

ÉCOLE DOCTORALE « Santé, Sciences, Technologies »

UNITÉ Inserm 930 - Imagerie et Cerveau

EQUIPE 4 : Troubles Affectifs

THÈSE

présentée par :

Mathieu NOLLET

soutenue le : **19 décembre 2011**

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

Discipline/S spécialité : Science de la Vie et de la Santé - Neurosciences

**Etude de l'implication fonctionnelle du
système orexinergique dans les
mécanismes physiopathogéniques de la
dépression majeure**

THÈSE dirigée par :

Philippe GAILLARD

Professeur des Universités (PU-PH), Université François - Rabelais (Tours)

THÈSE co-encadrée par :

Samuel LEMAN

Maitre de Conférences, Université François - Rabelais (Tours)

RAPPORTEURS :

Jian Sheng LIN

Directeur de Recherche, Inserm (Lyon)

Raymond MONGEAU

Chargé de Recherche (HDR), Inserm (Paris)

JURY :

Véronique FABRE

Chargée de Recherche, Inserm (Paris)

Philippe GAILLARD

Professeur des Universités, Université François - Rabelais (Tours)

Thérèse JAY

Directrice de Recherche, Inserm (Paris)

Samuel LEMAN

Maitre de Conférences, Université François - Rabelais (Tours)

Jian Sheng LIN

Directeur de Recherche, Inserm (Lyon)

Raymond MONGEAU

Chargé de Recherche (HDR), Inserm (Paris)

*« On peut être poète dans tous les domaines :
il suffit que l'on soit aventureux et que l'on aille à la découverte. »*

Guillaume APOLLINAIRE

*A mon grand-père...
Les étoiles ne sont pas éternelles, mais toujours elles brillent,
stellant le ciel de ce monde ou d'ailleurs.*

REMERCIEMENTS

Certains moments de la vie sont particulièrement propices à l'introspection. On regarde en arrière, et on contemple le chemin parcouru, tout ce que l'on a traversé, les moments de joie et de peine, les obstacles que l'on a réussi à franchir sans trop de dégâts, les *impedimenta* de l'existence. Surgit alors un flot de sentiments confus et vagues, où l'on se sent balloté entre la fierté d'être arrivé au bout d'une étape décisive, et l'appréhension de devoir poursuivre sa route que l'on sait semée d'embûches. L'épilogue d'un travail de thèse est un de ces moments-là...

Au terme de ce doctorat, je tiens en tout premier lieu à remercier sincèrement et chaleureusement Monsieur le Docteur Samuel LEMAN, qui a inspiré et dirigé ce travail. Il est difficile, en quelques mots, d'exprimer toutes les qualités, à la fois scientifiques et personnelles, dont il a su faire preuve durant ces longues années de thèse. Bien avant cela, en tant que professeur, il m'a donné goût aux Neurosciences, et a été pour beaucoup dans le choix de mon parcours universitaire. En supervisant mes travaux de Master, il a su m'encourager et me soutenir, comme il l'a toujours fait au cours de cette thèse. Inlassablement présent pour répondre à mes questions, à mes doutes, il a toujours su me guider par son enthousiasme et ses conseils pertinents. Nul doute que sans son investissement et sa patience, je n'en serais pas là aujourd'hui. Qu'il trouve ici le témoignage de ma profonde gratitude et le signe de mon amitié.

Je tiens également à remercier Monsieur le Professeur Philippe GAILLARD. En acceptant d'encadrer cette thèse, et par ses conseils toujours judicieux, il m'a permis de m'épanouir scientifiquement. Pour cela, je lui en suis très reconnaissant.

Je tiens à remercier Monsieur le Docteur Jian-Sheng LIN et Monsieur le Docteur Raymond MONGEAU, qui ont accepté d'être les rapporteurs de cette thèse, pour le temps et l'attention accordés à ce travail. Je tiens tout particulièrement à leur exprimer mon estime et l'honneur qu'ils me font de poser un œil critique sur ce manuscrit. Leurs commentaires seront pour moi l'occasion d'approfondir davantage ma réflexion sur ce travail de thèse.

Je souhaite aussi remercier Madame le Docteur Thérèse JAY et Madame le Docteur Véronique FABRE d'avoir accepté de rejoindre le jury de cette thèse. Leur expertise et leur regard critique sur ce travail ne manqueront pas d'aiguiser davantage mon questionnement scientifique. Je suis très honoré de leur participation, et je tiens à leur exprimer toute ma reconnaissance.

Je tiens particulièrement à remercier Madame le Professeur Catherine BELZUNG, qui m'a accepté au sein de son équipe. Son excellence scientifique a été pour moi source d'inspiration, et ses conseils avisés ont toujours participé à améliorer ce travail. Je lui suis enfin reconnaissant pour sa gentillesse et ses nombreux encouragements, tout aussi précieux.

Je souhaite spécialement remercier Monsieur le Docteur Frédéric MINIER pour son aide plus que précieuse et sa contribution significative à ce travail. En m'apprenant les rudiments de la biologie moléculaire, il a presque fait de moi un vrai biologiste. Je tiens à lui exprimer toute ma reconnaissance pour sa disponibilité et sa gentillesse.

Je tiens à exprimer toute ma gratitude à Arnaud TANTI, Bruno BRIZARD, Raymond JEGAT, Anne-Marie LEGUISQUET, Séverine DEVERS, et Maryse PINGAUD pour leur grande contribution à ce travail.

Je voudrais aussi vivement remercier tous les membres du laboratoire qui m'ont si bien accueilli et qui, chacun à leur manière, ont participé à l'accomplissement de ce travail : Dominique LEGLAUNEC, Frédérique GODARD, Madame le Docteur Borianana ATANASOVA, Monsieur le Docteur Pascal BARONE, et tous les chercheurs-cliniciens de l'équipe.

Je veux ici remercier, bien entendu, tous les doctorants et stagiaires (ainsi que les futurs doctorants et les « maintenant docteurs ») qui ont croisé ma route au cours de ces années, et grâce à qui il fut moins difficile de venir travailler : Arnaud, Elsa, Yann, Virginie, Khalid, Petra, Julie, Charline, Anthony, Alexandre, Yadira, Ipek, Bruno (docteur ès bricoleur) et bien sûr Clémence, qui a pris le temps de relire cette thèse, et dont la contribution à ce travail a été précieuse. Pour votre bonne humeur et pour tous ces agréables moments partagés, encore une fois, un grand merci.

Je tiens particulièrement à remercier toute ma famille, mes parents, mes grands-parents, qui bien que loin des préoccupations existentielles d'un doctorant surchargé, m'ont toujours encouragé et cru en moi. Du fond du cœur, merci...

Je remercie profondément mes amis, Aurélie et Stéphane, et leurs deux trésors, Anaïs et mon filleul Raphaël. Les mots me manquent pour écrire tout ce que vous m'avez apporté ces dernières années... Que ces quelques mots soient le témoignage de mon éternelle amitié. Merci aussi à Adrienne et « le Gros » Guillaume, qui sont si loin et si proches en même temps. Sachez que je ne vous oublie pas, et vous resterez, pour toujours, de vrais amis...

Enfin, merci à tous ceux que je n'ai pas cités et qui ont compté, d'une manière ou d'une autre, dans ma vie ces dernières années...

TABLE DES MATIÈRES

LISTE DES PUBLICATIONS ET COMMUNICATIONS.....	7
LISTE DES ABRÉVIATIONS	9
PRÉAMBULE	11
INTRODUCTION	15
1. LA DÉPRESSION MAJEURE.....	17
1.1. Epidémiologie.....	25
1.2. Etiologie.....	28
1.2.1. Facteurs psychologiques.....	28
1.2.2. Facteurs environnementaux.....	29
1.2.3. Facteurs génétiques	30
1.2.4. Le modèle de diathèse-stress de la dépression	33
1.3. Hypothèses neurobiologiques de la dépression majeure.....	33
1.3.1. Hypothèse monoaminergique	34
1.3.2. Hypothèse de la réponse au stress et de l'axe HPA.....	38
1.3.3. Hypothèse de la neuroplasticité	45
1.3.4. Autres hypothèses neurobiologiques	50
1.4. Altérations physiologiques et comportementales associées à la dépression.....	52
1.4.1. Altérations du traitement de l'information	52
1.4.2. Altérations du sommeil	54
1.4.3. Altérations du circuit de récompense.....	57
1.5. Les traitements des troubles dépressifs	61
1.5.1. Les inhibiteurs de monoamines oxydase.....	61
1.5.2. Les tricycliques	62
1.5.3. Les nouveaux antidépresseurs.....	63
1.6. Modéliser la dépression.....	66
1.6.1. Bio-essais ou tests du phénotype dépressif-like	68
1.6.1.1. Test de la nage forcée	68
1.6.1.2. Test de suspension par la queue.....	69
1.6.1.3. Tests de sensibilité hédonique	70
1.6.1.4. Les paradigmes d'hyponéophagie.....	72
1.6.2. Les modèles empiriques de la dépression.....	73
1.6.3. Les modèles de dépression	74
1.6.3.1. Modèle de résignation acquise	74
1.6.3.2. Stress périnataux	75
1.6.3.3. Défaite sociale	77
1.6.3.4. Le stress chronique imprédictible modéré	78
2. LE SYSTÈME OREXINERGIQUE/HYPOCRÉTINERGIQUE.....	81
2.1. La découverte des orexines et des hypocrétines	82
2.2. Physiologie du système orexinergique.....	84
2.2.1. Les orexines.....	84
2.2.2. Les récepteurs à orexines	86

2.3. Fonctions des orexines.....	88
2.3.1. Régulation du sommeil et de l'état de veille	88
2.3.2. Orexines et régulation de l'axe HPA	92
2.3.3. Orexines et régulation du système de récompense	95
2.3.4. Orexines et régulation du comportement alimentaire.....	97
2.4. Orexines et narcolepsie/cataplexie	100
3. OREXINES ET DÉPRESSION	103
3.1. Les premières études.....	103
3.2. Les données cliniques.....	104
3.3. Les données précliniques.....	108
3.4. L'hormone de mélan-concentration.....	114
4. OBJECTIFS	117
4.1. Le choix du modèle animal de dépression.....	117
4.2. Objectifs expérimentaux.....	120
RÉSULTATS.....	123
1. CARACTÉRISATION DE L'ACTIVATION DU SYSTÈME OREXINERGIQUE LORS D'UN ÉTAT DÉPRESSIF- <i>LIKE</i> CHEZ LA SOURIS	125
2. ÉTUDE DE L'EFFET DE LA PRIVATION PARTIELLE DE SOMMEIL SUR LE SYSTÈME OREXINERGIQUE LORS D'UN ÉTAT DÉPRESSIF- <i>LIKE</i> CHEZ LA SOURIS	141
3. IMPLICATION FONCTIONNELLE DU SYSTÈME OREXINERGIQUE DANS UN ÉTAT DÉPRESSIF- <i>LIKE</i> CHEZ LA SOURIS.....	171
DISCUSSION	221
1. CARACTÉRISATION DE L'ACTIVATION DU SYSTÈME OREXINERGIQUE LORS D'UN ÉTAT DÉPRESSIF- <i>LIKE</i> CHEZ LA SOURIS	224
2. ÉTUDE DE L'EFFET DE LA PRIVATION PARTIELLE DE SOMMEIL SUR LE SYSTÈME OREXINERGIQUE LORS D'UN ÉTAT DÉPRESSIF- <i>LIKE</i> CHEZ LA SOURIS	228
3. IMPLICATION FONCTIONNELLE DU SYSTÈME OREXINERGIQUE DANS UN ÉTAT DÉPRESSIF- <i>LIKE</i> CHEZ LA SOURIS.....	230
4. INTÉRÊTS DES SYSTÈMES NEUROPEPTIDERGIQUES	232
5. CONCLUSION.....	234
6. PERSPECTIVES.....	235
RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES	239
ANNEXE	286

LISTE DES PUBLICATIONS ET COMMUNICATIONS

Articles publiés, sous presse ou en préparation

Nollet M, Gaillard P, Tanti A, Girault V, Jenck F, Belzung C, Leman S. Neurogenesis-independent antidepressant-like effect of a dual orexin receptor antagonist in a rodent model of depression. *Biological Psychiatry* (en soumission).

Nollet M, Gaillard P, Belzung C, Leman S. Activation of orexin neurons following partial sleep deprivation and unpredictable chronic mild stress in mice (en préparation).

Nollet M, Gaillard P, Minier F, Tanti A, Belzung C, Leman S (2011). Activation of orexin neurons in dorsomedial/perifornical hypothalamus and antidepressant reversal in a rodent model of depression. *Neuropharmacology*, 61, 336-346.

Vancassel S, Leman S, Hanonick L, Denis S, Roger J, **Nollet M**, Bodard S, Kousignian I, Belzung C, Chalon S (2008). n-3 Polyunsaturated fatty acid supplementation reverses stress-induced modifications on brain monoamine levels in mice. *Journal of Lipid Research*, 49, 340-348. [article disponible en annexe]

Communications orales et affichées

Nollet M, Gaillard P, Minier F, Tanti A, Belzung C, Leman S (2011). Possible involvement of orexin neurons in the pathophysiology of depression. *15th Meeting on Health, Science and Technology*, 23 Juin, Tours (France). [Présentation orale - Prix de la meilleure communication orale]

Nollet M, Gaillard P, Tanti A, Belzung C, Leman S (2011). Antidepressant-like behavioral effect of almorexant, a dual orexin receptor antagonist, in the unpredictable chronic mild stress in mice. *10th Meeting of the French Neuroscience Society*, 24-27 Mai, Marseille (France) [Poster].

Nollet M, Gaillard P, Minier F, Tanti A, Belzung C, Leman S (2010). Effects of chronic fluoxetine treatment on orexinergic neuronal activation and orexin-receptor 2 expression in a mouse model of depression. *14th Meeting on Health, Science and Technology*, 30 Juin, Tours (France) [Présentation orale].

Nollet M, Gaillard P, Belzung C, Leman S (2008). Differential activation of orexin/hypocretin neurons in lateral and perifornical hypothalamus in a rodent model of depression. *6th FENS Forum of European Neuroscience*, 12-16 Juillet, Genève (Suisse) [Poster].

Leman S, **Nollet M**, Jegat R, Carrive PL, Belzung C (2007). C-Fos expression in orexin/hypocretin neurons in a rodent model of depression: effects of antidepressant treatment and sleep deprivation. *Society for Neuroscience*, 3-7 Novembre, San Diego (USA) [Poster].

Financement du présent travail de thèse : Bourse Doctorale de la Région Centre (2007-2010), et poste d'Attaché Temporaire d'Enseignement et de Recherche à l'Université François-Rabelais de Tours (2010-2011).

LISTE DES ABREVIATIONS

5-HT = *5-hydroxytryptamine* (sérotonine)
5-HTT = *5-hydroxytryptamine transporter*
ACTH = *Adrenocorticotropin hormone*
AMPA = *2-Amino-3-(5-Methyl-3-oxo-1,2-oxazol-4-yl)Propanoic Acid*
APA = *American Psychiatric Association*
BDNF = *Brain-derived neurotrophic factor*
BrDU = 5-Bromodéoxyuridine
CIM-10 = Classification internationale des maladies, dixième révision
CRH (F) = *Corticotropin-releasing hormone (factor)*, en français corticolibérine
DEX = Dexaméthasone
DHEA = Déhydroépiandrostérone
DMH = *dorsomedial hypothalamus*
DSM-IV = *Diagnosis and Statistical Manual of Mental Disorders, Fourth Edition*
FST = *Forced swim test*, en français test de la nage forcée
GABA = *Gamma-aminobutyric acid*
GR = *Glucocorticoid receptor*
HCRT = Hypocrétine
HPA = *Hypothalamic-pituitary-adrenal*
IMAO = Inhibiteur de la monoamine oxydase
IRSN = inhibiteur de la recapture sélectif de la noradrénaline
IRSNa = inhibiteur de la recapture de la sérotonine et de la noradrénaline
IRSS = Inhibiteur de la recapture sélectif de la sérotonine
KO = *Knock-out*
LCR = Liquide céphalo-rachidien
LH = *Lateral hypothalamus*
LPT = *Long term potentiation*
MAO = Monoamine oxydase
MR = *Mineralocorticoid receptor*
NA = Noradrénaline
NMDA = N-méthyl-D-aspartate
NPY = Neuropeptide Y
NSF = *Novelty-suppressed feeding*, en français suppression induite par la nouveauté
OX = orexine
OXR = *orexin receptor*
PFA = *Perifornical hypothalamic area*
PMN = Privation maternelle néonatale
PVN = *Paraventricular nucleus of the hypothalamus*
SGZ = *Subgranular zone*
TST = *Tail suspension test*, en français test de la nage forcée
UCMS = *Unpredictable chronic mild stress*

PRÉAMBULE

La première tâche d'un jeune chercheur débutant un travail de thèse est de définir son objet d'étude. Si cette étape préliminaire peut s'avérer être une formalité dans certains cas, elle se complique dès lors que l'étude porte sur une maladie psychiatrique, en particulier la dépression, de par l'absence même de consensus quant à sa nature, voire à son existence en tant qu'entité pathologique distincte, puisque ce trouble peut revêtir autant de formes différentes qu'il existe de patients.

Les maladies psychiatriques, et leurs manifestations comportementales parfois singulières, ont de tout temps à la fois fasciné et effrayé. Fasciné parce qu'elles nous renvoient à une part de nous-mêmes. Nous avons tous, à un moment de notre vie, été déprimés, anxieux, méfiants ou en proie à des hallucinations, même bénignement. Effrayé parce qu'elles échappent souvent à la notion de rationalité, aux limites plus aisément définissables entre le normal et le pathologique des troubles purement somatiques. C'est en partie cette frontière entre la normalité et l'anormalité qui rend la définition et l'étude des maladies psychiatriques si difficiles, mais aussi l'apparente absence de causes directement assignables à leur apparition. Pour autant, il est nécessaire de pouvoir définir ces maladies, afin de les comprendre, de les classer, pour pouvoir les diagnostiquer et les soigner.

