): 502-48.
Palanza, P., L. Gioiosa, et al. (2001). "Social stress in mice: gender differences and effects of estrous cycle and social dominance." Physiol Behav **73**(3): 411-20.
Palermo-Neto, J., C. de Oliveira Massoco, et al. (2003). "Effects of physical and psychological stressors on behavior, macrophage activity, and Ehrlich tumor growth." Brain Behav Immun **17**(1): 43-54.
Palumbo, M. L., M. C. Canzobre, et al. (2010). "Stress induced cognitive deficit is differentially modulated in BALB/c and C57Bl/6 mice: correlation with Th1/Th2 balance after stress exposure." J Neuroimmunol **218**(1-2): 12-20.
Papakostas, G. I. "The efficacy, tolerability, and safety of contemporary antidepressants." J Clin Psychiatry **71 Suppl E1**: e03.
Papp, M., P. Willner, et al. (1991). "An animal model of anhedonia: attenuation of sucrose consumption and place preference conditioning by chronic unpredictable mild stress." Psychopharmacology (Berl) **104**(2): 255-9.
Pardridge, W. M. (1977). "Kinetics of competitive inhibition of neutral amino acid transport across the blood-brain barrier." J Neurochem **28**(1): 103-8.
Pardridge, W. M. and W. H. Oldendorf (1977). "Transport of metabolic substrates through the blood-brain barrier." J Neurochem **28**(1): 5-12.
Pariante, C. M. (2003). "Depression, stress and the adrenal axis." J Neuroendocrinol **15**(8): 811-2.
Pariante, C. M. and A. H. Miller (2001). "Glucocorticoid receptors in major depression: relevance to pathophysiology and treatment." Biol Psychiatry **49**(5): 391-404.
Parolaro, D., N. Realini, et al. (2010). "The endocannabinoid system and psychiatric disorders." Exp Neurol.
Parpura-Gill, A., D. Beitz, et al. (1997). "The inhibitory effects of beta-amyloid on glutamate and glucose uptakes by cultured astrocytes." Brain Res **754**(1-2): 65-71.
Parsey, R. V., M. A. Oquendo, et al. (2006). "Altered serotonin 1A binding in major depression: a [carbonyl-C-11]WAY100635 positron emission tomography study." Biol Psychiatry **59**(2): 106-13.
Patnaik, S. K. and S. Sarangi (1980). "Age-related response to tryptophan pyrrolase to 17 beta-estradiol in the liver of female rats." J Biochem **87**(4): 1249-52.
Pauli, S., A. C. Linthorst, et al. (1998). "Tumour necrosis factor-alpha and interleukin-2 differentially affect hippocampal serotonergic neurotransmission, behavioural activity, body temperature and hypothalamic-pituitary-adrenocortical axis activity in the rat." Eur J Neurosci **10**(3): 868-78.

Pawlak, D., Y. Takada, et al. (2000). "Serotonergic and kynurenic pathways in rats exposed to foot shock." Brain Res Bull **52**(3): 197-205.
Pawlak, K., T. Domaniewski, et al. (2009). "Kynurenines and oxidative status are independently associated with thrombomodulin and von Willebrand factor levels in patients with end-stage renal disease." Thromb Res **124**(4): 452-7.
Paxinos, G. and K. Franklin (2001). "The Mouse Brain in Stereotoxic Coordinates." Academic Press: San Diego, CA.
Paxinos, G. and K. B. J. Franklin (2001). The mouse brain in stereotaxic coordinates. San Diego, CA, Academic Press.
Pearson, S. J. and G. P. Reynolds (1991). "Determination of 3-hydroxykynurenine in human brain and plasma by high-performance liquid chromatography with electrochemical detection. Increased concentrations in hepatic encephalopathy." J Chromatogr **565**(1-2): 436-40.
Pearson, S. J. and G. P. Reynolds (1992). "Increased brain concentrations of a neurotoxin, 3-hydroxykynurenine, in Huntington's disease." Neurosci Lett **144**(1-2): 199-201.
Peiffer, A., S. Veilleux, et al. (1991). "Antidepressant and other centrally acting drugs regulate glucocorticoid receptor messenger RNA levels in rat brain." Psychoneuroendocrinology **16**(6): 505-15.
Pellow, S., P. Chopin, et al. (1985). "Validation of open:closed arm entries in an elevated plus-maze as a measure of anxiety in the rat." J Neurosci Methods **14**(3): 149-67.
Penninx, B. W., S. W. Geerlings, et al. (1999). "Minor and major depression and the risk of death in older persons." Arch Gen Psychiatry **56**(10): 889-95.
Perez-De La Cruz, V., C. Gonzalez-Cortes, et al. (2005). "Excitotoxic brain damage involves early peroxynitrite formation in a model of Huntington's disease in rats: protective role of iron porphyrinate 5,10,15,20-tetrakis (4-sulfonatophenyl)porphyrinate iron (III)." Neuroscience **135**(2): 463-74.
Perez-De La Cruz, V. and A. Santamaria (2007). "Integrative hypothesis for Huntington's disease: a brief review of experimental evidence." Physiol Res **56**(5): 513-26.
Perez-Severiano, F., B. Escalante, et al. (1998). "Nitric oxide synthase inhibition prevents acute quinolinate-induced striatal neurotoxicity." Neurochem Res **23**(10): 1297-302.
Perkins, M. N. and T. W. Stone (1982). "An iontophoretic investigation of the actions of convulsant kynurenines and their interaction with the endogenous excitant quinolinic acid." Brain Res **247**(1): 184-7.
Perlis, R. H., R. Fraguas, et al. (2005). "Prevalence and clinical correlates of irritability in major depressive disorder: a preliminary report from the Sequenced Treatment Alternatives to Relieve Depression study." J Clin Psychiatry **66**(2): 159-66; quiz 147, 273-4.
Persoons, J. H., N. M. Moes, et al. (1997). "Acute and long-term effects of stressors on pulmonary immune functions." Am J Respir Cell Mol Biol **17**(2): 203-8.
Pertovaara, M., A. Raitala, et al. (2007). "Indoleamine 2,3-dioxygenase enzyme activity correlates with risk factors for atherosclerosis: the Cardiovascular Risk in Young Finns Study." Clin Exp Immunol **148**(1): 106-11.
Peters, D. A. (1982). "Prenatal stress: effects on brain biogenic amine and plasma corticosterone levels." Pharmacol Biochem Behav **17**(4): 721-5.
Peters, J. C. (1991). "Tryptophan nutrition and metabolism: an overview." Adv Exp Med Biol **294**: 345-58.
Petit-Demouliere, B., F. Chenu, et al. (2005). "Forced swimming test in mice: a review of antidepressant activity." Psychopharmacology (Berl) **177**(3): 245-55.
Pezawas, L., A. Meyer-Lindenberg, et al. (2005). "5-HTTLPR polymorphism impacts human cingulate-amygdala interactions: a genetic susceptibility mechanism for depression." Nat Neurosci **8**(6): 828-34.
Pfeiffer, A., V. Brantl, et al. (1986). "Psychotomimesis mediated by kappa opiate receptors." Science **233**(4765): 774-6.
Pineyro, G. and P. Blier (1999). "Autoregulation of serotonin neurons: role in antidepressant drug action." Pharmacol Rev **51**(3): 533-91.
Pinheiro, P. S. and C. Mulle (2008). "Presynaptic glutamate receptors: physiological functions and mechanisms of action." Nat Rev Neurosci **9**(6): 423-36.
Pitman, D. L., B. H. Natelson, et al. (1995). "Effects of exposure to stressors of varying predictability on adrenal function in rats." Behav Neurosci **109**(4): 767-76.

Popa, D., J. Cerdan, et al. "A longitudinal study of 5-HT outflow during chronic fluoxetine treatment using a new technique of chronic microdialysis in a highly emotional mouse strain." Eur J Pharmacol **628**(1-3): 83-90.
Porsolt, R. D., G. Anton, et al. (1978). "Behavioural despair in rats: a new model sensitive to antidepressant treatments." Eur J Pharmacol **47**(4): 379-91.
Porsolt, R. D., A. Bertin, et al. (1977). "Behavioral despair in mice: a primary screening test for antidepressants." Arch Int Pharmacodyn Ther **229**(2): 327-36.
Porsolt, R. D., M. Deniel, et al. (1979). "Forced swimming in rats: hypothermia, immobility and the effects of imipramine." Eur J Pharmacol **57**(4): 431-6.
Pothion, S., J. C. Bizot, et al. (2004). "Strain differences in sucrose preference and in the consequences of unpredictable chronic mild stress." Behav Brain Res **155**(1): 135-46.
Pratt, L. A., D. E. Ford, et al. (1996). "Depression, psychotropic medication, and risk of myocardial infarction. Prospective data from the Baltimore ECA follow-up." Circulation **94**(12): 3123-9.
Prescott, C. A., S. H. Aggen, et al. (1999). "Sex differences in the sources of genetic liability to alcohol abuse and dependence in a population-based sample of U.S. twins." Alcohol Clin Exp Res **23**(7): 1136-44.
Prewitt, C. M. and J. P. Herman (1997). "Hypothalamo-Pituitary-Adrenocortical Regulation Following Lesions of the Central Nucleus of the Amygdala." Stress **1**(4): 263-280.
Price, L. H., D. S. Charney, et al. (1990). "Clinical studies of 5-HT function using i.v. L-tryptophan." Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry **14**(4): 459-72.
Pugh, C. R., K. T. Nguyen, et al. (1999). "Role of interleukin-1 beta in impairment of contextual fear conditioning caused by social isolation." Behav Brain Res **106**(1-2): 109-18.
Purba, J. S., W. J. Hoogendijk, et al. (1996). "Increased number of vasopressin- and oxytocin-expressing neurons in the paraventricular nucleus of the hypothalamus in depression." Arch Gen Psychiatry **53**(2): 137-43.
Quan, N., R. Avitsur, et al. (2003). "Molecular mechanisms of glucocorticoid resistance in splenocytes of socially stressed male mice." J Neuroimmunol **137**(1-2): 51-8.
Raadsheer, F. C., W. J. Hoogendijk, et al. (1994). "Increased numbers of corticotropin-releasing hormone expressing neurons in the hypothalamic paraventricular nucleus of depressed patients." Neuroendocrinology **60**(4): 436-44.
Raadsheer, F. C., J. J. van Heerikhuize, et al. (1995). "Corticotropin-releasing hormone mRNA levels in the paraventricular nucleus of patients with Alzheimer's disease and depression." Am J Psychiatry **152**(9): 1372-6.
Raison, C. L., A. S. Borisov, et al. (2009). "Activation of central nervous system inflammatory pathways by interferon-alpha: relationship to monoamines and depression." Biol Psychiatry **65**(4): 296-303.
Raison, C. L., R. Dantzer, et al. (2009). "CSF concentrations of brain tryptophan and kynurenines during immune stimulation with IFN-alpha: relationship to CNS immune responses and depression." Mol Psychiatry.
Raison, C. L., R. Dantzer, et al. (2010). "CSF concentrations of brain tryptophan and kynurenines during immune stimulation with IFN-alpha: relationship to CNS immune responses and depression." Mol Psychiatry **15**(4): 393-403.
Rajkowska, G. and J. J. Miguel-Hidalgo (2007). "Gliogenesis and glial pathology in depression." CNS Neurol Disord Drug Targets **6**(3): 219-33.
Ramirez-Amaya, V., D. F. Marrone, et al. (2006). "Integration of new neurons into functional neural networks." J Neurosci **26**(47): 12237-41.
Rammal, H., J. Bouayed, et al. (2010). "A direct relationship between aggressive behavior in the resident/intruder test and cell oxidative status in adult male mice." Eur J Pharmacol **627**(1-3): 173-6.
Rammal, H., J. Bouayed, et al. (2008). "Evidence that oxidative stress is linked to anxiety-related behaviour in mice." Brain Behav Immun **22**(8): 1156-9.
Rammal, H., J. Bouayed, et al. (2008). "The impact of high anxiety level on the oxidative status of mouse peripheral blood lymphocytes, granulocytes and monocytes." Eur J Pharmacol **589**(1-3): 173-5.
Rassoulpour, A., H. Q. Wu, et al. (2005). "Nanomolar concentrations of kynurenic acid reduce extracellular dopamine levels in the striatum." J Neurochem **93**(3): 762-5.
Rechlin, T., M. Weis, et al. (1994). "Are affective disorders associated with alterations of heart rate variability?" J Affect Disord **32**(4): 271-5.

Redgate, E. S. and E. E. Fahringer (1973). "A comparison of the pituitary adrenal activity elicited by electrical stimulation of preoptic, amygdaloid and hypothalamic sites in the rat brain." Neuroendocrinology **12**(6): 334-43.
Reiche, E. M., H. K. Morimoto, et al. (2005). "Stress and depression-induced immune dysfunction: implications for the development and progression of cancer." Int Rev Psychiatry **17**(6): 515-27.
Reilly, J. G., S. F. McTavish, et al. (1997). "Rapid depletion of plasma tryptophan: a review of studies and experimental methodology." J Psychopharmacol **11**(4): 381-92.
Renault, P. F., J. H. Hoofnagle, et al. (1987). "Psychiatric complications of long-term interferon alfa therapy." Arch Intern Med **147**(9): 1577-80.
Revest, J. M., D. Dupret, et al. (2009). "Adult hippocampal neurogenesis is involved in anxiety-related behaviors." Mol Psychiatry.
Rex, A., C. A. Marsden, et al. (1993). "Effect of diazepam on cortical 5-HT release and behaviour in the guinea-pig on exposure to the elevated plus maze." Psychopharmacology (Berl) **110**(4): 490-6.
Reynolds, D. S. (2008). "The value of genetic and pharmacological approaches to understanding the complexities of GABA(A) receptor subtype functions: the anxiolytic effects of benzodiazepines." Pharmacol Biochem Behav **90**(1): 37-42.
Reynolds, J. L., T. A. Ignatowski, et al. (2004). "Brain-derived tumor necrosis factor-alpha and its involvement in noradrenergic neuron functioning involved in the mechanism of action of an antidepressant." J Pharmacol Exp Ther **310**(3): 1216-25.
Ribeiro, C. A., V. Grando, et al. (2006). "Evidence that quinolinic acid severely impairs energy metabolism through activation of NMDA receptors in striatum from developing rats." J Neurochem **99**(6): 1531-42.
Richardson-Jones, J. W., C. P. Craige, et al. "5-HT1A autoreceptor levels determine vulnerability to stress and response to antidepressants." Neuron **65**(1): 40-52.
Riley, W. T., F. A. Treiber, et al. (1989). "Anger and hostility in depression." J Nerv Ment Dis **177**(11): 668-74.
Rios, C. and A. Santamaria (1991). "Quinolinic acid is a potent lipid peroxidant in rat brain homogenates." Neurochem Res **16**(10): 1139-43.
Roberts, R. C., F. Du, et al. (1992). "Immunocytochemical localization of kynurenine aminotransferase in the rat striatum: a light and electron microscopic study." J Comp Neurol **326**(1): 82-90.
Roberts, R. C., K. E. McCarthy, et al. (1995). "3-Hydroxyanthranilic acid oxygenase-containing astrocytic processes surround glutamate-containing axon terminals in the rat striatum." J Neurosci **15**(2): 1150-61.
Robinson, M. B. and L. A. Dowd (1997). "Heterogeneity and functional properties of subtypes of sodium-dependent glutamate transporters in the mammalian central nervous system." Adv Pharmacol **37**: 69-115.
Rodgers, R. J., B. J. Cao, et al. (1997). "Animal models of anxiety: an ethological perspective." Braz J Med Biol Res **30**(3): 289-304.
Rodgers, R. J., J. Haller, et al. (1999). "Corticosterone response to the plus-maze: high correlation with risk assessment in rats and mice." Physiol Behav **68**(1-2): 47-53.
Rodgers, R. J. and N. J. Johnson (1995). "Factor analysis of spatiotemporal and ethological measures in the murine elevated plus-maze test of anxiety." Pharmacol Biochem Behav **52**(2): 297-303.
Roldan, E., R. Alvarez-Pelaez, et al. (1974). "Electrographic study of the amygdaloid defense response." Physiol Behav **13**(6): 779-87.
Rosenberg, D. R., F. P. Macmaster, et al. (2005). "Reduced anterior cingulate glutamate in pediatric major depression: a magnetic resonance spectroscopy study." Biol Psychiatry **58**(9): 700-4.
Rosenberg, D. R., Y. Mirza, et al. (2004). "Reduced anterior cingulate glutamatergic concentrations in childhood OCD and major depression versus healthy controls." J Am Acad Child Adolesc Psychiatry **43**(9): 1146-53.
Rosenzweig-Lipson, S., A. Sabb, et al. (2007). "Antidepressant-like effects of the novel, selective, 5-HT2C receptor agonist WAY-163909 in rodents." Psychopharmacology (Berl) **192**(2): 159-70.
Rothwell, N. J. and S. J. Hopkins (1995). "Cytokines and the nervous system II: Actions and mechanisms of action." Trends Neurosci **18**(3): 130-6.
Roy, A., D. Pickar, et al. (1988). "Norepinephrine and its metabolites in cerebrospinal fluid, plasma, and urine. Relationship to hypothalamic-pituitary-adrenal axis function in depression." Arch Gen Psychiatry **45**(9): 849-57.

Roy, E. J., O. Takikawa, et al. (2005). "Neuronal localization of indoleamine 2,3-dioxygenase in mice." Neurosci Lett **387**(2): 95-9.
Royall, D. R. (1999). "Frontal systems impairment in major depression." Semin Clin Neuropsychiatry **4**(1): 13-23.
Rubino, T., D. Vigano, et al. (2008). "Chronic delta 9-tetrahydrocannabinol during adolescence provokes sex-dependent changes in the emotional profile in adult rats: behavioral and biochemical correlates." Neuropsychopharmacology **33**(11): 2760-71.
Rudolph, U. and H. Mohler (2004). "Analysis of GABAA receptor function and dissection of the pharmacology of benzodiazepines and general anesthetics through mouse genetics." Annu Rev Pharmacol Toxicol **44**: 475-98.
Rueter, L. E., C. A. Fornal, et al. (1997). "A critical review of 5-HT brain microdialysis and behavior." Rev Neurosci **8**(2): 117-37.
Rueter, L. E. and B. L. Jacobs (1996). "A microdialysis examination of serotonin release in the rat forebrain induced by behavioral/environmental manipulations." Brain Res **739**(1-2): 57-69.
Ruis, M. A., J. H. te Brake, et al. (2001). "Adaptation to social isolation. Acute and long-term stress responses of growing gilts with different coping characteristics." Physiol Behav **73**(4): 541-51.
Rusch, B. D., H. C. Abercrombie, et al. (2001). "Hippocampal morphometry in depressed patients and control subjects: relations to anxiety symptoms." Biol Psychiatry **50**(12): 960-4.
Ryan, B. C. and J. G. Vandenbergh (2002). "Intrauterine position effects." Neurosci Biobehav Rev **26**(6): 665-78.
Ryu, J. K., H. B. Choi, et al. (2006). "Combined minocycline plus pyruvate treatment enhances effects of each agent to inhibit inflammation, oxidative damage, and neuronal loss in an excitotoxic animal model of Huntington's disease." Neuroscience **141**(4): 1835-48.
Sachser, N., M. Durschlag, et al. (1998). "Social relationships and the management of stress." Psychoneuroendocrinology **23**(8): 891-904.
Sacre, S., M. Medghalchi, et al. (2010). "Fluoxetine and citalopram exhibit potent antiinflammatory activity in human and murine models of rheumatoid arthritis and inhibit toll-like receptors." Arthritis Rheum **62**(3): 683-93.
Sahay, A. and R. Hen (2007). "Adult hippocampal neurogenesis in depression." Nat Neurosci **10**(9): 1110-5.
Sahay, A. and R. Hen (2008). "Hippocampal neurogenesis and depression." Novartis Found Symp **289**: 152-60; discussion 160-4, 193-5.
Saito, K., J. S. Crowley, et al. (1993). "A mechanism for increased quinolinic acid formation following acute systemic immune stimulation." J Biol Chem **268**(21): 15496-503.
Saito, K., S. P. Markey, et al. (1992). "Effects of immune activation on quinolinic acid and neuroactive kynurenines in the mouse." Neuroscience **51**(1): 25-39.
Salas, R. and M. De Biasi (2008). "Opposing actions of chronic stress and chronic nicotine on striatal function in mice." Neurosci Lett **440**(1): 32-4.
Salas, R., F. Pieri, et al. (2003). "Altered anxiety-related responses in mutant mice lacking the beta4 subunit of the nicotinic receptor." J Neurosci **23**(15): 6255-63.
Salome, N., J. Stemmelin, et al. (2006). "Selective blockade of NK2 or NK3 receptors produces anxiolytic- and antidepressant-like effects in gerbils." Pharmacol Biochem Behav **83**(4): 533-9.
Salter, M., R. Hazelwood, et al. (1995). "The effects of a novel and selective inhibitor of tryptophan 2,3-dioxygenase on tryptophan and serotonin metabolism in the rat." Biochem Pharmacol **49**(10): 1435-42.
Salter, M., R. G. Knowles, et al. (1989). "How does displacement of albumin-bound tryptophan cause sustained increases in the free tryptophan concentration in plasma and 5-hydroxytryptamine synthesis in brain?" Biochem J **262**(1): 365-8.
Salter, M. and C. I. Pogson (1985). "The role of tryptophan 2,3-dioxygenase in the hormonal control of tryptophan metabolism in isolated rat liver cells. Effects of glucocorticoids and experimental diabetes." Biochem J **229**(2): 499-504.
Samsonova, M. L. and I. P. Lapin (1973). "Antidepressants and liver tryptophan pyrrolase activity." Biochem Pharmacol **22**(12): 1499-507.
Sanacora, G., R. Gueorguieva, et al. (2004). "Subtype-specific alterations of gamma-aminobutyric acid and glutamate in patients with major depression." Arch Gen Psychiatry **61**(7): 705-13.
Sanacora, G., S. F. Kendell, et al. (2007). "Preliminary evidence of riluzole efficacy in antidepressant-treated patients with residual depressive symptoms." Biol Psychiatry **61**(6): 822-5.

Sanacora, G., C. A. Zarate, et al. (2008). "Targeting the glutamatergic system to develop novel, improved therapeutics for mood disorders." Nat Rev Drug Discov **7**(5): 426-37.
Sandi, C., J. C. Cambronero, et al. (1992). "Effects of HPA hormones on adapted lymphocyte responsiveness to repeated stress." Brain Res Bull **28**(4): 581-5.
Santamaria, A., S. Galvan-Arzate, et al. (2001). "Quinolinic acid induces oxidative stress in rat brain synaptosomes." Neuroreport **12**(4): 871-4.
Santamaria, A., M. E. Jimenez-Capdeville, et al. (2001). "In vivo hydroxyl radical formation after quinolinic acid infusion into rat corpus striatum." Neuroreport **12**(12): 2693-6.
Santamaria, A. and C. Rios (1993). "MK-801, an N-methyl-D-aspartate receptor antagonist, blocks quinolinic acid-induced lipid peroxidation in rat corpus striatum." Neurosci Lett **159**(1-2): 51-4.
Santamaria, A., D. Santamaria, et al. (1997). "Effects of N omega-nitro-L-arginine and L-arginine on quinolinic acid-induced lipid peroxidation." Toxicol Lett **93**(2-3): 117-24.
Santarelli, L., G. Gobbi, et al. (2001). "Genetic and pharmacological disruption of neurokinin 1 receptor function decreases anxiety-related behaviors and increases serotonergic function." Proc Natl Acad Sci U S A **98**(4): 1912-7.
Santarelli, L., M. Saxe, et al. (2003). "Requirement of hippocampal neurogenesis for the behavioral effects of antidepressants." Science **301**(5634): 805-9.
Sapko, M. T., P. Guidetti, et al. (2006). "Endogenous kynurenate controls the vulnerability of striatal neurons to quinolinate: Implications for Huntington's disease." Exp Neurol **197**(1): 31-40.
Sapolsky, R., C. Rivier, et al. (1987). "Interleukin-1 stimulates the secretion of hypothalamic corticotropin-releasing factor." Science **238**(4826): 522-4.
Sapolsky, R. M. (1999). "Glucocorticoids, stress, and their adverse neurological effects: relevance to aging." Exp Gerontol **34**(6): 721-32.
Sapolsky, R. M. (2000). "Glucocorticoids and hippocampal atrophy in neuropsychiatric disorders." Arch Gen Psychiatry **57**(10): 925-35.
Sapolsky, R. M. (2003). "Stress and plasticity in the limbic system." Neurochem Res **28**(11): 1735-42.
Sapolsky, R. M. (2004). "Is impaired neurogenesis relevant to the affective symptoms of depression?" Biol Psychiatry **56**(3): 137-9.
Sapolsky, R. M., M. P. Armanini, et al. (1989). "Elevation of hypophysial portal concentrations of adrenocorticotropin secretagogues after fornix transection." Endocrinology **125**(6): 2881-7.
Sardar, A. M., J. E. Bell, et al. (1995). "Increased concentrations of the neurotoxin 3-hydroxykynurenine in the frontal cortex of HIV-1-positive patients." J Neurochem **64**(2): 932-5.
Sardar, A. M. and G. P. Reynolds (1995). "Frontal cortex indoleamine-2,3-dioxygenase activity is increased in HIV-1-associated dementia." Neurosci Lett **187**(1): 9-12.
Sawchenko, P. E., H. Y. Li, et al. (2000). "Circuits and mechanisms governing hypothalamic responses to stress: a tale of two paradigms." Prog Brain Res **122**: 61-78.
Saylam, C., H. Ucerler, et al. (2006). "Reduced hippocampal volume in drug-free depressed patients." Surg Radiol Anat **28**(1): 82-7.
Scharfman, H. E., J. H. Goodman, et al. (2000). "Electrophysiological effects of exogenous and endogenous kynurenic acid in the rat brain: studies in vivo and in vitro." Amino Acids **19**(1): 283-97.
Scharfman, H. E., P. S. Hodgkins, et al. (1999). "Quantitative differences in the effects of de novo produced and exogenous kynurenic acid in rat brain slices." Neurosci Lett **274**(2): 111-4.
Schedlowski, M., A. Falk, et al. (1993). "Catecholamines induce alterations of distribution and activity of human natural killer (NK) cells." J Clin Immunol **13**(5): 344-51.
Schiepers, O. J., M. C. Wichers, et al. (2005). "Cytokines and major depression." Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry **29**(2): 201-17.
Schloesser, R. J., H. K. Manji, et al. (2009). "Suppression of adult neurogenesis leads to an increased hypothalamo-pituitary-adrenal axis response." Neuroreport **20**(6): 553-7.
Schmid, W., G. Scherer, et al. (1982). "Isolation and characterization of the rat tryptophan oxygenase gene." EMBO J **1**(10): 1287-93.
Schmidt, E. D., R. Binnekade, et al. (1996). "Short stressor induced long-lasting increases of vasopressin stores in hypothalamic corticotropin-releasing hormone (CRH) neurons in adult rats." J Neuroendocrinol **8**(9): 703-12.
Schmidt, E. D., A. W. Janszen, et al. (1995). "Interleukin-1-induced long-lasting changes in hypothalamic corticotropin-releasing hormone (CRH)--neurons and hyperresponsiveness of the hypothalamus-pituitary-adrenal axis." J Neurosci **15**(11): 7417-26.

Schmidt, W., P. Guidetti, et al. (1993). "Characterization of human brain kynurenine aminotransferases using [3H]kynurenine as a substrate." Neuroscience **55**(1): 177-84.
Schrocksnadel, K., B. Widner, et al. (2003). "Longitudinal study of tryptophan degradation during and after pregnancy." Life Sci **72**(7): 785-93.
Schrocksnadel, K., B. Wirleitner, et al. (2006). "Monitoring tryptophan metabolism in chronic immune activation." Clin Chim Acta **364**(1-2): 82-90.
Schroecksnadel, K., S. Kaser, et al. (2003). "Increased degradation of tryptophan in blood of patients with rheumatoid arthritis." J Rheumatol **30**(9): 1935-9.
Schroeder, K. E., K. Narkiewicz, et al. (2000). "Personality type and neural circulatory control." Hypertension **36**(5): 830-3.
Schroten, H., B. Spors, et al. (2001). "Potential role of human brain microvascular endothelial cells in the pathogenesis of brain abscess: inhibition of Staphylococcus aureus by activation of indoleamine 2,3-dioxygenase." Neuropediatrics **32**(4): 206-10.
Schuck, P. F., A. Tonin, et al. (2007). "In vitro effect of quinolinic acid on energy metabolism in brain of young rats." Neurosci Res **57**(2): 277-88.
Schuck, P. F., A. Tonin, et al. (2007). "Kynurenines impair energy metabolism in rat cerebral cortex." Cell Mol Neurobiol **27**(1): 147-60.
Schulenburg, H., C. L. Kurz, et al. (2004). "Evolution of the innate immune system: the worm perspective." Immunol Rev **198**: 36-58.
Schuster, J. P. and G. A. Schaub (2001). "Experimental Chagas disease: the influence of sex and psychoneuroimmunological factors." Parasitol Res **87**(12): 994-1000.
Schutz, G., E. Chow, et al. (1972). "Regulatory properties of hepatic tryptophan oxygenase." J Biol Chem **247**(17): 5333-7.
Schwarcz, R., A. C. Foster, et al. (1984). "Excitotoxic models for neurodegenerative disorders." Life Sci **35**(1): 19-32.
Schwarcz, R., E. Okuno, et al. (1988). "3-Hydroxyanthranilate oxygenase activity is increased in the brains of Huntington disease victims." Proc Natl Acad Sci U S A **85**(11): 4079-81.
Schwarcz, R. and R. Pellicciari (2002). "Manipulation of brain kynurenines: glial targets, neuronal effects, and clinical opportunities." J Pharmacol Exp Ther **303**(1): 1-10.
Schwarcz, R., W. O. Whetsell, Jr., et al. (1983). "Quinolinic acid: an endogenous metabolite that produces axon-sparing lesions in rat brain." Science **219**(4582): 316-8.
Scott, L. V. and T. G. Dinan (1998). "Vasopressin and the regulation of hypothalamic-pituitary-adrenal axis function: implications for the pathophysiology of depression." Life Sci **62**(22): 1985-98.
Seckl, J. R. and M. C. Holmes (2007). "Mechanisms of disease: glucocorticoids, their placental metabolism and fetal 'programming' of adult pathophysiology." Nat Clin Pract Endocrinol Metab **3**(6): 479-88.
Segawa, H., Y. Fukasawa, et al. (1999). "Identification and functional characterization of a Na+-independent neutral amino acid transporter with broad substrate selectivity." J Biol Chem **274**(28): 19745-51.
Seidel, A., V. Arolt, et al. (1995). "Cytokine production and serum proteins in depression." Scand J Immunol **41**(6): 534-8.
Seligman, M. E., R. A. Rosellini, et al. (1975). "Learned helplessness in the rat: time course, immunization, and reversibility." J Comp Physiol Psychol **88**(2): 542-7.
Selkoe, D. J. (1999). "Translating cell biology into therapeutic advances in Alzheimer's disease." Nature **399**(6738 Suppl): A23-31.
Selye, H. (1956). The stress of life.
New York, McGraw - Hill.
Selye, H. (1974). Stress without distress, Lippincott Williams & Wilkins.
Seminowicz, D. A., H. S. Mayberg, et al. (2004). "Limbic-frontal circuitry in major depression: a path modeling metanalysis." Neuroimage **22**(1): 409-18.
Sgoifo, A., C. Pozzato, et al. (2001). "Cardiac autonomic responses to intermittent social conflict in rats." Physiol Behav **73**(3): 343-9.
Shanks, N. and A. W. Kusnecov (1998). "Differential immune reactivity to stress in BALB/cByJ and C57BL/6J mice: in vivo dependence on macrophages." Physiol Behav **65**(1): 95-103.
Shaw, K., J. Turner, et al. (2002). "Are tryptophan and 5-hydroxytryptophan effective treatments for depression? A meta-analysis." Aust N Z J Psychiatry **36**(4): 488-91.

Shaw, K., J. Turner, et al. (2002). "Tryptophan and 5-hydroxytryptophan for depression." Cochrane Database Syst Rev(1): CD003198.
Sheline, Y. I., M. H. Gado, et al. (2003). "Untreated depression and hippocampal volume loss." Am J Psychiatry **160**(8): 1516-8.
Sheridan, J. F., N. G. Feng, et al. (1991). "Restraint stress differentially affects anti-viral cellular and humoral immune responses in mice." J Neuroimmunol **31**(3): 245-55.
Sherkheli, M. A. and S. Bano (2003). "Similar pattern of inhibition of tryptophan pyrrolase activity by fluoxetine hydrochloride in both sexes of rats." Pak J Pharm Sci **16**(2): 51-8.
Shiio, Y. and R. N. Eisenman (2003). "Histone sumoylation is associated with transcriptional repression." Proc Natl Acad Sci U S A **100**(23): 13225-30.
Shilatifard, A. (2006). "Chromatin modifications by methylation and ubiquitination: implications in the regulation of gene expression." Annu Rev Biochem **75**: 243-69.
Shimizu, T., S. Nomiyama, et al. (1978). "Indoleamine 2,3-dioxygenase. Purification and some properties." J Biol Chem **253**(13): 4700-6.
Shippenberg, T. S., A. LeFevour, et al. (2008). "Targeting endogenous mu- and delta-opioid receptor systems for the treatment of drug addiction." CNS Neurol Disord Drug Targets **7**(5): 442-53.
Shirayama, Y., H. Ishida, et al. (2004). "Stress increases dynorphin immunoreactivity in limbic brain regions and dynorphin antagonism produces antidepressant-like effects." J Neurochem **90**(5): 1258-68.
Shirayama, Y., H. Mitsushio, et al. (1996). "Reduction of substance P after chronic antidepressants treatment in the striatum, substantia nigra and amygdala of the rat." Brain Res **739**(1-2): 70-8.
Shurin, M. R., A. W. Kusnecov, et al. (1995). "Effect of a conditioned aversive stimulus on the immune response in three strains of rats." Psychoneuroendocrinology **20**(8): 837-49.
Sibille, E., Y. Wang, et al. (2009). "A molecular signature of depression in the amygdala." Am J Psychiatry **166**(9): 1011-24.
Siever, L. J. and K. L. Davis (1985). "Overview: toward a dysregulation hypothesis of depression." Am J Psychiatry **142**(9): 1017-31.
Simon, A. B. and J. M. Gorman (2006). "Advances in the treatment of anxiety: targeting glutamate." NeuroRx **3**(1): 57-68.
Simon, N. M., K. McNamara, et al. (2008). "A detailed examination of cytokine abnormalities in Major Depressive Disorder." Eur Neuropsychopharmacol **18**(3): 230-3.
Sitaramam, V. and T. Ramasarma (1975). "Nature of induction of tryptophan pyrrolase in cold exposure." J Appl Physiol **38**(2): 245-9.
Skolnick, P., P. Popik, et al. (2009). "Glutamate-based antidepressants: 20 years on." Trends Pharmacol Sci **30**(11): 563-9.
Sluzewska, A., J. K. Rybakowski, et al. (1995). "Interleukin-6 serum levels in depressed patients before and after treatment with fluoxetine." Ann N Y Acad Sci **762**: 474-6.
Smith, A. J., R. A. Smith, et al. (2009). "5-Hydroxyanthranilic acid, a tryptophan metabolite, generates oxidative stress and neuronal death via p38 activation in cultured cerebellar granule neurones." Neurotox Res **15**(4): 303-10.
Smith, R. S. (1991). "The macrophage theory of depression." Med Hypotheses **35**(4): 298-306.
Snaith, P. (1993). "Anhedonia: a neglected symptom of psychopathology." Psychol Med **23**(4): 957-66.
Soares, J. C. and J. J. Mann (1997). "The anatomy of mood disorders--review of structural neuroimaging studies." Biol Psychiatry **41**(1): 86-106.
Song, C., A. Lin, et al. (1998). "The inflammatory response system and the availability of plasma tryptophan in patients with primary sleep disorders and major depression." J Affect Disord **49**(3): 211-9.
Sourkes, T. L. (1971). "Alpha-methyltryptophan and its actions on tryptophan metabolism." Fed Proc **30**(3): 897-903.
Southgate, G. S., S. Daya, et al. (1998). "Melatonin plays a protective role in quinolinic acid-induced neurotoxicity in the rat hippocampus." J Chem Neuroanat **14**(3-4): 151-6.
Spano, P. F., K. Szyszka, et al. (1974). "Effect of clofibrate on free and total tryptophan in serum and brain tryptophan metabolism." Pharmacol Res Commun **6**(2): 163-73.
Spreux-Varoquaux, O., J. C. Alvarez, et al. (2001). "Differential abnormalities in plasma 5-HIAA and platelet serotonin concentrations in violent suicide attempters: relationships with impulsivity and depression." Life Sci **69**(6): 647-57.

Stahl, S. M. and D. D. Wise (2008). "The potential role of a corticotropin-releasing factor receptor-1 antagonist in psychiatric disorders." CNS Spectr **13**(6): 467-83.
Stahn, C. and F. Buttgereit (2008). "Genomic and nongenomic effects of glucocorticoids." Nat Clin Pract Rheumatol **4**(10): 525-33.
Stark, J. L., R. Avitsur, et al. (2002). "Interleukin-6 and the development of social disruption-induced glucocorticoid resistance." J Neuroimmunol **124**(1-2): 9-15.
Stark, J. L., R. Avitsur, et al. (2001). "Social stress induces glucocorticoid resistance in macrophages." Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol **280**(6): R1799-805.
Steckler, T., F. Holsboer, et al. (1999). "Glucocorticoids and depression." Baillieres Best Pract Res Clin Endocrinol Metab **13**(4): 597-614.
Steenbergen, H. L., R. P. Heinsbroek, et al. (1989). "Sex-dependent effects of inescapable shock administration on behavior and subsequent escape performance in rats." Physiol Behav **45**(4): 781-7.
Stefanski, V. (1998). "Social stress in loser rats: opposite immunological effects in submissive and subdominant males." Physiol Behav **63**(4): 605-13.
Steinbusch, H. W., A. A. Verhofstad, et al. (1981). "Immunohistochemical characterization of monoamine-containing neurons in the central nervous system by antibodies to serotonin and noradrenalin. A study in the rat and the lamprey (Lampetra fluviatilis)." Acta Histochem Suppl **24**: 107-22.
Steiner, M. A., K. Wanisch, et al. (2008). "Impaired cannabinoid receptor type 1 signaling interferes with stress-coping behavior in mice." Pharmacogenomics J **8**(3): 196-208.
Stephan, M. M., M. A. Chen, et al. (1997). "An extracellular loop region of the serotonin transporter may be involved in the translocation mechanism." Biochemistry **36**(6): 1322-8.
Steptoe, A., M. Hamer, et al. (2007). "The effects of acute psychological stress on circulating inflammatory factors in humans: a review and meta-analysis." Brain Behav Immun **21**(7): 901-12.
Steptoe, A., G. Willemsen, et al. (2001). "Acute mental stress elicits delayed increases in circulating inflammatory cytokine levels." Clin Sci (Lond) **101**(2): 185-92.
Sterlemann, V., K. Ganea, et al. (2008). "Long-term behavioral and neuroendocrine alterations following chronic social stress in mice: implications for stress-related disorders." Horm Behav **53**(2): 386-94.
Steru, L., R. Chermat, et al. (1987). "The automated Tail Suspension Test: a computerized device which differentiates psychotropic drugs." Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry **11**(6): 659-71.
Steru, L., R. Chermat, et al. (1985). "The tail suspension test: a new method for screening antidepressants in mice." Psychopharmacology (Berl) **85**(3): 367-70.
Stone, T. W. (1993). "Neuropharmacology of quinolinic and kynurenic acids." Pharmacol Rev **45**(3): 309-79.
Stone, T. W. (2001). "Kynurenic acid antagonists and kynurenine pathway inhibitors." Expert Opin Investig Drugs **10**(4): 633-45.
Stone, T. W. (2001). "Kynurenines in the CNS: from endogenous obscurity to therapeutic importance." Prog Neurobiol **64**(2): 185-218.
Stone, T. W., W. M. Behan, et al. (2000). "Possible mediation of quinolinic acid-induced hippocampal damage by reactive oxygen species." Amino Acids **19**(1): 275-81.
Stone, T. W. and N. R. Burton (1988). "NMDA receptors and ligands in the vertebrate CNS." Prog Neurobiol **30**(4): 333-68.
Stone, T. W., J. H. Connick, et al. (1987). "Endogenous excitotoxic agents." Ciba Found Symp **126**: 204-20.
Stone, T. W. and L. G. Darlington (2002). "Endogenous kynurenines as targets for drug discovery and development." Nat Rev Drug Discov **1**(8): 609-20.
Stone, T. W. and M. N. Perkins (1981). "Quinolinic acid: a potent endogenous excitant at amino acid receptors in CNS." Eur J Pharmacol **72**(4): 411-2.
Stowell, J. R., J. K. Kiecolt-Glaser, et al. (2001). "Perceived stress and cellular immunity: when coping counts." J Behav Med **24**(4): 323-39.
Stoy, N., G. M. Mackay, et al. (2005). "Tryptophan metabolism and oxidative stress in patients with Huntington's disease." J Neurochem **93**(3): 611-23.
Strekalova, T., R. Spanagel, et al. (2005). "Stress-induced hyperlocomotion as a confounding factor in anxiety and depression models in mice." Behav Pharmacol **16**(3): 171-80.

Strekalova, T. and H. W. Steinbusch (2010). "Measuring behavior in mice with chronic stress depression paradigm." Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry **34**(2): 348-61.
Sullivan, P. F., M. C. Neale, et al. (2000). "Genetic epidemiology of major depression: review and meta-analysis." Am J Psychiatry **157**(10): 1552-62.
Sullivan, R. M. and A. Gratton (1999). "Lateralized effects of medial prefrontal cortex lesions on neuroendocrine and autonomic stress responses in rats." J Neurosci **19**(7): 2834-40.
Surget, A. and C. Belzung (2008). "Involvement of vasopressin in affective disorders." Eur J Pharmacol **583**(2-3): 340-9.
Surget, A., M. Saxe, et al. (2008). "Drug-dependent requirement of hippocampal neurogenesis in a model of depression and of antidepressant reversal." Biol Psychiatry **64**(4): 293-301.
Surget, A., A. Tanti, et al. (Soumis). "Adult-generated hippocampal neurons contribute to regulation of the stress system."
Surget, A., Y. Wang, et al. (2009). "Corticolimbic transcriptome changes are state-dependent and region-specific in a rodent model of depression and of antidepressant reversal." Neuropsychopharmacology **34**(6): 1363-80.
Suzuki, S., S. Tone, et al. (2001). "Expression of indoleamine 2,3-dioxygenase and tryptophan 2,3-dioxygenase in early concepti." Biochem J **355**(Pt 2): 425-9.
Svingos, A. L., E. E. Colago, et al. (1999). "Cellular sites for dynorphin activation of kappa-opioid receptors in the rat nucleus accumbens shell." J Neurosci **19**(5): 1804-13.
Swardfager, W., N. Herrmann, et al. (2009). "Indoleamine 2,3-dioxygenase activation and depressive symptoms in patients with coronary artery disease." Psychoneuroendocrinology.
Swartz, K. J., M. J. During, et al. (1990). "Cerebral synthesis and release of kynurenic acid: an endogenous antagonist of excitatory amino acid receptors." J Neurosci **10**(9): 2965-73.
Szymanska, M., B. Budziszewska, et al. (2009). "The effect of antidepressant drugs on the HPA axis activity, glucocorticoid receptor level and FKBP51 concentration in prenatally stressed rats." Psychoneuroendocrinology **34**(6): 822-32.
Tagliamonte, A., G. Biggio, et al. (1973). "Increase of brain tryptophan and stimulation of serotonin synthesis by salicylate." J Neurochem **20**(3): 909-12.
Taher, Y. A., B. J. Piavaux, et al. (2008). "Indoleamine 2,3-dioxygenase-dependent tryptophan metabolites contribute to tolerance induction during allergen immunotherapy in a mouse model." J Allergy Clin Immunol **121**(4): 983-91 e2.
Takahashi, E., M. Katayama, et al. (2008). "Additive subthreshold dose effects of cannabinoid CB(1) receptor antagonist and selective serotonin reuptake inhibitor in antidepressant behavioral tests." Eur J Pharmacol **589**(1-3): 149-56.
Takahashi, L. K. and N. H. Kalin (1991). "Early developmental and temporal characteristics of stress-induced secretion of pituitary-adrenal hormones in prenatally stressed rat pups." Brain Res **558**(1): 75-8.
Takaki, A., Q. H. Huang, et al. (1994). "Immobilization stress may increase plasma interleukin-6 via central and peripheral catecholamines." Neuroimmunomodulation **1**(6): 335-42.
Takeuchi, F., R. Tsubouchi, et al. (1995). "Amino-acid sequence of rat liver kynureninase." Biochim Biophys Acta **1252**(2): 185-8.
Takikawa, O., R. Yoshida, et al. (1986). "Tryptophan degradation in mice initiated by indoleamine 2,3-dioxygenase." J Biol Chem **261**(8): 3648-53.
Tanaka, T. and W. E. Knox (1959). "The nature and mechanism of the tryptophan pyrrolase (peroxidase-oxidase) reaction of Pseudomonas and of rat liver." J Biol Chem **234**(5): 1162-70.
Tarullo, A. R. and M. R. Gunnar (2006). "Child maltreatment and the developing HPA axis." Horm Behav **50**(4): 632-9.
Tashiro, A., H. Makino, et al. (2007). "Experience-specific functional modification of the dentate gyrus through adult neurogenesis: a critical period during an immature stage." J Neurosci **27**(12): 3252-9.
Tashiro, M., K. Tsukada, et al. (1961). "A new pathway of D-tryptophan metabolism: enzymic formation of kynurenic acid via D-kynurenine." Biochem Biophys Res Commun **6**: 155-60.
Tatter, S. B., W. R. Galpern, et al. (1995). "Effects of striatal excitotoxicity on huntingtin-like immunoreactivity." Neuroreport **6**(8): 1125-9.
Tavares, R. G., A. P. Schmidt, et al. (2005). "In vivo quinolinic acid increases synaptosomal glutamate release in rats: reversal by guanosine." Neurochem Res **30**(4): 439-44.

Tavares, R. G., C. I. Tasca, et al. (2002). "Quinolinic acid stimulates synaptosomal glutamate release and inhibits glutamate uptake into astrocytes." Neurochem Int **40**(7): 621-7.
Tavares, R. G., C. I. Tasca, et al. (2000). "Quinolinic acid inhibits glutamate uptake into synaptic vesicles from rat brain." Neuroreport **11**(2): 249-53.
Taylor, M. W. and G. S. Feng (1991). "Relationship between interferon-gamma, indoleamine 2,3-dioxygenase, and tryptophan catabolism." FASEB J **5**(11): 2516-22.
Taylor, W. D., D. C. Steffens, et al. (2005). "Influence of serotonin transporter promoter region polymorphisms on hippocampal volumes in late-life depression." Arch Gen Psychiatry **62**(5): 537-44.
Thomas, S. R., D. Mohr, et al. (1994). "Nitric oxide inhibits indoleamine 2,3-dioxygenase activity in interferon-gamma primed mononuclear phagocytes." J Biol Chem **269**(20): 14457-64.
Thomas, S. R., A. C. Terentis, et al. (2007). "Post-translational regulation of human indoleamine 2,3-dioxygenase activity by nitric oxide." J Biol Chem **282**(33): 23778-87.
Thrivikraman, K. V., Y. Su, et al. (1997). "Patterns of Fos-Immunoreactivity in the CNS Induced by Repeated Hemorrhage in Conscious Rats: Correlations with Pituitary-Adrenal Axis Activity." Stress **2**(2): 145-158.
Tilders, F. J. and E. D. Schmidt (1999). "Cross-sensitization between immune and non-immune stressors. A role in the etiology of depression?" Adv Exp Med Biol **461**: 179-97.
Toma, S., M. Nakamura, et al. (1997). "Cloning and recombinant expression of rat and human kynureninase." FEBS Lett **408**(1): 5-10.
Tork, I. (1990). "Anatomy of the serotonergic system." Ann N Y Acad Sci **600**: 9-34; discussion 34-5.
Torres, I. L., G. D. Gamaro, et al. (2002). "Effects of chronic restraint stress on feeding behavior and on monoamine levels in different brain structures in rats." Neurochem Res **27**(6): 519-25.
Torres, K. C., L. R. Antonelli, et al. (2005). "Norepinephrine, dopamine and dexamethasone modulate discrete leukocyte subpopulations and cytokine profiles from human PBMC." J Neuroimmunol **166**(1-2): 144-57.
Touma, C., R. Palme, et al. (2004). "Analyzing corticosterone metabolites in fecal samples of mice: a noninvasive technique to monitor stress hormones." Horm Behav **45**(1): 10-22.
Touma, C., N. Sachser, et al. (2003). "Effects of sex and time of day on metabolism and excretion of corticosterone in urine and feces of mice." Gen Comp Endocrinol **130**(3): 267-78.
Touret, M., K. Kitahama, et al. (1987). "5-Hydroxytryptophan (5-HTP)-immunoreactive neurons in the rat brain tissue." Neurosci Lett **80**(3): 263-7.
Tronche, F., C. Kellendonk, et al. (1999). "Disruption of the glucocorticoid receptor gene in the nervous system results in reduced anxiety." Nat Genet **23**(1): 99-103.
Tsankova, N. M., O. Berton, et al. (2006). "Sustained hippocampal chromatin regulation in a mouse model of depression and antidepressant action." Nat Neurosci **9**(4): 519-25.
Tsao, C. W., Y. S. Lin, et al. (2006). "Cytokines and serotonin transporter in patients with major depression." Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry **30**(5): 899-905.
Tuglu, C., S. H. Kara, et al. (2003). "Increased serum tumor necrosis factor-alpha levels and treatment response in major depressive disorder." Psychopharmacology (Berl) **170**(4): 429-33.
Turner, E. H., J. M. Loftis, et al. (2006). "Serotonin a la carte: supplementation with the serotonin precursor 5-hydroxytryptophan." Pharmacol Ther **109**(3): 325-38.
Turrin, N. P., D. Gayle, et al. (2001). "Pro-inflammatory and anti-inflammatory cytokine mRNA induction in the periphery and brain following intraperitoneal administration of bacterial lipopolysaccharide." Brain Res Bull **54**(4): 443-53.
Turski, W. A., M. Nakamura, et al. (1988). "Identification and quantification of kynurenic acid in human brain tissue." Brain Res **454**(1-2): 164-9.
Twarog, B. M. and I. H. Page (1953). "Serotonin content of some mammalian tissues and urine and a method for its determination." Am J Physiol **175**(1): 157-61.
Tynan, R. J., S. Naicker, et al. (2010). "Chronic stress alters the density and morphology of microglia in a subset of stress-responsive brain regions." Brain Behav Immun **24**(7): 1058-68.
Ulrich-Lai, Y. M. and J. P. Herman (2009). "Neural regulation of endocrine and autonomic stress responses." Nat Rev Neurosci **10**(6): 397-409.
Ulrich-Lai, Y. M., W. Xie, et al. (2006). "Limbic and HPA axis function in an animal model of chronic neuropathic pain." Physiol Behav **88**(1-2): 67-76.
Uriguen, L., S. Perez-Rial, et al. (2004). "Impaired action of anxiolytic drugs in mice deficient in cannabinoid CB1 receptors." Neuropharmacology **46**(7): 966-73.

Usdin, E., R. Kretnansky, et al. (1976). Catecholamines and stress. Oxford, Pergamon press.
Vakili, K., S. S. Pillay, et al. (2000). "Hippocampal volume in primary unipolar major depression: a magnetic resonance imaging study." Biol Psychiatry **47**(12): 1087-90.
Vallee, M., S. MacCari, et al. (1999). "Long-term effects of prenatal stress and postnatal handling on age-related glucocorticoid secretion and cognitive performance: a longitudinal study in the rat." Eur J Neurosci **11**(8): 2906-16.
Van Gool, A. R., W. H. Kruit, et al. (2003). "Neuropsychiatric side effects of interferon-alfa therapy." Pharm World Sci **25**(1): 11-20.
Van Lieshout, R. J. and L. P. Voruganti (2008). "Diabetes mellitus during pregnancy and increased risk of schizophrenia in offspring: a review of the evidence and putative mechanisms." J Psychiatry Neurosci **33**(5): 395-404.
van West, D., J. Del-Favero, et al. (2004). "A major SNP haplotype of the arginine vasopressin 1B receptor protects against recurrent major depression." Mol Psychiatry **9**(3): 287-92.
Vancassel, S., S. Leman, et al. (2008). "n-3 polyunsaturated fatty acid supplementation reverses stress-induced modifications on brain monoamine levels in mice." J Lipid Res **49**(2): 340-8.
Vanhoutte, P. M. (1995). "[Vascular endothelium and vasomotor tonus]." Rev Med Liege **50**(10): 418-26.
Varty, G. B., M. E. Cohen-Williams, et al. (2003). "The antidepressant-like effects of neurokinin NK1 receptor antagonists in a gerbil tail suspension test." Behav Pharmacol **14**(1): 87-95.
Vecsei, L. and M. F. Beal (1990). "Influence of kynurenine treatment on open-field activity, elevated plus-maze, avoidance behaviors and seizures in rats." Pharmacol Biochem Behav **37**(1): 71-6.
Veith, R. C., N. Lewis, et al. (1994). "Sympathetic nervous system activity in major depression. Basal and desipramine-induced alterations in plasma norepinephrine kinetics." Arch Gen Psychiatry **51**(5): 411-22.
Vekovishcheva, O. Y., I. A. Sukhotina, et al. (2000). "Co-housing in a stable hierarchical group is not aversive for dominant and subordinate individuals." Neurosci Behav Physiol **30**(2): 195-200.
Videbech, P. (2000). "PET measurements of brain glucose metabolism and blood flow in major depressive disorder: a critical review." Acta Psychiatr Scand **101**(1): 11-20.
Vignau, J., O. Costisella, et al. (2009). "[Impact of interferon alpha immunotherapy on tryptophan metabolism in patients with chronic hepatitis C. Results of a pilot studies on ten patients]." Encephale **35**(5): 477-83.
Volgraf, M., J. P. Lumb, et al. (2008). "Biomimetic synthesis of the IDO inhibitors exiguamine A and B." Nat Chem Biol **4**(9): 535-7.
vom Saal, F. S. and F. H. Bronson (1980). "Sexual characteristics of adult female mice are correlated with their blood testosterone levels during prenatal development." Science **208**(4444): 597-9.
Vrooman, L., K. Jhamandas, et al. (1993). "Picolinic acid modulates kainic acid-evoked glutamate release from the striatum in vitro." Brain Res **627**(2): 193-8.
Wade, P. A., D. Pruss, et al. (1997). "Histone acetylation: chromatin in action." Trends Biochem Sci **22**(4): 128-32.
Wadenberg, M. L. (2003). "A review of the properties of spiradoline: a potent and selective kappa-opioid receptor agonist." CNS Drug Rev **9**(2): 187-98.
Walker, D. W., B. Curtis, et al. (1999). "Kynurenic acid in brain and cerebrospinal fluid of fetal, newborn, and adult sheep and effects of placental embolization." Pediatr Res **45**(6): 820-6.
Walsh, D. M., I. Klyubin, et al. (2002). "Naturally secreted oligomers of amyloid beta protein potently inhibit hippocampal long-term potentiation in vivo." Nature **416**(6880): 535-9.
Wang, H., P. T. Wong, et al. (2005). "Cholecystokinin-2 (CCK2) receptor-mediated anxiety-like behaviors in rats." Neurosci Biobehav Rev **29**(8): 1361-73.
Wang, J. F., L. Shao, et al. (2009). "Increased oxidative stress in the anterior cingulate cortex of subjects with bipolar disorder and schizophrenia." Bipolar Disord **11**(5): 523-9.
Wang, J. W., D. J. David, et al. (2008). "Chronic fluoxetine stimulates maturation and synaptic plasticity of adult-born hippocampal granule cells." J Neurosci **28**(6): 1374-84.
Ward, I. L. and J. Weisz (1984). "Differential effects of maternal stress on circulating levels of corticosterone, progesterone, and testosterone in male and female rat fetuses and their mothers." Endocrinology **114**(5): 1635-44.
Watkins, L. R., S. F. Maier, et al. (1995). "Cytokine-to-brain communication: a review & analysis of alternative mechanisms." Life Sci **57**(11): 1011-26.
Weaver, I. C., N. Cervoni, et al. (2004). "Epigenetic programming by maternal behavior." Nat Neurosci **7**(8): 847-54.