La dépression majeure fait partie des troubles psychiatriques les plus répandus, et bien qu'elle soit l'une des principales causes d'invalidité et l'un des plus sérieux problèmes de santé dans le monde, les mécanismes neurobiologiques à la base de la physiopathogénie et du traitement de la dépression majeure demeurent méconnus. Au-delà des facteurs psychosociaux souvent à l'origine de l'apparition de la maladie, de nombreux mécanismes neurobiologiques sous-tendent son étiopathogénèse, comme un déséquilibre de la neurotransmission monoaminergique, une perturbation de l'axe du stress, ou une altération de la neuroplasticité. Si l'implication de ces processus dans la physiopathogénie de la dépression majeure fait consensus, ils ne suffisent pas à expliquer l'ensemble des troubles observés chez les dépressifs. De multiples pistes ont été étudiées, en particulier celle d'un déséquilibre de certains neuropeptides. Ces derniers sont plus d'une centaine dans le cerveau, et d'autres restent encore à découvrir. Parmi ces neuropeptides, les orexines, de par leurs effets physiologiques et comportementaux remarquables, pourraient participer de manière importante aux troubles associés à la dépression majeure, voire en être un facteur étiogénique. De fait, un nombre grandissant d'études s'intéresse particulièrement aux liens entre ces neuropeptides et les

troubles dépressifs, avec cependant de nombreuses contradictions, et des questions qui restent en suspens quant à l'importance des orexines dans physiopathogénie de la dépression majeure. Ce travail de thèse avait donc pour objectif d'étudier précisément le rôle du système orexinergique dans la dépression majeure, dont nous avons documenté chacun des aspects dans partie **Introduction**.

Pour réaliser nos objectifs, nous avons utilisé le stress chronique imprédictible modéré chez la souris, un modèle de dépression majeure chez l'animal qui permet de reproduire le rôle des stress socio-environnementaux dans l'apparition d'un épisode dépressif. Nous avons dans un premier temps examiné l'implication des orexines dans les états dépressifs en étudiant les effets du stress chronique et d'un antidépresseur sur l'activation du système orexinergique. Etant donné que les troubles du sommeil font partie des symptômes les plus communément observés chez les individus dépressifs, et que des privations de sommeil peuvent avoir des effets antidépresseurs, nous avons ensuite tenté de savoir si le système orexinergique pouvait sous-tendre ces processus, en analysant l'effet de privations partielles de sommeil sur l'activation des neurones à orexines chez des souris soumises à un protocole de stress chronique. Enfin, nous avons directement étudié l'importance de la neurotransmission orexinergique dans les mécanismes physiopathogéniques de la dépression majeure en étudiant, chez des souris exposées à un stress chronique, l'effet du blocage pharmacologique du système orexinergique sur le comportement, l'axe du stress et la neurogenèse hippocampique. L'ensemble de ces données sera présenté dans la partie **Résultats**.

Ces travaux nous ont permis de mieux comprendre quel pouvait être le rôle du système orexinergique dans les états dépressifs, et de pouvoir enrichir nos connaissances, à la fois sur les orexines, sur la dépression majeure, et sur le lien qui semble unir ces deux entités. A l'aune de ces résultats, de nouvelles hypothèses apparaissent, et avec elles de possibles nouvelles avancées thérapeutiques. Le fruit de cette réflexion sera présenté dans la partie **Discussion**.

INTRODUCTION

1. La dépression majeure

Actuellement, la dépression est définie comme étant une maladie mentale caractérisée par une altération de l'état thymique, une humeur triste avec souffrance morale, ralentissement psychomoteur, lassitude et découragement¹. Cette définition, imparfaite mais assez large pour englober les différentes variantes que la maladie peut revêtir, ne reflète cependant pas véritablement la gravité de cette affection. Depuis plusieurs années, le mot « dépression » (et ses déclinaisons) est en effet de plus en plus usité par les médias. Si l'on ne peut qu'être satisfait de la vulgarisation du concept de trouble dépressif qui participe à son acceptation d'un point de vue médical, se posent en revanche les questions de la pertinence de l'usage qui en est fait, et de la réelle compréhension de son concept par le public. La dépression n'est pas à confondre avec la simple déprime ; c'est une véritable maladie qui revêt de multiples formes et dont la guérison nécessite souvent un traitement lourd, avec à la fois une prise en charge médicamenteuse (à base d'antidépresseurs) et psychothérapeutique.

Si l'on peut admettre aujourd'hui qu'il existe un relatif consensus pour définir la dépression majeure, cette maladie psychiatrique fit l'objet de très nombreuses interprétations au cours des siècles. Le mot dépression dérive du latin *depressio* (« abaissement, enfoncement »)². Historiquement, le mot dépression en tant que trouble psychologique fit pour la première fois son apparition au milieu du XVII^e siècle sous la plume de l'historien anglais Richard Baker, en référence à une personne souffrant de « grande dépression de l'esprit » (« *great depression of Spirit* »)³. Mais cette affection a toujours existé, et bien avant la naissance de ce terme dans la littérature, la notion de dépression en tant que « maladie » fut déjà décrite dans l'Antiquité. Dans l'Ancien Testament, le roi Saül fut décrit comme souffrant d'un trouble que l'on pourrait qualifier *a posteriori* de dépression, avant de se suicider. Cependant, le trouble dépressif n'a pas toujours été considéré comme séparé des autres maladies mentales. On ne peut donc pas s'intéresser à l'Histoire et à l'étiologie de la dépression sans aborder l'Histoire de la psychiatrie elle-même. En effet, la manière d'appréhender la dépression au cours de l'Histoire est intimement dépendante de la manière dont

¹ *Dictionnaire critique des termes de psychiatrie et de santé mentale*, sous la direction de Simon-Daniel Kipman (2005), Editions Doin, 479p.

² *Dictionnaire de l'Académie française*, Neuvième Edition (1992)

³ *Chronique des rois d'Angleterre, depuis le gouvernement des Romains, jusqu'à la mort du roi Jacques* (1641)

étaient appréhendés la science, le comportement humain et les troubles mentaux au cours des siècles.

Au cours de la Préhistoire, il est probable que les maladies mentales aient été vues comme des manifestations de possession par des forces surnaturelles. Des crânes humains datant du Néolithique ont été retrouvés portant des traces de trépanations, seul moyen de faire sortir les esprits malins qui occupaient l'hôte. Pour les grandes cultures anciennes telles qu'Égyptienne et Mésopotamienne, les causes de ces étranges maladies oscillaient entre explications naturelles ou surnaturelles. Les médecins et philosophes de l'époque classique de la Grèce Antique tentèrent d'expliquer les phénomènes physiques et psychologiques avec une approche plus scientifique. Au V^e siècle avant Jésus-Christ, Hippocrate (460-370 avant J.-C.) développa la théorie des humeurs, fondée sur la cosmologie des quatre Éléments d'Empédocle (490-435 avant J.-C.). A chaque Élément correspondait une qualité, une humeur corporelle et un tempérament, les maladies provenant d'un déséquilibre des fluides (Figure 1). Il fut probablement le premier à décrire et nommer la dépression comme une entité distincte due à un excès de bile (*kholé*) noire (*melas*) : la mélancolie (« *Si la crainte ou la tristesse persévère longtemps, cela tient à la mélancolie.* »)¹. Pour guérir de cette maladie, il fallait donc administrer un traitement qui renforçait les qualités opposées à celles qui étaient en excès.

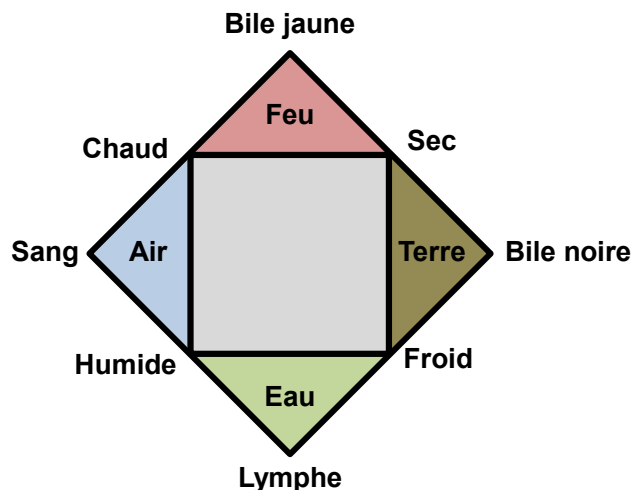


Figure 1. Théorie des humeurs élaborée par Hippocrate et fondée sur la cosmologie des quatre Éléments d'Empédocle. Un excès de bile noire entraîne la mélancolie, une maladie dite « froide et sèche ».

¹ *Aphorismes*, section 6-23, Hippocrate.

Pour Hippocrate, toutes les maladies et tous les troubles mentaux devaient pouvoir s'expliquer par des causes naturelles, alors que d'autres philosophes comme Platon (424-348 avant J.-C.), ou son élève Aristote (384-322 avant J.-C.), revinrent à des considérations plus mystiques pour expliquer l'origine des troubles mentaux. Ces courants de pensée se développèrent chez les Romains grâce aux guerres Punique (264-146 avant J.-C.), lorsque Rome vint à dominer une grande partie du monde civilisé. Dans ce contexte, d'autres penseurs comme Asclépiade de Bithynie (124-40 avant J.-C.) et Cicéron (106-43 avant J.-C.) rejetèrent la théorie d'Hippocrate en postulant que les facteurs émotionnels pouvaient provoquer une maladie physique. Plus tard, Arétée de Cappadoce (I^e ou II^e siècle après J.-C.) développa le concept de personnalité prémorbide en observant que les individus atteints de mélancolie étaient d'une humeur dépressive par nature. Pour lui, les troubles émotionnels résultaient d'une extension ou d'une exagération des traits de caractère existants.

Avec la chute de l'Empire Romain et avec l'essor du Christianisme, les peuples furent de nouveau enclins à privilégier les explications surnaturelles aux phénomènes qu'ils ne pouvaient expliquer de manière rationnelle, précipitant probablement la disparition de la pensée scientifique de l'époque gréco-romaine. L'Eglise du Moyen Age était davantage préoccupée par la « vie après la mort » que par l'existence terrestre, et privilégia les pouvoirs de guérison des symboles religieux aux connaissances médicales livresques conservées et cachées à l'abri des monastères. Dans un premier temps, les phénomènes de troubles mentaux embarrassèrent beaucoup les autorités chrétiennes, la folie pouvant parfois sembler tenir du religieux, ou revêtir un aspect démoniaque. Toutefois, au début du VII^e siècle, le Diable fut le coupable désigné pour tous les types de comportements déviants, et la démonologie fut synonyme de psychiatrie. Quant à la mélancolie, elle fut en partie assimilée à l'acédie, un mal de l'âme qui s'exprimait par l'ennui, un dégoût pour la prière, un abattement léthargique, un état de paresse ou de passivité prostrée, teintée de tristesse. L'acédie pouvait aussi et paradoxalement se caractériser par des états de suractivité, d'agitation, de fièvre physique et mentale. Le concept d'acédie fut décrit par Evagre le Pontique (346-399) puis plus tard par Jean Cassien (360-435), et considéré comme un péché capital.

Influencé par les textes Grecs et Romains, les médecins Perses développèrent de nouveaux concepts au sujet de la mélancolie durant l'âge d'or de l'Islam. Au XI^e siècle, dans son ouvrage encyclopédique de médecine, le Canon, Avicenne (980-1037), décrit la mélancolie comme un trouble de l'humeur dans lequel la personne pouvait devenir

suspicieuse et développer certains types de phobies. Ces troubles de l'humeur provenaient principalement d'un problème de respiration qui augmentait l'humidité à l'intérieur du cerveau. En cas d'une humidité trop importante, le cerveau perdait le contrôle de sa rationalité, provoquant des troubles mentaux.

Au début de la Renaissance, entre le XIII^e et le XVI^e siècle, l'Eglise fut attaquée par de nombreuses tentatives de réformes. Les autorités religieuses, fébriles et empêtrées dans leurs dogmes, cherchèrent à renforcer leurs pouvoirs en éliminant ce qu'elles percevaient comme contraire à l'Eglise. Les troubles mentaux furent assimilés au péché et au Diable, au même titre que les femmes, tentatrices, qui provoquaient le désir des hommes. Si les médecins ne trouvaient pas de cause à une maladie, ou si la maladie ne répondait pas aux traitements traditionnels, il s'agissait du démon. Beaucoup de malades mentaux et de femmes, jugés pour sorcellerie, furent envoyés au bûcher.

Le XVII^e siècle fut marqué par des avancées significatives concernant la psychiatrie et les troubles mélancoliques. Anatomie de la Mélancolie, l'ouvrage de Robert Burton (1577-1640) paru en 1621, apporta un nouvel éclairage sur ce trouble en s'appuyant sur de nouvelles théories et l'expérience de l'auteur. Il y décrit en détail les causes psychologiques et sociales (comme la pauvreté, la peur et la solitude) qui étaient associées à la mélancolie et semblaient en être la cause, et suggéra qu'elle pouvait être combattue grâce à une alimentation saine, du sommeil, de la musique, un travail gratifiant, et le fait de parler du problème avec un ami. Des œuvres théâtrales et romanesques comme celles de William Shakespeare (1564-1616) ou de Miguel de Cervantes (1547-1616), au travers de leurs personnages, illustrent remarquablement la manière dont les conflits intérieurs et les processus psychologiques étaient perçus. Les émotions commencèrent à être étudiées ainsi que leurs impacts sur les organes, particulièrement le cœur. Le philosophe Baruch Spinoza (1632-1677) postula l'inséparabilité du corps et de l'esprit et que les processus physiques étaient perçus psychologiquement comme des émotions, des pensées et des désirs.

Aux XVIII^e et XIX^e siècles, de nombreuses nouvelles théories virent le jour. Philippe Pinel (1745-1826) affirma que la vie émotionnelle des patients était souvent perturbée avant l'apparition des symptômes et mit l'accent sur l'importance des facteurs psychologiques dans le développement des maladies. Pour Pinel, les troubles mentaux sont dus à des atteintes physiologiques (principalement dans l'abdomen) provoquées par les émotions. Jean-Etienne Esquirol (1772-1840), élève de Pinel, adopta plutôt la théorie phrénologique de Franz Joseph Gall

(1758-1828) sur la localisation cérébrale des troubles mentaux. S'il reprit les thèses de Pinel concernant l'importance des facteurs moraux et émotionnels dans la vie des individus, il distingua quant à lui les causes prédisposantes et précipitantes, en définissant plus clairement les rôles des bouleversements sociaux et de l'isolement dans les maladies mentales. Pour lui, les prédispositions étaient sous-tendues par des causes sociales et psychologiques.

Au début du XIX^e siècle, Johann Christian August Heinroth (1773-1843) pensait que les « péchés » étaient le facteur causal des maladies mentales. Sans rapport à la religion, le « péché » désignait l'offense de la moralité d'une personne par ses propres pensées, se référant aux conflits internes entre les pulsions et la conscience. Pour Jacques-Joseph Moreau de Tours (1804-1884), disciple d'Esquirol, la compréhension des troubles mentaux ne pouvait venir que de sa propre expérience, et les rêves étaient une forme transitoire de la psychopathologie. Les faiblesses inhérentes de ces approches reposant sur l'introspection firent naître au milieu du XIX^e siècle, en réaction à ces courants de pensée, des théories tournées vers l'étude des causes organiques des troubles mentaux. L'homme qui incarne le mieux ce courant est le psychiatre allemand Wilhelm Griesinger (1817-1868), pour qui les maladies mentales étaient des maladies somatiques dont les causes se trouvaient toujours dans le cerveau, psychiatrie et neuropathologie ne faisant qu'un.

A la fin du XIX^e siècle, Emil Kraepelin (1855-1926) se pencha sur les facteurs biologiques et héréditaires considérés comme la cause de la maladie mentale. Ses travaux nosographiques, prémisses des futurs manuels de classification utilisés à l'heure actuelle, permirent de mieux définir les troubles mentaux, en particulier les psychoses maniaco-dépressives (qui incluaient plusieurs troubles affectifs comme le trouble bipolaire et la dépression majeure). Il définit notamment la dépression comme un état de tristesse profond, intense, avec un sentiment de douleur morale, et caractérisée par le ralentissement et l'inhibition des fonctions motrices (anesthésie affective). Les théories de Kraepelin, considérées comme l'aboutissement de l'approche neurophysiologique débutée avec Griesinger, continuèrent à dominer la manière de concevoir la psychiatrie jusqu'aux tentatives de conceptualisation avortées de Sigmund Freud (1856-1939) avec la psychanalyse. Selon cette approche psychodynamique, la dépression pouvait être considérée comme l'incapacité névrotique de l'individu à faire face à ses problèmes, concourant à donner une image inconsistante de la dépression majeure au point d'être parfois considérée encore aujourd'hui moins comme une pathologie réelle que

comme une faiblesse personnelle. Le courant psychanalytique prédomina en psychiatrie jusque dans les années 70, qui furent marquées par un regain d'intérêt pour l'étude des causes génétiques, biochimiques et neuropathologiques des troubles mentaux, rendue possible par les avancées technologiques disponibles pour les médecins et chercheurs.

La nécessité de pouvoir diagnostiquer le trouble dépressif selon des critères objectifs indépendamment de ces multiples courants de pensée fit naître deux outils de diagnostic et de classification des troubles mentaux, reconnus par une grande majorité d'experts internationaux et reposant sur un principe de questionnaire : le « Diagnostic and Statistical Manual, fourth edition » (DSM-IV) proposé par l'Association Américaine de Psychiatrie (APA)¹, et le chapitre V concernant les « Troubles mentaux et du comportement » de la « Classification internationale des maladies, version 10 » (CIM-10) de l'Organisation Mondiale de la Santé (OMS)². Ces outils permettent donc aux cliniciens de fonder leur diagnostic sur des critères cliniques objectivables et dépendant le moins possible des différentes approches théoriques (biologique, psycho-dynamique, cognitive, comportementale, interpersonnelle, systémique ou familiale), et de permettre une mesure systématique des troubles, circonscrite et non exhaustive, mais pouvant contribuer à la collecte et à la communication de statistiques de santé, ainsi qu'à la comparaison de groupes de populations selon ces critères.

D'après ces outils diagnostics, un épisode dépressif majeur doit durer au moins deux semaines, même lorsque l'hypothétique événement déclencheur s'est dissipé, et se caractérise par plusieurs modifications importantes de l'humeur et altérations psycho-physiologiques 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, 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 récurrentes morbides ou suicidaires (Tableau 1).

¹ American Psychiatric Association. *Diagnostic and Statistical Manual of Mental Disorders*, 4th edition revised. Washington DC : American Psychiatric Association, 2000, 943 p.

² Organisation mondiale de la Santé. CIM-10/ICD-10. *Classification internationale des maladies*, 10^e révision, chapitre V (F) Troubles mentaux et troubles du comportement : critères diagnostiques pour la recherche. Genève : Masson, 1994, 226 p.

Tableau 1. Définition des troubles dépressifs selon le DSM-IV et la CIM-10

Symptômes	Types de troubles
Symptômes principaux • Symptôme de tristesse : vivre une période d'au moins deux semaines (critère de durée) consécutives en se sentant triste, déprimé, sans espoir pratiquement toute la journée (critère d'intensité) et presque tous les jours (critère de fréquence). • Symptôme d'anhédonie : vivre une période d'au moins 2 semaines (critère de durée) consécutives en ayant perdu intérêt pour la plupart des choses pratiquement toute la journée (critère d'intensité) et presque tous les jours (critère de fréquence). Symptômes supplémentaires • Perte d'intérêt pour la plupart des choses comme les loisirs, le travail, ou les activités qui donnent habituellement du plaisir (uniquement dans le cas d'une réponse positive au symptôme principal de tristesse) • Epuisement, manque d'énergie • Prise ou perte de 5 kg au moins • Difficultés pour dormir (ou plus rarement hypersomnie) • Difficulté de concentration • Perte de confiance en soi, dévalorisation • Pensées morbides (avoir pensé à la mort en général, pour soi ou pour les autres).	Episode dépressif majeur (EDM) • Au moins 4 symptômes (dont au moins un symptôme principal) associés à une perturbation des activités (d'intensité faible, modérée ou importante). Selon le nombre de symptômes et le niveau de perturbation des activités, il se répartit en : Episode dépressif majeur léger • 4 à 5 symptômes avec une perturbation des activités faible. Episode dépressif majeur moyen • 4 à 5 symptômes avec une perturbation des activités modérée à importante - ou • Au moins 6 symptômes avec une perturbation des activités faible à modérée. Episode dépressif majeur sévère • Au moins 6 symptômes avec une perturbation importante des activités. Trouble dépressif chronique • La durée de l'épisode dépressif majeur est d'au moins deux ans. Trouble dépressif récurrent • Au moins 2 épisodes dépressifs majeurs au cours de la vie sans trouble dépressif chronique. Etats subsyndromiques Etats caractérisés par des périodes de tristesse ou d'anhédonie qui ne présentent pas tous les symptômes de l'EDM ou qui présentent un nombre de symptômes suffisant par rapport aux critères de l'EDM mais pas de perturbation des activités. • Au moins un signe (sentiment de tristesse ou d'anhédonie) avec des critères de durée (pendant deux semaines) dans le cas d'une réponse négative aux critères de fréquence et d'intensité pour les symptômes principaux - ou • Au moins un symptôme principal (avec des critères de durée, de fréquence et d'intensité) dans le cas d'une absence de perturbations des activités (critère de retentissement). • Au maximum 2 symptômes supplémentaires dans le cas d'une réponse positive à au moins un symptôme principal (avec les critères de durée, de fréquence et d'intensité) associé à une perturbation des activités, quelle que soit son intensité (critère de ralentissement).

De plus, il convient d'ajouter à cette liste de nombreux symptômes associés, plus ou moins liés aux précédents, et de fréquence variable, tels que l'anxiété, le retrait social, la perte motivationnelle, des troubles cognitifs, la perturbation de l'activité sexuelle, etc. D'autre part, des échelles permettant d'évaluer l'intensité du syndrome dépressif sont couramment utilisées lors d'études cliniques, telles que les échelles d'Hamilton, de Beck ou de Montgomery et Asberg (Demyttenaere et De Fruyt, 2003). Cependant, ces outils diagnostics d'évaluation et de classification ne sont pas toujours adaptés pour des études épidémiologiques de grande ampleur. Plusieurs questionnaires structurés ou semi-structurés plus ou moins longs et éventuellement utilisables par des non professionnels en santé mentale ont donc été élaborés en utilisant le DSM-IV ou la CIM-10 comme référence, permettant d'évaluer les troubles de santé mentale dans diverses populations. Parmi ces outils, citons le « *Schedule for Clinical Assessment in Neuropsychiatry* » (SCAN) (Wing *et al.*, 1990), développé par l'OMS, qui produit des diagnostics en cohérence avec la CIM-10, le « *Structured Clinical Interview for DSM Disorders* » (SCID) proche des critères du DSM-IV (Spitzer *et al.*, 1992 ; Williams *et al.*, 1992), ou encore le « *Composite International Diagnostic Interview* » (CIDI) (Kessler et Ustun, 2004) et sa version courte (« *Short Form* ») le CIDI-SF (Gigantesco et Morosini, 2008).

Certains patients dépressifs ont connu ou connaîtront également des phases maniaques caractérisées par la présence d'hyperactivité, d'euphorie et d'une recherche inconsidérée de plaisir. Bien qu'il doive y avoir plusieurs mécanismes étiopathogéniques 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). Le DSM-IV répertorie six sous-types de dépression majeure, et distingue en particulier deux syndromes dépressifs cliniques qui semblent chacun être l'antithèse de l'autre : la dépression mélancolique (qui peut également comprendre une composante psychotique) et la dépression atypique (Harald et Gordon, 2011). Cette distinction repose sur un pattern de symptômes psychologiques et neurovégétatifs, et est indépendante de la différence entre dépression unipolaire et bipolaire (Gold et Chrousos, 1999 ; Gold *et al.*, 2002 ; Gold et Chrousos, 2002 ; Harald et Gordon, 2011). En particulier, les perturbations de la réponse de stress s'orientent vers des directions opposées : une hyperactivité de l'axe du stress dans la forme mélancolique et une hypoactivité dans la forme atypique (Gold *et al.*, 2002).

Selon le DSM-IV, la forme mélancolique se rapproche de la dépression majeure « classique » et se caractérise par la présence d'anhédonie, d'humeur dépressive plus prononcée (culminant le matin), d'insomnie, de perte d'appétit et de poids, de perturbations psychomotrices, d'une diminution de la libido et d'une perturbation de la concentration et de la mémoire. De plus, l'intense anxiété ressentie prend la forme d'un fort sentiment de dévalorisation, de résignation et de pensées persistantes d'échec. On peut y retrouver une composante psychotique avec des délires ou des hallucinations, un très fort sentiment de culpabilité et d'inutilité, des troubles psychomoteurs et cognitifs graves caractérisés par des déficits de l'attention, de la vitesse psychomotrice, du fonctionnement exécutif et de la mémoire.

La dépression atypique est elle aussi associée avec une anhédonie et un état dysphorique (culminant en fin de journée), mais présente des symptômes antinomiques à la forme mélancolique. Au niveau psychophysiologique, ce sous-type de dépression est associé à une forte fatigue, une hypersomnie, 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 50 % pour ceux qui présentent la forme atypique stricte (Gold et Chrousos, 2002 ; Harald et Gordon, 2011). Néanmoins, il convient de souligner que la plupart des patients ont en général un mélange d'altérations cognitives, affectives et physiologiques qui n'embrassent pas précisément la distinction entre forme mélancolique et forme atypique. Même à l'intérieur de ces sous-types, chaque cas ne ressemble pas conformément à un autre. Toutefois, les patients atteints de l'un ou l'autre de ces sous-types développent en général des troubles dépressifs plus sévères et récurrents que ceux qui présentent des symptômes neurovégétatifs mixtes.

1.1. Épidémiologie

La variabilité nosologique des troubles mentaux rend difficile les études épidémiologiques, dont les résultats sont intrinsèquement dépendants des critères diagnostics d'inclusion, qui peuvent différer selon l'outil de mesure utilisé. Cette difficulté participe à la disparité des résultats

parfois observée dans ces études épidémiologiques sur la dépression majeure. Toutefois, l'évolution de ces outils de mesure a permis l'émergence de critères objectivables, contribuant ainsi à une meilleure connaissance des facteurs épidémiologiques et de certains phénomènes psychopathologiques liés au trouble dépressif.

Ainsi, selon un rapport de l'Organisation Mondiale de la Santé (OMS) (Murray et Lopez, 1996 ; Murray et Lopez, 1997b), la dépression majeure touche près de 121 millions de personnes dans le monde, et moins de 25 % d'entre-elles ont accès à un traitement efficace. L'invalidité sociale et/ou professionnelle provoquée par la maladie en fait la quatrième cause de handicap toutes affections confondues, et elle atteindra la deuxième place en 2020, derrière les maladies cardiovasculaires (Murray et Lopez, 1997a). En Europe, au moins 21 millions de personnes souffriraient de dépression, ce qui aurait représenté un coût de 118 milliards d'Euros en 2004 (Sobocki *et al.*, 2006). Les coûts directs et indirects d'un patient dépressif pour la société sont estimés à 5500 Euros (Sobocki *et al.*, 2007). Chaque année, il y aurait entre 10 et 20 millions de tentatives de suicides au niveau mondial, qui conduiraient à environ 1 million de morts par an, dont 60% peuvent être directement attribués à des individus souffrant de troubles de l'humeur (Mann, 2003). La dépression peut survenir dans n'importe quelle catégorie socioprofessionnelle, à tous les âges et dans n'importe quelle ethnie. Aux Etats-Unis, on estime que la dépression majeure affecte environ 16 % de la population (Kessler *et al.*, 2003). La dépression touche environ deux fois plus les femmes que les hommes, puisque la prévalence de la maladie sur la vie entière est d'approximativement 9 % pour les hommes et 17 % pour les femmes (Hasin *et al.*, 2005). En France, selon l'enquête Anadep réalisée en 2005¹, la prévalence au cours de la vie de l'épisode dépressif majeur est de 12 % pour les hommes et de 23,5 % pour les femmes.

Ces chiffres éloquents permettent d'estimer l'importance des troubles dépressifs et leurs effets sur la société, mais ne permettent pas d'appréhender véritablement la sévérité de cette pathologie ni les conséquences dramatiques qu'elle engendre dans la vie des patients en souffrance. La dépression majeure est en effet une affection particulièrement grave et invalidante, qui revêt pour 75 % à 85 % des patients un caractère chronique avec des récurrences d'épisodes dépressifs tout au long de la vie sous forme de succession de phases de rémission et de rechutes plus ou moins importantes (Judd *et al.*, 1998 ; Frank et Thase, 1999 ; Mueller *et al.*, 1999). La prise en charge des

¹ Chan Chee C, Beck F, Sapinho D, Guilbert P (2009). *La dépression en France* – Enquête Anadep 2005, Saint- Denis : INPES, coll. Etudes santé, 2009, 208 p.

patients dépressifs nécessite souvent deux volets complémentaires et indissociables, combinant une approche somatique grâce à un traitement médicamenteux, accompagné d'une approche psychologique avec la psychothérapie, et dans certains cas, d'une aide psychosociale.

D'après l'AFSSAPS¹ (Agence Française de Sécurité Sanitaire des Produits de Santé), après 8 semaines de traitement bien conduit, un tiers des patients déprimés traités par des antidépresseurs ont une réponse complète au traitement avec rémission des symptômes, un tiers ont une réponse partielle ou insuffisante au traitement, et un tiers ne répondent pas au traitement. Malgré les nombreuses études pointant le peu de différences entre les effets des antidépresseurs par rapport à ceux des placebos (Freemantle *et al.*, 2000 ; Kirsch *et al.*, 2008 ; Pigott *et al.*, 2010), l'apport des traitements pharmacologiques est très important, puisqu'en plus d'une efficacité avérée (Baghai *et al.*, 2011 ; Fountoulakis et Moller, 2011), les patients rétablis à la suite d'un épisode dépressif présentent un risque de rechute évalué à 30% en cas d'arrêt du traitement (Geddes *et al.*, 2003). Les psychothérapies sont également très utiles dans le traitement de la dépression, puisqu'associées à un traitement antidépresseur, elles accélèrent la rémission des patients dépressifs (Segal *et al.*, 2002 ; Cuijpers *et al.*, 2011).

Au-delà de la détresse psychologique, la dépression majeure est associée à un grand nombre de troubles somatiques liés à la perturbation de processus biologiques affectant le sommeil, l'appétit, le métabolisme, le système nerveux autonome et le système neuroendocrinien (Gold *et al.*, 1988a ; Gold *et al.*, 1988b ; Frank et 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 et Schroll, 1996 ; Pratt *et al.*, 1996 ; Penninx *et al.*, 1999) ou une ostéoporose précoce (Pratt *et al.*, 1996), et être ainsi responsables d'un accroissement du taux de mortalité à âge égal chez les dépressifs indépendamment du suicide, du tabagisme ou de l'alcoolisme (Barefoot et Schroll, 1996 ; Michelson *et al.*, 1996 ; Penninx *et al.*, 1999 ; Matsumoto *et al.*, 2011).

¹ Bon usage des médicaments antidépresseurs dans le traitement des troubles dépressifs et des troubles anxieux de l'adulte, AFSSAPS, Octobre 2006.

1.2. Étiologie

L'étiologie de la dépression majeure reste encore largement méconnue de par le cadre nosographique hétérogène de cette pathologie. Il existe en effet de fortes disparités entre les individus souffrant de dépression majeure, dont les troubles peuvent varier en termes de durée, de récurrence ou d'intensité. De plus, si la dépression majeure se caractérise toujours par de la tristesse et/ou de l'anhédonie, tous les patients dépressifs ne présentent pas exactement les mêmes symptômes. Enfin, au-delà du tableau clinique, il existe également des différences interindividuelles concernant les mécanismes neurobiologiques impliqués et la réponse aux traitements. Cette variabilité au sein même du trouble dépressif suggère encore une fois qu'il ne s'agit pas d'une entité pathologique parfaitement circonscrite, dont les causes et les mécanismes sous-jacents peuvent également différer selon les individus.

Il existe trois principaux facteurs étiologiques qui peuvent expliquer l'apparition du trouble dépressif. On distingue tout d'abord une composante psychologique, sous-tendue par les composantes socio-environnementale et génétique, génératrices d'une vulnérabilité face à des facteurs socio-environnementaux déclenchants. C'est l'interaction de ces trois facteurs qui peut engendrer le développement de la pathologie dépressive.

1.2.1. Facteurs psychologiques

La contingence biographique de la personne (petite enfance, enfance et adolescence notamment) va considérablement influencer sur sa construction psychologique et sa manière de réagir aux événements pénibles auxquels elle est confrontée. Face à un échec ou à un événement traumatisant, certaines personnes vont être plus susceptibles que d'autres de développer une dépression. Certains individus ont tendance à expliquer les événements pénibles en termes stables (« cela va durer toujours »), globaux (« cela va affecter tout ce que je fais »), et interne (« tout cela est de ma faute »). Ces attributions pessimistes, généralisées et auto-culpabilisantes peuvent aboutir à un état de dépression (Alloy *et al.*, 1988 ; Joiner *et al.*, 2001). Les individus plus sensibles à la dépression vont donc répondre aux événements pénibles d'une façon particulièrement centrée sur eux-mêmes et auto-dévalorisante (Wood *et al.*, 1990a ; Wood *et al.*, 1990b). Lorsqu'ils sont dans une situation difficile qu'ils jugent inextricable, leurs ruminations amplifient les sentiments négatifs, qui à leur tour déclenchent les autres

symptômes cognitifs et comportementaux de la dépression. Il existe donc une interaction réciproque entre l'humeur dépressive et les pensées négatives. La dépression provoque des pensées négatives centrées sur soi-même et une façon auto-dépréciative d'expliquer les événements qui entraînent alors l'individu dans un cycle dépressif en maintenant constamment l'humeur dépressive. Ce mécanisme psychologique a été remarquablement montré dans une étude ayant évalué l'humeur et le degré de ruminations d'étudiants de l'Université Stanford en Californie deux semaines avant que le tremblement de terre de 1989 ne dévaste la majeure partie de la région. Ceux qui avaient été identifiés comme ayant une tendance à déprimer devant des événements négatifs montrèrent plus de signes de dépression, aussi bien dix jours que sept semaines après le tremblement de terre (Nolen-Hoeksema et Morrow, 1991). *A contrario*, d'autres études ont montré que les patients dépressifs ayant tout de même une façon optimiste d'interpréter les événements avaient plus de chances de se remettre rapidement (Needles et Abramson, 1990 ; Metalsky *et al.*, 1993). Ces études démontrent que la personnalité est un facteur étiologique fondamental de la dépression majeure qui va déterminer la manière de faire face psychologiquement à un événement stressant et potentiellement dépressogène. Ce facteur personnalité va être grandement modelé par le vécu de l'individu et par sa constitution biologique.

1.2.2. Facteurs environnementaux

L'environnement va participer à l'étiologie de la dépression en agissant sur ce que l'on pourrait appeler les causes profondes de la dépression, c'est-à-dire en participant à la construction psychologique de l'individu, le rendant plus vulnérable face à des événements particulièrement stressants de la vie (Heim et Nemeroff, 2001). L'environnement familial va être primordial pour le développement psychoaffectif de l'enfant, puisqu'un comportement parental affectif inapproprié et distant peut induire une augmentation de 38 % du risque de développer un épisode dépressif au cours de la vie (Kendler, 2001). De même, les enfants de parents dépressifs sont beaucoup plus susceptibles de souffrir d'une dépression à l'âge adulte (Beardslee *et al.*, 1998). Au-delà du contexte affectif familial, les traumatismes de l'enfance sont aussi générateurs de vulnérabilités. La perte précoce d'un parent prédispose également au développement de dépressions unipolaires ou bipolaires et de troubles anxieux (Kendler *et al.*, 1992 ; Kendler *et al.*, 1993a ; Agid *et al.*, 1999). Dans ce contexte, il a récemment été montré que les personnes ayant perdu un ou plusieurs membres de leur famille pendant la guerre du

Kosovo, alors qu'ils étaient enfants ou adolescents, avaient plus de risques de présenter un épisode dépressif à l'âge adulte (Moreno *et al.*, 2005). De même, des femmes ayant été victime d'abus sexuels ou physiques durant leur enfance, mais pas à l'âge adulte, sont plus susceptibles de présenter des symptômes de dépression et d'anxiété des années après (McCauley *et al.*, 1997). Les expériences douloureuses durant le développement d'un individu peuvent donc induire une vulnérabilité aux effets du stress des années après, prédisposant ces individus au développement d'une dépression majeure. Cette vulnérabilité va dépendre de l'intensité et de la quantité de mémoires émotionnelles liées à des échecs et à des expériences aversives et traumatiques.