Webster, J. I., L. Tonelli, et al. (2002). "Neuroendocrine regulation of immunity." Annu Rev Immunol **20**: 125-63.
Weidenfeld, J. and R. Yirmiya (1996). "Effects of bacterial endotoxin on the glucocorticoid feedback regulation of adrenocortical response to stress." Neuroimmunomodulation **3**(6): 352-7.
Weinstock, M., T. Poltyrev, et al. (1998). "Effect of prenatal stress on plasma corticosterone and catecholamines in response to footshock in rats." Physiol Behav **64**(4): 439-44.
Weiss, G., C. Murr, et al. (1999). "Modulation of neopterin formation and tryptophan degradation by Th1- and Th2-derived cytokines in human monocytic cells." Clin Exp Immunol **116**(3): 435-40.
Weiss, J. M. (1997). "Does decreased sucrose intake indicate loss of preference in CMS model?" Psychopharmacology (Berl) **134**(4): 368-70; discussion 371-7.
Weissmann, D., M. F. Belin, et al. (1987). "Immunohistochemistry of tryptophan hydroxylase in the rat brain." Neuroscience **23**(1): 291-304.
Werner, E. R., M. Hirsch-Kauffmann, et al. (1987). "Interferon-gamma-induced degradation of tryptophan by human cells in vitro." Biol Chem Hoppe Seyler **368**(10): 1407-12.
Whetsell, W. O., Jr. and R. Schwarcz (1989). "Prolonged exposure to submicromolar concentrations of quinolinic acid causes excitotoxic damage in organotypic cultures of rat corticostriatal system." Neurosci Lett **97**(3): 271-5.
Wichers, M. C., G. H. Koek, et al. (2005). "IDO and interferon-alpha-induced depressive symptoms: a shift in hypothesis from tryptophan depletion to neurotoxicity." Mol Psychiatry **10**(6): 538-44.
Widner, B., A. Laich, et al. (2002). "Neopterin production, tryptophan degradation, and mental depression--what is the link?" Brain Behav Immun **16**(5): 590-5.
Widner, B., F. Leblhuber, et al. (1999). "Degradation of tryptophan in neurodegenerative disorders." Adv Exp Med Biol **467**: 133-8.
Widner, B., F. Leblhuber, et al. (2000). "Tryptophan degradation and immune activation in Alzheimer's disease." J Neural Transm **107**(3): 343-53.
Willner, P. (1984). "The validity of animal models of depression." Psychopharmacology (Berl) **83**(1): 1-16.
Willner, P. (1997). "Validity, reliability and utility of the chronic mild stress model of depression: a 10-year review and evaluation." Psychopharmacology (Berl) **134**(4): 319-29.
Willner, P. (2005). "Chronic mild stress (CMS) revisited: consistency and behavioural-neurobiological concordance in the effects of CMS." Neuropsychobiology **52**(2): 90-110.
Willner, P., R. Muscat, et al. (1992). "Chronic mild stress-induced anhedonia: a realistic animal model of depression." Neurosci Biobehav Rev **16**(4): 525-34.
Wirleitner, B., G. Neurauter, et al. (2003). "Interferon-gamma-induced conversion of tryptophan: immunologic and neuropsychiatric aspects." Curr Med Chem **10**(16): 1581-91.
Wirleitner, B., V. Rudzite, et al. (2003). "Immune activation and degradation of tryptophan in coronary heart disease." Eur J Clin Invest **33**(7): 550-4.
Wise, R. A. (2009). "Roles for nigrostriatal--not just mesocorticolimbic--dopamine in reward and addiction." Trends Neurosci **32**(10): 517-24.
Wolf, H. (1974). "The effect of hormones and vitamin B6 on urinary excretion of metabolites of the kynurenine pathway." Scand J Clin Lab Invest **136**: 1-186.
Wolkowitz, O. M., H. Burke, et al. (2009). "Glucocorticoids. Mood, memory, and mechanisms." Ann N Y Acad Sci **1179**: 19-40.
Wong, D. T., K. W. Perry, et al. (2005). "Case history: the discovery of fluoxetine hydrochloride (Prozac)." Nat Rev Drug Discov **4**(9): 764-74.
Wong, M. L. and J. Licinio (2001). "Research and treatment approaches to depression." Nat Rev Neurosci **2**(5): 343-51.
Wood, E. R., T. J. Bussey, et al. (1993). "A glycine antagonist 7-chlorokynurenic acid attenuates ischemia-induced learning deficits." Neuroreport **4**(2): 151-4.
Wu, H. Q., P. Guidetti, et al. (2000). "Kynurenergic manipulations influence excitatory synaptic function and excitotoxic vulnerability in the rat hippocampus in vivo." Neuroscience **97**(2): 243-51.
Wu, H. Q., E. F. Pereira, et al. (2009). "The Astrocyte-Derived alpha7 Nicotinic Receptor Antagonist Kynurenic Acid Controls Extracellular Glutamate Levels in the Prefrontal Cortex." J Mol Neurosci.
Wurtman, R. J. (2005). "Genes, stress, and depression." Metabolism **54**(5 Suppl 1): 16-9.
Wyatt, R. J., B. Portnoy, et al. (1971). "Resting plasma catecholamine concentrations in patients with depression and anxiety." Arch Gen Psychiatry **24**(1): 65-70.

Xu, F., R. R. Gainetdinov, et al. (2000). "Mice lacking the norepinephrine transporter are supersensitive to psychostimulants." Nat Neurosci **3**(5): 465-71.
Xu, Y., T. A. Day, et al. (1999). "The central amygdala modulates hypothalamic-pituitary-adrenal axis responses to systemic interleukin-1beta administration." Neuroscience **94**(1): 175-83.
Yadid, G. and A. Friedman (2008). "Dynamics of the dopaminergic system as a key component to the understanding of depression." Prog Brain Res **172**: 265-86.
Yadid, G., R. Nakash, et al. (2000). "Elucidation of the neurobiology of depression: insights from a novel genetic animal model." Prog Neurobiol **62**(4): 353-78.
Yaffe, K., T. Blackwell, et al. (1999). "Depressive symptoms and cognitive decline in nondemented elderly women: a prospective study." Arch Gen Psychiatry **56**(5): 425-30.
Yalcin, I., F. Aksu, et al. (2005). "Effects of desipramine and tramadol in a chronic mild stress model in mice are altered by yohimbine but not by pindolol." Eur J Pharmacol **514**(2-3): 165-74.
Yalcin, I., C. Belzung, et al. (2008). "Mouse strain differences in the unpredictable chronic mild stress: a four-antidepressant survey." Behav Brain Res **193**(1): 140-3.
Yalcin, I., S. Coubard, et al. (2008). "Effects of 5,7-dihydroxytryptamine lesion of the dorsal raphe nucleus on the antidepressant-like action of tramadol in the unpredictable chronic mild stress in mice." Psychopharmacology (Berl) **200**(4): 497-507.
Yee, B. K., S. W. Zhu, et al. (2007). "Levels of neurotrophic factors in the hippocampus and amygdala correlate with anxiety- and fear-related behaviour in C57BL6 mice." J Neural Transm **114**(4): 431-44.
Yeragani, V. K., R. Pohl, et al. (1991). "Heart rate variability in patients with major depression." Psychiatry Res **37**(1): 35-46.
Yirmiya, R., J. Weidenfeld, et al. (1999). "Cytokines, "depression due to a general medical condition," and antidepressant drugs." Adv Exp Med Biol **461**: 283-316.
Yue, E. W., B. Douty, et al. (2009). "Discovery of potent competitive inhibitors of indoleamine 2,3-dioxygenase with in vivo pharmacodynamic activity and efficacy in a mouse melanoma model." J Med Chem **52**(23): 7364-7.
Yun, J., H. Koike, et al. (2010). "Chronic restraint stress impairs neurogenesis and hippocampus-dependent fear memory in mice: possible involvement of a brain-specific transcription factor Npas4." J Neurochem **114**(6): 1840-51.
Zarate, C. A., Jr., J. L. Payne, et al. (2004). "An open-label trial of riluzole in patients with treatment-resistant major depression." Am J Psychiatry **161**(1): 171-4.
Zarrindast, M. R., J. Solati, et al. (2008). "Effect of intra-amygdala injection of nicotine and GABA receptor agents on anxiety-like behaviour in rats." Pharmacology **82**(4): 276-84.
Zeron, M. M., O. Hansson, et al. (2002). "Increased sensitivity to N-methyl-D-aspartate receptor-mediated excitotoxicity in a mouse model of Huntington's disease." Neuron **33**(6): 849-60.
Zhang, X., J. M. Beaulieu, et al. (2004). "Tryptophan hydroxylase-2 controls brain serotonin synthesis." Science **305**(5681): 217.
Zhao, C., W. Deng, et al. (2008). "Mechanisms and functional implications of adult neurogenesis." Cell **132**(4): 645-60.
Zhou, D., A. W. Kusnecov, et al. (1993). "Exposure to physical and psychological stressors elevates plasma interleukin 6: relationship to the activation of hypothalamic-pituitary-adrenal axis." Endocrinology **133**(6): 2523-30.
Zhu, G. F., C. Chancellor-Freeland, et al. (1996). "Endogenous substance P mediates cold water stress-induced increase in interleukin-6 secretion from peritoneal macrophages." J Neurosci **16**(11): 3745-52.
Zobel, A. W., T. Nickel, et al. (2000). "Effects of the high-affinity corticotropin-releasing hormone receptor 1 antagonist R121919 in major depression: the first 20 patients treated." J Psychiatr Res **34**(3): 171-81.
Zunszain, P. A., C. Anacker, et al. (2010). "Glucocorticoids, cytokines and brain abnormalities in depression." Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry.

*****

ANNEXES

*****

Annexe 1 : Effects of neuronal and inducible NOS inhibitor 1-[2-(trifluoromethyl) phenyl] imidazole (TRIM) in unpredictable chronic mild stress procedure in mice

Mutlu *et coll.* 2009

Publication à laquelle j'ai participée suggérant l'effet antidépresseur d'un traitement chronique par un inhibiteur des enzymes iNOS et nNOS : le TRIM.

Pharmacology, Biochemistry and Behavior 92 (2009) 82–87

Contents lists available at ScienceDirect

Pharmacology, Biochemistry and Behavior

journal homepage: www.elsevier.com/locate/pharmbiochembeh

Effects of neuronal and inducible NOS inhibitor 1-[2-(trifluoromethyl) phenyl] imidazole (TRIM) in unpredictable chronic mild stress procedure in mice

Oguz Mutlu [a,b,*], Güner Ulak [b,1], Anthony Laugeray [a,2], Catherine Belzung [a,3]

[a] INSERM U-930 FRE CNRS 2448 Université François Rabelais Tours, Faculté des Sciences et Techniques, Université François Rabelais, Parc Grandmont, F-37200 Tours, France
[b] Department of Pharmacology, Faculty of Medicine, Kocaeli University, 41380 Kocaeli, Turkey

ARTICLE INFO

Article history:
Received 11 August 2008
Received in revised form 9 October 2008
Accepted 21 October 2008
Available online 29 October 2008

Keywords:
Nitric oxide
TRIM
Antidepressant
Unpredictable chronic mild stress
Mice

ABSTRACT

Nitric oxide is an intracellular messenger which is involved in several functions and pathologies such as depression, anxiety, learning and memory. In many studies nitric oxide synthase inhibitors (NOSI) were shown to possess antidepressant-like effects in animal models of depression. The aim of this study is to investigate the effects of a selective neuronal and inducible nitric oxide synthase inhibitor TRIM (30 mg/kg/day, 35 days) in mice subjected to unpredictable chronic mild stress and then compare it's effect with a conventional selective serotonin reuptake inhibitor fluoxetine (15 mg/kg/day, 35 days). Stressed vehicle animals showed a significant disturbed coat state when compared with nonstressed animals and this effect was reversed by TRIM or fluoxetine. Both TRIM and fluoxetine prevented the stress-induced deficit in the grooming behaviour in the splash test. TRIM and fluoxetine also significantly decreased the attack frequency when compared to the stressed control group in the resident–intruder test. These results support the assumption that NOS inhibitors can be a new class of antidepressant drugs possibly acting on neuronal NOS.
© 2008 Elsevier Inc. All rights reserved.

1. Introduction

Depression is a common, chronic, recurrent and life debilitating illness with severe morbidity and mortality (Kiecolt-Glaser and Glaser, 2002). The mechanisms and brain areas underlying the pathophysiology of this disorder are not yet well understood. Clinical studies showed elevated plasma nitrate levels and increased nitric oxide synthase (NOS) expression in the hippocampus of depressed patients (De Oliveira et al., 2000, 2008).

Nitric oxide (NO), which is an important neurotransmitter in the nervous system, (Baranano et al., 2001) is synthesized from L-arginine aminoacid by the NOS enzyme (Schuman and Madison, 1994). It plays an important role in regulating many behavioural, cognitive and emotional processes such as learning, aggression, locomotion, anxiety and depression (Dzoljic et al., 1997; Harkin et al., 1999; Holscher 1997; Nelson et al., 1995; Wiley et al., 1995). In recent studies, inhibition of NOS enzyme elicited antidepressant-like behavioural effects in several animal experiments (Harkin et al., 1999; Jefferys and Funder, 1996; Da Silva et al., 2000; Yildiz et al., 2000a,b) and this effect was reversed by NOS substrate L-arginine suggesting that NO plays an important role in these behavioural responses (Harkin et al., 1999; Jefferys and Funder, 1996; Yildiz et al., 2000a,b). Further, NOS activity is involved in the mechanism of action of several antidepressants. For example, the selective serotonin reuptake inhibitor paroxetine inhibits in vitro NOS activity and decreases plasma nitrite and nitrate levels significantly in depressed patients (Finkel et al., 1996), whereas chronic therapy with imipramine or citalopram did not change NOS activity in the examined brain regions (cortex, hippocampus or cerebellum) (Jopek et al., 1999). Furthermore, Wegener et al. (2003) showed that, serotonergic antidepressants paroxetine, citalopram and tianeptine and mixed serotonergic–noradrenergic antidepressant imipramine decreased hippocampal NOS activity in vitro in rats although they don't have direct effects on NOS under clinically relevant conditions. It seems that there are controversial results for the effects of different antidepressants on NOS activity but the actions on NOS are common to a variety of structurally dissimilar serotonergic antidepressants.

The unpredictable chronic mild stress (UCMS) model is a promising and valuable animal model of depression which shows similar features to the depressive symptoms seen in human (Willner, 1997). It was also reported that, UCMS-mice exhibited a degradation in the physical coat state (Ducottet et al., 2003) and this effect was reversed by antidepressants such as fluoxetine (Ducottet et al., 2003; Santarelli et al., 2003). TRIM is a selective inhibitor of neuronal and inducible isoforms of NOS and it shows only a weak activity against endothelial

* Corresponding author. Department of Pharmacology, Faculty of Medicine, Kocaeli University, 41380 Kocaeli, Turkey. Tel.: +90 262 303 72 50; fax: +90 262 303 70 03.
E-mail addresses: mutluo@superonline.com (O. Mutlu), gunerulak@yahoo.com (G. Ulak), alaugeray@yahoo.fr (A. Laugeray), catherine.belzung@univ-tours.fr (C. Belzung).
[1] Tel.: +90 262 303 74 66.
[2] Tel.: +33 247 36 69 94.
[3] Tel.: +33 247 36 69 94.

0091-3057/$ – see front matter © 2008 Elsevier Inc. All rights reserved.
doi:10.1016/j.pbb.2008.10.013

NOS (Handy et al., 1995; 1996). In recent studies, it was shown that TRIM exerted antidepressant, anxiolytic and antinociceptive effects in rodents (Volke et al., 2003; Handy et al., 1995) and that it can be considered as an appropriate tool to clarify the role of nNOS in the central nervous system. However, these effects were experienced in a bioassay of depression, and not in a model that was mimicking the ethiopathogenic features of depression.

Literature search showed us that there had been no study investigating the effect of TRIM on depression after chronic injection in the UCMS model. This study was aimed to investigate the effects of 1-(2-trifluoromethylphenyl) imidazole (TRIM) in mice subjected to UCMS at a dose of 30 mg/kg which exhibited selectivity for inhibition of neuronal NO synthase in vitro and in vivo (Handy et al., 1995, 1996) and to compare it's effects with a conventional SSRI fluoxetine. For determining the effects of the UCMS regimen and drug therapy, coat state of the animals was recorded during UCMS. At the end of the UCMS regimen, splash and resident–intruder tests which are known to be the frequently used and effective methods to evaluate depression after UCMS model (Mineur et al., 2003; Yalcin et al., 2005, 2008) were applied to all of the animals in order to assess the ability of drugs to reverse stress-induced effects.

2. Methods

2.1. Animals

Seventy-two male, inbred BALB/c ByJ mice (Centre d'Elevage Janvier, France) aged of 7 weeks at their arrival to the laboratory were used in this study. The animals were kept in the laboratory for 2 weeks before the onset of the experiments. Animals were split into two groups: the non stressed mice and mice subjected to unpredictable chronic mild stress (UCMS) procedure. Non-stressed mice were group-housed (6 mice per cage) during the experiment while mice of the stressed group were singly-housed in cages (the dimensions: length: 268 mm, width: 135 mm, height: 81 mm) at the start of the chronic stress until the end of the study. Non-stressed mice were maintained under standard laboratory conditions (12-h-light:12-h-dark cycle, lights on at 08:00 h pm, $T=21\pm1$ C) in a separate room. All animals received food and water ad libitum. Such a group-housed control group was preferred to a singly-housing condition as social isolation is highly stressful for mice and thus should per se contribute to the chronic stress effects (Arbe et al., 2002; Muscat and Willner, 1992; Spani et al., 2003). All procedures described in this paper were conducted in accordance with European Community Council directive for the Ethical Treatment of Animals (86/609/EEC) and with the French legislation from Ministere de l'Agriculture concerning research involving animal subjects.

2.2. Experimental groups and drug administration

At the end of 2 weeks drug-free UCMS, mice were assigned to different experimental groups in a semi-randomized manner, so that the initial coat state and body weights were equivalent in all of the groups. We examined the effects of the chronic administration of TRIM and fluoxetine in stressed and non-stressed mice. Mice were randomly assigned to one of the 6 following experimental groups: non stressed NaCl ($n=11$), non stressed fluoxetine 15 mg/kg ($n=11$), non stressed TRIM 30 mg/kg ($n=12$), UCMS-ed NaCl ($n=10$), UCMS-ed fluoxetine 15 mg/kg ($n=12$), and UCMS-ed TRIM 30 mg/kg ($n=12$). All drugs were administered intraperitoneally (i.p.) every day at 11 a.m. in a volume of 0.1 ml/10 g body weight for 35 days. At the end of the UCMS, actograph, resident–intruder and splash tests were performed respectively. All of the nonstressed animals were isolated 1 day before the actograph test just like the UCMS-ed mice. Two days after the actograph test, the resident–intruder test was performed and 1 day later, the splash test was performed for all animals.

2.3. Unpredictable chronic mild stress model

The unpredictable chronic mild stress regimen used in this study was based on the procedure originally designed by Willner et al. (1992) and adapted to mice (Ducottet and Belzung, 2004). This stress model consists from repeated mild physical and psychological stressors. Mice were subjected several times a day for 7 weeks to different kinds of stressors in a chronic, inevitable and unpredictable way. Stressors were damp sawdust, changing the sawdust, placement in an empty cage or empty cage with water on the bottom (bath), periods of soiled cage with aversive odour (old rat or mice sawdust), social stress (switching the cages), cage tilting (45 °C), predator sounds for 15 min (sounds of different animals), inversion of light/dark cycle, lights on for a short time during the dark phase or lights off during the light phase, and confinement in tube (see Table 1). Stressors were administered in a pseudo-random manner, and could occur at any time of night and day. In this respect, the stressor sequence was changed every week in order to make the stress procedure unpredictable. During behavioural tests, the stress procedure was slightly modified: the number of stressors applied during the light period was reduced so as not to interfere with the tests. Non stressed mice were left undisturbed in their home cages. Ethically, stress procedure did not involve food and water deprivation or immobilization. The mice that were tested were not subjected to any stressors during 12 h before the behavioural tests, including splash test and actograph. In all experiments, the first 2 drug-free weeks of UCMS was followed by 5 UCMS applied weeks during which mice were treated with drug or vehicle. To determine the effects of the UCMS regimen and drug treatment, we examined the state of the coat in mice and performed the splash and the resident–intruder test. The actograph test was also performed to measure the locomotor activity. For further details on the procedure, see Yalcin et al. (2005).

2.4. Coat state and body weight

Before and during the UCMS, state of the coat and body weights of the animals were recorded once a week. The evaluation of the coat state was carried out by the assessment of eight different body parts: head (including eyes and nose), neck, dorsal coat, ventral coat, tail, forepaws, hindpaws and genital region (Ducottet et al., 2003; Ducottet and Belzung, 2004). A score of 0 for a coat in a good state or a score of 1 for a dirty coat (fur) or piloerection was given for each of these areas. Sum of these scores gave us an index of the general physical state of a mouse. Dirty state was characterized by a fluffy, greasy, less dense coat or piloerection. The state of the coat was evaluated by observers unaware of the treatment condition of the mice.

2.5. Splash test

This test was used to evaluate the grooming behaviour of mice. A 10% sucrose solution was squirted on the dorsal coat of mice in their homecage. The total time of grooming was recorded during 5 min after the vaporisation of sucrose solution (Ducottet and Belzung, 2004). All mice were then again placed in their home cage. The observer was unaware of the treatment conditions.

2.6. Actograph

Activity of the animals was recorded between 12 and 14 h using a photo-electric actimeter (Boissier and Simon, 1965). This test allowed us to evaluate the activity of mice in their homecage excluding the possible effects of the new environment on locomotor activity. The homecage was placed in the centre of the device, which consisted from a 20 cm×20 cm square plane with two electrical eyes. The infrared beams were placed outside of the cage at a height of 2.8 cm, sufficient to detect mice movements and elevated above the level of

Table 1
Unpredictable chronic mild stress procedure

Weeks	Monday	Tuesday	Wednesday	Thursday	Friday	Saturday	Sunday
Week 1	Coat state, weighing (9 h) Without sawdust (12h) Social stress (14h) New sawdust (16 h30)	3 sawdust changing (10–11–12 h) Damp sawdust (14 h) New sawdust (17 h)	Bain (10–11 h) Sounds of predators (15 h30) Cat hair (15–16 h) New sawdust (18 h)	Small tubes (9.30–10.30 h) 3 old sawdust changing (15–16–17 h) Without sawdust (22 h)	Cages tilt at 45° (9 h30–10 h30) New sawdust (15 h) Social stress (20 h)	Reversal of the light/ dark cycle (after 6 h) Social stress (15 h)	Reversal of the light/ dark cycle Old mice sawdust (12 h) New sawdust (20 h)
Week 2	Coat state, weighing (9 h) Cages tilt at 45° (12–14 h) Without sawdust (14 h) Small tubes (14–16 h) New sawdust (20 h)	Bain (12 h30–13 h30) Damp sawdust (15 h30–16 h30) Social stress (18–19–20 h)	Old sawdust (9 h30–11 h30) Sounds of predators (13 h) Horse hair (15 h–17 h) New sawdust (18 h)	Reversal of the light/dark cycle Social stress (10 h) Sounds of predators (12 h) Social stress (14 h, 15 h)	Small tubes (10.30–11.30 h) Old mice sawdust (16 h) New sawdust (22 h)	4 light/dark succession every 1 h (10–14.00 h) Without sawdust (14 h)	4 light/dark succession every 1 h (10–14.00 h) New sawdust (20 h)
Week 3	Coat state, weighing Treatment (11 h) Light (12–15 h) Damp sawdust (16–18 h)	Treatment (11 h) Damp sawdust (10.30–12.30 h) Without sawdust (14.30– 16.30 h)	Treatment (11 h) Cages tilt at 45° (12.30–14.30) Social stress (15, 16, 17 h)	Treatment (11 h) Reversal of the light/dark cycle (8–15 h) Damp sawdust (15–17 h)	Treatment (11 h) Without sawdust (10–12.30 h) Social stress (14–15–16 h)	Treatment (11 h) Reversal of the light/dark cycle Social stress (17 h)	Treatment (11 h) Reversal of the light/ dark cycle Damp sawdust (14– 16 h)
Week 4	Coat state, weighing Treatment (11 h) Without sawdust (13– 18 h) Dark (20–24 h)	Treatment (11 h) Damp sawdust (10.30–12.30 h) Small tubes (15–16 h)	Treatment (11 h) Cages tilt at 45° (11–14 h) Social stress (17 h)	Treatment (11 h) Without sawdust (13 h) Social stress (15 h)	Treatment (11 h) New sawdust (10 h) Social stress (15 h)	Treatment (11 h) Dark (01–04) Light (9–12)	Treatment (11 h) Dark (4–6) Light (15–17)
Week 5	Coat state, weighing Treatment (11 h) Small tubes (14–17 h)	Treatment (11 h) Old rat sawdust (10–12 h) Horse hair (14 h–16 h)	Treatment (11 h) New sawdust (10 h) Cages tilt at 45° (11 h–13 h) Old rat sawdust (14 h–17 h)	Treatment (11 h) New sawdust (10 h) Bain (10–11 h) Cat hair (13–16 h)	Treatment (11 h) Cages tilt at 45° (12–14 h) Sounds of predators (14 h30) Damp sawdust (15.30 h) New sawdust (17.30 h)	Treatment (11 h) 4 light/dark succession every 1 h (10–14 h) Without sawdust (13 h)	Treatment (11 h) 4 light/dark succession every 1 h (10–14 h) New sawdust (22 h)
Week 6	Coat state, weighing Treatment (11 h) Cages tilt at 45°(14–17 h) Sounds of predators (22 h)	Treatment (11 h) New sawdust (14 h) Old rat sawdust (16 h30) Social stress (17 h30)	Treatment (11 h) Social stress Cages tilt at 45°(14 h) Small tubes (15–17 h)	Treatment (11 h) Small tubes (12.30–13.30) Cat hair (13.30–14 h) Damp sawdust (14.30–16 h)	Treatment (11 h) New sawdust (11 h) Sawdust changing (11 h30)	Treatment (11 h) Reversal of the light/dark cycle Damp sawdust (14 h–17 h)	Treatment (11 h) Reversal of the light/ dark cycle
Week 7	Coat state, weighing (9 h) Treatment (11 h) Social stress (13, 14, 15 h) Old rat sawdust (20 h)	Treatment (11 h) New sawdust (14 h) Old rat sawdust (16.30) Social stress (17.30)	Treatment (11 h) Social stress (12 h) Cages tilt at 45° (14–16 h) New sawdust (17 h)	Treatment (11 h) Cages tilt at 45° (10 h–12 h) Without sawdust (15 h)	Treatment (11 h) New sawdust (10 h) Light (9–12 h) Bain (12–14 h) Small tubes (15–16 h)	Treatment (11 h) Reversal of the light/dark cycle Without sawdust (15 h)	Treatment (11 h) Reversal of the light/ dark cycle New sawdust (12 h) Social stress (15 h)

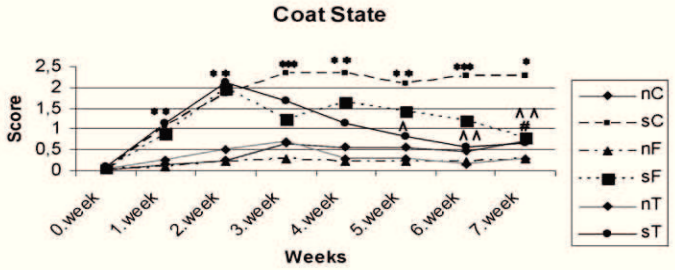


Fig. 1. Effects of fluoxetine (15 mg/kg, i.p.) and TRIM (30 mg/kg, i.p.) given for 35 days on coat state in non-stressed and stressed groups during UCMS. All of the treatments begun after 2 weeks of stress regimen and were administered during 5 weeks. Data are means ± SEM. *p<0.05, **p<0.01, ***p<0.001, difference between stressed and non stressed vehicle; ^p<0.05, ^^p<0.01 difference between stressed TRIM and stressed vehicle. # p<0.05, difference between stressed and non stressed fluoxetine group. nC = nonstressed control (vehicle) group, nF = nonstressed fluoxetine group, nT = nonstressed TRIM group, sC = stressed control (vehicle) group, sF = stressed fluoxetine group, and sT = stressed TRIM group.

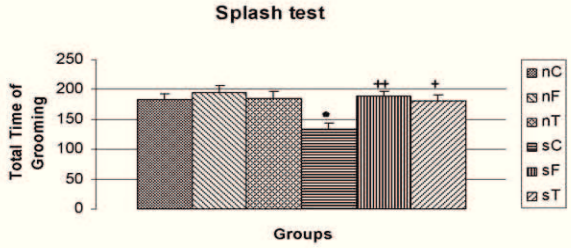


Fig. 2. Effects of fluoxetine (15 mg/kg, i.p.) and TRIM (30 mg/kg, i.p.) given for 35 days on total time of grooming in the splash test in the end of the unpredictable chronic mild stress regimen. Data are means ± SEM. *p<0.01, compared to non-stressed vehicle group, +p<0.05, ++p<0.01, compared to the stressed vehicle group. nC = nonstressed control (vehicle) group, nF = nonstressed fluoxetine group, nT = nonstressed TRIM group, sC = stressed control (vehicle) group, sF = stressed fluoxetine group, and sT = stressed TRIM group.

the sawdust in order to permit data recording. When mice crossed throughout, the movement of the animal was detected automatically.

2.7. Resident/intruder test

The resident–intruder test was carried out as previously described by Mineur et al. (2003). Non-stressed mice were isolated 48 h before the test during which the bedding was not changed in order to increase the amount of territorial cues within the cages. Mice were tested against an A/J intruder, known for it's high passivity and lack of aggression (Michard and Carlier, 1985). The opponent was placed into the cage of the test animal (resident) in such a way that mice were placed in opposite corners. The cage was then covered with a plastic lid and the test started immediately, lasting for a maximum of 5 min. The number of attacks between the resident and intruder mice was recorded during 5 min.

2.8. Drugs

TRIM was purchased from Tocris (Avonmouth, UK). Fluoxetine hydrochloride was supplied as a gift by Deva (İstanbul, Turkey). All of the drugs were dissolved in 0.9% NaCl and given intraperitoneally (i.p.) in a volume of 0.1 ml per 10 g body weight of mice. The control groups received the same volume of NaCl.

2.9. Statistics

The results of the coat state during 7 weeks and the results of locomotion and body weight in the end of UCMS regimen were compared by Kruskal–Wallis H followed by Dunn's test when significant differences were detected. The total time of grooming in the splash test and the attack frequency in resident–intruder test were analysed using a two-way ANOVA followed by the Dunnett-t post hoc test when differences were significant. Data are expressed as the mean values ± SEM. Differences were considered to be statistically significant when p was less than 0.05.

Table 2
The drugs were administered for 5 weeks

Environment	Treatment mg/kg (i.p.)	Body weight (g)	Locomotor activity
Non-stressed	Vehicle	30.33 ± 0.36	2254.33 ± 256.25
Non-stressed	Fluoxetine (15)	30.13 ± 0.57	2445.82 ± 321.57
Non-stressed	TRIM (30)	31.82 ± 0.29	2629.42 ± 295.70
Stressed	Vehicle	31.22 ± 0.54	2706.5 ± 420.9
Stressed	Fluoxetine (15)	31.30 ± 0.54	2462 ± 426.25
Stressed	TRIM (30)	31.45 ± 0.41	2324.83 ± 298.99

Results are shown as the means ± S.E.M.