Outre son aspect structurant sur le développement psychologique d'un individu et sur sa personnalité, l'environnement va donc très souvent être un déclencheur de l'épisode dépressif, devenant cette fois-ci la cause immédiate de la dépression. Cette dernière est en effet souvent engendrée par des expériences pénibles et particulièrement stressantes, comme la perte d'un travail, des problèmes financiers, un divorce, un rejet, le décès d'un membre de la famille, ou un traumatisme physique ou psychologique (Hamilton *et al.*, 1993 ; Kendler *et al.*, 1993b ; Kendler *et al.*, 1999). Le stress est caractérisé comme le facteur environnemental majeur pouvant précipiter un épisode dépressif et en influencer la sévérité, la durée et la récurrence. Plusieurs troubles neuropsychiatriques sont d'ailleurs liés à l'occurrence du stress, qui est connu pour déclencher et exacerber les états dépressifs (McEwen, 1998a ; McEwen, 1998b). Les stress environnementaux à l'âge adulte peuvent ainsi contribuer à l'émergence d'un épisode dépressif qui est renforcé lorsque ceux-ci revêtent un caractère chronique ou traumatique (Kendler *et al.*, 1995).

1.2.3. Facteurs génétiques

Si la dépression majeure présente une composante génétique, celle-ci est d'importance moindre que celle généralement observée dans d'autres affections psychiatriques comme le trouble bipolaire ou la schizophrénie, puisque le taux de concordance entre des jumeaux homozygotes et dizygotes pour le trouble dépressif n'est que d'environ 37 % (Sullivan *et al.*, 2000). De plus, l'héritabilité de la pathologie est plus importante chez les femmes que chez les hommes (Wurtman, 2005). L'importance des facteurs génétiques varie également suivant l'importance des troubles, puisque les dépressions précoces, sévères et récurrentes (Fava et Kendler, 2000 ; Gilbertson *et al.*, 2002), de même

que les formes mélancoliques et atypiques, ont une plus grande héritabilité que des syndromes mixtes ou moins sévères (Kendler *et al.*, 1996 ; Kendler *et al.*, 1999). Certains traits de personnalité comme les conduites d'évitement de la douleur, l'anxiété, le pessimisme et le neuroticisme conférant une vulnérabilité à la survenue d'un épisode dépressif, ont un taux d'héritabilité important (Bouchard, Jr., 1994 ; Kendler *et al.*, 2006).

Toutefois, il est maintenant admis que la part génétique de la dépression majeure n'est pas le fait de gènes isolés, mais résulterait plutôt d'une interaction complexe de différents gènes régulant des fonctions biologiques impliquées dans la physiopathologie de la maladie. Malgré quelques contradictions, plusieurs études ont permis d'identifier des régions chromosomiques associées à la dépression majeure (Holmans *et al.*, 2007 ; Levinson *et al.*, 2007), mais l'hétérogénéité clinique de la maladie semble être un frein à la réplification de certains résultats. Cependant, parmi les gènes pouvant influencer l'apparition de la dépression majeure, celui du transporteur de la sérotonine a fait l'objet d'une attention particulière (Levinson, 2006). Ce gène est touché par un polymorphisme caractérisé par deux allèles, un allèle long ou un allèle court. L'allèle court ralentit la synthèse du transporteur de la sérotonine, ce qui réduit la recapture de ce neurotransmetteur dans l'élément présynaptique, participant à diminuer la vitesse d'adaptation des neurones sérotoninergiques face à des changements de stimulations. Comme la sérotonine est libérée lors d'un stress aigu, ce polymorphisme va pouvoir influencer la sensibilité des individus au stress. Les sujets sains possédant l'allèle court présentent en effet une activation exagérée de l'amygdale quand ils sont exposés à des stimuli stressants (Munafo *et al.*, 2008). Ces personnes sont aussi plus susceptibles de présenter une aggravation de leur humeur en cas de déplétion de tryptophane, le précurseur de la sérotonine (Neumeister *et al.*, 2002). De fait, d'autres études ont indiqué que ce polymorphisme pouvait conférer une prédisposition pour la dépression, mais également pour le neuroticisme et l'anxiété qui sont des facteurs de risque pour la dépression (Lesch *et al.*, 1996 ; Greenberg *et al.*, 2000 ; Foster et MacQueen, 2008). 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 (cortex cingulaire et amygdale) (Pezawas *et al.*, 2005).

Ces données indiquent qu'il existe un lien entre le patrimoine génétique et la susceptibilité de souffrir d'une dépression majeure. Cependant, la

faiblesse de ce lien conduit à penser que d'autres facteurs, comme un environnement stressant, vont agir en interaction avec une vulnérabilité génétique pour augmenter la probabilité de l'apparition d'un épisode dépressif. On peut donc penser que le phénotype causé par certaines variations critiques dans le patrimoine génétique peut rester silencieux jusqu'à ce que le sujet se retrouve confronté à certaines circonstances comme une expérience traumatisante ou encore une exposition répétée à un environnement aversif, anxiogène ou déstabilisant (stress chronique). Cette interaction entre le patrimoine génétique et l'environnement a été brillamment démontré par une étude épidémiologique prospective dans laquelle les auteurs ont analysé le génotype des sujets pour le polymorphisme du transporteur de la sérotonine (Caspi *et al.*, 2003). Plus les sujets ayant l'allèle court avaient fait l'expérience d'événements stressants, plus la probabilité d'avoir présenté un épisode dépressif l'année précédant l'étude était importante, comparativement aux sujets porteurs de l'allèle long. Ce polymorphisme n'induit donc un risque de développer une dépression qu'en association avec des événements stressants, ce qui a été ensuite confirmé par d'autres études (Kendler *et al.*, 2005 ; Zalsman *et al.*, 2006 ; Cervilla *et al.*, 2007 ; Kilpatrick *et al.*, 2007). Cependant, des controverses existent, puisqu'une étude a montré que la déplétion expérimentale de sérotonine chez des patients dépressifs en phase de rémission et portant l'allèle court avait moins d'effets sur l'humeur que ceux observés chez les patients homozygotes pour l'allèle long (Neumeister *et al.*, 2006b).

Divers facteurs développementaux et environnementaux peuvent également conférer une susceptibilité pour la dépression en affectant le génome d'une manière épigénétique. Il a en effet été montré que les soins maternels apportés aux jeunes chez les rongeurs induisaient des changements épigénétiques dans la région promotrice du gène du récepteur aux glucocorticoïdes, diminuant la probabilité d'apparition d'un état dépressif-like (Weaver *et al.*, 2004). De même, un stress chronique induit des changements épigénétiques inhibant l'expression du gène du facteur neurotrophique BDNF (*Brain-Derived Neurotrophic Factor*), ces changements étant contrecarrés par un traitement chronique avec un antidépresseur (Tsankova *et al.*, 2006).

Dans tous les cas, l'impact de gènes individuels sur le risque de développer une dépression majeure semble faible, et il est de plus en plus clair que le risque de développer une dépression soit le fruit d'une interaction complexe de plusieurs gènes, pouvant affecter la personnalité, en interaction avec des stress psychosociaux liés à l'environnement (Cicchetti *et al.*, 2007).

1.2.4. Le modèle de diathèse-stress de la dépression

En 1991, Martin Seligman écrivait que « *la recette d'une dépression sévère, c'est un pessimisme préexistant qui rencontre un échec* ». Il est maintenant clair que les facteurs biologiques n'agissent pas dans un vide psychologique et social. Ces observations ont permis d'élaborer le modèle de diathèse-stress de la dépression. Dans ce modèle, l'individu fait état d'une prédisposition induite par une vulnérabilité génétique ou biologique (la diathèse), qui en interagissant avec l'environnement et les événements de la vie, en particulier le stress, peut déclencher un épisode dépressif. Cette vulnérabilité va être elle-même influencée par des événements structurellement négatifs souvent vécus dans l'enfance et l'adolescence, et va accompagner et/ou sous-tendre les réactions psychologiques provoquées par les expériences vécues. Il est cependant délicat, dans les études traitant de l'impact des problèmes psychosociaux durant l'enfance sur le risque de développer une dépression à l'âge adulte, de séparer les effets des gènes de ceux de l'environnement (Charney et Manji, 2004 ; Wurtman, 2005). Les pensées négatives du psychisme influencent, d'une manière ou d'une autre, les mécanismes biochimiques qui, par un cercle vicieux, amplifient les idées dépressives. En effet, être enfermé et s'apitoyer sur soi-même suscitent le rejet (Segrin et Abramson, 1994), et les déprimés présentent un risque élevé de divorce ou de licenciement, renforçant alors leur dépression.

De fait, plus la vulnérabilité intrinsèque de l'individu est importante, moins il sera nécessaire de subir des événements stressants pour observer l'apparition d'un trouble dépressif. A l'inverse, une personne peu prédisposée devra être davantage confrontée à des situations stressantes avant l'apparition d'une dépression. Néanmoins, même si une personne présente une forte prédisposition, rien n'affirme qu'elle développera plus tard dans sa vie des troubles dépressifs.

1.3. Hypothèses neurobiologiques de la dépression majeure

Comme nous venons de le voir, la dépression est un trouble qui affecte l'ensemble de l'organisme et dont l'origine est multifactorielle, impliquant une humeur mélancolique, des pensées négatives, des prédispositions génétiques mais également de très nombreux déséquilibres biochimiques. Plusieurs hypothèses existent pour expliquer la physiopathogénie du trouble dépressif, mais aucune

d'entre elles n'est suffisante pour expliquer complètement les altérations cognitives, psychologiques et biologiques de la dépression.

1.3.1. Hypothèse monoaminergique

C'est à partir des années 50 qu'est apparu un modèle physiopathogénique crédible de la dépression, fondé sur une déficience centrale de disponibilité de neurotransmetteurs monoaminergiques. A l'origine de cette hypothèse, il y eut notamment l'observation des effets de la réserpine, un alcaloïde utilisé contre l'hypertension artérielle, qui entraînait une déplétion de la neurotransmission monoaminergique cérébrale en se fixant sur les vésicules de stockage de la dopamine, de la noradrénaline et de la sérotonine (Schildkraut, 1965). Chez environ 15 % des patients, la réserpine provoquait une altération de l'humeur et les symptômes d'un état dépressif, pouvant conduire à des tentatives de suicide. A l'inverse, on remarqua à la même époque que l'utilisation d'un antituberculeux, l'isoniazide, avait des propriétés antidépressives, qui devint d'ailleurs la première molécule à avoir été nommée « antidépresseur ». Bien que ce composé n'ait aucune action directe sur le système monoaminergique, un autre composé qui lui est proche, l'iproniazide, présentait également un profil antidépresseur en réprimant la dégradation oxydative de neurotransmetteurs monoaminergiques comme la sérotonine, la noradrénaline et la dopamine. Cet inhibiteur de monoamine oxydase (IMAO) fut le premier antidépresseur mis sur le marché. Une autre molécule aux propriétés antidépressives, l'imipramine, fut découverte en 1957. Ce composé tricyclique agit en bloquant la recapture de la sérotonine et de la noradrénaline en inhibant leurs transporteurs. Au fil du temps, de nombreuses autres molécules furent synthétisées, notamment celles capables d'agir plus spécifiquement sur la sérotonine et la noradrénaline. De fait, presque tous les composés régulant la concentration intrasynaptique de sérotonine et de noradrénaline, en augmentant leur disponibilité et l'activation du neurone post-synaptique, possèdent un effet antidépresseur, soutenant l'hypothèse d'une perturbation du système monoaminergique dans la dépression (Hoes, 1982 ; Leonard, 2001).

De nombreux autres arguments sont venus étayer cette hypothèse. D'un point de vue neuroanatomique, la sérotonine (5-hydroxytryptamine, 5-HT) et la noradrénaline (NA) sont synthétisées dans des neurones dont les corps cellulaires sont situés dans le tronc cérébral, formant différents noyaux ; la 5-HT est synthétisée dans les neurones des noyaux du raphé, alors que la NA est produite au niveau du locus

cœruleus. Les neurones noradrénergiques et sérotoninergiques de ces structures innervent l'ensemble du cerveau et de la moelle épinière, en particulier le système limbique, le striatum et le cortex préfrontal, suggérant des systèmes capables de moduler un grand nombre de fonctions cérébrales impliquées dans les émotions, le raisonnement ou les comportements (Nutt, 2002 ; Drevets *et al.*, 2007 ; Goddard *et al.*, 2010). Puisque la plupart des antidépresseurs augmentent le niveau de la 5-HT et de la NA au niveau des terminaisons synaptiques, notamment par une désensibilisation des autorécepteurs somatodendritiques, un déséquilibre des systèmes sérotoninergique et noradrénergique 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 (Hindmarch, 2002).

Le système sérotoninergique occupe une place particulière dans l'étiopathogénie du trouble dépressif, puisque d'une part les inhibiteurs de recapture sélectifs de sérotonine (IRSS) possèdent des effets antidépresseurs, et que d'autre part la majorité des autres antidépresseurs augmentent également la neurotransmission sérotoninergique. Il est expérimentalement possible de réduire le taux de sérotonine par des traitements pharmacologiques oraux qui vont diminuer le taux plasmatique de tryptophane, le précurseur de la sérotonine. Même si cette déplétion en tryptophane n'induit pas de troubles dépressifs chez le sujet sain, elle va néanmoins induire une réapparition des symptômes dépressifs chez des patients ayant été traités avec succès par des IRSS (Ruhé *et al.*, 2007). De nombreuses études se sont également intéressées aux différents récepteurs de la sérotonine. Les données issues d'analyses *post-mortem*, pharmacologiques et de neuroimagerie ont pu mettre en évidence une diminution en terme de densité et de sensibilité de certains sous-types de récepteurs à la sérotonine (Stockmeier, 2003), en particulier le récepteur 5-HT_{1A} (Pitchot *et al.*, 2005 ; Drevets *et al.*, 2007). De plus, certains antidépresseurs administrés de manière chronique augmentent l'activation des récepteurs 5-HT_{1A} postsynaptiques (Chaput *et al.*, 1991 ; Haddjeri *et al.*, 1998). D'autres études ont montré que le niveau de la protéine p11, qui augmente l'efficacité de la signalisation du récepteur 5-HT_{1B}, était diminué dans le cerveau de patients ayant souffert de dépression (Svenningsson *et al.*, 2006). Les techniques moléculaires de suppression de l'expression d'un gène ont aussi permis de souligner l'implication du système sérotoninergique dans la dépression. Par exemple, les souris *knock-out* pour le gène du transporteur de la sérotonine (*5-HT transporter*, 5-HTT ou *serotonin transporter*, SERT), dont le rôle est la recapture de la sérotonine libérée

dans la synapse, présentent une anxiété plus importante (Ansorge *et al.*, 2004). L'allèle court du polymorphisme du promoteur du gène du transporteur de la sérotonine (*5-HT-transporter-linked polymorphic region*, 5-HTTLPR), réduisant l'efficacité de la transcription du gène et l'expression de 5-HTT, est également associé à une vulnérabilité accrue de développer un trouble dépressif lors d'événements stressants au cours de la vie (Caspi *et al.*, 2003). Ces données peuvent paraître contradictoires au regard de l'action thérapeutique des IRSS. Néanmoins, cette contradiction peut être expliquée par la différence entre une altération monoaminergique chronique durant le développement (Ansorge *et al.*, 2004) et l'hypothétique déplétion monoaminergique chez un adulte atteint de dépression.

D'autres neurotransmetteurs ont également fait l'objet d'investigations, corroborant d'autant plus l'hypothèse monoaminergique de la dépression. La déplétion expérimentale des catécholamines (dopamine, adrénaline et noradrénaline) n'induit pas de dépression chez le sujet sain, mais va induire une rechute chez les patients ayant été traités avec succès avec des inhibiteurs de recapture de noradrénaline (Ruhé *et al.*, 2007). Une augmentation de la sensibilité du récepteur noradrénergique α -2, principalement présynaptique et dont le rôle est de moduler la libération de noradrénaline par un feedback négatif, a été décrite chez des patients dépressifs (Ordway *et al.*, 2003), corroborant l'hypothèse d'un épuisement du stock de noradrénaline dans la dépression. L'importante comorbidité entre la maladie de Parkinson et la dépression suggère qu'une déficience en dopamine pourrait aussi être impliquée dans la physiopathologie du trouble psychiatrique (Koerts *et al.*, 2007). Cette hypothèse est renforcée par l'effet antidépresseur du bupropion, qui inhibe la recapture de la dopamine, et par le pramipexole, un agoniste dopaminergique, même si ce dernier a été développé pour la maladie de Parkinson (Gershon *et al.*, 2007). De plus, tous les antidépresseurs augmentent la libération de dopamine dans le cortex préfrontal, au niveau duquel l'expression des récepteurs D1 de la dopamine semble déterminante pour réguler l'état dépressif (Lavergne et Jay, 2010).

Enfin, l'effet de psychostimulants sur l'humeur supporte indirectement l'hypothèse monoaminergique de la dépression, puisque la cocaïne et les amphétamines vont entraîner une augmentation importante de monoamines dans la synapse, sans toutefois soulager les troubles des patients dépressifs. Néanmoins, une réponse aiguë à une dose d'amphétamines est capable de prédire la réponse à long-terme du patient aux inhibiteurs de recapture de monoamines (Tremblay *et al.*, 2002).

Malgré tout ce qui a été décrit ci-dessus, l'hypothèse monoaminergique, bien que séduisante, ne permet pas d'expliquer la totalité des perturbations observées dans la dépression et présente plusieurs limites. L'une d'entre elles est que cette hypothèse dérive directement de l'observation de l'efficacité d'antidépresseurs monoaminergiques, alors même que chez 30 à 40 % des patients dépressifs, ces traitements demeurent inefficaces. De plus, si approximativement deux tiers des patients répondent cliniquement à ces composés, un tiers répondent au placebo (Mann, 2005). Il est connu que les monoamines, en plus de leur rôle modulateur de l'humeur et de l'anxiété, participent à un grand nombre de fonctions centrales et périphériques, régulant des systèmes impliqués dans la cognition, l'attention, les rythmes veille/sommeil, le comportement alimentaire, le comportement sexuel, l'addiction, l'activité cardiovasculaire, ou l'activité viscérale. En agissant sur les systèmes monoaminergiques de manière générale, ces systèmes vont être affectés et vont pouvoir, indirectement, contribuer à l'amélioration de l'humeur du patient dépressif. Cette fonction antidépressive serait alors sans lien direct avec l'effet spécifique de l'antidépresseur sur les systèmes monoaminergiques. En outre, l'apparition des premiers effets bénéfiques d'un traitement antidépresseur ne s'observe qu'après un délai de plusieurs semaines, alors que l'augmentation du niveau de monoamines est plutôt rapide (Wong et Licinio, 2001 ; Artigas *et al.*, 2002). Cela sous-entend que la stimulation des cibles monoaminergiques va entraîner des modifications physiologiques et structurales progressives au sein de ces structures, en particulier celles impliquées dans la régulation de l'humeur et de l'état dépressif, permettant l'apparition des effets cliniques.

La non spécificité des antidépresseurs monoaminergiques entraîne par ailleurs souvent de nombreux effets secondaires (maux de tête, nausées, nervosité, insomnie, agitation, difficultés sexuelles, prise de poids, etc.). Il est donc envisageable d'essayer d'obtenir des effets thérapeutiques en agissant plus spécifiquement sur des systèmes directement liés aux perturbations observées dans la dépression ; d'ailleurs, de nombreuses autres cibles thérapeutiques sont à l'étude en s'appuyant sur d'autres hypothèses neurobiologiques et qui ne visent pas directement les transmissions monoaminergiques, mais par exemple le glutamate (Hashimoto, 2011), la mélatonine (Detanico *et al.*, 2009), le système cannabinoïde (McLaughlin et Gobbi, 2011), la corticolibérine et la vasopressine (Louis *et al.*, 2006 ; Surget *et al.*, 2008 ; Madaan et Wilson, 2009 ; Urani *et al.*, 2011), la substance P (Gobbi et Blier, 2005 ; Muñoz et Coveñas, 2011), l'hormone de mélanconcentration (*melanin-concentrating hormone*, MCH) (Shimazaki *et al.*,

2006 ; David *et al.*, 2007), ou le neuropeptide Y (Madaan et Wilson, 2009).

1.3.2. Hypothèse de la réponse au stress et de l'axe HPA

Le stress est un concept à plusieurs dimensions qui englobe à la fois les stimuli stressants (on parlera ainsi de stressseurs), l'état dans lequel se trouve l'organisme, et la réaction engendrée par les stressseurs. On doit la première utilisation du concept de « stress » (tension en anglais) en médecine et en biologie à Hans Selye, qui a popularisé le terme et qui l'a défini au sens large comme « la mesure des avanies causées par la vie¹ ». Il a conceptualisé en 1956 la réponse de stress en élaborant un modèle, le « syndrome d'adaptation générale », faisant encore référence aujourd'hui. Selon cette conception, la réponse initiale au stress est la réaction d'alarme. Il s'agit de fonctions réflexes archaïques et bien conservées au service de l'autoconservation de l'espèce. Cette première étape est suivie d'une seconde étape moins précoce mais plus durable, le stade d'adaptation ou de résistance, qui comprend une activation réussie des systèmes de réponse adéquate, en particulier de l'axe HPA (axe hypothalamo-hypophyso-surrénalien ou axe corticotrope, en anglais *hypothalamic-pituitary-adrenal axis*). La durée de cette phase est fonction du stress lui-même et des capacités d'adaptation de l'organisme qui dépendront, au-delà des réponses physiologiques, du traitement cognitif et des prises de décision. En général, l'individu parvient à faire face et retrouve un état physiologique normal par le rétablissement de la balance homéostatique. Si le stress se prolonge, ou se répète fréquemment, une phase d'épuisement se met alors en place, et l'individu devient incapable de s'adapter et de surmonter la situation. Ses capacités psychologiques, cognitives et émotionnelles à faire face à la situation stressante s'amenuisent, les ressources énergétiques de l'organisme s'épuisent et certains processus physiologiques se retrouvent anormalement hyperactifs ou réprimés. L'activation soutenue de tous ces processus physiologiques, et particulièrement de l'axe HPA, peut se traduire par une multitude d'effets néfastes (morts cellulaires et neuronales, diminution de la plasticité neurale, affaiblissement du système immunitaire, etc.) pouvant conduire, s'ils deviennent chroniques, à un état pathologique.

L'axe HPA est donc le principal système de réponse au stress, qui s'insère néanmoins dans un mécanisme adaptatif plus vaste composé

¹ « *the rate of all the wear and tear caused by life* », Hans Selye, 1956.

d'autres systèmes centraux et périphériques, en interaction avec l'axe HPA, et accompagnant également la réponse au stress. Comme décrit précédemment, lors d'un événement stressant, l'organisme va réagir en déclenchant une réponse physiologique adaptative. L'intégration des stimuli liés au stress va faire intervenir plusieurs circuits corticolimbiques qui vont transmettre l'information à l'hypothalamus, dans le noyau paraventriculaire (*paraventricular nucleus*, PVN). Ce noyau possède deux types de neurones : les neurones magnocellulaires qui sécrètent l'ocytocine et la vasopressine, et les neurones parvocellulaires qui sécrètent la vasopressine, l'hormone thyroïdienne (*thyrotropin-releasing hormone*, TRH) et la corticolibérine (*corticotropin-releasing hormone*, CRH, ou *corticotropin-releasing factor*, CRF). Lorsque les neurones parvocellulaires vont être stimulés suite à un stress, le CRF va être libéré dans le système porte hypothalamo-hypophysaire pour rejoindre l'adénohypophyse (hypophyse antérieure) et déclencher la sécrétion dans le système circulatoire sanguin de l'hormone adrénocorticotrope (*adrenocorticotrophic hormone*, ACTH). Cette dernière parvient alors au niveau des glandes corticosurrénales, induisant la libération des hormones corticostéroïdes (principalement le cortisol chez les primates et la corticostérone chez les rongeurs), produit final dans la réponse de l'axe HPA. Ces corticostéroïdes vont agir à la fois en périphérie et sur le système nerveux central à travers les récepteurs de type I ou récepteurs des minéralocorticoïdes (*mineralocorticoid receptor*, MR) et les récepteurs de type II ou récepteurs des glucocorticoïdes (*glucocorticoid receptor*, GR). Afin de maintenir l'homéostasie, les corticostéroïdes vont initier une boucle de rétrocontrôle négatif sur l'axe HPA pour réduire la production de CRH en agissant sur l'hypothalamus et l'hypophyse antérieure, mais également sur d'autres structures centrales comme le cortex préfrontal, l'amygdale et l'hippocampe (Quirarte *et al.*, 1997 ; Bao *et al.*, 2008) (Figure 2).

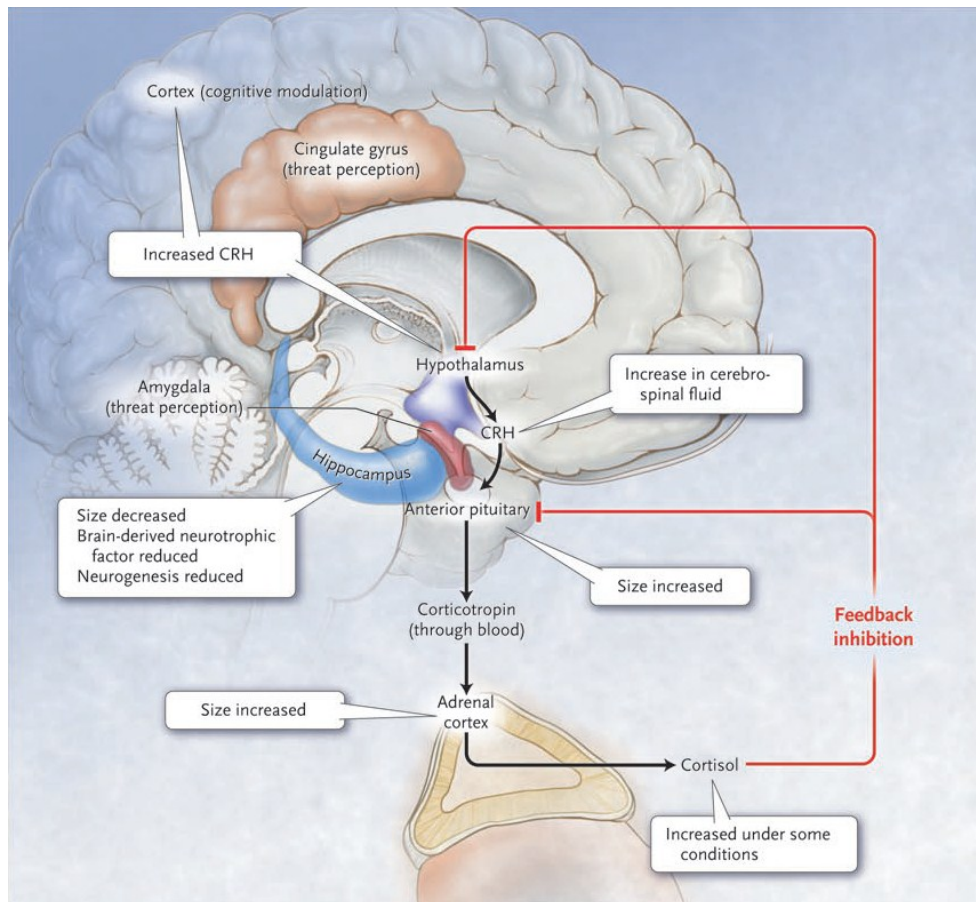


Figure 2. L'hypothèse de l'implication de l'axe HPA dans la dépression postule que des anomalies de la sécrétion du cortisol puissent sous-tendre la dépression. Les flèches noires montrent qu'en réponse au stress, préalablement perçu et identifié comme tel par les structures corticolimbiques (amygdale, cortex préfrontal, gyrus cingulaire, hippocampe), la CRH et accessoirement la vasopressine (non représentée ici) vont alors être libérées. En atteignant l'hypophyse, ces deux molécules vont être à l'origine de la libération dans le système circulatoire de l'ACTH. Cette dernière va permettre aux glandes surrénales de sécréter le cortisol. Les lignes rouges indiquent que le cortisol, en retour, supprime la libération de la CRH, d'ACTH et du cortisol lui-même via l'hypophyse antérieure, l'hypothalamus mais aussi les structures corticolimbiques sus-citées. Les études sur la dépression indiquent que les niveaux de cortisol sont fréquemment augmentés dans la dépression sévère, et les niveaux de CRH et de vasopressine sont également élevés. L'ensemble des régulateurs corticolimbiques de la réponse au stress sont perturbés, avec notamment des anomalies du rétrocontrôle que le cortisol exerce sur l'axe HPA. D'après Belmaker et Agam (2008).

Lorsque le stress se prolonge anormalement ou survient de manière trop fréquente ou excessive, l'activation soutenue de l'axe HPA peut engendrer des altérations importantes conduisant à des pathologies comme la dépression (Sapolsky, 1996 ; McEwen, 1998a ; Sapolsky, 2003). En effet, des stress périnataux peuvent augmenter le risque de

développer une dépression à l'âge adulte et sont associés à une hyperactivité permanente de l'axe HPA (Lee *et al.*, 2005b ; Tarullo et Gunnar, 2006). De fait, il est à présent clairement établi que la dépression majeure s'accompagne très fréquemment d'une hyperactivité de l'axe HPA (Burke *et al.*, 2005 ; Carroll *et al.*, 2007), corroborée par la forte occurrence d'épisodes dépressifs chez les patients souffrant du syndrome de Cushing, caractérisé par une hypertrophie des glandes surrénales à l'origine d'une hypersécrétion chronique de corticostéroïdes (Carroll *et al.*, 2007). En outre, de nombreuses études ont souligné le rôle de l'axe HPA dans la dépression en mettant en évidence 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, et une augmentation du volume des glandes surrénales (Pariante, 2003). Il est néanmoins nécessaire de noter que le niveau de cortisol dans le sang n'a pas valeur de diagnostic de la dépression, puisque ce taux varie considérablement au cours du cycle circadien, et qu'il existe un chevauchement considérable entre le niveau de cortisol des patients dépressifs et ceux des sujets contrôles (Burke *et al.*, 2005).

Généralement, les patients dépressifs présentent une altération du rétrocontrôle négatif qu'exercent les corticostéroïdes sur l'axe HPA (Nemeroff, 1996 ; Holsboer, 2000). Il est possible de mettre en évidence cette altération en injectant un corticostéroïde exogène, la dexaméthasone, qui va normalement provoquer dans les heures suivantes une diminution de la concentration en glucocorticoïdes plasmatiques en activant le rétrocontrôle négatif de l'axe HPA. Ce test de suppression à la dexaméthasone n'induit aucun changement pour environ la moitié des patients souffrant de dépression sévère, ce qui démontre que ces patients présentent des anomalies de la régulation de l'axe HPA et conservent une concentration en glucocorticoïdes endogènes élevée (Carroll *et al.*, 2007). De plus, lorsque des patients présentent des altérations de l'axe HPA, la rémission clinique est toujours associée à une 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 ; Carroll *et al.*, 2007).

De nombreuses études ont démontré l'implication du CRF dans la pathophysiologie de la dépression. Chez les patients dépressifs, on observe une augmentation du nombre de neurones sécrétant du CRF dans le PVN, ainsi qu'une élévation du niveau de CRF dans ce noyau,

dans le système limbique et dans le liquide céphalo-rachidien (Raadsheer *et al.*, 1994 ; Raadsheer *et al.*, 1995 ; Merali *et al.*, 2004 ; Merali *et al.*, 2006). Chez les rongeurs, l'injection intracérébrale de CRF induit des altérations physiologiques et comportementales analogues aux symptômes de la dépression, comme une diminution du comportement alimentaire et de l'activité sexuelle, des perturbations du sommeil et une augmentation de l'anxiété (Holsboer, 2001). De plus, l'implication du CRF dans la dépression est soulignée par l'effet de l'administration chronique d'antidépresseurs qui va engendrer une diminution de la synthèse et de la concentration de CRF dans le liquide céphalo-rachidien (Barden, 1996 ; Heuser *et al.*, 1996). Enfin, un polymorphisme du gène du récepteur CRH1 a été identifié et associé à une augmentation du risque pour la dépression majeure (Liu *et al.*, 2006). D'ailleurs, les antagonistes du récepteur CRH1 semblent montrer une certaine efficacité dans différents tests et modèles de dépression chez les rongeurs de même que lors d'essais cliniques (Zobel *et al.*, 2000 ; Louis *et al.*, 2006 ; Surget *et al.*, 2008), même si ces résultats n'ont pas toujours pu être répliqués (Binneman *et al.*, 2008). Néanmoins, tous les patients ne présentent pas nécessairement d'hyperactivité de l'axe HPA, et ces antagonistes pourraient ne pas être efficaces chez ceux-ci.

La vasopressine joue également un rôle dans le fonctionnement de l'axe HPA en étant capable d'induire la libération d'ACTH principalement lorsque le stress devient chronique (Scott et Dinan, 1998). De nombreuses études ont d'ailleurs souligné l'implication de la vasopressine dans la pathophysiologie de la dépression. Des élévations des niveaux de vasopressine plasmatique et de la synthèse de vasopressine ont été respectivement corrélées avec le niveau de cortisol et le risque de suicide chez les dépressifs (de Winter *et al.*, 2003 ; Merali *et al.*, 2006 ; Meynen *et al.*, 2006), de même qu'une augmentation du nombre de neurone exprimant la vasopressine et du niveau de vasopressine dans le PVN (Purba *et al.*, 1996 ; Bao et Swaab, 2010). Un polymorphisme du gène du récepteur V1b de la vasopressine aurait des effets protecteurs contre la dépression majeure (van West *et al.*, 2006), confirmé par l'effet des antagonistes des récepteurs V1b dans les modèles animaux de dépression (Griebel *et al.*, 2002 ; Alonso *et al.*, 2004 ; Louis *et al.*, 2006 ; Surget *et al.*, 2008 ; Urani *et al.*, 2011).

L'implication des glucocorticoïdes dans la dépression majeure est aussi attestée par plusieurs études qui démontrent notamment que des polymorphismes du gène du GR sont associés à une vulnérabilité plus importante face au risque de développer des troubles dépressifs (Claes, 2009). De plus, des études *post-mortem* chez des patients dépressifs ont mis en évidence une diminution de l'expression des GR au niveau de

l'hippocampe et du cortex frontal, mais également dans le PVN et l'hypophyse (Modell *et al.*, 1997 ; Webster *et al.*, 2002), ce qui pourrait contribuer à l'altération du rétrocontrôle négatif (Pariante et Lightman, 2008 ; Anacker *et al.*, 2011). Des souris *knock-out* dépourvues de GR dans tout ou partie du cerveau présentent une hyperactivité de l'axe du stress avec une augmentation des niveaux de CRH et de glucocorticoïdes, ainsi que des comportements dépressifs-*like*, ces altérations pouvant être contrecarrées par des antidépresseurs (Tronche *et al.*, 1999 ; Boyle *et al.*, 2005). Enfin, il a été envisagé de cibler les GR pour traiter la dépression en luttant contre l'hyperactivité de l'axe HPA (Pariante et Miller, 2001), grâce à des inhibiteurs de la synthèse des hormones corticostéroïdes tels que la métyrapone, l'aminoglutéthamide ou le kétoconazole (Reus *et al.*, 1997 ; Jahn *et al.*, 2004), ou grâce à des antagonistes des GR comme le mifepristone (Belanoff *et al.*, 2002 ; Flores *et al.*, 2006). Cependant, ces produits ne présentent pas une action spécifique sur le système nerveux central et leurs effets secondaires restent rédhibitoires pour envisager un usage clinique en cas de dépression (Holsboer et Barden, 1996 ; Wolkowitz et Reus, 1999).