3. Results

Fig. 1illustrates the total score of the coat state during 7 weeks of the UCMS regimen. Kruskal–Wallis H test revealed a significant difference between the groups from the beginning of the first week until the end of the UCMS (H=41.415, p<0.0001; H=51.975 p<0.0001; H=39.965, p<0.0001; H=45.234, p<0.0001; H=39.537, p<0.0001; H=43.640, p<0.0001; H=33.951, p<0.0001, respectively) (Fig. 1). We also observed a significant difference between non-stressed vehicle and stressed vehicle groups from the beginning of the first week until the end of the UCMS regimen (p<0.01, p<0.01, p<0.001, p<0.01, p<0.01, p<0.001, p<0.05, respectively). Effect of fluoxetine on coat state was statistically significant at the seventh week (p<0.05) whereas TRIM exerted its effect at the fifth week (p<0.05, p<0.01, p<0.01).

We did not observe a statistically significant difference between the body weight of all groups at the end of UCMS regimen (H=10.275, p=0.068). Furthermore, no significant impairment of locomotor activity due to the UCMS regimen or treatment was observed (H=1.365, p=0.93) (Table 2).

Effects of fluoxetine and TRIM on total time of grooming in the splash test are shown in Fig. 2. There was a significant difference between groups ($F_{(5,62)}$=3.979, p=0.004). Non-stressed vehicle mice groomed significantly more than stressed vehicle mice (p<0.01). Both fluoxetine and TRIM significantly augmented the latency of the grooming behaviour in stressed mice in the splash test (p<0.01 and p<0.05 respectively).

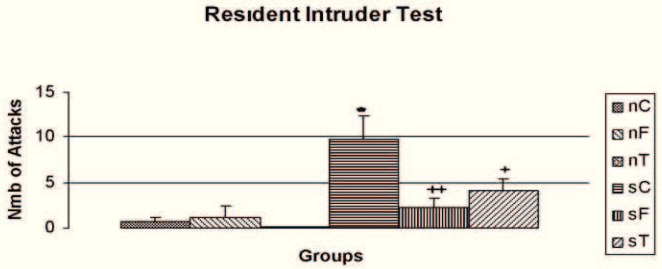


Fig. 3. Effects of fluoxetine (15 mg/kg, i.p/day, 35 days) and TRIM (30 mg/kg, i.p./day, 35 days) on attack frequency in the resident–intruder test after UCMS. Data are means ± SEM. *p<0.0001, compared to the non-stressed vehicle group, +p<0.05, ++p<0.01, compared to the stressed vehicle group. nC = nonstressed control (vehicle) group, nF = nonstressed fluoxetine group, nT = nonstressed TRIM group, sC = stressed control (vehicle) group, sF = stressed fluoxetine group, and sT = stressed TRIM group.

Effects of fluoxetine and TRIM on attack frequency in the resident–intruder test are shown in Fig. 3. There was a significant difference between groups ($F_{(5,62)}=7.664$, $p<0.0001$). In the resident–intruder test, the attack frequency was significantly increased in stressed vehicle animals compared to non-stressed animals ($p<0.0001$). This effect was reversed by both TRIM (30 mg/kg/day, 35 days) and fluoxetine (15 mg/kg/day, 35 days) ($p<0.05$, $p<0.01$ respectively compared to stressed vehicle).

4. Discussion

In this study, we showed that UCMS regimen induced a coat state degradation and this effect was reversed by a selective neuronal and inducible nitric oxide synthase inhibitor TRIM as well as by fluoxetine. Interestingly, the onset of this action was faster after TRIM then after fluoxetine. Indeed, coat state improvement occurred 3 weeks after TRIM treatment whereas 5 weeks therapy was necessary to observe fluoxetine's action. Similar effects were also observed in the splash test. Moreover, in the resident–intruder test, stressed mice demonstrated a larger degree of aggresivity, an effect abolished by both drugs. These results cannot be attributed to the effects of the drugs on activity since both TRIM and fluoxetine had no any effects on locomotor activity.

Selective serotonin re-uptake inhibitors are believed to exert their clinical antidepressant effects by blocking the re-uptake of serotonin at the synapse, resulting in an elevation of extracellular serotonin concentrations in brain. Fluoxetine is one of the most currently used antidepressant among this group of drugs. Furthermore, monoaminergic-acting antidepressants may exert their therapeutic effects by long-term persistent adaptations that serve as a form of drug induced neural plasticity (Santarelli et al., 2003; Surget et al., 2008) which needs several weeks to occur and may explain the delayed onset of action.

It is proposed that, NOS inhibitor 7-NI may increase serotonin (5-HT) levels in rat hippocampus after systemic therapy (Wegener et al., 2000), suggesting that antidepressant-like effects of NOS inhibitors can be related with the changes that occur in 5-HT levels in the brain. This is confirmed by the fact that NOS inhibition modulates central serotonin release (Kiss, 2000; Smith and Whitton, 2000; Wegener et al., 2000). In rats exposed to chronic mild stress, 5-HT and 5-HIAA levels decreased significantly in many brain regions, compared to nonstressed animals (Li et al., 2003; Vancassel et al., 2008). Therefore, it can be the fact that effects of TRIM might be underlied by its ability to reverse UCMS-induced alteration of 5-HT. Alternatively, a possible mechanism may also be related with NMDA receptors. Interestingly, competitive and non-competitive NMDA receptor antagonists induce antidepressant-like effects in animal models (Eckeli et al., 2000) and combined therapy of NMDA receptor antagonists with subactive doses of antidepressants such as fluoxetine, venlafaxine and imipramine, resulted in antidepressant response in the FST test (Rogóz et al., 2002). Indeed inhibition of NO synthesis may exert similar effects to the NMDA receptor antagonists (Wiley et al., 1995) and it can be suggested that NOS inhibition can have antidepressant effects similar to NMDA receptor antagonists.

In recent studies many investigators showed that various inhibitors of NOS such as competitive nonspecific NOS inhibitor N^G-nitro-L-arginine methyl ester (L-NAME), N^G-nitro-L-arginine (L-NA), selective nNOS inhibitors 7-nitroindazole (7-NI) and N^W-propyl-L-arginine (L-NPA) possess antidepressant-like properties in animal models (Ghasemi et al., 2008; Harkin et al., 2004; Volke et al., 2003; Yildiz et al., 2000a,b). It is suggested that nNOS plays a key role in the antidepressant-like effects of NOS inhibitors (Volke et al., 2003). This is in line with the observation that nNOS mRNA expression was increased after stress in several brain regions (De Oliveira et al., 2000) and that CMS exposure upregulates nNOS expression selectively in hippocampus while it doesn't change iNOS and eNOS expressions (Zhou et al., 2007). Furthermore, over-expression of nNOS suppresses hippocampal neurogenesis in the hippocampus of animals exposed to chronic stress while nNOS inhibition preserves and reverses CMS induced effects by promoting hippocampal neurogenesis (Zhou et al., 2007). Zhou et al. (2007) showed that CMS-induced behavioural despair and hippocampal neurogenesis impairment were prevented and reversed in mice receiving nNOS inhibitor 7-Nitroindazole (7-NI). TRIM had different pharmacokinetic and pharmacodynamic features when compared with 7-NI and there were controversial results for the selectivity on nNOS inhibition of these two compounds (Volke et al., 2003; Handy et al., 1995; Fidecka, 2003). TRIM at a dose of 50 mg/kg was known to inhibit nNOS and had clear antidepressive and anxiolytic effects although it also inhibited locomotion and motor activity at this dose (Volke et al., 2003).

Glutamate is a necessary neurotransmitter for long-term potentiation although it was proposed that neurotoxic elevations of glutamatergic and nitrergic activity should be the reason of the neurodegenerative pathology in the hippocampus of depressive patients (Sapolsky, 2000) and that hippocampal NOS activity is decreased by the local/direct administration of antidepressants in the hippocampus (Wegener et al., 2003). It was previously demonstrated that CMS exposure induces nNOS over-expression in the hippocampus and as a result, NO and it's metabolite peroxynitrite increases evidently. So, the decreased cell proliferation and the disturbed survival of the newborn cells in the dentate gyrus is formed especially due to the excess production of peroxynitrite which is attributed to the over-expression of nNOS in the hippocampus as a response to chronic stress. It was shown that stress and elevated glucocorticoid results in glutamate excitotoxicity, disturbed calcium homeostatis, inhibition of glucose transport and increase in oxygen radical generation (Sapolsky, 2000). TRIM, as a neuronal and inducible NOS inhibitor probably preserves cells from glutamate mediated neurotoxicity, necrosis and cell death. It can be that these effects might occur rapidly, thus explaining the rapid onset of drug action.

The effects of stress on feeding behaviour and body weight are still controversial. Although various studies indicated a decrease in these parameters (Haleem and Parveen, 1994), some recent studies indicated increase or no change (Sanchez et al., 1998). In our model there were no any effects of stress regimen and drugs on body weight. It is also known that TRIM has a selectivity to nNOS and iNOS but it showed very low selectivity to eNOS (Handy et al., 1995, 1996). So we didn't expect to observe any hypertensive effects of TRIM in this study. In recent studies it was also mentioned that TRIM had antinociceptive (Handy et al., 1995; Fidecka 2003) and anticonvulsant effects (Dzoljic et al., 1997) without changing arterial blood pressure (Handy and Moore 1997; Escott et al., 1998) with similar doses used in our study. Moreover another NOS inhibitor 7-NI used at the minimum dose required to inhibit nNOS (30 mg/kg) for 7 days in CMS mice model and exerted no side effects such as hypertension (Zhou et al., 2007).

In our study and in previous studies the results of the resident–intruder test showed that there is an increase in the aggresivity levels for defending the home territory against the intruder in the chronic mild stressed animals (Mineur et al., 2003; Yalcin et al., 2008). Serotonergic system can be the primer candidate for the underlying mechanisms. In recent studies, depressed patients showed changes in the serotonin levels (Tannenbaum and Anisman, 2003) and the therapy with serotonin reuptake inhibitors decreased aggression level in humans and rodents (Nelson and Chiavegatto, 2001).

It can be postulated that TRIM, selectively inhibiting nNOS, on the other hand can also selectively inhibit iNOS and thus may possibly contribute to the neuroprotective role against stress conditions (Harvey et al., 2004). Harvey et al. showed that stress induced NOS activation was blocked by selective iNOS inhibitors supporting that stres–restress-mediated glucocorticoid release activated iNOS. In recent studies, it was also postulated that increase in iNOS expression results in the formation of high amounts of NO and elevated NO

concentrations can then interact with superoxide anion, generated by the mitochondria or by other mechanisms, leading to the formation of the powerful oxidant species peroxynitrite. All these resulted with cell damage and changes in neuronal physiological functions (Lipton, 1999; Harvey et al., 2004).

5. Conclusion

In conclusion, NOS inhibitors can be a novel approach for antidepressant therapy exerting their effect possibly on neuronal NOS and TRIM can be a well-used kind of this group of drugs by the selective inhibition of both nNOS and iNOS. Further studies with different doses of TRIM should be done for the evaluation of iNOS on the antidepressant effect of TRIM.

References

Arbe MD, Einstein R, Lavidis NA. Stressful animal housing conditions and their potential effect on sympathetic neurotransmission in mice. Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol 2002;282:1422–8.

Baranano DE, Ferris CD, Snyder SH. A typical neural messengers. Trends Neurosci 2001;24:99-106.

Boissier JR, Simon P. Action de la caffeine sur la motilite' spontanne'e chez la souris. Arch Int Pharmacodyn 1965;158:212–21.

Da Silva GD, Matteussi AS, dos Santos AR, Calixto JB, Rodrigues AL. Evidence for dual effects of nitric oxide in the forced swimming test and in the tail suspension test in mice. Neurorep 2000;11:3699–702.

De Oliveira RM, Del Bel EA, Mamede-Rosa ML, Padovan CM, Deakin JF, Guimarães FS. Expression of neuronal nitric oxide synthase mRNA in stress-related brain areas after restraint in rats. Neurosci Lett 2000;289:123–6.

De Oliveira RMW, Guimarães FS, Deakin JFW. Expression of neuronal nitric oxide synthase in the hippocampal formation in affective disorders. Braz J Med Biol Res 2008;41(4):333–41.

Ducottet C, Belzung C. Behaviour in the elevated plus-maze predicts coping after subchronic mild stress in mice. Physiol Behav 2004;81:417–26.

Ducottet C, Griebel G, Belzung C. Effects of the selective nonpeptide corticotropin-releasing factor receptor 1 antagonist antalarmin in the chronic mild stress model of depression in mice. Prog Neuro-Psychopharmacol Biol Psychiatry 2003;27:625–31.

Dzoljic E, De Vries R, Dzoljic MR. New and potent inhibitors of nitric oxide synthase reduce motor activity in mice. Behav Brain Res 1997;87:209–12.

Eckeli AL, Dach F, Rodrigues ALS. Acute treatments with GMP produce antidepressant-like effects in mice. NeuroRep 2000;11:1839–43.

Escott KJ, Beech JS, Haga KK, Williams SC, Meldrum BS, Bath PM. Cerebroprotective effect of the nitric oxide synthase inhibitors, 1-(2-trifluoromethyl-phenyl) imidazole and 7-nitro indazole, after transient focal cerebral ischemia in the rat. J Cereb Blood Flow Metab 1998;18:281–7.

Fidecka S. Study on the influence of potent inhibitors of neuronal nitric oxide synthase on the antinociceptive and anticonvulsant activity of benzodiazepines in mice. Pol J Pharmacol 2003;55:193–201.

Finkel MS, Laghrissi-Thode F, Pollock BG, Rong J. Paroxetine is a novel nitric oxide synthase inhibitor. Psychopharmacol Bull 1996;32(4):653–8.

Ghasemi M, Sadeghipour H, Mosleh A, Sadeghipour HR, Mani AR, Dehpour AR. Nitric oxide involvement in the antidepressant-like effects of acute lithium administration in the mouse forced swimming test. Eur Neuropsychopharmacol 2008;18:323–32.

Haleem DJ, Parveen T. Brain regional serotonin synthesis following adaptation to repeated restraint. NeuroRep 1994;5:1785–8.

Handy RL, Harb HL, Wallace P, Gaffen Z, Whitehead KJ, Moore PK. Inhibition of nitric oxide synthase by 1-(2-trifluoromethylphenyl) imidazole (TRIM) in vitro: anti-nociceptive and cardiovascular effects. Br J Pharmacol 1996;119(2):423–31.

Handy RLC, Moore PK. Mechanism of the inhibition of neuronal nitric oxide synthase by 1-(2-trifluoromethylphenyl) imidazole (TRIM). Life Sci 1997;60:389–94.

Handy RLC, Wallace P, Gaffen ZA, Whitehead KJ, Moore PK. The antinociceptive effect of 1-(2-trifluoromethylphenyl)imidazole (TRIM), a potent inhibitor of neuronal nitric oxide synthase in vitro, in the mouse. Br J Pharmacol 1995;116:2349–50.

Harkin A, Bruce KH, Craft B, Paul IA. Nitric oxide synthase inhibitors have antidepressant-like properties in mice. 1. Acute treatments are active in the forced swim test. Eur J Pharmacol 1999;372:207–13.

Harkin A, Connor TJ, Burns MP, Kelly JP. Nitric oxide synthase inhibitors augment the effects of serotonin re-uptake inhibitors in the forced swimming test. Eur Neuropsychopharmacol 2004;14(4):274–81.

Harvey BH, Oosthuizen F, Brand L, Wegener G, Stein DJ. Stress–restress evokes sustained iNOS activity and altered GABA levels and NMDA receptors in rat hippocampus. J Psychopharmacol 2004;175:494–502.

Holscher C. Nitric oxide, the enigmatic neuronal messenger: its role in synaptic plasticity. Trends Neurosci 1997;20:298–303.

Jefferys D, Funder J. Nitric oxide modulates retention of immobility in the forced swimming test in rats. Eur J Pharmacol 1996;295:131–5.

Jopek R, Kata M, Nowak G. The activity of rat brain nitric oxide synthase following chronic antidepressant treatment. Acta Pol Pharm 1999;56(4):307–10.

Kiecolt-Glaser J, Glaser R. Depression and immune function. Central pathways to morbidity and mortality. J Psychosom Res 2002;53:873.

Kiss JP. Role of nitric oxide in the regulation of monoaminergic neurotransmission. Brain Res Bull 2000;52:459–66.

Li JM, Kong LD, Wang YM, Cheng CHK, Zhang WY, Tan WZ. Behavioral and biochemical studies on chronic mild stress models in rats treated with a Chinese traditional prescription Banxia-houpu decoction. Life Sci 2003;74:55–73.

Lipton SA. Neuronal protection and destruction by NO. Cell Death Differ 1999;6:943–51.

Michard C, Carlier M. Les conduites d'agression intraspécifique chez la souris domestique: Différences individuelles et analyses génétiques. Biol Behav 1985;10:123–46.

Mineur YS, Prasol DJ, Belzung C, Crusio WE. Agonistic behavior and unpredictable chronic mild stress in mice. Behav Gen 2003;33(5):513–9.

Muscat R, Willner P. Suppression of sucrose drinking by chronic mild unpredictable stress: a methodological analysis. Neurosci Biobehav Rev 1992;16:507–17.

Nelson RJ, Chiavegatto S. Molecular basis of aggression. Trends Neurosci 2001;24:713–9.

Nelson RJ, Demas GE, Huang PL, Fishman MC, Dawson VL, Dawson TM, et al. Behavioural abnormalities in male mice lacking neuronal nitric oxide synthase. Nature 1995;378:383–6.

Rogóz Z, Skuza G, Maj J, Danysz W. Synergistic effect of uncompetitive NMDA receptor antagonists and antidepressant drugs in the forced swimming test in rats. Neuropharmacology 2002;42:1024–30.

Sanchez MM, Aguado F, Sanchez-Toscano F, Saphier D. Neuroendocrine and immuno-cytochemical demonstrations of decreased hypothalamo-pituitary-adrenal axis responsiveness to restraint stress after long-term social isolation. Endocrinology 1998;139:579–87.

Santarelli L, Saxe M, Gross C, Surget A, Battaglia F, Dulawa S. Requirement of hippocampal neurogenesis for the behavioral effects of antidepressants. Science 2003;301:805–9.

Sapolsky RM. Glucocorticoids and hippocampal atrophy in neuropsychiatric disorders. Arch Gen Psychiatry 2000;57:925–35.

Schuman EM, Madison DV. Nitric oxide and synaptic function. Annu Rev Neurosci 1994;17:153–83.

Smith JCE, Whitton PS. Nitric oxide modulates N-methyl-D-aspartate-evoked serotonin release in the raphe nuclei and frontal cortex of the freely moving rat. Neurosci Lett 2000;291:5–8.

Spani D, Arras M, Konig B, Rulicke T. Higher heart rate of laboratory mice housed individually vs in pairs. Lab Anim 2003;37:54–62.

Surget A, Saxe M, Leman S, Ibarguen-Vargas Y, Chalon S, Griebel G, et al. Drug-dependent requirement of hippocampal neurogenesis in a model of depression and of antidepressant reversal. Biol Psychiat 2008;64(4):293–301.

Tannenbaum B, Anisman H. Impact of chronic intermittent challenges in stressor-susceptible and resilient strains of mice. Biol Psychiatry 2003;53:292–303.

Vancassel S, Leman S, Hanonick L, Denis S, Roger J, Nollet M, et al. n-3 polyunsaturated fatty acid supplementation reverses stress-induced modifications on brain monoamine levels in mice. J Lipid Res 2008;49(2):340–8.

Volke V, Wegener G, Bourin M, Vasar E. Antidepressant- and anxiolytic-like effects of selective neuronal NOS inhibitor 1-(2-trifluoromethylphenyl)-imidazole in mice. Behav Brain Res 2003;140:141–7.

Wegener G, Volke V, Rosenberg R. Endogenous nitric oxide decreases hippocampal levels of serotonin and dopamine in vivo. Br J Pharmacol 2000;130:575–80.

Wegener G, Volke V, Harvey BH, Rosenberg R. Local, but not systemic administration of serotonergic antidepressants decreases hippocampal nitric oxide synthase activity. Brain Res 2003;959:128–34.

Wiley JL, Cristello AF, Balster RL. Effects of site-selective NMDA receptor antagonists in an elevated plus-maze model of anxiety in mice. Eur J Pharmacol 1995;294:101–7.

Willner P. Validity, reliability and utility of the chronic mild stress model of depression: a 10-year review and evaluation. Psychopharmacology (Berl) 1997;134:319–29.

Willner P, Muscat R, Papp M. Chronic mild stress-induced anhedonia: a realistic animal model of depression. Neurosci Biobehav Rev 1992;16:525–34.

Yalçın I, Aksu F, Belzung C. Effects of desipramine and tramadol in a chronic mild stress model in mice are altered by yohimbine but not by pindolol. Eur J Pharmacol 2005;514:165–74.

Yalçın I, Coubard S, Bodard S, Chalon S, Belzung C. Effects of 5,7-dihydroxytrptamine lesion of the dorsal raphe nucleus on the antidepressant-like action of tramadol in the unpredictable chronic mild stress in mice. Psychopharmacology(Berl) 2008;200 (4):497–507.

Yildiz F, Erden BF, Ulak G, Utkan T, Gacar N. Antidepressant-like effect of 7-nitroindazole in the forced swimming test in rats. Psychopharmacology (Berl) 2000a;149:41–4.

Yildiz F, Ulak G, Erden BF, Gacar N. Anxiolytic-like effects of 7-nitroindazole in the rat plus-maze test. Pharmacol Biochem Behav 2000b;65:199–202.

Zhou Q, Hu Y, Hua Y, Mei H, Luo C, Han X. Neuronal nitric oxide synthase contributes to chronic stress-induced depression by suppressing hippocampal neurogenesis. J Neurochem 2007;103(5):1843–54.

Annexe 2 : Antidepressants recruit new neurons to improve stress response regulation
Surget *et coll.* soumis à *Molecular Psychiatry*

Autre travail auquel j'ai participé, suggérant que l'augmentation de la neurogénèse dans l'hippocampe participe à la restauration des réseaux neuronaux impliqués dans l'intégration du stress.

Antidepressants recruit new neurons to improve stress response regulation

Alexandre Surget[1,2*], Arnaud Tanti[1,2], E. David Leonardo[3], Anthony Laugeray[1,2], Quentin Rainer[1,2], Chadi Touma[4], Rupert Palme[5], Guy Griebel[6], Yadira Ibarguen-Vargas[1,2], René Hen[3], Catherine Belzung[1,2]

[1] *U930, Inserm, Tours, F-37200, France.*

[2] *Université François Rabelais, Tours, F-37200, France.*

[3] *Departments of Psychiatry and Neuroscience, Columbia University, New York, NY-10032, USA.*

[4] *Department of Behavioral Neuroendocrinology, Max Planck Institute of Psychiatry, Munich, D-80804, Germany.*

[5] *Department of Biomedical Sciences/Biochemistry, University of Veterinary Medicine, Vienna, A-1210, Austria.*

[6] *CNS Research Department, Sanofi-Aventis, Bagneux, F-92220, France.*

* To whom correspondence should be addressed. Kavli Institute for Systems Neuroscience & Centre for the Biology of Memory, Norwegian University of Science and Technology (NTNU), MTFS (4th Floor, Room 1420A), Olav Kyrres Gate 9, 7489 Trondheim, Norway. Tel: +47-73598966, e-mail: alexandre.surget@ntnu.no

Running title: New neurons contribute to stress response regulation.

SUMMARY
Recent researches suggest an involvement of hippocampal neurogenesis in behavioral effects of antidepressants. However, the precise mechanism through which new granule neurons can underlie antidepressant response remains a mystery. Here, using the unpredictable chronic mild stress (UCMS) in mice, we demonstrate that this paradigm reduces hippocampal neurogenesis and dampens the relationship between hippocampus and the main stress hormone system, the hypothalamo-pituitary-adrenal (HPA) axis, which is restored by antidepressant through a neurogenesis-dependent mechanism. Particularly, chronic stress severely impairs the HPA axis activity, the ability of hippocampus to modulate downstream brain areas regulating HPA axis, the reactivity of hippocampal granule neurons to glucocorticoid stimulation, and hippocampus-dependent negative feedback of HPA axis. Remarkably, we reveal that, while ablation of hippocampal neurogenesis has no effect on its own, the antidepressant fluoxetine is able to restore the capability of hippocampus to inhibit the stress system only when neurogenesis is effective and can be stimulated. Our results provide direct evidence that antidepressants act through adult-generated neurons to re-establish hippocampal regulation of the HPA axis. Accordingly, these findings provide a framework for a neurobiological mechanism through which new neurons can underlie some antidepressant effects: neurogenesis may strengthen stress integration by hippocampus, while enhancing hippocampal neurogenesis during chronic stress or depression may restore the central control on stress response systems, then enabling to initiate recovery.

Introduction

In mammals, hippocampus continues to generate new neurons in the dentate gyrus (DG) throughout adult life.(Eriksson, Perfilieva et coll. 1998; Zhao, Deng et coll. 2008) Efforts directed at understanding the function of adult-generated neurons in hippocampus have focused primarily on their role in cognitive processes such as contextual and spatial memory. In addition, there is evidence linking adult neurogenesis to the detrimental effects of chronic stress, to affective disorders and to the response to antidepressant treatment.(Kempermann, Krebs *et coll.* 2008; Krishnan and Nestler 2008) Indeed, stress, a major etiological factor for anxiety/depressive disorders, decreases the production and the survival of the new hippocampal neurons,(Cameron and Gould 1994; Gould, Tanapat *et coll.* 1998) while treatments with antidepressants increase them and blocking hippocampal neurogenesis prevents the behavioral effects of antidepressants in several paradigms in rodents.(Santarelli, Saxe *et coll.* 2003; Jiang, Zhang *et coll.* 2005; Airan, Meltzer *et coll.* 2007; Surget, Saxe *et coll.* 2008; Wang, David *et coll.* 2008) However, more complex pictures of the relationship between neurogenesis and antidepressant effects question the precise function of adult-generated neurons.(Holick, Lee et coll. 2008; Bessa, Ferreira et coll. 2009; David, Samuels et coll. 2009; Revest, Dupret et coll. 2009) Indeed, while there has been progress in elucidating the mechanisms through which stress reduces neurogenesis, little is known about either the function of these new neurons in triggering stress-related disorders or in the mechanisms through which they could exert some antidepressant effects.(Kempermann, Krebs *et coll.* 2008; Sahay and Hen 2008)

The hippocampal formation is able to influence the activity of several cortical and subcortical structures involved in endocrine, motor, affective and cognitive functions.(Amaral and Witter 1989; Moser and Moser 1998; Naber and Witter 1998; Floresco, Todd *et coll.* 2001) Thus, in addition to its role in strictly mnemonic processes, hippocampus is well-positioned to modulate motivational behaviors, emotional state and stress response.(Floresco, Todd *et coll.* 2001; Herman, Ostrander *et coll.* 2005; Ulrich-Lai and Herman 2009) In particular, the hippocampus is a regulator of the main neuroendocrine stress system, the hypothalamo-pituitary-adrenal (HPA) axis.(Herman, Schafer *et coll.* 1989; Mizoguchi, Ishige *et coll.* 2003; Ulrich-Lai and Herman 2009) Affective disorders and particularly anxiety/depression are frequently associated with abnormalities in HPA axis activity including alterations of its negative feedback.(Pariante and Miller 2001; Gold and Chrousos 2002; Gillespie and Nemeroff 2005) These changes are probably important since it has been shown that the normalization of HPA activity parallels remission and reduces the risk of relapse in depressed patients with HPA abnormalities.(Heuser 1998; Holsboer 2000; Belmaker and Agam 2008)

The DG is exquisitely sensitive to glucocorticoid levels, and may be damaged under conditions of high glucocorticoid levels and chronic stress.(Sapolsky 2000; McEwen 2005) Within this framework, we hypothesized that the pro-neurogenic effect of the antidepressant fluoxetine (a selective serotonin reuptake inhibitor – SSRI) provides a fresh source of DG responsive neurons which are well positioned to initiate the improvement of hippocampal function in stress integration and maybe, as a result, contribute to the antidepressant response when stress systems are formerly disturbed. Here, we found that chronic stress exposure induces severe abnormalities in hippocampus-dependent regulation of stress systems and that antidepressant treatment with fluoxetine reverses such effects through a neurogenesis-dependent mechanism.

Materials and methods

Animals

Male mice aged between 3 and 4 months at the time of the beginning of the UCMS exposure were used in this study. BALB/c mice were purchased from Taconic (Germantown, NY) or from Centre d'Elevage Janvier (Le Genest Saint Isle, France). Animals were group-housed (n = 4-5 per cage) until the onset of the UCMS regimen and maintained under standard laboratory conditions (12/12h light-dark cycle –on at 11:00/off at 23:00–, 22±2°C, food and water ad libitum). All animal care and treatment were in accordance with the European Community Council directive 86/609/EEC and with the Guide and Use of Laboratory Animals established by the US National Institute of Health.

Drugs

The selective serotonin reuptake inhibitor fluoxetine (Eli Lilly, Indianapolis, IN) and the CRF1 antagonist SSR125543 (Sanofi-Aventis, Bagneux, France) were dissolved in a saline solution (0.9% NaCl) or suspended in a saline solution (0.9% NaCl) containing 5% dimethyl sulphoxide (DMSO) and 5% Cremophor EL respectively. Vehicle, fluoxetine (20mg/kg/day) and SSR125543 (20mg/kg/day) were daily administered intraperitoneally (i.p.), based on our previous experiment showing activity at these concentrations.(Surget, Wang *et coll.* 2009) Concentrations were adjusted to administer 10 ml/kg. The dexamethasone-phosphate

(DEX-P, Sigma-Aldrich) was prepared for i.p. administration (0.1mg/kg) in a saline solution (0.9% NaCl). The dexamethasone (DEX, Sigma-Aldrich) was prepared for in situ infusion (50ng in 0.6µl) in a saline solution (0.9% NaCl) containing 0.2% ethanol.

X-ray irradiation procedure

Irradiation was performed as previously described.(Santarelli, Saxe *et coll.* 2003; Surget, Saxe *et coll.* 2008) All mice were anesthetized with ketamine/xylazine (100mg/kg and 7mg/kg respectively), placed in a stereotaxic frame and then, only for irradiated mice, exposed to cranial irradiation using a Siemens Stabilopan X-ray system (Hamburg, Germany). Animals were protected with a lead shield that covered the body, but left unshielded a 3.22x11mm treatment field above the hippocampus (interaural 3.00 to 0.00). Dosimetry was done using a Capintec Model PR06G electrometer ionization chamber (Capintec, Ramsey, NJ) and Kodak Readypack Radiographic XV films (Kodak, Rochester, NY). The corrected dose rate was approximately 1.8 Gy/min at a source to skin distance of 30cm. The procedure lasted 2min47sec, delivering a total of 5 Gy. Three 5 Gy doses were given over the course of one week (day 0, 4 and 8).

Unpredictable Chronic Mild Stress (UCMS)

The stress regimen used was previously described(Surget, Wang *et coll.* 2009) and is a variant of the chronic mild stress procedures described by Willner in rat.(Willner 1997) Mice were repeatedly subjected to various socio-environmental stressors according to a "random" schedule for a total period of 6-8 weeks. UCMS-exposed mice were maintained under the same standard laboratory conditions but were isolated in small individual cages (24x11x12cm) while non-stressed control mice were also isolated but in larger laboratory cages (42x28x18cm). The first two weeks of UCMS regimen were drug-free, treatment began from the third week (day 14) to the end of the experiments. The different stressors were: altered bedding (sawdust change, removal of sawdust, damp sawdust, substitution of sawdust with 21°C water, rat feces); cage tilting (45°) or shaking (2 x 5sec); cage exchange (mice were positioned in the empty cage of another male); induced defensive posture (repeated slight on the back until the mouse showed a defensive posture); altered length and time of light/dark cycle. Body weight and fur coat state were assessed weekly, as markers of the progression of the UCMS-evoked syndrome. The total score of the state of the coat resulted from the sum of scores obtained from seven different body parts: head, neck, dorsal coat, ventral coat, tail, forepaws and hindpaws. For each body area, a score of 0 was given for a well-groomed coat and 1 for an unkempt coat.

Cookie Test (CT)

This test required a device containing three aligned compartments with the same dimension (20x20x20cm). Only the colors of the walls and the floor were different between the compartments: white for the first one, grey for the second one and black for the third one (Figure 1c). The three compartments communicated by two openings controlled by the experimenters. The device was illuminated with 200-lux white light. Four weeks and half before the first session, a small portion (2g±1) of a chocolate cookie (Pepito, Lu, France) was placed in the home cage every two days during 2.5 weeks in order to familiarize the mice with the palatable stimulus. The last two weeks before the first session were cookie-free. One hour before testing, food was removed in order to avoid inter-individual differences in the drive for feeding (hunger). At the time of testing, a small amount (2g±1) of chocolate cookie (or of regular food in a supplemental control experiment) was positioned at the center of the black room. The white room was the compartment of the departure where the mouse was placed with the head facing the opposite side to the opening. Each session of the test lasted five minutes; the door of the first opening was closed after the transition of the mouse within a maximum time of 2 minutes (the mouse was gently guided to the second room if required). The number of bites was recorded within the 5min test period. Four sessions of testing were performed within 9 days, each session being separated from the previous one by 3 days. All the sessions were performed during the light phase (from 15:00).

BrdU labeling for SGZ proliferation and neurogenesis

Immunohistochemistry for SGZ proliferation was performed as previously described.(Surget, Saxe *et coll.* 2008) Mice received BrdU injections (Sigma-Aldrich, 4x75mg/kg i.p., every 2h) and were sacrificed 24h after the last BrdU injection. After anesthesia with ketamine/xylazine (120mg/kg and 10mg/kg respectively), mice were transcardially perfused: saline (0.9% NaCl) for 2min, 4% paraformaldehyde (PFA)/0.1M phosphate-buffered saline (PBS, pH=7.4) for 5min and brains were collected, post-fixed overnight in 4% PFA/0.1M PBS at 4°C, and cryoprotected in 0.1M PBS/30% sucrose/0.1% sodium azide and stored at 4°C. Serial coronal sections through the rostro-caudal brain extent were cut (45µm), every third section from each

brain was collected and stored in 0.1M PBS. BrdU immunohistochemistry was performed on free-floating sections as described. Sections were treated with 3% H202/50% ethanol for 20min, rinsed in 0.1M PBS, treated with 2N HCl (30min), rinsed in borate buffer for 5min (0.1M, pH=8.4), then rinsed in 0.1M PBS and incubated with a rat anti-BrdU monoclonal antibody (1:500, Oxford Biotechnology). Forty hours later, sections were rinsed in 0.1M PBS, incubated 2.5h with a rabbit anti-rat biotinylated antibody (1:200, Vector Laboratories) and followed by amplification with an avidin-biotin complex (Elite ABC kit, Vector Laboratories). The staining was visualized with DAB (Sigma-Aldrich). BrdU positive cell quantification was performed as described. Briefly, every third section through the rostro-caudal extent of the hippocampus was examined. All BrdU-labeled cells in the subgranular zone and the granule cell layer, defined as a two-body-wide zone along the border of the granule cell layer, were counted in each section by two experimenters unaware of the slide code. Counts were performed at x400 magnification using a light microscope (Leica). The total number of BrdU-labeled cells was estimated by multiplying the number of cells counted in every third section by 3.

The hippocampal neurogenesis evaluation is derived from the BrdU/NeuN double-labeling described in Alonso and colleagues.(Alonso, Griebel et coll. 2004) Mice were administered with BrdU (2x150mg/kg i.p. per day during 3 days). Four weeks later, mice were anesthetized with ketamine/xylazine (120mg/kg and 10mg/kg respectively), transcardially perfused and the brain collected as described above. Serial coronal sections through the rostro-caudal brain extent were cut (30µm), every fourth section from each brain was collected and stored in 0.1M PBS. Immunohistochemistry was performed on free-floating sections. Sections were successively treated with HCl (2N, 30min), treated with borate buffer (0.1M, pH=8.4, 5min), rinsed with 0.1M PBS/0.2% Triton/ 2% Goat Serum (GS), incubated for 20h with a rat anti-BrdU monoclonal antibody (1:500 Oxford Biotechnology) and a mouse anti-NeuN monoclonal antibody (1:1000, Chemicon), rinsed with 0.1M PBS/0.2% Triton/ 2% GS, incubated for 2.5h with fluorochrome-labelled secondary antibodies generated in goat, including Alexa-488nm anti-mouse and Alexa-633nm anti-rat (1:200, Molecular Probe). Sections were then rinsed with 0.1M PBS/0.2% Triton/ 2% GS and were mounted on slides with the mounting medium for fluorescence « hard-set » Vectashield (Vector Laboratories). Eight sections (16 hippocampus) along the rostro-caudal extent of the hippocampus were examined: Bregma approximately -1.46, -1.82, -2.18, -2.54, -2.80, -3.08, -3.28, -3.52 according to Paxinos and Franklin (2001).(Paxinos and Franklin 2001) All BrdU/NeuN double-labeled cells in the granule cell layer were counted in each section by two experimenters unaware of the slide code. Counts were performed at x400 magnification using a confocal microscope (Olympus) and Fluoview software. The number of BrdU/NeuN-labeled cells was expressed for all the groups in % to the result of the control-vehicle mice.

Intrahippocampal DEX infusion

The infusion experiment was derived from the method previously described.(Mizoguchi, Ishige *et coll.* 2003) Mice were stereotaxically and bilaterally implanted with a guide cannula (6mm long, 0.6mm outer diameter, 0.36mm inner diameter), which was anchored firmly to the skull by steel screws, dental adhesive and acrylic resin under ketamine/xylazine anesthesia (120mg/kg and 10mg/kg respectively) and closed by stylets. The following coordinates were used for the guide cannula implantation according to Paxinos and Franklin's atlas(Paxinos and Franklin 2001) : bregma = -3.08, lateral = ±2.3, vertical = -1.4. After the implantation, animals were gently placed back to their home cage in a specific room (27°C). When the mice exhibited the signs of a normal locomotor activity, they were returned to their normal housing room. The next days, mice were familiarized to a mock infusion protocol to minimize any stress associated with the procedure before the start of infusion experiments. After a 1-week recovery period from the surgery, the stylets were removed and replaced with an infusion cannula (7mm long, 0.3mm outer diameter, 0.17mm inner diameter) that extended 1 mm below the guide cannula. Infusion was carried out directly in the home cage where a small portion of a known chocolate cookie was placed in the cage in order to decrease locomotor activity during infusion. The animals received bilateral infusions during 1.5min of either vehicle (0.9% NaCl / 0.2% ethanol, 8-9 mice per group) or DEX (50ng in 0.6µl, 8-9 mice per group) using a microinfusion pump. The infusion was performed between 14:00 and 15:00. The dose of DEX was determined by preliminary experiments using doses of DEX ranging between 1 and 500 ng/site. The cannula remained in place for 2.25min after the completion of the infusion and then animals were returned to their home cage. Animals were then either transcardially perfused two hours later to assess intrahippocampal DEX-induced c-fos changes or, in another experiment, sacrificed four hours later to collect blood and assess intrahippocampal DEX-induced changes in plasma corticosterone levels.

Intrahippocampal DEX-induced changes in c-fos

Two hours after the infusion animals were anesthetized with ketamine/xylazine (120mg/kg and 10mg/kg respectively) and transcardially perfused: saline (0.9% NaCl) for 2min, 4% PFA/0.1M PBS (pH=7.4) for 5min and brains were collected, post-fixed overnight in 4% PFA/0.1M PBS at 4°C, then cryoprotected in 0.1M PBS/30% sucrose/0.1% sodium azide and stored at 4°C until processed for immunohistochemistry.
Serial coronal sections through the rostro-caudal brain extent were cut (40µm), every third section from each brain was collected and stored in 0.1M PBS. Immunohistochemistry for c-fos was performed on free-floating sections. Briefly, sections were treated with 3% H202/50% ethanol for 20min, rinsed in 0.1M PBS and incubated with a rabbit anti-Fos antibody antibody (Calbiochem, PC38, 1:5000). Forty eight hours later, sections were rinsed in 0.1M PBS, incubated for two hours at room temperature with a donkey anti-rabbit biotinylated antibody (Jackson Immunoresearch, 1:500) and followed by amplification with an avidin-biotin complex (Elite ABC kit, Vector Laboratories). The staining was visualized with DAB (Sigma-Aldrich). Sections were mounted on gelatin-coated slides, dried, dehydrated, coverslipped and were examined under a Leica DM 2000 microscope at x200 magnification. For cell counting of regions of interest and data analysis, the nomenclature and nuclei boundaries used were those defined by Paxinos and Franklin's mouse brain atlas.(Paxinos and Franklin 2001) c-fos positive cells within each region were counted bilaterally in consecutive sections, starting from bregma 0.62 to bregma -1.58. For every animal and region the same number of sections was used. Regions included and corresponding coordinates were the lateral septum (LS): bregma [0.62 to 0.14], anteromedial bed nucleus of the stria terminalis (amBST): bregma [0.62 to 0.02], posteromedial bed nucleus of the stria terminalis (pmBST): bregma [-0.10 to -0.34], anteroventral bed nucleus of the stria terminalis (avBST): bregma [0.62 to 0.02], ventrolateral preoptic area (vlPOA): bregma [0.26 to -0.10], medial preoptic area (mPOA): bregma [0.14 to -0.46], dorsomedial hypothalamic nucleus (DMH): bregma [-1.34 to -1.58], lateral hypothalamic nucleus (LH): bregma [-0.34 to -0.70], Arcuate nucleus: bregma [-1.22 to -1.58], and the paraventricular nucleus (PVN) of the hypothalamus: bregma [-0.58 to -1.22].

DEX-induced c-fos changes in the dentate gyrus

In the second part of the dark phase, mice were i.p. injected with either DEX-P (0.1mg/kg, 5 mice per group) or saline (0.9% NaCl, 5 mice per group). Thirty minutes later, mice were placed in a circular open-field (diameter 35cm) for 5min. Then, 90min later (120min after injection), mice were anesthetized with ketamine/xylazine (120mg/kg and 10mg/kg respectively) and transcardially perfused: saline (0.9% NaCl) for 2min, 4% PFA/0.1M PBS (pH=7.4) for 5min and brains were collected, post-fixed overnight in 4% PFA/0.1M PBS at 4°C, then cryoprotected in 0.1M PBS/30% sucrose/0.1% sodium azide and stored at 4°C. Serial coronal sections through the rostro-caudal brain extent were cut (30µm), every fourth section from each brain was collected and stored in 0.1M PBS. Immunohistochemistry was performed on free-floating sections and derived from the methods previously described.(Kee, Teixeira et coll. 2007) Sections were successively treated with HCl (2N, 30min), treated with borate buffer (0.1M, pH=8.4, 5min), rinsed with 0.1M PBS/0.2% Triton/ 2% GS, incubated for 20h with a rabbit anti-FOS monoclonal antibody (1:1000 Oxford Biotechnology) and a mouse anti-NeuN monoclonal antibody (1:1000, Chemicon), rinsed with 0.1M PBS/0.2% Triton/ 2% GS, incubated for 2.5h with fluorochrome-labelled secondary antibodies generated in goat, including Alexa-488nm anti-mouse and Alexa-546nm anti-rabbit (1:200, Molecular Probe). Sections were then rinsed with 0.1M PBS/0.2% Triton/ 2% GS and were mounted on slides with the mounting medium for fluorescence « hard-set » Vectashield (Vector Laboratories). Eight sections (16 hippocampus) along the rostro-caudal extent of the hippocampus were examined: Bregma approximatively -1.46, -1.82, -2.18, -2.54, -2.80, -3.08, -3.28, -3.52 according to Paxinos and Franklin.(Paxinos and Franklin 2001) All FOS/NeuN double-labeled cells in the granule cell layer were counted in each section by two experimenters unaware of the slide code. Counts were performed at x400 magnification using a confocal microscope (Olympus) and Fluoview software.

Feces collection

In this experiment, feces were collected according to the schedule represented in Figure 4b. For each fecal collection, the litter of the cage was collected and substituted by new sawdust. The feces were then extracted from the litter in another room, this procedure allowed a minimal disturbance of the animals during collection. Each sample contained therefore the feces emitted between two collection time points. It is noteworthy that the animals were handled several times each day in order to familiarize them to be manipulated. Moreover, two weeks before the feces collection, animal from this experiment were subjected to a similar schedule of sawdust changes in order to familiarize them to this procedure.

Extraction and analysis of corticosterone metabolites

Fecal samples were analyzed for immunoreactive corticosterone metabolites using a 5α-pregnane-3β,11β,21-triol-20-one enzyme-immunoassay (EIA) as previously described.(Ibarguen-Vargas, Surget *et coll.* 2008) Details regarding development, biochemical characteristics and physiological validation of this assay have previously been described.(Touma, Sachser et coll. 2003; Touma, Palme et coll. 2004) Before EIA analysis, the fecal samples were dried and homogenized. Aliquots of 0.05 g were extracted with 1 ml of 80% methanol. A detailed description of the extraction procedure and the assay performance has been published elsewhere.(Touma, Palme *et coll.* 2004) The intra- and inter-assay coefficients of variation were 9.1% and 14.0%, respectively.

Intrahippocampal DEX-induced changes in plasma corticosterone

Four hours after the infusion, the animals were killed by CO2 asphyxiation and then decapitated. The trunk blood was collected and centrifugated at 1200xg for 12min to separate the plasma, which was stored at -20°C until corticosterone radioimmunoassay. For histological verification of the cannula position, the brains were fixed with 4% PFA/0.1M PBS during one day and cryoprotected in 0.1M PBS/30% sucrose/0.1% sodium azide and stored at 4°C. Thirty-µm sections were cut in a cryostat for the verification of the implantation. We included only those animals in which the correct position of the cannula was demonstrated.

Plasma was analyzed for total corticosterone levels using a 125I-labeled corticosterone double-antibody radioimmunoassay kit (MP Biomedicals, NY) according to the manufacturer's protocol. To avoid inter-assay variability, all the samples were run in a single assay (the intra-assay variability was 4.5%). According to the manufacturer, the assay sensitivity is 7.7 ng/ml and the percentage of cross-reactivity with steroids was corticosterone 100%, desoxycorticosterone 0.34%, testosterone 0.1%, cortisol 0.05%, aldosterone 0.03%, progesterone 0.02%, androstenedione 0.01%, 5α-dihydrotestosterone 0.01%, others <0.01%.

Statistics

Considering that small size samples ($n \leq 14$) were used and that assumptions for parametric statistics were not ensured (normality and homoscedasticity), data were analyzed using non-parametric procedures: an analysis was done following the Kruskal–Wallis "ANOVA by ranks" H test, followed up with a U-test adjusted for multiple comparisons, when appropriate (i.e., $P < 0.05$).

Results

Hippocampal neurogenesis is required for chronic stress reversal by fluoxetine

We first assessed the involvement of hippocampal neurogenesis in the emergence and the recovery of behavioral and physical changes in the Unpredictable Chronic Mild Stress (UCMS).(Willner 1997; Ibarguen-Vargas, Surget *et coll.* 2008; Surget, Wang *et coll.* 2009) Mice were initially exposed to 3 targeted X-irradiations five weeks before UCMS procedure in order to disrupt cell proliferation in the subgranular zone (SGZ) of the DG.(Santarelli, Saxe *et coll.* 2003; Surget, Saxe *et coll.* 2008) Mice were then subjected to a 6- to 8-week UCMS procedure or maintained under non-stressful conditions (control mice) (Figure 1a, Supplementary Figure S1a). Two weeks after initiating UCMS, mice were treated daily with either a selective serotonin reuptake inhibitor antidepressant, fluoxetine (20 mg/kg/day, ip) or a vehicle solution (NaCl 0.9%, ip). X-irradiation induced a strong depletion of SGZ cell proliferation (~90%, Figure 1b) independently of the environment (control/UCMS) or the treatment (vehicle/fluoxetine). UCMS exposure resulted in a significant decrease of SGZ cell proliferation (~25%, Figure 1b) and of the production of new neurons (~35%, Supplementary Figure S1b), which is counteracted by fluoxetine treatment (SGZ proliferation, $P = 0.0001$; Neurogenesis, $P = 0.0346$; Kruskal-Wallis H test).

Considering that anhedonia is one of the major symptoms of depression, we developed a behavioral paradigm based on the motivation for a palatable stimulus (a chocolate cookie): the Cookie Test (CT). In this test, the animal is placed in a starting compartment at one end of the device made up of three aligned compartments communicating by two openings (Figure 1c). A portion of a chocolate cookie is placed at the center of the compartment located at the other end. A 5-min session was performed every 3 days for a total of 4 sessions. This test is based on the conflict between the drive for the stimulus and the neophobic behavior of the mouse. A reduction of the cookie consumption may be therefore interpreted as an anhedonia, a habituation deficit or a combination of both effects. We found that session repetition resulted in a progressive increase of the cookie consumption in control mice (session 1, $P = 0.8149$; session 2, $P = 0.1387$; session 3, $P = 0.0013$; session 4, $P = 0.0001$; Kruskal-Wallis H test; Figure 1d). UCMS exposure suppressed the consumption increase, an effect which has been reversed by fluoxetine treatment. Interestingly, although irradiated mice did not display any behavioral differences with the non-irradiated mice in control or UCMS

conditions, they were insensitive to the fluoxetine reversal. As a control experiment, the substitution of the cookie by a regular food pellet produced a quasi-null consumption during the 4 sessions for all the groups (data not shown), underlining the importance of the "hedonic" feature of the stimulus. Our results therefore demonstrated that the ablation of hippocampal neurogenesis on its own has no effect in the CT but prevents the fluoxetine reversal in UCMS mice. A similar profile of results was also obtained when examining body weight change across the experiment (a significant change of body weight is one of the main symptoms of major depression) and the coat state (Supplementary Figures S2a-b).
However, we found that "antidepressant-like" effects can be obtained following UCMS exposure even in irradiated mice when using non-monoaminergic compounds such as the corticotropin-releasing factor 1 (CRF_1) receptor antagonist SSR125543. This compound can directly act at the level of structures involved in the stress integration such as various corticolimbic areas and the HPA axis through the direct inhibition of the CRF_1 receptors.(Holmes, Heilig et coll. 2003) In a similar protocol of the previous experiment, the SSR125543 counteracted UCMS effects in the CT (session 1, $P = 0.9998$; session 2, $P = 0.8644$; session 3, $P = 0.0414$; session 4, $P = 0.0108$; Kruskal-Wallis H test; Figure 1e), on body weight (Supplementary Figure S2c) and on coat state (Supplementary Figure S2d) in non-irradiated mice but also in irradiated mice.
All these results, along with our previous study(Surget, Saxe *et coll.* 2008), indicate that hippocampal neurogenesis, although not directly involved in the emergence of a depression-like state or the vulnerability to stress, is required for the recovery effects of monoaminergic antidepressants. However, alternative mechanisms, independent of neurogenesis, can be used to induce similar effects by other factors such as CRF1 antagonists which directly target stress systems. Taken together, these results raise the possibility that stimulating neurogenesis by fluoxetine facilitates the hippocampal regulation on stress systems.

Chronic stress impairs hippocampal modulation of brain areas involved in stress response
Several evidences link hippocampus within regulation of stress systems and HPA axis. Direct stimulations of hippocampus are able to decrease glucocorticoid secretion, while hippocampal lesions strengthen stress-induced HPA activation, particularly by disrupting negative feedback and impeding termination of glucocorticoid secretion. However, hippocampus does not directly project to the paraventricular nucleus (PVN) of the hypothalamus, which is responsible for HPA activation. Instead, hippocampus regulates HPA activity through two- or three-neuron circuits, by extending glutamatergic outputs toward PVN-connected GABAergic neuron populations of stress-integrative subcortical regions (Figure 2a), such as medial and ventrolateral preoptic areas (mPOA and vlPOA respectively), anteromedial and posteromedial bed nucleus of stria terminalis (amBST and pmBST), lateral septum (LS), dorsomedial and lateral hypothalamic nuclei (DMH and LH).(Herman, Schafer *et coll.* 1989; Herman, Ostrander *et coll.* 2005; Ulrich-Lai and Herman 2009) Accordingly, we aimed to assess whether UCMS and fluoxetine affect the ability of hippocampus to modulate these subcortical relay sites and the PVN following glucocorticoid stimulation. For this purpose, mice were bilaterally implanted with guide cannula above the DG following a 7-week UCMS exposure (Figures 2b-c). After one-week recovery, mice were subjected to intra-hippocampal infusion with either the glucocorticoid receptor (GR) agonist dexamethasone (DEX, 50ng) or vehicle (NaCl 0.9%, ethanol 0.2%), and then mice were euthanized 2h later to collect brain. We assessed neuronal activation in mPOA, vlPOA, amBST, pmBST, LS, DMH, LH and PVN by immunodetection of *c-fos*, an immediate early gene (IEG) (Figure 2d-e, Supplementary Figure S3). As a control, c-*fos* expression was also quantified in anteroventral BST (avBST) and arcuate nucleus which also regulate PVN activity but are devoid of hippocampal inputs.).(Amaral and Witter 1989; Herman, Schafer *et coll.* 1989; Naber and Witter 1998; Herman, Ostrander *et coll.* 2005; Ulrich-Lai and Herman 2009) Intrahippocampal DEX infusion in control-vehicle mice was able to increase the number of FOS-labeled cells in almost all these subcortical relay sites: mPOA, amBST, pmBST, LS, DMH, LH but not vlPOA. UCMS impaired this increase in all these regions, and even induced a significant decrease in vlPOA, while fluoxetine treatment reversed all the UCMS effects except in DMH and LH (mPOA, $P = 0.0218$; vlPOA, $P = 0.0198$; amBST, $P = 0.0464$; pmBST, $P = 0.0296$; LS, $P = 0.0073$; DMH, $P = 0.0356$; LH, $P = 0.0072$; Kruskal-Wallis H test; Figure 2e, Supplementary Figure S3). As expected, no effect of UCMS or treatment was found in the avBST and arcuate nucleus ($P = 0.104$ and $P = 0.251$ respectively; Kruskal-Wallis H test). These results indicate that chronic stress exposure dampens hippocampal influences to its downstream relays toward HPA axis and lead to the possibility that these effects may be reflected in the PVN activation itself. Indeed, intrahippocampal DEX infusion yielded to a significant increase of FOS expression in the PVN of UCMS-vehicle but not control-vehicle and UCMS fluoxetine mice ($P = 0.0308$; Kruskal-Wallis H test). Taken together, these results suggest that chronic stress by decreasing the inhibitory regulation from hippocampus biases the net input balance into the PVN toward greater excitatory influences leading to PVN over-activation and perhaps HPA hyperactivity, an effect which

may be counteracted by antidepressant treatment.

Chronic stress disrupts reactivity of hippocampal granule cells to glucocorticoid stimulation

Considering that UCMS and fluoxetine alter hippocampal influences on its downstream stress-integrative sites, we aimed to directly test the ability of hippocampus itself, particularly the hippocampal DG granule neurons, to react to glucocorticoid stimulation. DG granule cells can be activated and express IEGs when the organism is exposed to a new environment.(Ramirez-Amaya, Marrone *et coll.* 2006; Kee, Teixeira *et coll.* 2007; Tashiro, Makino *et coll.* 2007) We took advantage of this property to examine the reactivity of the DG granule neurons to a DEX injection in the context of a new environment exposure. A new cohort of 8-week UCMS-subjected mice were administered with either DEX-Phosphate (DEX-P, 0.1mg/kg, ip) or vehicle (NaCl 0.9%, ip), exposed 30 minutes later to a circular open-field during 5 minutes, and then sacrificed 90 minutes later to extract the brain and to evaluate the immunoreactivity to the IEG *c-fos* (Figures 3a-b). DEX administration induced a 43.9% suppression of the total number of FOS-labeled granule cells ($P = 0.0209$; Kruskal-Wallis H test; Figure 3c, Supplementary Figure S4). The DEX-induced suppression was nearly absent in UCMS mice (5.3%) but restored by a fluoxetine treatment (33.9%). Thus, the UCMS exposure causes a reduction of the DG granule neurons' ability to react to glucocorticoid stimulation and perhaps impairs in this way the ability of the hippocampus to initiate a negative feedback on stress systems and HPA axis. As adult-generated DG neurons are continuously added to the network, they are a potential source of new glucocorticoid sensitive neurons which in turn could affect stress integration and feedback on the HPA axis.

Fluoxetine restores HPA axis activity and feedback via a neurogenesis-dependent mechanism

In order to examine the link between neurogenesis and the hippocampus-dependent stress response, we then investigated whether UCMS induces abnormalities in the HPA axis similar to those found in anxiety/depression disorders, either for basal glucocorticoid release or at the level of negative feedback integrity. A cohort of mice were exposed to a 7-week UCMS regimen (Figure 4a) and the level of the corticosterone metabolites were quantified in 9 fecal samples per mouse taken from the home cage, allowing the estimation of the circadian activity of the HPA axis (Figure 4b). As a caveat, fecal corticosterone metabolite levels cannot provide a temporal resolution as precise as plasma corticosterone levels. However, this method is largely non invasive compared with multiple blood collections or indwelling catheters and avoids examining multiple groups of animals at different time points. Accordingly, although fecal corticosterone metabolite measures may slightly lessen temporal resolution, this method has the major advantage to circumvent important methodological bias induced by invasive procedures, and to comply with higher ethical standards.

Although we did not observe a global UCMS-induced alteration of the HPA axis activity (15:00, $P = 0.2834$; 18:00, $P = 0.7616$; 20:00, $P = 0.0111$; 22:00, $P = 0.015$; 0:00, $P = 0.2858$; 2:00, $P = 0.3944$; 4:00, $P = 0.0275$; 7:00, $P = 0.3923$; 11:00, $P = 0.8984$; Kruskal-Wallis H test; Figures 4c-e), fecal corticosterone metabolites are significantly increased by UCMS at the end of the light phase (20:00 and 22:00) and decreased at the middle of the dark phase (4:00; Figure 4c). Fluoxetine was able to block partially these changes (20:00 and 4:00). Interestingly, UCMS also induced in irradiated mice a significant increase of fecal corticosterone metabolites at the end of the dark phase (20:00 and 22:00) and a trend for a decrease at the middle of dark phase (4:00; Figure 4d). Accordingly, ablation of neurogenesis by X-irradiation had roughly no effect in baseline HPA axis activity in control and UCMS vehicle-treated mice (Figure 4d-e); however, it suppressed the ability of fluoxetine to restore the UCMS-induced changes.