La libération des glucocorticoïdes est un processus adaptatif clef lors d'un stress. Dans des conditions normales, la libération de ces hormones va permettre de rediriger les ressources énergétiques, attentionnelles et cognitives pour se soustraire à l'agent stressant ou à ses effets. Cependant, si le stress devient chronique et que l'individu ne peut faire face, le maintien à long terme ou l'intensité excessive de la réponse au stress peut s'avérer préjudiciable pour les structures cérébrales cibles. En effet, le stress chronique, qui est souvent utilisé dans la modélisation des états dépressifs, est capable de provoquer des atrophies neuronales au niveau du cortex préfrontal et de l'hippocampe (Bisagno *et al.*, 2000 ; Cook et Wellman, 2004 ; Radley *et al.*, 2004). Ces processus sont dépendants des glucocorticoïdes (Magarinos et McEwen, 1995b ; Sapolsky, 2003). Le stress et les glucocorticoïdes sont également capables d'affecter d'autres types cellulaires, comme les cellules gliales et endothéliales dans le cortex préfrontal (Alonso, 2000 ; Banasr *et al.*, 2007) et vont également inhiber la neurogenèse hippocampique (Cameron et Gould, 1994 ; Dranovsky et Hen, 2006) et perturber la plasticité synaptique en diminuant la potentialisation à long terme dans l'hippocampe (Kim et Diamond, 2002) et dans le cortex préfrontal (Jay *et al.*, 2004 ; Cerqueira *et al.*, 2007). A l'opposé de son action sur l'hippocampe et le cortex préfrontal, le stress et les glucocorticoïdes augmentent la plasticité synaptique et les fonctions neuronales de l'amygdale, en favorisant la croissance dendritique, la

connectivité synaptique et la potentialisation à long terme (Vyas *et al.*, 2002 ; Vyas *et al.*, 2003 ; Vyas *et al.*, 2006).

Les dérèglements profonds du fonctionnement de l'axe du stress pourraient donc être à l'origine d'un cercle vicieux qui pourrait précipiter et consolider les altérations neuropathologiques des troubles dépressifs. De plus, il permet de concevoir un mécanisme neurobiologique de la relation stress/diathèse : des variants alléliques sur certains gènes clefs pourraient rendre la cellule plus sensible à l'action des médiateurs du stress, favorisant les altérations neuroplastiques induites en cas d'excès de stimulation et rendant alors l'individu plus vulnérable qu'un autre au stress et par conséquent à l'apparition de troubles dépressifs. Dans ce cas, le stress pourrait être causal, mais il est envisageable qu'il soit également secondaire à l'humeur dépressive dans d'autres cas.

L'hyperactivité de l'axe HPA et l'affaiblissement de son rétrocontrôle négatif semblent donc être des altérations neuroendocriniennes clefs dans la dépression. Elles peuvent jouer un rôle important dans des symptômes comportementaux tels que l'élévation de l'anxiété, l'insomnie, les pertes d'appétit, de libido, et les carences cognitives qui sont caractéristiques du sous-type mélancolique de la dépression majeure (Gold et Chrousos, 2002). En revanche, sachant que les symptômes comportementaux de la dépression atypique (léthargie, fatigue, hypersomnie, augmentation de l'appétit, etc.) semblent être le reflet inverse de ceux de la forme mélancolique, il a été suggéré qu'un profil neuroendocrinien opposé (c'est-à-dire une hypoactivité pathologique des systèmes de stress) pouvait être à la base de ces différences (Gold *et al.*, 2002 ; Gold et Chrousos, 2002 ; Antonijevic, 2006). En effet, Chrousos et Gold ont initialement montré que la dépression atypique pouvait être sous-tendue par une activité réduite de l'axe HPA, de la sécrétion du CRF et de la fonction noradrénergique (Chrousos et Gold, 1992), ce qui fut confirmé par la suite (Geraciotti, Jr. *et al.*, 1997 ; Anisman *et al.*, 1999 ; Levitan *et al.*, 2002). Cependant, le manque de consensus clair sur les caractéristiques cliniques de la forme atypique peut être à l'origine de quelques discordances (Posternak et Zimmerman, 2002 ; Benazzi, 2003 ; Joyce *et al.*, 2004). Aux regards de ces différences de fonctionnement de l'axe du stress dans la dépression mélancolique et atypique, une hypercortisolémie n'est donc pas la seule anomalie possible dans la dépression majeure, soulignant davantage la grande hétérogénéité de cette affection.

1.3.3. Hypothèse de la neuroplasticité

D'une manière générale, la neuroplasticité désigne la capacité de réorganisation du système nerveux, entraînant une modification fonctionnelle de celui-ci. Cette réorganisation fait intervenir plusieurs processus comme la production de nouvelles cellules (neurones ou glie), le développement ou l'élimination de l'arborisation dendritique neuronale et de nouvelles connexions synaptiques, la facilitation ou l'inhibition des transmissions synaptiques pouvant produire une altération dans la réponse cellulaire. Ces modifications structurelles vont donc être le support d'une réorganisation de réseaux neuronaux et synaptiques permettant aux cellules cérébrales de s'adapter aux changements endogènes et exogènes à l'organisme. De fait, une altération de la plasticité neuronale, rendant le système nerveux incapable de répondre adéquatement au stress, pourrait contribuer à expliquer l'étiopathogenèse de la dépression. Cette altération de la neuroplasticité pourrait être le fruit de l'interaction d'une vulnérabilité génétique avec des facteurs environnementaux générateurs de stress, entraînant le développement de troubles dépressifs.

Dès lors, de nombreux travaux se sont penchés sur l'implication de la neuroplasticité dans la pathophysiologie et le traitement des troubles de l'humeur en venant étayer cette hypothèse (Jacobs *et al.*, 2000 ; Sapolsky, 2000 ; McEwen, 2001 ; Pittenger et Duman, 2008). Bien qu'il existe une certaine hétérogénéité dans les résultats de ces études, à l'image de celle qui existe dans la pathologie dépressive elle-même avec des différences en fonction de l'âge, du sexe, ou du type de dépression, il se dégage néanmoins un certain consensus concernant plusieurs régions cérébrales mises en cause. En effet, des études de neuroimagerie anatomique (telle que l'imagerie par résonance magnétique, IRM) et *post-mortem* ont notamment décrit chez des patients souffrant de dépression de nombreuses anomalies morphologiques, neuroanatomiques et cytoarchitecturales dans le cortex préfrontal, le cortex cingulaire, le striatum (Drevets *et al.*, 2008 ; Quidé *et al.*, 2011), et plus particulièrement dans l'hippocampe (Sheline *et al.*, 1996 ; Bremner *et al.*, 2000 ; Steffens *et al.*, 2000 ; Sheline *et al.*, 2003). Les données morphologiques concernant l'amygdale sont plus controversées, puisque des augmentations aussi bien que des diminutions de son volume ont été décrites chez des patients dépressifs (Drevets *et al.*, 2008). En outre, d'autres études ont montré que les antidépresseurs, administrés de manière chronique, contrecarrent certaines de ces altérations (Czeh *et al.*, 2001 ; Drevets *et al.*, 2002 ; Drevets, 2003 ; Sheline *et al.*, 2003 ; Neumeister *et al.*, 2005 ; Fales *et al.*, 2009).

Si de nombreux travaux viennent appuyer l'hypothèse d'une altération de la neuroplasticité dans la dépression, les mécanismes précis à l'origine de ces altérations restent flous, même si le stress semble être un facteur déterminant dans l'apparition d'un déficit de plasticité cellulaire. L'excès de stress ou de glucocorticoïdes va ainsi pouvoir engendrer l'atrophie ou la mort de certaines cellules, la diminution de l'arborisation dendritique et de la synaptogenèse, ainsi que la réduction du volume de l'hippocampe et des dysfonctionnements du cortex préfrontal chez les rongeurs et les primates non humains (Sapolsky, 2000 ; Sapolsky, 2003 ; Pittenger et Duman, 2008). Ces changements morphologiques et fonctionnels sont contrecarrés par l'administration chronique d'antidépresseurs (Malberg et Duman, 2003 ; Rocher *et al.*, 2004 ; Carlson *et al.*, 2006 ; Dupin *et al.*, 2006 ; Mailliet *et al.*, 2008).

A partir de la fin des années 90, la recherche sur les liens entre plasticité cérébrale et dépression a pris un nouvel essor, principalement grâce à la découverte de la neurogenèse hippocampique chez l'adulte. La notion de neuroplasticité s'est en effet considérablement enrichie ces dernières années, en particulier grâce à la remise en cause des travaux de Santiago Ramón y Cajal, réalisés au début du XX^e siècle, selon lesquels la formation des neurones, ou neurogenèse, s'effectuait uniquement au cours du développement embryonnaire chez les mammifères, le système nerveux adulte étant incapable de se régénérer. C'est plus d'un demi-siècle plus tard, au cours des années 60, que les travaux de Joseph Altman vinrent sensiblement ébrancher ce dogme avec la mise en évidence de l'apparition de nouvelles cellules dans le cortex cérébral, l'hippocampe et le bulbe olfactif chez le rat et le chat adulte (Altman, 1962 ; Altman, 1963 ; Altman et Das, 1966 ; Altman, 1969a ; Altman, 1969b), sans qu'il soit possible de déterminer avec certitude s'il s'agissait de neurones ou de cellules gliales. Néanmoins, ces découvertes ne suscitèrent que peu d'engouement dans la communauté scientifique, méfiante vis-à-vis des résultats, et préférant l'explication d'observations artéfactuelles. Il fallut attendre la fin des années 70 et le début des années 80 pour relancer l'intérêt des scientifiques pour la neurogenèse adulte avec les travaux de Michael Kaplan, Shirley Bayer et Fernando Nottebohm qui confirmèrent l'existence d'une neurogenèse adulte chez le rat et les oiseaux (Kaplan et Hinds, 1977 ; Bayer *et al.*, 1982 ; Bayer, 1982 ; Goldman et Nottebohm, 1983). Finalement, ce n'est qu'au cours des années 90 que la neurogenèse hippocampique adulte fut observée et confirmée chez les primates non humains et chez l'Homme (Reynolds et Weiss, 1992 ; Gage *et al.*, 1995 ; Kuhn *et al.*, 1996 ; Eriksson *et al.*, 1998 ; Gould *et al.*, 1999b).

La neurogenèse adulte est principalement circonscrite dans deux zones neurogéniques : la zone subventriculaire, qui borde les ventricules latéraux et point de départ de la migration des nouveaux neurones vers le bulbe olfactif, et la zone subgranulaire adjacente au gyrus denté, à l'origine des nouvelles cellules granulaires du gyrus denté de l'hippocampe (Ming et Song, 2005 ; Zhao *et al.*, 2008). Bien que certaines études aient suggéré l'apparition de nouveaux neurones dans le néocortex, le striatum, l'amygdale, la substance noire et l'hypothalamus, l'existence d'une neurogenèse adulte ailleurs que dans les zones subgranulaire et subventriculaire est sujette à controverses (Gould, 2007).

Les anomalies de l'hippocampe observées chez les patients dépressifs ont logiquement amené les chercheurs à s'intéresser tout particulièrement à l'implication de la neurogenèse hippocampique dans la dépression. Les premiers travaux ont montré que l'administration exogène de glucocorticoïdes entraînait une diminution de la prolifération cellulaire dans la zone subgranulaire (Cameron et Gould, 1994). Le niveau élevé de ces hormones en cas de stress excessif pourrait contribuer à réduire la taille de l'hippocampe et sous-tendre l'apparition des troubles dépressifs (MacQueen *et al.*, 2003). Plusieurs études ont aussi montré que le stress chronique diminue le volume de l'hippocampe chez les primates, les rongeurs et les toupailles communs (Czeh *et al.*, 2001 ; Coe *et al.*, 2003 ; Alonso *et al.*, 2004), mais induit également une réduction de l'arborisation dendritique, de la différenciation en nouveaux neurones et de la survie des néoneurones dans l'hippocampe (Sapolsky, 2003).

Un grand nombre de facteurs extracellulaires peuvent réguler la neurogenèse, en particulier les monoamines. En effet, de nombreux antidépresseurs monoaminergiques administrés de manière chronique, mais pas de manière aiguë, stimulent la prolifération cellulaire, la neurogenèse et la survie des nouveaux neurones dans l'hippocampe chez les rongeurs, les toupailles communs et les primates non humains (Perera *et al.*, 2007 ; Zhao *et al.*, 2008). D'autres études ont montré que la stimulation directe des systèmes sérotoninergique et noradrénergiques favorise la neurogenèse dans l'hippocampe (Banasr *et al.*, 2004 ; Banasr et Duman, 2007 ; Lucas *et al.*, 2007). De plus, la déplétion du récepteur 5-HT_{1A} empêche à la fois les effets neurogéniques et comportementaux d'un antidépresseur sérotoninergique (Santarelli *et al.*, 2003). De même, la prolifération cellulaire de l'hippocampe est diminuée par la déplétion du système noradrénergique, tandis que la stimulation de la libération de noradrénaline dans l'hippocampe permet l'accroissement du niveau de

neurogenèse hippocampique (Kulkarni *et al.*, 2002 ; Rizk *et al.*, 2006). Ces antidépresseurs monoaminergiques sont aussi capables de prévenir ou de contrecarrer la réduction de la neurogenèse hippocampique induite par le stress chronique (Surget *et al.*, 2008 ; Surget *et al.*, 2011).

Récemment, la possibilité de supprimer spécifiquement la neurogenèse hippocampique a permis de mieux comprendre le rôle de ces nouveaux neurones dans le cadre de la dépression. De manière remarquable, la suppression spécifique de la neurogenèse hippocampique par irradiation chez des souris adultes empêche l'action bénéfique d'antidépresseurs sérotoninergiques et noradrénergiques dans un modèle de dépression (Santarelli *et al.*, 2003), sans que cette suppression n'induisse de symptômes dépressifs. D'autres travaux sont venus corroborer le lien entre neurogenèse et effets antidépresseurs (Alonso *et al.*, 2004 ; Jiang *et al.*, 2005 ; Airan *et al.*, 2007 ; Surget *et al.*, 2008), alors que certaines études ont apporté quelques nuances en démontrant que la dépendance des effets des antidépresseurs pour les nouveaux neurones pouvait être influencée par les conditions d'élevage, le patrimoine génétique et les paradigmes utilisés pour modéliser la dépression (Meshi *et al.*, 2006 ; Holick *et al.*, 2008 ; Huang *et al.*, 2008 ; Miller *et al.*, 2008). Très récemment, une étude a mise en évidence que la neurogenèse hippocampique était indispensable pour qu'un antidépresseur sérotoninergique puisse rétablir la régulation qu'exerce l'hippocampe sur l'axe HPA, démontrant ainsi que les nouveaux neurones du gyrus denté vont permettre aux antidépresseurs monoaminergiques de contrecarrer les dysfonctionnements de l'axe du stress (Surget *et al.*, 2011). Toutes ces études semblent indiquer que la diminution de la neurogenèse hippocampique participerait à rendre les individus vulnérables dans un contexte dépressogène, sans pour autant être une cause de la dépression majeure, puisque qu'elle ne semble pas induire de comportements dépressifs en tant que tel (Henn et Vollmayr, 2004), bien que ceci ait été récemment remis en cause (Snyder *et al.*, 2011).

D'autres systèmes de neurotransmission sont également impliqués dans la stimulation de la neurogenèse, comme l'acétylcholine (Cooper-Kuhn *et al.*, 2004), le neuropeptide Y (Howell *et al.*, 2005), et la dopamine (Borta et Hoglinger, 2007). De plus, des molécules ayant des propriétés antidépressives mais sans action directe sur la neurotransmission sérotoninergique ou noradrénergique comme le lithium, un stabilisateur d'humeur utilisé chez des patients souffrant de troubles bipolaires, et l'olanzapine, un antipsychotique atypique, stimulent également la neurogenèse hippocampique (Manji *et al.*, 2000 ;

Kodama *et al.*, 2004), alors que les psychotropes dénués de propriétés antidépressives comme l'halopéridol ou les benzodiazépines en sont incapables (Malberg *et al.*, 2000 ; Santarelli *et al.*, 2003 ; Kodama *et al.*, 2004 ; Nixon et Crews, 2004).

Il existe de nombreux autres facteurs qui peuvent également réguler la neurogenèse hippocampique, comme l'environnement enrichi, l'exercice physique ou les tâches cognitives (van Praag *et al.*, 1999 ; Gould *et al.*, 1999a ; Tashiro *et al.*, 2007), de même que les facteurs neurotrophiques tel que le BDNF (Lee et Son, 2009). Ce dernier joue notamment un rôle majeur dans la croissance axonale, la survie neuronale et la plasticité synaptique (Heldt *et al.*, 2007 ; Schmidt et Duman, 2007), et est affecté par le stress (Angelucci *et al.*, 2005 ; Kozlovsky *et al.*, 2007). Des études cliniques et précliniques ont montré que la dépression majeure et les états dépressif-like étaient associés à un déficit de BDNF dans l'hippocampe (Karege *et al.*, 2005 ; Tsankova *et al.*, 2006 ; Frodl *et al.*, 2007), et que les traitements antidépresseurs ou la sismothérapie augmentait le taux de BDNF (Chen *et al.*, 2001 ; Karege *et al.*, 2005). De plus, l'injection de BDNF directement dans l'hippocampe a des effets antidépresseurs-like chez le rat (Shirayama *et al.*, 2002). Cependant, il semblerait qu'une réduction du taux de BDNF ne soit pas propre à la dépression majeure et puisse être retrouvée dans d'autres troubles psychiatriques (Angelucci *et al.*, 2005). De plus, des souris possédant moins de BDNF ne présentent pas de comportement spécifiquement dépressifs-like et ne sont pas plus sensibles aux effets du stress chronique que des souris sauvages (Lyons *et al.*, 1999 ; Ibarguen-Vargas *et al.*, 2009).

Finalement, ces études sur les effets du stress et des antidépresseurs sur la neuroplasticité en général, et sur la neurogenèse hippocampique en particulier, ont renforcé l'hypothèse cellulaire et moléculaire de la dépression. L'intégration de ces nouvelles données dans le modèle étiologique multifactoriel du trouble dépressif permet de mieux en appréhender l'origine, donnant un sens à l'interaction de prédispositions génétiques (déficit de protéines ou de médiateurs des voies de signalisation contribuant à la plasticité) associée et/ou contribuant à une vulnérabilité accrue (excès de stress et dérégulation de ses médiateurs moléculaires) face à des facteurs environnementaux stressants. Les effets de chacun de ces facteurs pourraient être cumulatifs, les conséquences plastiques d'un événement de la vie tel qu'une expérience aversive s'ajoutant aux précédentes jusqu'à perturber le bon fonctionnement des structures corticolimbiques et induire un état dépressif.