More relevant regarding chronic stress alterations and pathophysiology of depression,(Pariante and Miller 2001) we aimed to test HPA axis feedback integrity. For this purpose, the mice were subjected to the DEX suppression test (DST; Figure 4b). In this test, the administration of the GR agonist DEX-P (0.1mg/kg, ip) suppresses the subsequent release of endogenous glucocorticoids when negative feedback integrity is intact. Our results demonstrated that UCMS dampens the effectiveness of the negative feedback (control 61.1% *vs* UCMS 38.4%) and that fluoxetine restores DEX-induced suppression to control levels (65.7%; $P = 0.001$; Kruskal-Wallis H test; Figure 4f). However, while ablation of hippocampal neurogenesis did not significantly affect the negative feedback integrity in control (59.9%) and UCMS (30%) vehicle-treated mice, it disrupted the normalization of the HPA axis negative feedback in UCMS mice by fluoxetine treatment (42.2%).

Our current results support the idea that neurogenesis may subserve some hippocampal functions in stress integration, which is in line with a recent report indicating that glucocorticoid secretion under specific stress conditions can be altered in animals with inhibited hippocampal neurogenesis.(Schloesser, Manji et coll. 2009) Overall, our data lead to the hypothesis that enhancing neurogenesis may be a mechanism through

which antidepressants restore hippocampal regulation of stress systems, underlying subsequent recovery.

New neurons contribute to the hippocampal inhibition of the stress response.

In order to directly test this hypothesis and precisely determine the role of the new neurons in antidepressant effects, we aimed to examine the ability of the hippocampus to regulate HPA axis activity under UCMS condition and to assess the effects of antidepressant treatment and hippocampal neurogenesis on this function. Non-irradiated and irradiated mice were exposed to a 7-week UCMS regimen including a 5-week treatment to fluoxetine or vehicle (Figure 5a). Following UCMS exposure, mice were implanted with guide cannula above the DG (Figure 5b). After one-week recovery, mice were bilaterally injected with either DEX (50ng) or vehicle (NaCl 0.9%, ethanol 0.2%), and then blood was collected 4h later in order to measure the plasma corticosterone. The results demonstrated that the intrahippocampal DEX infusion induced 51.2% corticosterone suppression in non-irradiated control mice (P = 0.0034; Kruskal-Wallis H test; Figure 5c, Supplementary Figure S5). The neurogenesis ablation did not alter on its own the ability of the hippocampus to inhibit the HPA axis, as suggested by the 50.9% DEX-induced corticosterone suppression in irradiated control mice. However, UCMS disrupted hippocampal inhibition with low suppression in both non-irradiated and irradiated mice (5.1% and 3.7% respectively). Finally, fluoxetine was able to restore hippocampus-dependent negative feedback on HPA axis in non-irradiated UCMS mice to control levels (56.1%), but not in irradiated UCMS mice (12.4%). The latter result demonstrates that new hippocampal neurons are required during UCMS exposure to re-establish the hippocampal inhibition of the stress response.

Discussion

Since the first evidences linking behavioral effects of antidepressants and hippocampal neurogenesis, no significant progress has arisen in the understanding of the specific role of neurogenesis in antidepressant response. Accordingly, it was necessary to identify the hippocampal function that could be affected by adding supplemental new neurons and concurrently contribute to recovery following chronic stress and anxiety/depression-like states. Interestingly, our current study provides answers and sheds new light on the role of hippocampal neurogenesis in the adult brain. We demonstrated that chronic stress exposure severely disrupts HPA axis activity, hippocampal regulation of subcortical stress-integrative structures, reactivity of DG granule neurons to glucocorticoid stimulation, and hippocampus-dependent negative feedback of HPA axis. The SSRI fluoxetine was able to induce a reversal of the behavioral effects of UCMS along with the restoration of the hippocampal control on stress systems via a neurogenesis-dependent mechanism. Taken together, these results provide direct demonstration of a consistent neurobiological process through which neurogenesis participates to antidepressant response: new neurons would be recruited by antidepressant drugs to reestablish hippocampal regulation of stress systems and then to probably initiate recovery.

This work was initiated when the possibility of a causative role of adult neurogenesis in anxiety/depression was broadly debated in the literature.(Duman 2004; Henn and Vollmayr 2004; Sapolsky 2004; Sahay and Hen 2007; Eisch, Cameron *et coll.* 2008) However, our results do not actually support such a hypothesis: first, because ablation of new hippocampal neurons does not cause any anxiety/depression-like states or make mice more vulnerable to chronic stress; second, because enhancing neurogenesis is unlikely to be the final process through which recovery becomes possible. Indeed, although we confirmed here that hippocampal neurogenesis is required for behavioral and physical UCMS reversal by monoaminergic antidepressants (like fluoxetine and imipramine),(Surget, Saxe *et coll.* 2008) and even extended the results to alterations more relevant for depressive disorders such as anhedonia or body weight changes,(American Psychiatric Association 1994) we also established that similar reversal can be elicited even in animals with ablated neurogenesis by compounds targeting stress response circuits (like CRF_1 or vasopressine 1b antagonists).(Stahl and Wise 2008; Surget and Belzung 2008) If enhancing neurogenesis is one mechanism among others, we can assume that it is not involved in the etiology of anxiety/depression and that it is not the final relevant process for antidepressant effects. As a consequence, elevation of hippocampal neurogenesis may be a crucial but indirect pathway for monoaminergic antidepressants toward more important downstream effects underlying recovery under chronic stress.

Rather, our study suggests that the improvement of stress system regulation is a critical process in the therapeutic action of antidepressants and that hippocampal neurogenesis contributes to this mechanism. This is consistent with clinical data, which demonstrate that, in most patients with altered HPA axis negative feedback, remission and decreased risk of relapse are associated with the improvement of HPA axis functioning.(Heuser 1998; Holsboer 2000; Belmaker and Agam 2008) Here, hippocampus has been found to regulate brain systems involved in stress response; a function apparently used by monoaminergic antidepressants to modulate stress integration. Indeed, our results indicate that neurogenesis lies beneath

successful resolution of HPA impairments by fluoxetine treatment, suggesting that hippocampal neurogenesis is able to impact stress response. This possibility is in agreement with a recent report indicating that neurogenesis inhibition may yield to higher corticosterone secretion following exposure to a new bright-lighting condition.(Schloesser, Manji *et coll.* 2009) On the other hand, CRF_1 antagonists can bypass neurogenesis inhibition and directly act at the roots of the stress systems by antagonizing information conveyed by PVN neurons, which are responsible for activating HPA axis and brain regions involved in stress response. Taken together, these results reveal a role for hippocampal neurogenesis in the regulation of HPA axis and suggest that therapeutic strategies directed at targeting stress systems may be more specific to treat anxiety/depression than monoaminergic drugs. However, very few clinical studies testing such compounds are available to date and further trials in patients will be required to confirm or not this hypothesis.(Ising and Holsboer 2007)

The relationship between hippocampus and brain stress systems was accurately scrutinized here. We found that chronic stress disrupts the ability of hippocampal granule neurons to react to glucocorticoid stimulation. This is consistent with previous results demonstrating that chronic stress reduced GR levels in hippocampus.(Liu, Diorio et coll. 1997; Furay, Bruestle et coll. 2008; Sterlemann, Ganea et coll. 2008) It is therefore possible that impairments in granule neurons reactivity embody a functional correlate of hippocampal GR disturbances and then underlie blunted glucocorticoid feedback and HPA response under chronic stress conditions.(Mizoguchi, Ishige *et coll.* 2003; de Kloet, Joels *et coll.* 2005) We tested this possibility by going further in the neurocircuitry connecting hippocampus to HPA axis and assessing hippocampus-driven FOS activation of subcortical regions relaying inhibitory influences of hippocampus to PVN and HPA axis. Strikingly, chronic stress exposure has greatly lessened the increase of FOS expression in these subcortical relay sites induced by direct injection of DEX in hippocampus. These effects probably triggered the highest PVN activation found in stressed mice and may dampen hippocampus-dependent negative feedback of HPA axis. Interestingly, fluoxetine treatment has been shown to restore the reactivity of DG granule neurons and of hippocampal subcortical relay sites toward PVN. Taken together, these results suggest that enhancing neurogenesis may be a way for antidepressant to add potential source of new glucocorticoid sensitive neurons which may then affect hippocampal stress integration and HPA axis regulation. In addition to the preceding downstream subcortical relay sites, hippocampus also influences the activity of various corticolimbic structures which control stress response, emotion and motivation such as the amygdala, cingulate gyrus, prefrontal cortex and ventral striatum.(Amaral and Witter 1989; Moser and Moser 1998; Naber and Witter 1998; Floresco, Todd *et coll.* 2001) These structures are thought to underlie the main pathophysiological manifestations of anxiety/depressive disorders.(Seminowicz, Mayberg et coll. 2004; Carlson, Singh et coll. 2006; Drevets, Price et coll. 2008) Accordingly, it is conceivable that the UCMS-induced HPA abnormalities represent only a measurable fraction of larger changes in the stress integration system. The elevation of hippocampal neurogenesis might therefore be a mechanism through which antidepressants restore a normal activity of several brain systems involved in an integrated stress response.

Taken together, our data suggest that, while hippocampal neurogenesis would contribute to the improvement of stress integration by antidepressant drugs during chronic stress exposure, its role could be less important in the absence of prior deficiencies or pathological situations. This result parallels the Kempermann's hypothesis of the neurogenic reserve.(Kempermann 2008) He suggests that adult newborn hippocampal neurons would constitute a reserve, inessential in normal conditions, but which could become decisive when the organism is confronted to novelty or complex situations. In our context, new hippocampal neurons might thus be critical for antidepressant effects only when the hippocampus-dependent regulation of stress system is deficient.

In summary, this study identifies a new role for hippocampal neurogenesis which is to regulate the stress hormone system. This new role may explain why adult-generated granule cells are required for the behavioral effects of antidepressants. However, not all the patients with depression display HPA abnormalities,(Holsboer 2000; Belmaker and Agam 2008) as well as not all the mouse strains exhibit HPA disturbances following UCMS exposure.(Ibarguen-Vargas, Surget *et coll.* 2008) It is therefore likely that the extent of neurogenesis involvement in antidepressant effects can depend on the degree of stress system alterations for each subject or strain. Interestingly, the previous conflicting results can be enlightened by this hypothesis. Indeed, the utilization of control non-stressed mice or stressed mice without significant alterations of stress systems would be less appropriate to highlight the role of adult-generated hippocampal neurons in antidepressant effects.(Holick, Lee *et coll.* 2008; Bessa, Ferreira *et coll.* 2009) Future studies will therefore have to examine whether stress system alterations are clearly a condition for the neurogenesis involvement in antidepressant effects as proposed by our study and whether adult-generated hippocampal

neurons can influence stress integration in relevant brain regions such as prefrontal cortex, cingulate cortex or amygdala.

Supplemental Information
Supplemental Information for this article includes Supplemental Figures.

Acknowledgements. The authors thank Dr Sylvie Chalon (Inserm) and Dr Samuel Leman (Université F. Rabelais) for helps and comments, as well as Anne-Marie Leguisquet, Séverine Devers, Maryse Pingaud, Dominique Le Glaunec, Lucette Garreau, Edith Klobetz-Rassam and Navieta Ramasami for assistance.

Conflict of interest. A.S., A.T., E.D.L., A.L., Q.R., C.T., R.P. and Y.I.V., report no biomedical financial interests or potential conflicts of interests. G.G. is an employee of Sanofi-Aventis. R.H. receives compensation as a consultant for BrainCells, PsychoGenics, Servier, Astra Zeneca, and Lundbeck in relation to the generation of novel antidepressants. C.B. receives compensation as a consultant for Takeda.

References

1. Eriksson PS, Perfilieva E, Bjork-Eriksson T, Alborn AM, Nordborg C, Peterson DA et al. Neurogenesis in the adult human hippocampus. Nat Med 1998 Nov; 4(11): 1313-1317.

2. Zhao C, Deng W, Gage FH. Mechanisms and functional implications of adult neurogenesis. Cell 2008 Feb 22; 132(4): 645-660.

3. Kempermann G, Krebs J, Fabel K. The contribution of failing adult hippocampal neurogenesis to psychiatric disorders. Curr Opin Psychiatry 2008 May; 21(3): 290-295.

4. Krishnan V, Nestler EJ. The molecular neurobiology of depression. Nature 2008 Oct 16; 455(7215): 894-902.

5. Cameron HA, Gould E. Adult neurogenesis is regulated by adrenal steroids in the dentate gyrus. Neuroscience 1994 Jul; 61(2): 203-209.

6. Gould E, Tanapat P, McEwen BS, Flugge G, Fuchs E. Proliferation of granule cell precursors in the dentate gyrus of adult monkeys is diminished by stress. Proc Natl Acad Sci U S A 1998 Mar 17; 95(6): 3168-3171.

7. Santarelli L, Saxe M, Gross C, Surget A, Battaglia F, Dulawa S et al. Requirement of hippocampal neurogenesis for the behavioral effects of antidepressants. Science 2003 Aug 8; 301(5634): 805-809.

8. Surget A, Saxe M, Leman S, Ibarguen-Vargas Y, Chalon S, Griebel G et al. Drug-dependent requirement of hippocampal neurogenesis in a model of depression and of antidepressant reversal. Biol Psychiatry 2008 Aug 15; 64(4): 293-301.

9. Airan RD, Meltzer LA, Roy M, Gong Y, Chen H, Deisseroth K. High-speed imaging reveals neurophysiological links to behavior in an animal model of depression. Science 2007 Aug 10; 317(5839): 819-823.

10. Jiang W, Zhang Y, Xiao L, Van Cleemput J, Ji SP, Bai G et al. Cannabinoids promote embryonic and adult hippocampus neurogenesis and produce anxiolytic- and antidepressant-like effects. J Clin Invest 2005 Nov; 115(11): 3104-3116.

11. Wang JW, David DJ, Monckton JE, Battaglia F, Hen R. Chronic fluoxetine stimulates maturation and synaptic plasticity of adult-born hippocampal granule cells. J Neurosci 2008 Feb 6; 28(6): 1374-1384.

12. David DJ, Samuels BA, Rainer Q, Wang JW, Marsteller D, Mendez I et al. Neurogenesis-dependent and -independent effects of fluoxetine in an animal model of anxiety/depression. Neuron 2009 May 28; 62(4): 479-493.

13. Revest JM, Dupret D, Koehl M, Funk-Reiter C, Grosjean N, Piazza PV et al. Adult hippocampal neurogenesis is involved in anxiety-related behaviors. Mol Psychiatry 2009 Mar 3.

14. Bessa JM, Ferreira D, Melo I, Marques F, Cerqueira JJ, Palha JA et al. The mood-improving actions of antidepressants do not depend on neurogenesis but are associated with neuronal remodeling. Mol Psychiatry 2009 Aug; 14(8): 764-773, 739.

15. Holick KA, Lee DC, Hen R, Dulawa SC. Behavioral effects of chronic fluoxetine in BALB/cJ mice do not require adult hippocampal neurogenesis or the serotonin 1A receptor. Neuropsychopharmacology 2008 Jan; 33(2): 406-417.

16. Sahay A, Hen R. Hippocampal neurogenesis and depression. Novartis Found Symp 2008; 289: 152-160; discussion 160-154, 193-155.

17. Amaral DG, Witter MP. The three-dimensional organization of the hippocampal formation: a review of anatomical data. Neuroscience 1989; 31(3): 571-591.

18. Naber PA, Witter MP. Subicular efferents are organized mostly as parallel projections: a double-labeling, retrograde-tracing study in the rat. J Comp Neurol 1998 Apr 13; 393(3): 284-297.

19. Moser MB, Moser EI. Functional differentiation in the hippocampus. Hippocampus 1998; 8(6): 608-619.

20. Floresco SB, Todd CL, Grace AA. Glutamatergic afferents from the hippocampus to the nucleus accumbens regulate activity of ventral tegmental area dopamine neurons. J Neurosci 2001 Jul 1; 21(13): 4915-4922.

21. Herman JP, Ostrander MM, Mueller NK, Figueiredo H. Limbic system mechanisms of stress regulation: hypothalamo-pituitary-adrenocortical axis. Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry 2005 Dec; 29(8): 1201-1213.

22. Ulrich-Lai YM, Herman JP. Neural regulation of endocrine and autonomic stress responses. Nat Rev Neurosci 2009 Jun; 10(6): 397-409.

23. Herman JP, Schafer MK, Young EA, Thompson R, Douglass J, Akil H et al. Evidence for hippocampal regulation of neuroendocrine neurons of the hypothalamo-pituitary-adrenocortical axis. J Neurosci 1989 Sep; 9(9): 3072-3082.

24. Mizoguchi K, Ishige A, Aburada M, Tabira T. Chronic stress attenuates glucocorticoid negative feedback: involvement of the prefrontal cortex and hippocampus. Neuroscience 2003; 119(3): 887-897.

25. Pariante CM, Miller AH. Glucocorticoid receptors in major depression: relevance to pathophysiology and treatment. Biol Psychiatry 2001 Mar 1; 49(5): 391-404.

26. Gold PW, Chrousos GP. Organization of the stress system and its dysregulation in melancholic and atypical depression: high vs low CRH/NE states. Mol Psychiatry 2002; 7(3): 254-275.

27. Gillespie CF, Nemeroff CB. Hypercortisolemia and depression. Psychosom Med 2005 May-Jun; 67 Suppl 1: S26-28.

28. Holsboer F. The corticosteroid receptor hypothesis of depression. Neuropsychopharmacology 2000 Nov; 23(5): 477-501.

29. Heuser I. Anna-Monika-Prize paper. The hypothalamic-pituitary-adrenal system in depression. Pharmacopsychiatry 1998 Jan; 31(1): 10-13.

30. Belmaker RH, Agam G. Major depressive disorder. N Engl J Med 2008 Jan 3; 358(1): 55-68.

31. McEwen BS. Glucocorticoids, depression, and mood disorders: structural remodeling in the brain. Metabolism 2005 May; 54(5 Suppl 1): 20-23.

32. Sapolsky RM. Glucocorticoids and hippocampal atrophy in neuropsychiatric disorders. Arch Gen Psychiatry 2000 Oct; 57(10): 925-935.

33. Surget A, Wang Y, Leman S, Ibarguen-Vargas Y, Edgar N, Griebel G et al. Corticolimbic transcriptome changes are state-dependent and region-specific in a rodent model of depression and of antidepressant reversal. Neuropsychopharmacology 2009 May; 34(6): 1363-1380.

34. Willner P. Validity, reliability and utility of the chronic mild stress model of depression: a 10-year review and evaluation. Psychopharmacology (Berl) 1997 Dec; 134(4): 319-329.

35. Alonso R, Griebel G, Pavone G, Stemmelin J, Le Fur G, Soubrie P. Blockade of CRF(1) or V(1b) receptors reverses stress-induced suppression of neurogenesis in a mouse model of depression. Mol Psychiatry 2004 Mar; 9(3): 278-286, 224.

36. Paxinos G, Franklin KBJ. The mouse brain in stereotaxic coordinates. Academic Press: San Diego, CA, 2001, 124pp.

37. Kee N, Teixeira CM, Wang AH, Frankland PW. Preferential incorporation of adult-generated granule cells into spatial memory networks in the dentate gyrus. Nat Neurosci 2007 Mar; 10(3): 355-362.

38. Ibarguen-Vargas Y, Surget A, Touma C, Palme R, Belzung C. Multifaceted strain-specific effects in a mouse model of depression and of antidepressant reversal. Psychoneuroendocrinology 2008 Nov; 33(10): 1357-1368.

39. Touma C, Palme R, Sachser N. Analyzing corticosterone metabolites in fecal samples of mice: a noninvasive technique to monitor stress hormones. Horm Behav 2004 Jan; 45(1): 10-22.

40. Touma C, Sachser N, Mostl E, Palme R. Effects of sex and time of day on metabolism and excretion of corticosterone in urine and feces of mice. Gen Comp Endocrinol 2003 Feb 15; 130(3): 267-278.

41. Holmes A, Heilig M, Rupniak NM, Steckler T, Griebel G. Neuropeptide systems as novel therapeutic targets for depression and anxiety disorders. Trends Pharmacol Sci 2003 Nov; 24(11): 580-588.

42. Tashiro A, Makino H, Gage FH. Experience-specific functional modification of the dentate gyrus through adult neurogenesis: a critical period during an immature stage. J Neurosci 2007 Mar 21; 27(12): 3252-3259.

43. Ramirez-Amaya V, Marrone DF, Gage FH, Worley PF, Barnes CA. Integration of new neurons into functional neural networks. J Neurosci 2006 Nov 22; 26(47): 12237-12241.

44. Schloesser RJ, Manji HK, Martinowich K. Suppression of adult neurogenesis leads to an increased hypothalamo-pituitary-adrenal axis response. Neuroreport 2009 Apr 22; 20(6): 553-557.

45. Duman RS. Depression: a case of neuronal life and death? Biol Psychiatry 2004 Aug 1; 56(3): 140-145.

46. Eisch AJ, Cameron HA, Encinas JM, Meltzer LA, Ming GL, Overstreet-Wadiche LS. Adult neurogenesis, mental health, and mental illness: hope or hype? J Neurosci 2008 Nov 12; 28(46): 11785-11791.

47. Sapolsky RM. Is impaired neurogenesis relevant to the affective symptoms of depression? Biol Psychiatry 2004 Aug 1; 56(3): 137-139.

48. Henn FA, Vollmayr B. Neurogenesis and depression: etiology or epiphenomenon? Biol Psychiatry 2004 Aug 1; 56(3): 146-150.

49. Sahay A, Hen R. Adult hippocampal neurogenesis in depression. Nat Neurosci 2007 Sep; 10(9): 1110-1115.

50. American Psychiatric Association. Diagnostic and Statistical Manual of Mental Disorders, Fourth Edition. American Psychiatric Press: Washington DC, 1994.

51. Stahl SM, Wise DD. The potential role of a corticotropin-releasing factor receptor-1 antagonist in psychiatric disorders. CNS Spectr 2008 Jun; 13(6): 467-483.

52. Surget A, Belzung C. Involvement of vasopressin in affective disorders. Eur J Pharmacol 2008 Apr 7; 583(2-3): 340-349.

53. Ising M, Holsboer F. CRH-sub-1 receptor antagonists for the treatment of depression and anxiety. Exp Clin Psychopharmacol 2007 Dec; 15(6): 519-528.

54. Liu D, Diorio J, Tannenbaum B, Caldji C, Francis D, Freedman A et al. Maternal care, hippocampal glucocorticoid receptors, and hypothalamic-pituitary-adrenal responses to stress. Science 1997 Sep 12; 277(5332): 1659-1662.

55. Sterlemann V, Ganea K, Liebl C, Harbich D, Alam S, Holsboer F et al. Long-term behavioral and neuroendocrine alterations following chronic social stress in mice: implications for stress-related disorders. Horm Behav 2008 Feb; 53(2): 386-394.

56. Furay AR, Bruestle AE, Herman JP. The role of the forebrain glucocorticoid receptor in acute and chronic stress. Endocrinology 2008 Nov; 149(11): 5482-5490.

57. de Kloet ER, Joels M, Holsboer F. Stress and the brain: from adaptation to disease. Nat Rev Neurosci 2005 Jun; 6(6): 463-475.

58. Carlson PJ, Singh JB, Zarate CA, Jr., Drevets WC, Manji HK. Neural circuitry and neuroplasticity in mood disorders: insights for novel therapeutic targets. NeuroRx 2006 Jan; 3(1): 22-41.

59. Drevets WC, Price JL, Furey ML. Brain structural and functional abnormalities in mood disorders: implications for neurocircuitry models of depression. Brain Struct Funct 2008 Sep; 213(1-2): 93-118.

60. Seminowicz DA, Mayberg HS, McIntosh AR, Goldapple K, Kennedy S, Segal Z et al. Limbic-frontal circuitry in major depression: a path modeling metanalysis. Neuroimage 2004 May; 22(1): 409-418.

61. Kempermann G. The neurogenic reserve hypothesis: what is adult hippocampal neurogenesis good for? Trends Neurosci 2008 Apr; 31(4): 163-169.

FIGURE LEGENDS

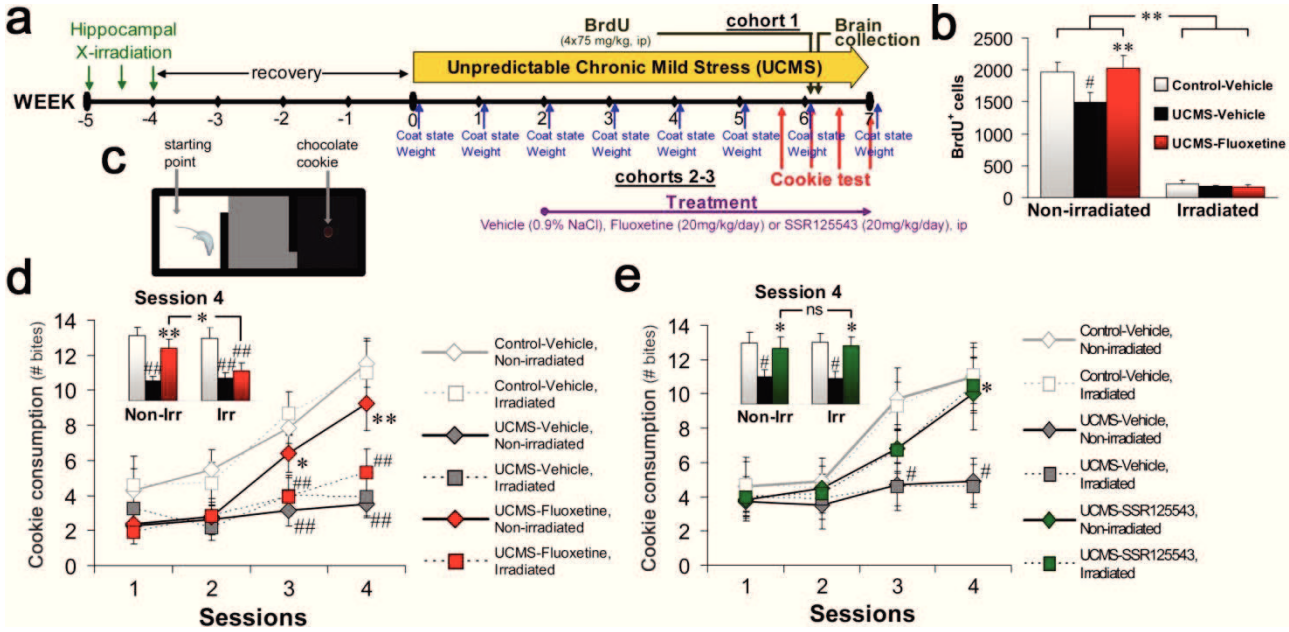


Figure 1. Hippocampal neurogenesis is required for fluoxetine but not for the CRF_1 antagonist (SSR125543) behavioral effects. (a) Schematic representation of the experimental design. (b) The cell proliferation in the subgranular zone (SGZ), assessed by the number of BrdU-positive cells, is reduced by the UCMS exposure. This effect is reversed by fluoxetine treatment (20 mg/kg/day, ip). X-ray procedure induced a strong depletion of the SGZ cell proliferation (n = 5-7 per group). (c) Schematic representation of the device of the Cookie Test (CT). (d) The consumption of the cookie (number of bites) in the CT increased along the 4 sessions in control mice. UCMS induced a decrease of this consumption, which was reversed by fluoxetine in non-irradiated mice (Non-Irr) but not in irradiated mice (Irr). Insert represents details of the session 4. (n = 13-14 per group). (e) SSR125543 (20 mg/kg/day, ip) reversed the UCMS effects in the CT in both non-irradiated mice and irradiated mice. Insert represents details of the session 4 (n = 10 per group). Kruskal-Wallis H test followed up with a U-test adjusted for multiple comparisons: $^{\#}$, $p<0.05$ and $^{\#\#}$, $p<0.01$ UCMS mice *vs.* control-vehicle mice; *, $p<0.05$ and **, $p<0.01$ UCMS-fluoxetine/SSR125543 mice *vs.* UCMS-vehicle mice, or between line-connected groups. Data represent mean±sem.

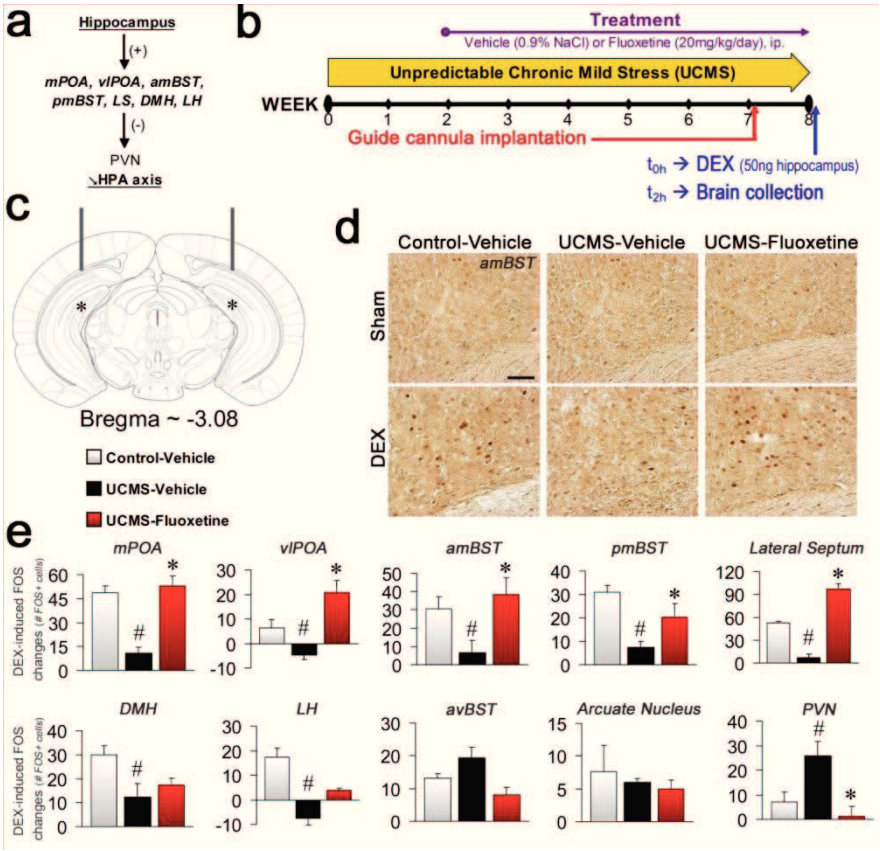


Figure 2. Chronic stress impairs hippocampal modulation of brain areas involved in stress response, an effect reversed by fluoxetine. (a) Schematic representation of the neurocircuitry underlying hippocampal regulation on HPA axis. CA1 and subiculum in hippocampus send glutamatergic efferences (+) toward subcortical relay sites, such as medial and ventrolateral preoptic areas (mPOA and vlPOA respectively), anteromedial and posteromedial bed nucleus of stria terminalis (amBST and pmBST), lateral septum (LS), dorsomedial and lateral hypothalamic nuclei (DMH and LH). These sites contain GABAergic neuron population (-) underlying inhibitory influences to the paraventricular nucleus (PVN). (b) Schematic representation of the experimental design. (c) Schematic representation of the guide-cannula implantation (bar: bregma = -3.08, lateral = ±2.3, vertical = -1.4) and of the dexamethasone (DEX) infusion sites, one millimeter lower (asterisk). The figure is adapted from Paxinos and Franklin (2001; ref.36). (d) Representative images of FOS-labeled positive cells from the amBST (scale bar, 50µm). (e) Changes induced by intrahippocampal DEX infusion on the number of FOS-labeled cells in mPOA, vlPOA, amBST, pmBST, LS, DMH, LH, anteroventral BST (avBST), arcuate nucleus and PVN in control, UCMS-vehicle and UCMS-fluoxetine (20 mg/kg/day, ip) mice (n = 4 per group). Kruskal-Wallis H test followed up with a U-test adjusted for multiple comparisons: $^{\#}$, $p<0.05$ UCMS-vehicle mice *vs.* control-vehicle mice; *, $p<0.05$ UCMS-fluoxetine mice *vs.* UCMS-vehicle mice. Data represent mean±sem.

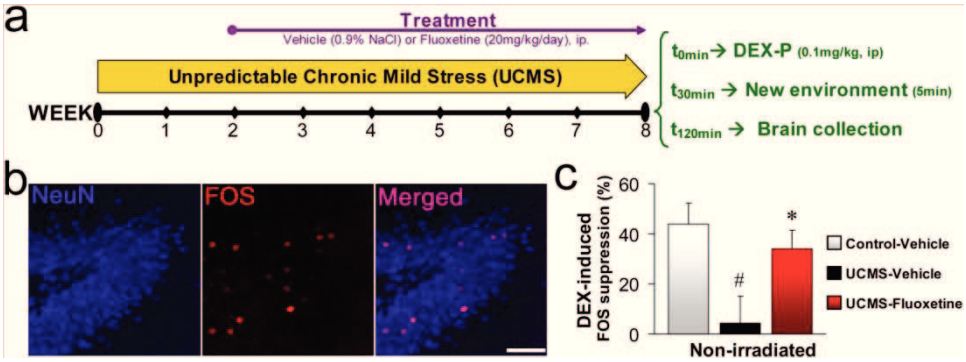


Figure 3. UCMS dampens the sensitivity of the hippocampal granule neurons to glucocorticoid stimulation. (a) Schematic representation of the experimental design. Mice were subjected to a DEX-P or a vehicle injection followed by a novel environment exposure and brains were collected to assess the FOS immunoreactivity in dentate neurons. (b) Representative confocal images of $NeuN^+$ (blue), FOS^+ (red) and $NeuN^+FOS^+$ (merged) cells in the granular cell layer of the dentate gyrus (scale bar, 50µm). (c) The DEX treatment caused a decrease of the number of FOS-labeled granule cells in the dentate gyrus of control mice. The UCMS paradigm blunted the sensitivity of granule cells to DEX, while fluoxetine treatment (20 mg/kg/day, ip) reestablish a higher level of FOS-suppression in UCMS mice (n = 5 per group). Kruskal-Wallis H test followed up with a U-test adjusted for multiple comparisons: $^{\#}$, $p<0.05$ and $^{\#\#}$, $p<0.01$ UCMS-vehicle mice *vs.* control-vehicle mice; *, $p<0.05$ and **, $p<0.01$ UCMS-fluoxetine mice *vs.* UCMS-vehicle mice. Data represent mean±sem.

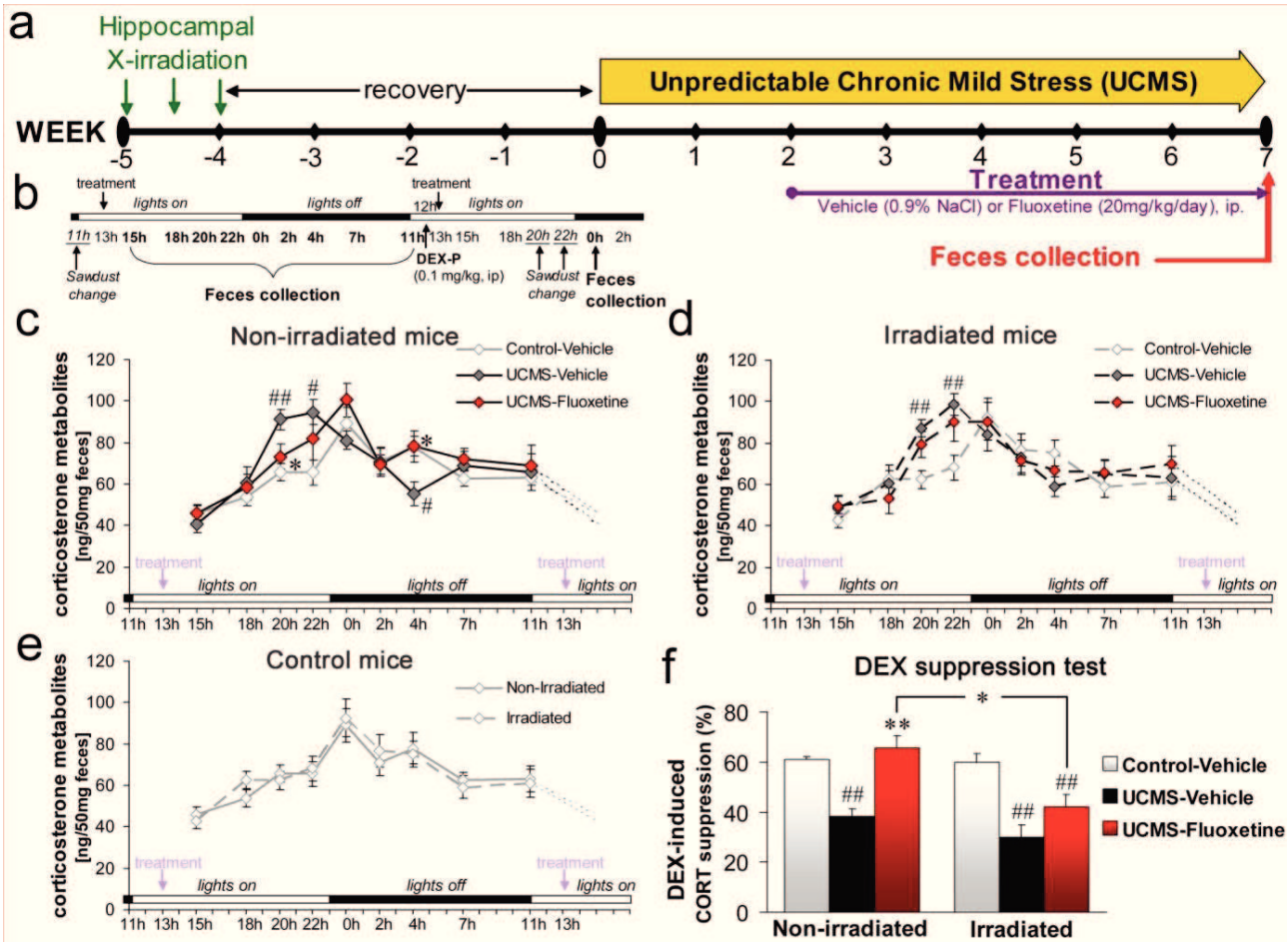


Figure 4. Fluoxetine treatment counteracts the UCMS-induced abnormalities of the HPA axis activity with a neurogenesis-dependent mechanism. (a) Schematic representation of the experimental design. (b) Schedule of the fecal sample collection and of the dexamethasone-phosphate (DEX-P) administration. (c) The level of the fecal corticosterone metabolites (CORT) was considered as a correlate of the circadian HPA activity. UCMS exposure in non-irradiated mice induced several changes in the 24h baseline circadian HPA activity, which was partly reversed by fluoxetine treatment (20 mg/kg/day, ip; n = 9-11 per group). (d) In irradiated mice, UCMS exposure also induced several changes in the 24h baseline circadian HPA activity, but fluoxetine was unable to reverse these effects (n = 8-10 per group). (e) X-irradiation had no effect on its own on basal HPA axis activity in control mice as revealed by the fecal CORT levels (n = 10-11 per group). (f) The HPA negative feedback was examined by the DEX suppression test. The DEX-induced CORT suppression was significantly weakened by UCMS in both non-irradiated and irradiated mice, but reversed by fluoxetine treatment only in non-irradiated mice (n = 8-11 per group). Kruskal-Wallis H test followed up with a U-test adjusted for multiple comparisons. $^{\#}$, $p<0.05$ and $^{\#\#}$, $p<0.01$ UCMS-vehicle mice *vs.* control-vehicle mice; *, $p<0.05$ and **, $p<0.01$ UCMS-fluoxetine mice *vs.* UCMS-vehicle mice, or between line-connected groups. Data represent mean±sem.

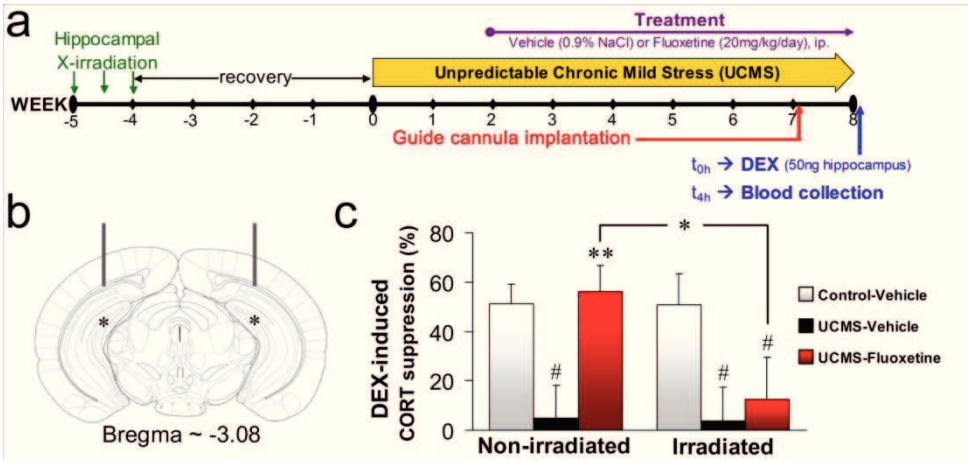


Figure 5. Adult-generated granule neurons are required to restore the hippocampal inhibition of HPA axis during the UCMS. (a) Schematic representation of the experimental design. (b) Schematic representation of the guide-cannula implantation (bar: bregma = -3.08, lateral = ±2.3, vertical = -1.4) and of the dexamethasone (DEX) infusion sites, one millimeter lower (asterisk). The figure is adapted from Paxinos and Franklin (2001; ref.36). (c) The intrahippocampal DEX infusion caused a significant decrease of the plasma corticosterone (CORT) in control mice. The ability of hippocampus to reduce CORT level following DEX was not altered by irradiation. In contrast, the UCMS exposure abolished the hippocampus-induced CORT suppression. Fluoxetine treatment (20 mg/kg/day, ip) was able to restore the CORT suppression at a level similar to control mice in non-irradiated mice but not in irradiated mice (n = 7-8 per group). Kruskal-Wallis H test followed up with a U-test adjusted for multiple comparisons: $^{\#}$, $p<0.05$ UCMS mice *vs.* control-vehicle mice; *, $p<0.05$ and **, $p<0.01$ UCMS-fluoxetine mice *vs.* UCMS-vehicle mice, or between line-connected groups. Data represent mean±sem.

Annexe 3 : Role of kynurenine pathway metabolites in the pathophysiology of depression: focus on oxidative stress.

Projet de post-doctorat déposé auprès de l'INSERM (France) et du NH & MRC (Australie) dans le but de financer un séjour d'un an dans un laboratoire Australien (G. Guillemin).

Title : Role of kynurenine pathway metabolites in the pathophysiology of depression focus on oxidative stress

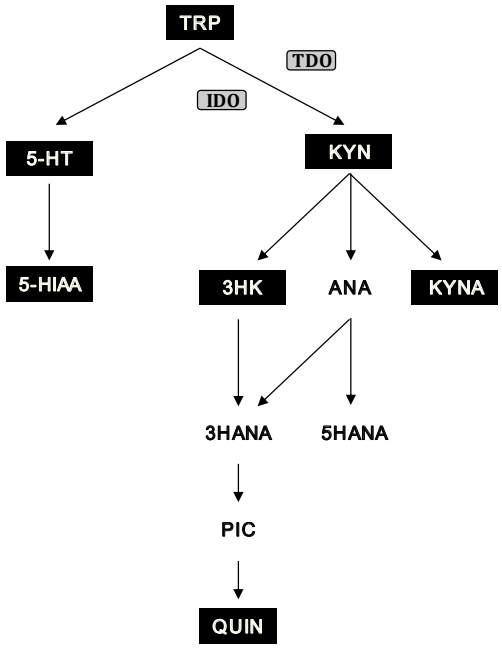
BACKGROUND

Depression

Depression represents one of the most common and proliferating health problems worldwide (Wong and Licinio 2001). According to the World Health Organization, unipolar depression will be the second most prevalent cause of illness-induced disability by 2020 (Murray and Lopez 1997). Despite more than 50 years of research, aetiology and pathophysiology of this illness remain very elusive although many biological alterations have been reliably reported in depressed patients. Among these, reduced monoaminergic neurotransmission, increased activity of the HPA axis and raised liberation of proinflammatory cytokines are the most common features of depressive disorders (Asberg, Bertilsson *et coll.* 1984; Steckler, Holsboer *et coll.* 1999; Gold and Chrousos 2002; Elhwuegi 2004; Dunn, Swiergiel *et coll.* 2005; Gabbay, Klein *et coll.* 2009; Miller, Maletic *et coll.* 2009) .

Current pharmacological therapies consist in replenishing intracellular stores of monoamines in particular those of noradrenalin and serotonin (5-HT). However, all available antidepressant drugs are far from being perfect cure for several reasons. First of all, it takes six to eight weeks to exert their effects, which means that therapeutic action does not result from rapid effects on monoamine neurotransmission as expected but rather through long term changes. Secondly, there is a problem of efficacy because all drugs are able to alleviate depressive symptoms in only 60 to 70% of patients, and are consequently hardly more effective than placebo (Kirsch, Deacon et coll. 2008; Kirsch 2009). Another drawback of current antidepressant treatments is the wide range of undesirable side effects affecting virtually all biological functions including particularly cardio-vascular, intestine and sexual (Papakostas). For all these reasons, the search for new molecules and biological targets for antidepressant drug discovery remains a major challenge for biomedical research. However, the discovery of such compounds requires a better understanding of the pathogenesis of major depression, and particularly cellular and molecular alterations underlying depressive symptoms.

Figure 1: Simplified overview of the TRP metabolism



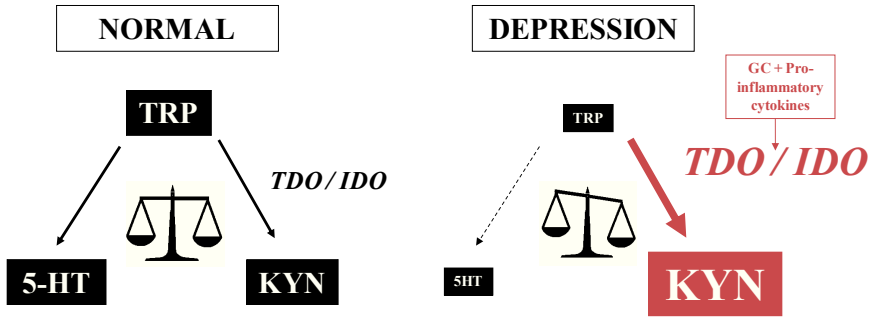
TRP = tryptophan	ANA = Anthranilic acid
5-HT = serotonin	KYNA = Kynurenic acid
5-HIAA = 5-hydroxyindoleacetic acid	3HANA = 3-hydroxyanthranilic acid
KYN = kynurenin	5HANA = 5-hydroxyanthranilic acid
TDO = tryptophan-2,3-dioxygenase	PIC = Picolinic acid
IDO = indoleamine-2,3-dioxygenase	QUIN = quinolinic acid.
3HK = 3-hydroxykynurenine	

Involvement of the kynurenine pathway (KP) in depression

One promising way to fulfil such objectives is to clarify the role of the kynurenine pathway (KP), one of the two routes of tryptophan (TRP) metabolism, in biochemical disturbances occurring during depressive disorders (see figure 1 for a description of the KP). Indeed, over the last decade activation of the KP has increasingly been reported in patients suffering from various types of depressive disorders such as major depression (Myint, Kim *et coll.* 2006), bipolar disorders (Miller, Llenos et coll. 2008), major/minor depressive states related to immunotherapeutic treatments (Capuron, Ravaud *et coll.* 2002), pre- and post-partum depression (Maes, Verkerk *et coll.* 2002; Kohl, Walch *et coll.* 2005), cardiovascular disease-related depression (Swardfager, Herrmann *et coll.* 2009). Such a pathological mechanism seems to be closely related to neuroendocrine and immune changes found in these patients. Indeed, over activation of the hypothalamic-pituitary-adrenal axis (HPA axis), leading to high circulating concentrations of glucocorticoids (GC), and over production of pro-inflammatory cytokines by immune cells are two major features of depressive states both in humans (Steckler, Holsboer *et coll.* 1999; Gold and Chrousos 2002; Dunn, Swiergiel *et coll.* 2005; Gabbay, Klein *et coll.* 2009; Miller, Maletic *et coll.* 2009) and animal models of depression (Ibarguen-Vargas, Surget *et coll.* 2008; Anisman 2009). Such disturbances can activate the KP through two

enzymes, the tryptophan-2,3-dioxygenase (TDO) and the indoleamine-2,3-dioxygenase (IDO), that are respectively activated by GC and pro-inflammatory cytokines (Byrne, Lehmann *et coll.* 1986; Comings, Muhleman *et coll.* 1995; Wichers, Koek *et coll.* 2005). Therefore, it has been repeatedly shown that depressive states are associated with increased levels of KYN in plasma but also reduced levels of TRP leading to a rise of the KYN/TRP ratio. Interestingly, this phenomenon is positively correlated with the intensity of depressive symptoms in many diseases (Bonaccorso, Puzella *et coll.* 2001; Maes, Verkerk *et coll.* 2002; Wichers, Koek *et coll.* 2005; Mackay, Forrest *et coll.* 2008; Raison, Borisov *et coll.* 2009). These results strongly suggest a causal relationship between TRP catabolism along the KP and biological mechanisms underlying anxio-depressive states.
However, pathological mechanisms by which the KP may induce such bio-behavioural alterations remain to be clarified. Two hypotheses have been formulated to explain the link between KP activation and depressive states. The first one, the "kynurenine shunt", postulated that once activated, TDO and IDO might lead to the breakdown of TRP into KYN, thereby reducing the availability of TRP for brain 5-HT synthesis (see Figure 2).

Figure 2: The « kynurenine shunt » hypothesis of depression



High levels of glucocorticoids (GC) and pro-inflammatory cytokines in depressed patients accelerate the degradation of tryptophan (TRP) along the kynurenine pathway, and consequently decrease the availability of the aminoacid for the synthesis of serotonin (5-HT).

However, preclinical and clinical studies have found that KP activation is not sufficient to induce TRP depletion and then could not explain biochemical and behavioural abnormalities observed in depressed patients (Wichers, Koek *et coll.* 2005; Raison, Dantzer *et coll.* 2010). Interestingly, however, both peripheral and intracerebral administration of KYN alone can induce anxiety-like and depressive-like behaviours in laboratory animals (Vecsei and Beal 1990; Lapin 1996; O'Connor, Lawson *et coll.* 2008), indicating that KP metabolites may be more relevant than TRP depletion to induce behavioural symptoms.
Studies performed in this realm have provided key evidence for an involvement of KP downstream metabolites. As it is depicted in figure 1, KYN is further metabolized through two distinct pathways along which several neuroactive compounds are produced. This is the case for the NMDA agonist/free radical generator quinolinic acid (QUIN) that can induce excitotoxic lesions (in case of tissue accumulation) with subsequent influx of Ca^{2+}, activation of both neuronal nitric oxide synthase (nNOS) and inducible nitric oxide synthase (iNOS), and excess generation of nitric oxide (NO·) (Braidy, Grant et coll. 2009). On the contrary, kynurenic acid (KYNA) acts as NMDA and α7 nicotinic receptor antagonist and is subsequently able to counteract QUIN toxicity (Hilmas, Pereira *et coll.* 2001; Stone 2001). Some other KP metabolites such as 3-hydroxykynurenine (3HK), 3-hydroxyanthranilic acid (3-HANA) and 5-hydroxyanthranilic acid (5-HANA) are also known to exert neurotoxic actions through an increase in oxidative stress (Okuda, Nishiyama *et coll.* 1998; Goldstein, Leopold *et coll.* 2000; Morita, Saito *et coll.* 2001; Smith, Smith *et coll.* 2009). Conversely, another QUIN precursor, picolinic acid (PIC), is known to be neuroprotective as it is able to block QUIN toxicity by acting through the attenuation of calcium-dependent glutamate release and/or chelating endogenous zinc (Vrooman, Jhamandas et coll. 1993; Jhamandas, Boegman et coll. 1998). On the basis of these properties, it has been proposed that the relative balance between QUIN and KYNA pathways may underlie the development of cellular alterations that might influence numerous pathways believed to be involved in depression, including neurotransmitter metabolism, neuroendocrine function and neural plasticity (Anisman, Merali *et coll.* 2008; Dantzer, O'Connor *et coll.* 2008). However, very few studies have measured CNS concentrations of these compounds. Raison et *al.* (2009) recently showed that cerebrospinal fluid (CSF) concentration of QUIN is not only elevated in depressed patients but is also positively correlated with the

intensity of depressive symptoms assessed by Montgomery–Asberg Depression Rating Scale (MADRS) (see Figure 3). As mentioned above, the depressive score have already been found to be correlated with the level of activation of the peripheral KP but Raison and collaborators have, for the first time, given evidence that high levels of QUIN in the CSF are associated with depressive states of higher intensity. However, CSF data are far from being representative of what can happen within specific structures of the limbic system importantly affected during depressive disorders.

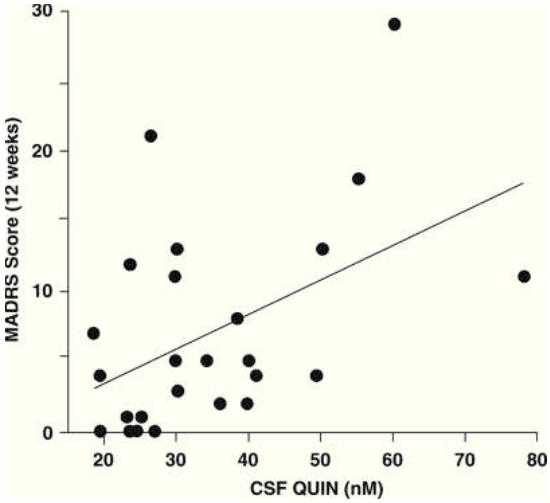


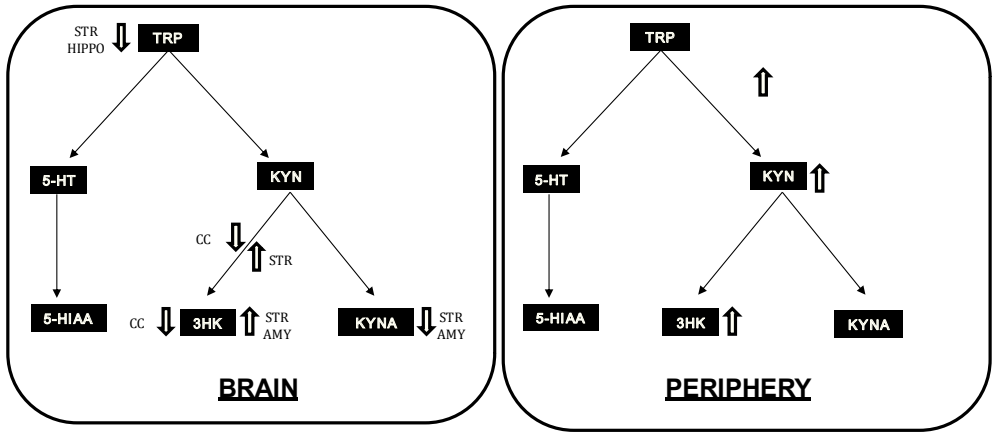
Figure 3 : Correlation between cerebrospinal fluid (CSF) quinolinic acid (QUIN) and depression scores in controls and patients treated with interferon (IFN)-α/ribavirin for hepatitis C virus (HCV) infection. Subjects treated with IFN-α/ribavirin were studied after ~12 weeks on IFN-α/ribavirin therapy. Symptoms of depression were assessed using the Montgomery–Asberg Depression Rating Scale (MADRS). CSF QUIN significantly correlated with MADRS scores (Spearman's ρ=0.47, d.f.=23, P=0.019). (***As reported by Raison et al., 2009***)

Recent improvement of the knowledge on the role of the KP in depression

To better understand in which extent the KP metabolites are involved in the pathological processes underlying depression, we need to study and characterize more precisely the role that QUIN and other KP metabolites may have in cellular and molecular changes found in depression. The only alternative to do this *in vivo* is to use animal models of depression. This will allow us to obtain more comprehensive data by getting and studying specific brain regions, which is of course not possible with human patients.

With this aim, during my PhD I have used a validated animal model of depression (Surget, Saxe *et coll.* 2008; Sibille, Wang *et coll.* 2009; Surget, Wang *et coll.* 2009) – the Unpredictable Chronic Mild Stress (UCMS; see below for a more detailed description) – to investigate more deeply the link between activation of the KP and anxio-depressive behaviours. Therefore, in a recently completed HPLC study, I found that in addition to be peripherally activated by UCMS (as it is observed in depressed patients), the KP is diverted towards 3HK synthesis in the periphery and in subcortical limbic structures (amygdala = AMY and striatum = STR) whereas the opposite is observed in cortical limbic structures (cingulate cortex = CC), i.e. 3HK concentration is reduced (Laugeray, Launay *et coll.* 2010) (see Figure 4).

Figure 4: UCMS effects on the kynurenine pathway



STR: Striatum – HIPPO: Hippocampus – AMY: Amygdala – CC: Cingulate cortex

These results are very important because they constitute the first evidence that UCMS-induced cerebral KP alterations are structure-dependant: QUIN pathway being favoured in AMY and STR whereas it is reduced in CC.
Moreover, I have also showed that the activation of the peripheral KP is positively correlated with the expression of anxiety-like and depressive-like behaviours in UCMS mice (Laugeray, Launay et coll. *Submitted*). Interestingly, these results are in accordance with clinical works reporting a positive correlation between KP activation and depressive scores (see above). This is of importance because this proves that UCMS is a good model to study KP involvement in depression. More recently, we were interested in investigating the effects of both the classical antidepressant fluoxetine (FLX; a selective serotonin reuptake inhibitor) and the IDO inhibitor 1-methyltryptophan (1MT). The results provided strong evidence that both the peripheral and the cerebral KP play a key role not only in the pathogenesis of depression but also in the mechanisms of action of antidepressant drugs. To follow on this first set of results on the effects of UCMS on the KP (see figure 4), we then showed that 1MT is as good as FLX to reverse bio-behavioural UCMS-induced alterations (Laugeray, Launay et coll. *In preparation*). Similar results have been obtained by the group of Robert Dantzer who showed that 1MT could blocks both LPS- and BCG-induced increases in depressive-like behaviours in mice (O'Connor, Lawson *et coll.* 2008; O'Connor, Lawson *et coll.* 2009). Taken together, these data strongly suggest that KYN and its downstream metabolites are key mediators of anxio-depressive states.