1.3.4. Autres hypothèses neurobiologiques

De nombreuses autres hypothèses neurobiologiques existent pour tenter d'expliquer tout ou partie de l'étiologie de la dépression majeure. Beaucoup de ces mécanismes sont d'ailleurs impliqués dans d'autres maladies psychiatriques ou neurologiques. Etant donné l'extrême interconnectivité du système nerveux central et la diversité symptomatologique du trouble dépressif, il n'est pas étonnant de pouvoir trouver d'autres facteurs étiopathogéniques, résumés dans le tableau ci-dessous, qui pourraient expliquer les multiples altérations physiologiques et comportementales de la dépression (Tableau 2).

Tableau 2. Autres théories biologiques de la dépression majeure. Modifié d'après Belmaker et Agam (2008).

Théories	Pour	Contre
Altération de la neurotransmission glutaminergique	• Les niveaux de glutamate et de glutamine sont réduits dans le cortex préfrontal • L'injection de kétamine, un antagoniste NMDA, induit un effet antidépresseur rapide et soutenu • Les niveaux corticaux d'ARNm du transporteur du glutamate et de l'enzyme qui transforme le glutamate en glutamine est réduit	• Les niveaux de glutamate dans le cortex occipital est augmenté • La kétamine possède une grande affinité pour le récepteur D2 de la dopamine • L'effet des antidépresseurs sur les récepteurs AMPA reste hypothétique
Réduction de la neurotransmission GABAergique	• Les niveaux de GABA dans le plasma, le LCR, et dans le cortex cérébral sont réduits • Les agonistes GABAergiques ont des effets dans les modèles animaux de dépression • Les antidépresseurs affectent la fonction GABAergique • L'immunoréactivité des neurones GABA est réduit dans le cortex préfrontal	• Le GABA est présent dans plus de 30 % des synapses, ce qui suggère une non spécificité • Il n'y a pas de différences dans les niveaux de GABA du cortex préfrontal • La neurotransmission GABAergique pourrait être reliée aux symptômes de l'anxiété dans la dépression
Déficiences dans la synthèse de neurostéroïdes	• Les niveaux de cholestérol sont bas dans le plasma et dans le cerveau durant la dépression • La DHEA a des effets antidépresseurs chez les patients dépressifs	• Les données concernant la schizophrénie sont similaires • Les neurostéroïdes affectent principalement la mémoire et le sommeil
Déséquilibre monoamine/acétylcholine	• L'humeur dépressive peut être induit chez l'Homme par l'administration d'un inhibiteur d'acétylcholinestérase • Les antagonistes des récepteurs cholinergiques nicotiniques potentialisent les antidépresseurs	• La mécamylamine, un antagoniste des récepteurs cholinergiques nicotiniques, réduit les symptômes de la dépression • Beaucoup d'antidépresseurs ne sont pas anticholinergiques
Perturbation des cytokines	• La dépression est fréquente dans les maladies infectieuses et auto-immunes • L'exposition à des cytokines induit des symptômes dépressifs, et la libération des cytokines augmente dans la dépression • Les antidépresseurs ont des effets anti-inflammatoires • Les cytokines affectent l'axe HPA et les monoamines	• La plupart des études sont corrélatives • Les symptômes de la dépression induits par les cytokines sont temporaires et ne sont pas répliqués dans toutes les études • Les antagonistes de la substance P sont peu efficaces dans la dépression
Perturbation de la thyroxine	• Les niveaux de transthyrétine sont réduits dans le LCR des patients dépressifs • Les hormones thyroïdiennes modulent le système sérotoninergique dans le cerveau • La neurogenèse est diminuée après l'administration de thyroxine chez les rats adultes avec hypothyroïdisme	• La thyroxine est inefficace dans la dépression • L'hypothyroïdisme n'est pas manifeste chez la plupart des patients dépressifs

1.4. Altérations physiologiques et comportementales associées à la dépression

Les perturbations neurobiologiques liées à la neurotransmission monoaminergique, à la dérégulation de l'axe du stress et aux troubles de la neuroplasticité vont engendrer de nombreux dysfonctionnements physiologiques dans différentes régions cérébrales. De fait, beaucoup de régions dans lesquelles des anomalies structurelles ont été observées présentent également des anomalies fonctionnelles, dont l'étude est rendu possible grâce à des outils comme la tomographie par émission de positons (TEP) ou l'IRM fonctionnelle (IRMf). On retrouve généralement chez les patients dépressifs une diminution de l'activité des aires du cortex préfrontal impliquées dans les fonctions exécutives comme la mémoire de travail, et au contraire une augmentation de l'activité des zones associées aux ruminations mentales et aux émotions négatives, à savoir certaines sous-parties du cortex préfrontal, le cortex cingulaire, le thalamus et l'amygdale (Drevets *et al.*, 2008 ; Quidé *et al.*, 2011). Certaines de ces altérations fonctionnelles peuvent être améliorées après un traitement antidépresseur ou une sismothérapie (Drevets *et al.*, 2002 ; Mayberg *et al.*, 2005).

La convergence de toutes ces données a permis, grâce aux méta-analyses et aux modèles de réseaux, de mettre en évidence des circuits corticolimbiques impliqués dans la régulation et l'étiopathogenèse des troubles dépressifs, en particulier le circuit limbique-cortical-striatal-pallidal-thalamique (Drevets *et al.*, 2008). Ce circuit a des connexions avec le cortex préfrontal, le cortex cingulaire, le cortex orbitofrontal, l'hippocampe, le striatum ventral, le thalamus antérieur et médiodorsal, et l'amygdale. Ce circuit possède également des connexions avec des aires sensibles et des structures de contrôle viscéral comme l'hypothalamus et la substance grise périaqueducale (Drevets *et al.*, 2008 ; Quidé *et al.*, 2011). Le dysfonctionnement de ces réseaux neuronaux lié à des déficits neuroanatomiques et neurochimiques sont à l'origine de nombreuses altérations.

1.4.1. Altérations du traitement de l'information

Les troubles cognitifs et neuropsychologiques sont une des caractéristiques de la dépression majeure et font partie des symptômes les plus communément observés, constituant un critère diagnostique à part entière (DSM). Les perturbations de l'attention, de la concentration, de la mémoire, de la perception et de la prise de décision

sont souvent source d'inadaptation pour le patient dépressif, alimentant ainsi son sentiment d'autodépréciation. Néanmoins, les nombreux travaux qui se sont penchés sur les symptômes cognitifs des troubles de l'humeur rapportent souvent des résultats peu clairs, voire contradictoires. Certaines études ont fait état d'un large spectre de déficits cognitifs comme des troubles du traitement rapide de l'information, de l'attention, de la mémoire et des fonctions exécutives (Landrø *et al.*, 2001 ; MacQueen *et al.*, 2002 ; Tsourtos *et al.*, 2002 ; Stordal *et al.*, 2004 ; Rose et Ebmeier, 2006), alors que d'autres non (Channon *et al.*, 1993 ; Purcell *et al.*, 1997 ; Grant *et al.*, 2001). Plusieurs facteurs peuvent contribuer à expliquer ces divergences dans les résultats, en particulier l'hétérogénéité clinique de la dépression, les différences de traitements (la plupart des patients sont sous médication durant leur participation), ou les batteries de tests cognitifs couramment utilisées en neuropsychologie qui ne sont pas toujours adaptées à ce type de pathologie. Malgré tout, la présence de troubles cognitifs dans la dépression majeure fait consensus. Ces déficits sont d'ailleurs souvent résiduels chez les sujets sains ayant souffert de dépression, ce qui démontre que certains traits cognitifs seraient présents indépendamment de l'état dépressif (Tham *et al.*, 1997).

Ce qui échappe en revanche à la controverse, ce sont les perturbations du traitement de l'information émotionnelle chez les dépressifs, qui se caractérisent notamment par des biais de traitements de l'information à valence négative comparée à un stimulus à valence positive ou neutre (Murphy *et al.*, 1999 ; Murray *et al.*, 1999 ; Elliott *et al.*, 2000). En effet, dans les études de mémoire, les patients dépressifs se souviennent plus facilement des informations connotées négativement comparées aux informations connotées positivement (Bradley *et al.*, 1995 ; Murray *et al.*, 1999). Les processus attentionnels des dépressifs sont également davantage perturbés par des stimuli à valence négative qui leur rappellent leur maladie (Broomfield *et al.*, 2007). Les patients dépressifs traités (Murphy *et al.*, 1999) et non traités (Erickson *et al.*, 2005) vont répondre plus vite lorsqu'il s'agit de mots cibles tristes comparés à des mots joyeux, soulignant que l'information connotée négativement va être traitée plus rapidement. De plus, les patients dépressifs traités sont plus négatifs dans leur interprétation de mots dont le sens est ambigu (Mogg *et al.*, 2006) ou de situations ambiguës (Nunn *et al.*, 1997) par rapport à des sujets sains. Les patients souffrant de dépression vont par exemple avoir tendance à porter leur attention sur des visages tristes par rapport à des visages neutres ou exprimant une émotion positive (Gotlib *et al.*, 2004a ; Gotlib *et al.*, 2004b). Lors de ce type de tâche, on observe également une augmentation de l'activité de l'amygdale chez les dépressifs lorsqu'ils observent des visages tristes

ou effrayants (Drevets, 2001 ; Sheline *et al.*, 2001 ; Fu *et al.*, 2004). Cette augmentation de l'activité de l'amygdale est aussi observée chez des sujets sains mais ayant connu un ou plusieurs épisodes de dépression, suggérant qu'il s'agirait d'un marqueur de trait plutôt qu'un marqueur d'état des dépressifs (Neumeister *et al.*, 2006a). Dans une autre étude, lors de la présentation de visages à intensité croissante d'expressions faciales, une augmentation graduelle de l'activité bilatérale du cortex visuel fusiforme et du striatum ventral fut observée chez les sujets sains pour les visages joyeux, tandis que les patients dépressifs présentaient le même pattern d'activation mais pour les visages tristes (Surguladze *et al.*, 2005).

Tous ces travaux suggèrent l'existence d'un biais de traitement de l'information chez les patients dépressifs, qui pourrait faciliter la représentation mentale des stimuli à valence négative. Les données de neuroimagerie nous indiquent que les réponses physiologiques au sein des circuits neuronaux sous-tendant le traitement de l'information liée aux émotions sont perturbées, et que ces réponses altérées pourraient représenter les corrélats neurophysiologiques des biais de traitement des émotions observés dans la dépression majeure.

1.4.2. Altérations du sommeil

Chez les mammifères, le sommeil est composé de cycles durant lesquels deux types de sommeil distincts coexistent, le sommeil à ondes lentes et le sommeil paradoxal, le sommeil à ondes lentes étant subdivisé chez les primates et les chats en quatre phases. La période d'endormissement (phase 1) fait place au sommeil léger (phase 2), puis au sommeil moyennement profond (phase 3) pour aboutir au sommeil profond (phase 4). Ces quatre phases de sommeil à ondes lentes, correspondant au sommeil profond durant lequel l'activité électroencéphalographique ralentit, vont ensuite laisser place au sommeil paradoxal (la phase durant laquelle on rêve), appelé ainsi par Michel Jouvet en 1959 car l'électroencéphalogramme à ce moment ressemble à celui d'un état vigile. Une nuit est composée de plusieurs cycles d'environ 90 minutes chacun. Les raisons de l'organisation fonctionnelle de ces cycles restent inconnues (Walker, 2009).

A mesure que le système nerveux central passe d'un stade du sommeil à un autre, d'importants changements neurochimiques accompagnent cette progression (Saper *et al.*, 2001). Durant le sommeil à ondes lentes, le système cholinergique du tronc cérébral et du prosencéphale basal est très peu actif (Hobson *et al.*, 1975), à l'image de l'activité des neurones sérotoninergiques des noyaux du raphé et des neurones

noradrénergiques du locus coeruleus (Aston-Jones et Bloom, 1981 ; Shima *et al.*, 1986). Durant le sommeil paradoxal, ces deux dernières populations de neurones monoaminergiques sont très fortement inhibées alors que le système cholinergique redevient actif (Kametani et Kawamura, 1990 ; Marrosu *et al.*, 1995), aboutissant à un état cérébral largement dépourvu de modulation aminergique et dominé par l'acétylcholine. La transition entre sommeil lent et paradoxal s'accompagne également de nombreux changements dans de multiples régions cérébrales comme le tronc cérébral, le thalamus, le cortex préfrontal, les ganglions de la base, le lobe temporal et occipital, et l'amygdale (Nofzinger, 2005).

La dépression majeure a depuis longtemps été associée à des altérations du sommeil qui constituent un des critères diagnostiques de la maladie (Kupfer, 1976). Près de 90 % des patients dépressifs souffrent de troubles du sommeil, principalement des insomnies (bien qu'il soit aussi possible d'observer des hypersomnies), caractérisées par des difficultés à s'endormir, de fréquents réveils durant la nuit, et un sommeil non réparateur (Gillin *et al.*, 1979 ; Berger *et al.*, 1982 ; Kupfer *et al.*, 1985 ; Waller *et al.*, 1989). De plus, les patients dépressifs souffrent particulièrement de perturbations du sommeil paradoxal, avec une réduction de la latence d'apparition et une augmentation de la durée du premier épisode de sommeil paradoxal, ainsi qu'une augmentation générale de la densité de ce sommeil au cours de la nuit conjointement à une diminution du sommeil lent (Benca *et al.*, 1992 ; Tsuno *et al.*, 2005 ; Armitage, 2007 ; Gottesmann et Gottesman, 2007). L'incapacité à initier et à maintenir le sommeil s'avère être un important facteur de risque pour une rechute en cas de dépression chronique, en même temps qu'il augmente le risque de développer un premier épisode dépressif (Harvey, 2001 ; Perlis *et al.*, 2006 ; Ohayon, 2007). Au contraire, l'amélioration de l'architecture du sommeil s'accompagne d'une réduction du risque de rechute lors d'épisodes dépressifs récurrents (Ohayon, 2007). Des altérations du sommeil sont aussi retrouvées dans plusieurs modèles animaux de dépression, notamment une diminution de la latence de sommeil paradoxal qui est observée chez des animaux soumis à un paradigme de résignation acquise (Adrien *et al.*, 1991), à l'injection néonatale de clomipramine (Vogel *et al.*, 1990c), à des stress prénataux (Dugovic *et al.*, 1999) et à un stress chronique (Cheeta *et al.*, 1997 ; Grønli *et al.*, 2004). Ces résultats démontrent l'importance que revêtent les altérations du sommeil dans la dépression. En plus d'aggraver l'humeur des patients, ces altérations peuvent perturber les processus cognitifs liés au traitement des émotions, participant à l'apparition et à la maintenance des symptômes de la dépression (Walker et van der Helm, 2009).

Ces perturbations du sommeil observées chez les patients dépressifs, en plus du fait que la plupart des antidépresseurs et des psychothérapies diminuent la densité de sommeil paradoxal (Vogel *et al.*, 1990a ; Nofzinger *et al.*, 1994 ; Buysse *et al.*, 1997 ; Winokur *et al.*, 2001), ont été à l'origine de la théorie selon laquelle la pression du sommeil paradoxal est augmentée chez les patients dépressifs. La régulation du sommeil paradoxal au niveau pontin dépend en effet de la balance entre le système sérotoninergique et cholinergique (Adrien, 2002). Puisque la dépression est schématiquement associée à une augmentation de la neurotransmission cholinergique et une diminution de la neurotransmission sérotoninergique (Chau *et al.*, 2011), certains auteurs ont proposé que ce déséquilibre puisse être responsable de la désinhibition du sommeil paradoxal chez les patients dépressifs (Figure 3). Même si les mécanismes neurophysiologiques à l'origine des perturbations du sommeil associées à la dépression est sûrement plus complexe (Lauriello *et al.*, 1993 ; Seifritz *et al.*, 1998), l'augmentation de la pression du sommeil paradoxal chez les patients dépressifs pourrait représenter une autre manifestation du déséquilibre de la neurotransmission monoaminergique.

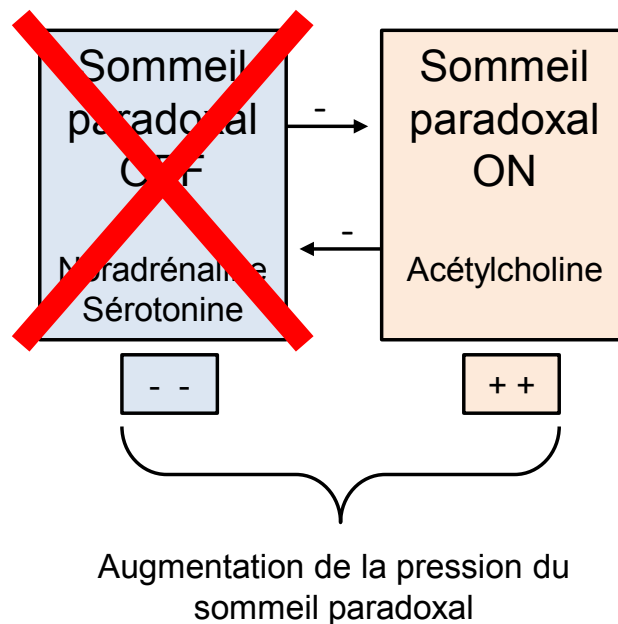


Figure 3. Représentation schématique de la régulation du sommeil paradoxal au niveau pontin. L'apparition du sommeil paradoxal dépend de deux systèmes de neurotransmission antagoniste : le système cholinergique (promoteur de sommeil paradoxal) et le système monoaminergique (inhibiteur de sommeil paradoxal). Chez les patients dépressifs, la diminution de la sérotonine et de la noradrénaline, en même temps que l'augmentation de la neurotransmission cholinergique, induit une augmentation de la pression du sommeil paradoxal. Modifiée d'après Adrien *et al.*, 2002.