Rationale for this project
As mentioned above, the catabolism of TRP through the KP is accelerated in both depressed patients and "depressed" mice. In addition, KYN is diverted towards the synthesis of 3HK and QUIN (see figure 1) in some tissues (in the periphery and within the AMY and the STR in UCMS mice) whereas in other tissues this is the opposite (in the CC in UCMS mice). Given that 3HK and QUIN are both neurotoxic mainly through oxidative damages, it would be relevant to determine if such KP changes could be associated with an increase in oxidative stress. Indeed, some imbalances between oxidant and antioxidant systems have been described in depressed patients (see for review (Maes, Galecki et coll. 2010)). As a consequence, ***our hypothesis is that accumulation of some KP metabolites into the brain could significantly contribute to alter cellular and molecular functioning of cerebral cells by increasing the level of oxidative stress in key structures involved in the regulation of mood, and are consequently responsible for bio-behavioural alterations observed in depression.***

OBJECTIVE OF THE PROJECT

The main objective of this project is to check whether KP alterations observed in our animal model of depression (UCMS) can alter the balance between pro-oxidant and anti-oxidant systems and consequently induce/increase oxidative stress.

This project will be based upon two methodological approaches:
Aim 1. Investigate the presence of markers of oxidative stress in various tissues in which the level of 3HK is increased by UCMS.
Aim 2. Evaluate the antioxidant potential in tissues in which 3HK is increased by UCMS

RESEARCH PLAN

Aim 1. ***Investigate the presence of markers of oxidative stress in various tissues in which the level of 3HK is increased by UCMS.***

Summary of the experiment:
Given that our initial results indicated (Laugeray, Launay *et coll.* 2010; Laugeray, Launay *et coll. In preparation*) that the KP is significantly diverted towards the synthesis of pro-oxidant compounds such as 3HK in the periphery and within some limbic structures (see figure 4), the first experiment will try to determine if these pathological mechanisms are responsible for the increase of oxidative stress in cerebral structures of "depressed" mice. With this aim, male BALB/c mice will be subjected to a 7-week UCMS procedure in order to induce depressive symptoms. Then, the level of KP metabolites will be measured in the

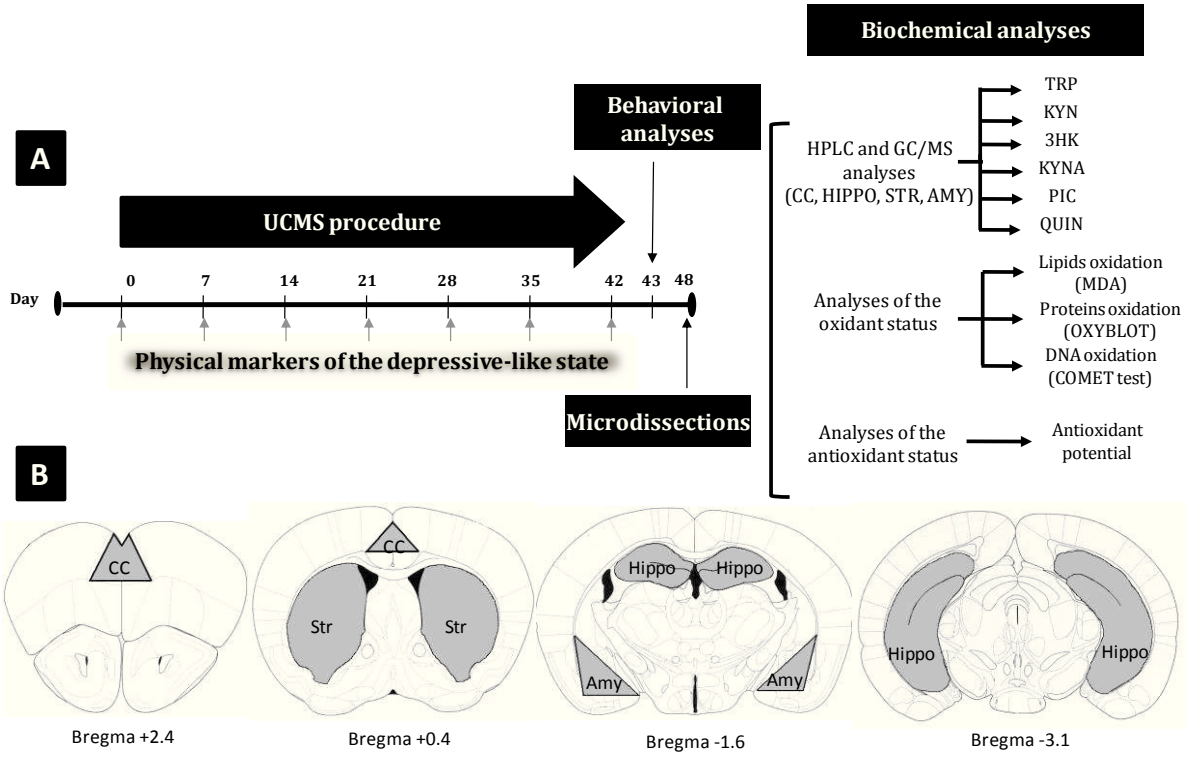
periphery and within cerebral structures strongly involved in the modulation of emotional states (amygdale = AMY, hippocampus = HIPPO, cingulated cortex = CC and striatum = STR). Measurements of oxidant and antioxidant status will be performed in another group of animals (UCMS vs. control). To be sure that oxidative stress is induced by KP metabolites, a supplementary group of mice will be i.p. injected with KYN.

Materials and methods:
(The general design of the experiment is depicted on figure 5)

1) ***Induction of depressive symptoms in mice***

The UCMS model of depression: This model consists in confronting mice to mild and non-harmful socio-environmental stressors during several weeks, in an unpredictable way. The stressed mice are isolated in small individual cages (24x11x12cm) with food and water *ad libitum*, while the non-stressed mice are grouped with their congeners in large cages with some shelters enabling them to escape from the aggressive interactions. The UCMS-exposed mice are faced with several different stressors such as housing on damp sawdust (about 200 ml of water for 100 g of sawdust), sawdust changing (replacement of the soiled sawdust by an equivalent volume of new sawdust), placement in an empty cage (usually the home cage of the subject, but with no sawdust), placement in an empty cage with water (the mouse is placed in its empty cage, whose bottom has been filled up with 1 cm high water at 21°C), switching cages (also sometimes termed as social stress: the mouse from a cage A is placed in the soiled cage from mouse B, mouse B itself being absent in order to avoid aggressive interactions), cage tilting (45ºC), predator sounds, introduction of rat or cats faeces as well as fur in the mouse home cage, inversion of the light/dark cycle, lights on for a short time during the dark phase or light off during the light phase, confinement in small tubes (diameter: 4 cm; length: 5 cm). The duration of these stressors as well as the moment of their occurrence vary from one day to the other. Usually, mice are exposed to one stressor at the beginning of the scotophase and to another one at the end of the scotophase. It can also be that several stressors are applied simultaneously (for example, lights on during the dark phase at the same time then damp sawdust). The stressors we use are rather mild in their intensity (mainly psychosocial stressors), the essential features being their chronicity (the protocol lasts several weeks: from six to ten weeks) and the unpredictability.
The UCMS procedure mimics the role of chronic stress in precipitating depression and induces various long-term physical, behavioural, neurochemical and neuroendocrine alterations that resemble those observed in depressed patients, which are reversed only by chronic, but not acute antidepressants treatments (Belzung and Surget *In press.*). It has been reported that the UCMS regimen in mice elicits decrease in responsiveness to reward, as revealed by decreased palatable sucrose consumption (Pothion, Bizot *et coll.* 2004), deteriorates physical state and induces changes in emotional-related behaviours; these abnormalities are reversed by chronic but not acute antidepressant treatment (Santarelli, Saxe *et coll.* 2003; Yalcin, Aksu *et coll.* 2005; Surget, Saxe *et coll.* 2008; Yalcin, Belzung *et coll.* 2008; Laugeray, Launay *et coll. In preparation;* Belzung and Surget *In press.*).

Figure 5: Experimental design of the project



2) *Assessment of the depressive-like state*

During the UCMS protocol: Body weight, and coat state will be assessed weekly, as markers of the progression of the UCMS-evoked syndrome. The coat score combined results from different body parts (0=well-groomed, 1=unkempt). This index has been widely pharmacologically validated (Santarelli, Saxe *et coll.* 2003).
At the end of the protocol: Emotion-related and agonistic behaviours were measured at the end of UCMS using various tests such as the novelty suppressed feeding (NSF) test, the resident/intruder test, the splash test etc, anhedonia tests (see (Belzung and Surget *In press.*) for a detailed description of each test and expected results).

3) *Tissue sampling and measurements of KP metabolites*

Brain tissues: Brain structures will be collected 1 day after the end of the behavioural testing period and will be then microdissected. Brains will be rapidly removed from CO_2-killed mice and placed in ice-cold slurry of 0.9% NaCl. Rostro-caudal sections (2 mm) will be quickly obtained on a brain tissue blocker. Four consecutive sections from Bregma + 2.4 to - 3.1 will be then microdissected (Paxinos and Franklin 2001). CC will be dissected from the first two sections and will include prelimbic and cingulate cortices. Dorsal and ventral parts of the STR will be obtained from the second slice. AMY will be obtained from the third section and HIPPO from the third and the fourth sections. All samples will be immediately frozen and stored at -80°C.
Peripheral tissues: Lungs will be removed just after the brain and will be immediately frozen and stored at -80°C. This tissue was chosen because of its high level of IDO expression [53, 54].
Biochemical measurements of TRP metabolites: TRP and downstream KP metabolites will be measured using techniques (HPLC and GC/MS) currently in use in the laboratory of **Dr Gilles GUILLEMIN** who is a very recognised expert in the KP, and has a strong track record in the measurement of KP metabolites (http://www.drgillesguillemin.com).

4) ***Determination of the oxidative status***

These measurements will be performed in France, in collaboration with **Dr Jorge DOMENECH**'s group (*EA3855: Microenvironnement de l'Hématopoïèse et Cellules Souches, Tours*).

To determine the oxidative status of each tissues, we will use several techniques given that free radicals have multiple targets such as lipids, proteins and DNA (Maes, Galecki *et coll.* 2010).
Lipid peroxidation: Assays of malondialdehyde (MDA), a by-product of polyunsaturated fatty acid peroxidation and arachidonic acid, is employed as a measure for lipid peroxidation and thus also for oxidative stress. MDA is a reactive aldehyde or reactive carbonyl compound that may modify proteins to generate advanced lipoxidation end (ALE) products. The complex MDA-proteins will be quantified by western blot (WB by using the MDA-antibody ab27642 (Abcam, Inc.).
Proteins oxidation: As MDA is not the only compound able to oxidize proteins, we will also quantify the level of oxidized proteins by using the OxyBlot™ Protein Oxidation Detection Kit that is ideal for the sensitive and rapid detection of proteins modified by oxygen free radicals and other reactive species. As a consequence of this modification, carbonyl groups are introduced into protein side chains. By using the kit protocol, the carbonyl groups are derivatized with DNPH and then detected by antibodies specific to the attached DNP moiety of the proteins.
DNA oxidation: As free radicals can also induce DNA damages, we will use the COMET test to measure such oxidative damages. The comet assay is not the only way to measure oxidative DNA damage, but it is very sensitive and accurate, being relatively free of artefacts.

To confirm the hypothesis of a rise in oxidative stress, we will also measure by WB the level of activation of MAPK pathways classically induced by oxidative stress i.e. p38, $Erk_{1/2}$ and JNK (Kimball, Abbas et coll. 2008). For this, we will use the following antibodies: anti-p38, anti-phospho-p38, anti-p44-42 ($Erk_{1/2}$), anti-phospho-p44-42, anti SAPK/JNK and anti-phospho-SAPK/JNK, all obtained from Cell Signaling Technology®.

Aim 2. ***Evaluate the antioxidant potential in tissues in which 3HK is increased by UCMS.***

Summary of the experiment:
As an increase of oxidative stress may also result from a reduction of the antioxidant capacity of cells, we will also investigate if UCMS-induced KP alterations (accumulation of toxic KP metabolites in some structures) might be involved in such a pathological process. Therefore, the second experiment of the project will seek to determine the antioxidant status peripheral and cerebral tissues in which UCMS induce KP changes. With this aim, we will use the same experimental design as previously described, except for the part 4) that is detailed below.

Materials and methods:

1) ***Induction of depressive symptoms in mice***
   See experiment 1

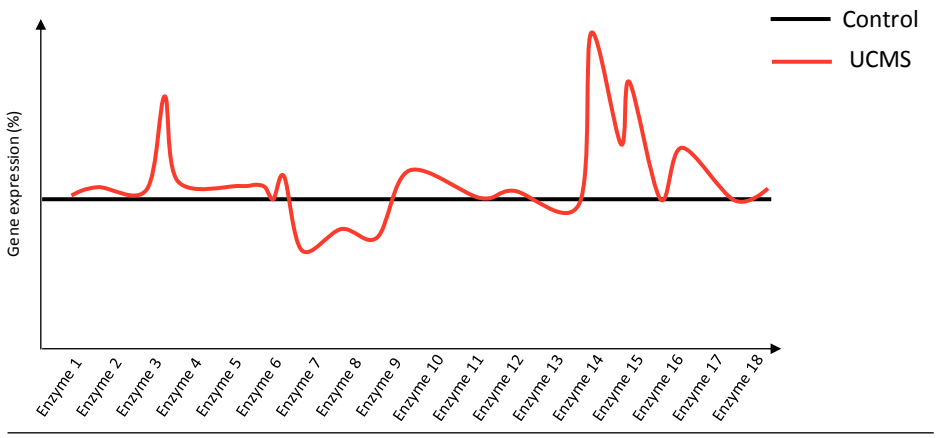
2) ***Assessment of the depressive-like state***
   See experiment 1

3) ***Tissue sampling and measurements of KP metabolites***
   See experiment 1

4) ***Determination of the antioxidant status***

The antioxidative status of our samples will be determined by using an innovative patented technique developed in the laboratory of J. Domenech (EA3855, France, Tours).
The purpose of this technique is to determine the expression profile of a couple of antioxidative genes in our tissues. After having been extracted from samples, mRNAs of each antioxidant enzyme will be quantified by qRT-PCR. After statistical and computing treatments, we will obtain an expression profile similar to that depicted on figure 6.

Figure 6: Example of an expression profile of antioxidant genes in a specific tissue



Red line represents expression changes of each enzyme gene. Increased expression = Up to the black « control » level of expression; Decreased expression = Down to the « black » control level of expression.

OUTCOMES AND SIGNIFICANCE:

On the one hand, many studies have shown that oxidative stress is an important feature of major depression (Maes 2010; Maes, Galecki *et coll.* 2010; Maes, Ruckoanich *et coll.* 2010). On the other hand, it has been repeatedly demonstrated that exogenous TRP induces oxidative stress through KP metabolites both in humans and laboratory animals (Forrest, Mackay et coll. 2004; Feksa, Latini et coll. 2006; Feksa, Latini et coll. 2008). Moreover, it is now relatively clear that neuroendocrine and immune changes observed in depressed patients induce a hijacking of the metabolism of TRP towards the synthesis of KYN (Maes, Verkerk *et coll.* 2002; Myint, Kim *et coll.* 2006; Leonard and Myint 2009). Taken together, all these data clearly put in evidence the link between depression and the KP that is likely to be oxidative stress. To date, however, no studies have demonstrated this link. Therefore, the experiments proposed in this project would be the first ones to investigate, and maybe to show precisely how the KP participates to the pathogenesis of depression: through cellular abnormalities induced by toxic metabolites-induced oxidative stress.

REFERENCES

1. Wong MLLicinio J. Research and treatment approaches to depression. Nat Rev Neurosci, 2001:2: 343-51.
2. Murray CJLopez AD. Alternative projections of mortality and disability by cause 1990-2020: Global Burden of Disease Study. Lancet, 1997:349: 1498-504.
3. Asberg M, Bertilsson L, Martensson B, Scalia-Tomba GP, Thoren PTraskman-Bendz L. CSF monoamine metabolites in melancholia. Acta Psychiatr Scand, 1984:69: 201-19.
4. Dunn AJ, Swiergiel AHde Beaurepaire R. Cytokines as mediators of depression: what can we learn from animal studies? Neurosci Biobehav Rev, 2005:29: 891-909.
5. Elhwuegi AS. Central monoamines and their role in major depression. Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry, 2004:28: 435-51.
6. Gabbay V, Klein RG, Alonso CM, Babb JS, Nishawala M, De Jesus G, Hirsch GS, Hottinger-Blanc PMGonzalez CJ. Immune system dysregulation in adolescent major depressive disorder. J Affect Disord, 2009:115: 177-82.
7. Gold PWChrousos GP. Organization of the stress system and its dysregulation in melancholic and atypical depression: high vs low CRH/NE states. Mol Psychiatry, 2002:7: 254-75.
8. Miller AH, Maletic VRaison CL. Inflammation and its discontents: the role of cytokines in the pathophysiology of major depression. Biol Psychiatry, 2009:65: 732-41.
9. Steckler T, Holsboer FReul JM. Glucocorticoids and depression. Baillieres Best Pract Res Clin Endocrinol Metab, 1999:13: 597-614.
10. Kirsch I. Antidepressants and the placebo response. Epidemiol Psichiatr Soc, 2009:18: 318-22.
11. Kirsch I, Deacon BJ, Huedo-Medina TB, Scoboria A, Moore TJJohnson BT. Initial severity and antidepressant benefits: a meta-analysis of data submitted to the Food and Drug Administration. PLoS Med, 2008:5: e45.
12. Papakostas GI. The efficacy, tolerability, and safety of contemporary antidepressants. J Clin Psychiatry, 71 Suppl E1: e03.
13. Myint AM, Kim YK, Verkerk R, Scharpe S, Steinbusch HLeonard B. Kynurenine pathway in major depression: Evidence of impaired neuroprotection. J Affect Disord, 2006.
14. Miller CL, Llenos IC, Cwik M, Walkup JWeis S. Alterations in kynurenine precursor and product levels in schizophrenia and bipolar disorder. Neurochem Int, 2008:52: 1297-303.
15. Capuron L, Ravaud A, Neveu PJ, Miller AH, Maes MDantzer R. Association between decreased serum tryptophan concentrations and depressive symptoms in cancer patients undergoing cytokine therapy. Mol Psychiatry, 2002:7: 468-73.
16. Kohl C, Walch T, Huber R, Kemmler G, Neurauter G, Fuchs D, Solder E, Schrocksnadel HSperner-Unterweger B. Measurement of tryptophan, kynurenine and neopterin in women with and without postpartum blues. J Affect Disord, 2005:86: 135-42.
17. Maes M, Verkerk R, Bonaccorso S, Ombelet W, Bosmans EScharpe S. Depressive and anxiety symptoms in the early puerperium are related to increased degradation of tryptophan into kynurenine, a phenomenon which is related to immune activation. Life Sci, 2002:71: 1837-48.
18. Swardfager W, Herrmann N, Dowlati Y, Oh PI, Kiss A, Walker SELanctot KL. Indoleamine 2,3-dioxygenase activation and depressive symptoms in patients with coronary artery disease. Psychoneuroendocrinology, 2009.
19. Anisman H. Cascading effects of stressors and inflammatory immune system activation: implications for major depressive disorder. J Psychiatry Neurosci, 2009:34: 4-20.
20. Ibarguen-Vargas Y, Surget A, Touma C, Palme RBelzung C. Multifaceted strain-specific effects in a mouse model of depression and of antidepressant reversal. Psychoneuroendocrinology, 2008:33: 1357-68.
21. Byrne GI, Lehmann LK, Kirschbaum JG, Borden EC, Lee CMBrown RR. Induction of tryptophan degradation in vitro and in vivo: a gamma-interferon-stimulated activity. J Interferon Res, 1986:6: 389-96.
22. Comings DE, Muhleman D, Dietz G, Sherman MForest GL. Sequence of human tryptophan 2,3-dioxygenase (TDO2): presence of a glucocorticoid response-like element composed of a GTT repeat and an intronic CCCCT repeat. Genomics, 1995:29: 390-6.

23. Wichers MC, Koek GH, Robaeys G, Verkerk R, Scharpe SMaes M. IDO and interferon-alpha-induced depressive symptoms: a shift in hypothesis from tryptophan depletion to neurotoxicity. Mol Psychiatry, 2005:10: 538-44.

24. Bonaccorso S, Puzella A, Marino V, Pasquini M, Biondi M, Artini M, Almerighi C, Levrero M, Egyed B, Bosmans E, Meltzer HYMaes M. Immunotherapy with interferon-alpha in patients affected by chronic hepatitis C induces an intercorrelated stimulation of the cytokine network and an increase in depressive and anxiety symptoms. Psychiatry Res, 2001:105: 45-55.

25. Mackay GM, Forrest CM, Christofides J, Bridel MA, Mitchell S, Cowlard R, Stone TWDarlington LG. Kynurenine Metabolites and Inflammation Markers in Depressed Patients Treated with Fluoxetine or Counselling. Clin Exp Pharmacol Physiol, 2008.

26. Raison CL, Borisov AS, Majer M, Drake DF, Pagnoni G, Woolwine BJ, Vogt GJ, Massung BMiller AH. Activation of central nervous system inflammatory pathways by interferon-alpha: relationship to monoamines and depression. Biol Psychiatry, 2009:65: 296-303.

27. Raison CL, Dantzer R, Kelley KW, Lawson MA, Woolwine BJ, Vogt G, Spivey JR, Saito KMiller AH. CSF concentrations of brain tryptophan and kynurenines during immune stimulation with IFN-alpha: relationship to CNS immune responses and depression. Mol Psychiatry, 2010:15: 393-403.

28. Lapin IP. Anxiogenic activity of quinolinic acid and kynurenine in the social interaction test in mice. Journal of Psychopharmacology, 1996:10: 246-9.

29. O'Connor JC, Lawson MA, Andre C, Moreau M, Lestage J, Castanon N, Kelley KWDantzer R. Lipopolysaccharide-induced depressive-like behavior is mediated by indoleamine 2,3-dioxygenase activation in mice. Mol Psychiatry, 2008.

30. Vecsei LBeal MF. Influence of kynurenine treatment on open-field activity, elevated plus-maze, avoidance behaviors and seizures in rats. Pharmacol Biochem Behav, 1990:37: 71-6.

31. Braidy N, Grant R, Adams S, Brew BJGuillemin GJ. Mechanism for quinolinic acid cytotoxicity in human astrocytes and neurons. Neurotox Res, 2009:16: 77-86.

32. Hilmas C, Pereira EF, Alkondon M, Rassoulpour A, Schwarcz RAlbuquerque EX. The brain metabolite kynurenic acid inhibits alpha7 nicotinic receptor activity and increases non-alpha7 nicotinic receptor expression: physiopathological implications. J Neurosci, 2001:21: 7463-73.

33. Stone TW. Kynurenic acid antagonists and kynurenine pathway inhibitors. Expert Opin Investig Drugs, 2001:10: 633-45.

34. Goldstein LE, Leopold MC, Huang X, Atwood CS, Saunders AJ, Hartshorn M, Lim JT, Faget KY, Muffat JA, Scarpa RC, Chylack LT, Jr., Bowden EF, Tanzi REBush AI. 3-Hydroxykynurenine and 3-hydroxyanthranilic acid generate hydrogen peroxide and promote alpha-crystallin cross-linking by metal ion reduction. Biochemistry, 2000:39: 7266-75.

35. Morita T, Saito K, Takemura M, Maekawa N, Fujigaki S, Fujii H, Wada H, Takeuchi S, Noma ASeishima M. 3-Hydroxyanthranilic acid, an L-tryptophan metabolite, induces apoptosis in monocyte-derived cells stimulated by interferon-gamma. Ann Clin Biochem, 2001:38: 242-51.

36. Okuda S, Nishiyama N, Saito HKatsuki H. 3-Hydroxykynurenine, an endogenous oxidative stress generator, causes neuronal cell death with apoptotic features and region selectivity. J Neurochem, 1998:70: 299-307.

37. Smith AJ, Smith RAStone TW. 5-Hydroxyanthranilic acid, a tryptophan metabolite, generates oxidative stress and neuronal death via p38 activation in cultured cerebellar granule neurones. Neurotox Res, 2009:15: 303-10.

38. Jhamandas KH, Boegman RJ, Beninger RJFlesher S. Role of zinc in blockade of excitotoxic action of quinolinic acid by picolinic acid. Amino Acids, 1998:14: 257-61.

39. Vrooman L, Jhamandas K, Boegman RJBeninger RJ. Picolinic acid modulates kainic acid-evoked glutamate release from the striatum in vitro. Brain Res, 1993:627: 193-8.

40. Anisman H, Merali ZHayley S. Neurotransmitter, peptide and cytokine processes in relation to depressive disorder: comorbidity between depression and neurodegenerative disorders. Prog Neurobiol, 2008:85: 1-74.

41. Dantzer R, O'Connor JC, Freund GG, Johnson RWKelley KW. From inflammation to sickness and depression: when the immune system subjugates the brain. Nat Rev Neurosci, 2008:9: 46-56.

42. Sibille E, Wang Y, Joeyen-Waldorf J, Gaiteri C, Surget A, Oh S, Belzung C, Tseng GCLewis DA. A molecular signature of depression in the amygdala. Am J Psychiatry, 2009:166: 1011-24.

43. Surget A, Saxe M, Leman S, Ibarguen-Vargas Y, Chalon S, Griebel G, Hen RBelzung C. Drug-dependent requirement of hippocampal neurogenesis in a model of depression and of antidepressant reversal. Biol Psychiatry, 2008:64: 293-301.

44. Surget A, Wang Y, Leman S, Ibarguen-Vargas Y, Edgar N, Griebel G, Belzung CSibille E. Corticolimbic transcriptome changes are state-dependent and region-specific in a rodent model of depression and of antidepressant reversal. Neuropsychopharmacology, 2009:34: 1363-80.

45. Laugeray A, Launay JM, Callebert J, Surget A, Belzung CBarone PR. Peripheral and cerebral metabolic abnormalities of the tryptophan-kynurenine pathway in a murine model of major depression. Behav Brain Res, 2010:210: 84-91.

46. Laugeray A, Launay JM, Callebert J, Surget A, Belzung CBarone PR. Evidence for a key role of the peripheral kynurenine pathway in the modulation of anxiety- and depression-like behaviours in mice: focus on individual differences. Submitted.

47. Laugeray A, Launay JM, Callebert J, Mutlu O, Célestine J, Belzung CBarone PR. Effects of the antidepressant fluoxetine on neurochemical alterations of the kynurenine pathway induced by UCMS in mice: comparison with the IDO inhibitor 1-methyl-tryptohane. In preparation.

48. O'Connor JC, Lawson MA, Andre C, Briley EM, Szegedi SS, Lestage J, Castanon N, Herkenham M, Dantzer RKelley KW. Induction of IDO by bacille Calmette-Guerin is responsible for development of murine depressive-like behavior. J Immunol, 2009:182: 3202-12.

49. Maes M, Galecki P, Chang YSBerk M. A review on the oxidative and nitrosative stress (O&NS) pathways in major depression and their possible contribution to the (neuro)degenerative processes in that illness. Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry, 2010.

50. Belzung CSurget A, Unpredictable chronic mild stress in mice., in Experimental models in neurobehavioral research., K. AV. and L. JL., Editors. In press., Nova Science: New York.

51. Pothion S, Bizot JC, Trovero FBelzung C. Strain differences in sucrose preference and in the consequences of unpredictable chronic mild stress. Behav Brain Res, 2004:155: 135-46.

52. Santarelli L, Saxe M, Gross C, Surget A, Battaglia F, Dulawa S, Weisstaub N, Lee J, Duman R, Arancio O, Belzung CHen R. Requirement of hippocampal neurogenesis for the behavioral effects of antidepressants. Science, 2003:301: 805-9.

53. Yalcin I, Aksu FBelzung C. Effects of desipramine and tramadol in a chronic mild stress model in mice are altered by yohimbine but not by pindolol. Eur J Pharmacol, 2005:514: 165-74.

54. Yalcin I, Belzung CSurget A. Mouse strain differences in the unpredictable chronic mild stress: a four-antidepressant survey. Behav Brain Res, 2008:193: 140-3.

55. Paxinos GFranklin K. The Mouse Brain in Stereotoxic Coordinates. Academic Press: San Diego, CA., 2001.

56. Kimball SR, Abbas AJefferson LS. Melatonin represses oxidative stress-induced activation of the MAP kinase and mTOR signaling pathways in H4IIE hepatoma cells through inhibition of Ras. J Pineal Res, 2008:44: 379-86.

57. Maes M. An intriguing and hitherto unexplained co-occurrence: Depression and chronic fatigue syndrome are manifestations of shared inflammatory, oxidative and nitrosative (IO&NS) pathways. Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry, 2010.

58. Maes M, Ruckoanich P, Chang YS, Mahanonda NBerk M. Multiple aberrations in shared inflammatory and oxidative & nitrosative stress (IO&NS) pathways explain the co-association of depression and cardiovascular disorder (CVD), and the increased risk for CVD and due mortality in depressed patients. Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry, 2010.

59. Feksa LR, Latini A, Rech VC, Feksa PB, Koch GD, Amaral MF, Leipnitz G, Dutra-Filho CS, Wajner MWannmacher CM. Tryptophan administration induces oxidative stress in brain cortex of rats. Metab Brain Dis, 2008:23: 221-33.

60. Feksa LR, Latini A, Rech VC, Wajner M, Dutra-Filho CS, de Souza Wyse ATWannmacher CM. Promotion of oxidative stress by L-tryptophan in cerebral cortex of rats. Neurochem Int, 2006:49: 87-93.

61. Forrest CM, Mackay GM, Stoy N, Egerton M, Christofides J, Stone TWDarlington LG. Tryptophan loading induces oxidative stress. Free Radic Res, 2004:38: 1167-71.

62. Leonard BEMyint A. The psychoneuroimmunology of depression. Hum Psychopharmacol, 2009:24: 165-75.