Etrangement, certains auteurs ont remarqué que la privation de sommeil pouvait avoir des effets antidépresseurs (Pflug et Tolle, 1971). Une privation de sommeil d'une nuit permet d'améliorer l'humeur chez 60 % des patients dépressifs, alors que 90 % des patients voient leur humeur s'améliorer après trois nuits consécutives de privation de sommeil (Wu et Bunney, 1990 ; Wirz-Justice et Van Den Hoofdakker, 1999). Ces effets bénéfiques restent cependant transitoires (Southmayd *et al.*, 1990). En revanche, une privation sélective de sommeil paradoxal durant plusieurs nuits consécutives induit un effet antidépresseur graduel mais soutenu chez la moitié des patients dépressifs (Vogel *et al.*, 1980). De plus, des effets antidépresseurs-*like* suite à une privation de sommeil ont aussi été mis en évidence chez le rat (Maudhuit *et al.*, 1996a ; Adrien, 2002). Ces effets bénéfiques des privations de sommeil pourraient en partie s'expliquer par l'augmentation de la neurotransmission sérotoninergique. En effet, chez le rat, des privations de sommeil paradoxal durant un jour ou des privations totales de sommeil durant quatre jours induisent une désensibilisation de l'autorécepteur somatodendritique 5-HT_{1A} (qui inhibe la libération de sérotonine) dans les neurones du noyau du raphé (Prévot *et al.*, 1996 ; Maudhuit *et al.*, 1996a ; Maudhuit *et al.*, 1996b), et cette désensibilisation disparaît après quatre jours de recouvrement de sommeil (Prévot *et al.*, 1996). Au-delà des multiples changements sur divers systèmes de neurotransmission, il semble donc que les privations de sommeil pourraient induire, au niveau sérotoninergique, les mêmes changements adaptatifs que ceux décrits après un traitement chronique aux antidépresseurs, au moins concernant les récepteurs 5-HT_{1A} (Jolas *et al.*, 1994 ; Maudhuit *et al.*, 1996a). De fait, les privations de sommeil augmentent l'efficacité des antidépresseurs, notamment chez des patients résistants aux traitements classiques (Leibenluft et Wehr, 1992 ; Benedetti *et al.*, 1997). Cet effet potentialisateur est d'ailleurs observé lorsque les privations de sommeil sont associées à un antagoniste 5-HT_{1A} (Smeraldi *et al.*, 1999), mais pas avec un agoniste dopaminergique (Benedetti *et al.*, 1996).

1.4.3. Altérations du circuit de récompense

A l'instar des perturbations du sommeil, l'anhédonie est un des symptômes majeurs de la dépression (DSM), puisqu'environ 37 % des individus dépressifs font l'expérience clinique d'une anhédonie (Pelizza et Ferrari, 2009). Celle-ci est particulièrement difficile à traiter, et beaucoup d'études montrent que les antidépresseurs actuels, tels que les IRSS, sont peu efficaces pour soulager les troubles anhédoniques (Treadway et Zald, 2011), qui sont d'ailleurs souvent prédictors d'une

faible réponse aux antidépresseurs (Spijker *et al.*, 2001). L'hypothèse selon laquelle l'anhédonie serait liée à un déficit en dopamine qui régulerait les expériences de plaisir en présence de stimuli agréables a poussé certains auteurs à proposer une théorie dopaminergique de la dépression pour expliquer les troubles anhédoniques qui lui sont souvent associés (Willner, 1983a ; Willner, 1983b ; Willner, 1983c). Des études précliniques et cliniques ont d'ailleurs montré que la neurotransmission dopaminergique était altérée dans des modèles animaux de dépression, et au moins dans une sous-population de patients dépressifs (Dunlop et Nemeroff, 2007 ; Yadid et Friedman, 2008). Mais depuis quelques années, cette hypothèse dopaminergique expliquant en totalité l'anhédonie dans les troubles dépressifs a été abandonnée (Berridge et Robinson, 2003 ; Salamone *et al.*, 2007).

Des auteurs ont donc proposé une redéfinition de l'anhédonie dans le cadre de la dépression, en proposant une distinction entre l'anhédonie consummatoire, qui pourrait être définie comme l'absence de réponse hédonique face aux stimuli agréables, et l'anhédonie anticipatoire ou motivationnelle, qui serait la diminution de la motivation à rechercher ce stimulus agréable (Treadway et Zald, 2011). Cette distinction fait écho aux travaux chez l'animal démontrant que le système de récompense pourrait être sous-tendu par le « *liking* » qui correspond au plaisir ressenti au cours de la consommation d'un stimulus, et le « *wanting* » qui se réfère à l'intérêt de l'animal envers un stimulus qui exerce sur lui une attraction ainsi qu'aux processus liés à l'initiation du comportement dirigé vers ce stimulus (Berridge et Robinson, 1998 ; Berridge et Robinson, 2003). Selon ces auteurs, le système dopaminergique sous-tendrait tout particulièrement la dimension du « *wanting* », en jouant un rôle dans la motivation à obtenir une récompense et non pas dans les aspects hédoniques liés à la récompense (Berridge et Robinson, 1998 ; Salamone *et al.*, 2007). Situés dans la *pars compacta* de la substance noire et dans l'aire tegmentale ventrale, les neurones dopaminergiques sont au cœur du système de récompense et projettent largement vers le noyau caudé dorsal, le putamen, le striatum ventral (incluant le noyau accumbens), l'amygdale, l'hippocampe, et les régions corticales (Treadway et Zald, 2011). En revanche, les expériences de plaisir hédoniques seraient liées aux opioïdes endogènes comme les endorphines, les enképhalines, ou les dynorphines qui vont jouer un rôle dans les expériences subjectives d'euphorie et de plaisir (Treadway et Zald, 2011). Les récepteurs opioïdiques sont très exprimés dans le striatum ventral, particulièrement dans le noyau accumbens (Pecina et Berridge, 2005). La stimulation de ces récepteurs sous-tend la réponse hédonique aux récompenses naturelles comme la nourriture (Pecina *et al.*, 2006). Au-

delà du striatum ventral, d'autres régions font également partie du système du « liking », à savoir le pallidum ventral, le cortex orbitofrontal et le cortex cingulaire antérieur (Berridge et Kringelbach, 2008 ; Rushworth et Behrens, 2008 ; Smith *et al.*, 2009b). Chez l'Homme, les récepteurs μ -opioïdes dans le striatum et le cortex préfrontal sont très liés aux réponses affectives et aux effets subjectifs des psychostimulants (Zubieta *et al.*, 2001 ; Liberzon *et al.*, 2002 ; Jayaram-Lindstrom *et al.*, 2004 ; Zubieta *et al.*, 2005).

Même si le système dopaminergique n'a reçu que peu d'attention des chercheurs travaillant sur la dépression comparativement aux travaux sur la sérotonine et la noradrénaline, plusieurs études ont mis en évidence un déficit en dopamine dans le trouble dépressif, conforté par la forte comorbidité entre la maladie de Parkinson et la dépression (Koerts *et al.*, 2007). Premièrement, les patients dépressifs présentent une diminution du niveau d'acide homovanillique, le principal métabolite de la dopamine (Willner, 1983a ; Lambert *et al.*, 2000). De plus, le blocage du système dopaminergique peut induire ou précipiter les symptômes dépressifs chez des patients souffrant de dépression ou en phase de rémission (Bremner *et al.*, 2003 ; Ruhé *et al.*, 2007 ; Hasler *et al.*, 2008), alors que l'augmentation de la neurotransmission dopaminergique engendre des effets antidépresseurs chez des patients résistants aux autres traitements (Cassano *et al.*, 2005 ; Mihara *et al.*, 2010). Ensuite, un grand nombre de travaux en neuroimagerie chez des patients dépressifs ont souligné des perturbations structurelles dans les zones impliquées dans le circuit de la récompense et riche en dopamine, comme le striatum ventral (Kim *et al.*, 2008 ; Matsuo *et al.*, 2008 ; Pizzagalli *et al.*, 2009 ; Wacker *et al.*, 2009). De plus, une diminution de L-DOPA (le précurseur de la dopamine) a été mise en évidence dans le striatum de patients dépressifs qui souffraient d'athymie et de ralentissements psychomoteurs (Martinot *et al.*, 2001 ; Bragulat *et al.*, 2007). De même, l'activité du transporteur de la dopamine dans le striatum est diminuée chez des patients dépressifs anhédoniques (Sarchiapone *et al.*, 2006). En neuroimagerie fonctionnelle, une diminution de l'activité du striatum ventral et du noyau accumbens a pu être observée chez des patients dépressifs au moment de recevoir une récompense (McCabe *et al.*, 2009 ; Pizzagalli *et al.*, 2009 ; Smoski *et al.*, 2009 ; Wacker *et al.*, 2009 ; McCabe *et al.*, 2010) ou à l'anticipation de la récompense (Forbes, 2009 ; Smoski *et al.*, 2009). Chez l'animal, les rats Flinders Sensitive Line, considérés comme un modèle génétique de dépression, présentent un faible taux basal de dopamine et une diminution de la neurotransmission dopaminergique dans le noyau accumbens (Zangen *et al.*, 2001). D'autre part, les agonistes du récepteur D2 à la dopamine ont des effets antidépresseurs (Gershon *et*

al., 2007). Enfin, des études génétiques ont identifié plusieurs polymorphismes reliés aux fonctions dopaminergiques qui augmentent le risque de développer un épisode dépressif, en particulier des variations alléliques du gène DRD4 et du récepteur D3 (Dikeos *et al.*, 1999 ; Chiaroni *et al.*, 2000 ; López León *et al.*, 2005). Il semble donc clair que la dépression peut être associée à des altérations des fonctions dopaminergiques, dont le rétablissement peut engendrer des effets antidépresseurs. Le déficit en dopamine observé chez les dépressifs pourrait donc participer à expliquer l'anhédonie anticipatoire.

Les premières études sur les liens entre un déficit du système opioïdérique et les troubles hédoniques associés à la dépression datent du début des années 80. Deux études observèrent une rémission temporaire des symptômes chez des patients dépressifs après l'injection d'un agoniste opioïdérique (Pickar *et al.*, 1981 ; Catlin *et al.*, 1982). Mais depuis lors, les études cliniques ont été largement équivoques, sans véritablement conclure sur le rôle précis des opioïdes dans la dépression (Hegadoren *et al.*, 2009), bien que d'autres études précliniques aient démontré des effets antidépresseurs-*like* par des agonistes opioïdériques (Saitoh *et al.*, 2008).

Bien que les mécanismes neurobiologiques sous-jacents aux troubles anhédoniques dans la dépression restent méconnus, ces travaux illustrent l'existence d'une nette détérioration de la neurotransmission dopaminergique chez nombre de patients dépressifs au sein des structures clefs du système de récompense. Même si les circuits neuronaux impliquant les opioïdes endogènes dans la dépression ont reçu moins d'attention de la part des scientifiques, les données vont dans le sens d'une distinction entre l'anhédonie motivationnelle et l'anhédonie consommatoire (Treadway et Zald, 2011). De plus, ces mêmes auteurs ont suggéré l'existence d'une anhédonie décisionnelle, indépendante des déficits cognitifs observés chez les patients dépressifs. La diminution de la neurotransmission dopaminergique et opioïdérique, mais également sérotoninergique (Kranz *et al.*, 2010), pourrait donc sous-tendre un large spectre d'altérations hédoniques, comme en témoigne l'anhédonie olfactive observée chez les patients dépressifs et récemment mise en évidence par des chercheurs de notre laboratoire (Atanasova *et al.*, 2010).

1.5. Les traitements des troubles dépressifs

Les premiers véritables traitements des troubles affectifs datent du début des années 50, avec l'introduction de l'imipramine et de l'iproniazide. Avant cela, les outils thérapeutiques employés pour traiter les troubles de l'humeur étaient relativement rudimentaires. À la fin du XIX^e et début du XX^e siècle, les agents utilisés étaient aussi divers que l'hydrate de chloral, les barbituriques, le bromure, les amphétamines, mais également les dérivés opiacés. Durant la première moitié du XX^e siècle, outre les traitements comme l'électroconvulsivothérapie ou les « cures de sommeil », aucun traitement spécifique satisfaisant n'était disponible.

1.5.1. Les inhibiteurs de monoamines oxydase

L'origine des premières molécules que l'on peut spécifiquement qualifier d'antidépresseurs, les inhibiteurs de la monoamine oxydase, réside dans la découverte fortuite des effets psychostimulants des dérivés hydraziniques, comme l'iproniazide ou l'isoniazide, substances antituberculeuses utilisées depuis le début des années 50. En 1952, on observa que des patients tuberculeux traités avec de l'iproniazide présentaient divers changements comme une plus grande vitalité, un accroissement de leurs activités sociales, et une amélioration de l'humeur, et que l'iproniazide (et non l'isoniazide) était capable d'inhiber la monoamine oxydase (l'enzyme intervenant dans le catabolisme des monoamines) (López-Muñoz *et al.*, 2007). À partir de ces premières observations, d'autres études commencèrent à décrire l'effet bénéfique de l'isoniazide sur l'humeur chez des patients psychiatriques (Delay *et al.*, 1952 ; Salzer et Lurie, 1953). C'est finalement en 1957 que les premiers effets de l'iproniazide sur des patients dépressifs furent présentés lors du congrès de l'*American Psychiatric Association* (APA) à Syracuse. Même si cet agent était beaucoup moins utilisé que l'isoniazide pour traiter la tuberculose (car jugé moins efficace), plusieurs études rapportèrent que l'iproniazide avait amélioré l'humeur de patient tuberculeux souffrant également de dépression (Ayd, 1957 ; Crane, 1957), et même de patients seulement dépressifs (Loomer *et al.*, 1957). Un an après le congrès de l'APA, et même si l'iproniazide était seulement commercialisée en tant qu'antituberculeux sous le nom de Marsilid, plus de 400 000 patients atteints de dépression furent traités avec ce médicament. Par la suite, d'autres substances permettant d'inhiber la MAO furent synthétisées (Maass et Nimmo, 1959 ; Freyhan, 1960 ; Robinson *et al.*, 1973 ; Jacobsen, 1986 ; Ban, 2001).

Bien que pour la première fois on put véritablement parler de traitements antidépresseurs cliniquement efficaces, ces premiers inhibiteurs de la monoamine oxydase (IMAO) ne furent pas sans poser quelques problèmes. Les IMAO utilisés au cours des années 50 et 60 étaient des inhibiteurs irréversibles de la MAO. L'un des effets secondaires les plus ennuyeux des IMAO non sélectifs et irréversibles était de causer de graves altérations de la pression artérielle, pouvant aboutir à une maladie cérébrovasculaire. En 1968, on découvrit l'existence de deux formes de la MAO (Johnston, 1968). La MAO de type A interagit préférentiellement avec le métabolisme de monoamines impliquées dans les états dépressifs comme la sérotonine et la noradrénaline (mais également l'adrénaline), alors que la MAO de type B est impliquée dans le métabolisme de la phényléthylamine et de la benzylamine. Ces découvertes encouragèrent le développement de nouvelles molécules qui inhibent sélectivement et de manière réversible la MAO-A en permettant à la MAO-B de rester active et de métaboliser certaines substances comme la tyramine, ingérée avec la nourriture, dont l'absence de dégradation pouvait mener à des crises d'hypertension. Le premier représentant des IMAO sélectifs et réversibles fut le moclobémide (Lecrubier et Guelfi, 1990 ; Angst *et al.*, 1995), plus efficace que les premières molécules, et qui possédait en outre des propriétés anxiolytiques, élargissant ainsi son spectre d'action.

1.5.2. Les tricycliques

L'histoire des antidépresseurs tricycliques (et des tétracycliques), tenant leur nom de leur structure chimique, commença à la fin du XIX^e siècle avec la synthèse des premières phénothiazines qui servaient alors pour l'industrie textile. Près d'un demi-siècle plus tard, en 1948, des tests pharmacologiques permirent de remarquer que certains dérivés de phénothiazines possédaient des propriétés antihistaminiques en plus de leurs effets sédatifs, analgésiques et antispasmodiques (Fangmann *et al.*, 2008). En 1952, Pierre Deniker et Jean Delay découvrirent qu'une phénothiazine, la chlorpromazine, améliorait de manière spectaculaire l'humeur de patients psychotiques (López-Muñoz *et al.*, 2005). Plusieurs autres phénothiazines furent synthétisées et testées, sans réelle efficacité, sur différentes populations de patients psychiatriques. Cependant, en 1956, Roland Kuhn et son équipe remarquèrent que trois patients diagnostiqués pour une dépression psychotique présentaient une nette amélioration de leur état à la suite d'un traitement avec une phénothiazine, l'imipramine. Cet

effet antidépresseur fut ensuite confirmé chez d'autres patients dépressifs (Kuhn, 1958).

Ces résultats furent reçus avec scepticisme par la communauté médicale, qui pensait majoritairement que la dépression provenait de conflits intrapsychiques et que les substances pharmacologiques masquaient les vrais symptômes de la dépression. Néanmoins, l'effet antidépresseur fut confirmé par de nombreux spécialistes, et l'imipramine arriva sur le marché Suisse en 1957, puis en 1958 dans le reste de l'Europe et en Amérique du Nord (Lehmann *et al.*, 1958). Ce fut une grande avancée dans le traitement de la dépression, et l'imipramine fut le premier représentant d'une nouvelle famille d'antidépresseurs, connue sous le nom d'imipraminiques ou tricycliques, avec des effets vraiment spécifiques sur l'humeur des patients. Le nombre de publication sur les effets de l'imipramine sur la dépression ne cessèrent de croître dans les années qui suivirent (Ball et Kiloh, 1959 ; Klerman et Cole, 1965), et d'autres tricycliques et tétracycliques furent mis sur le marché.

Cependant, il fallut attendre la fin des années 60 pour comprendre le mode d'action de ces molécules qui permettent d'augmenter la fonction monoaminergique en inhibant la recapture des monoamines. Certains tricycliques ont une action préférentiellement sérotoninergique (comme la clomipramine), alors que d'autres ont une action préférentiellement noradrénergique (comme la désipramine, la maprotiline ou la nortriptiline). En outre, tous les tricycliques bloquent les récepteurs muscariniques cholinergiques, les récepteurs H1 de l'histamine et les récepteurs α -adrénergiques, sans que ces actions soient déterminantes pour leur effet thérapeutique, et qui vont être davantage responsables d'effets secondaires (Wong et Licinio, 2001 ; Artigas *et al.*, 2002). En effet, le blocage des récepteurs adrénergiques α -1 provoque une hypotension orthostatique et des vertiges, les effets anticholinergiques sur les récepteurs muscariniques produisent des troubles de la mémoire, et le blocage des récepteurs histaminergiques de type 1 peut causer de la sédation et une augmentation du poids corporel. De plus, certains antidépresseurs tricycliques bloquent aussi les récepteurs de type 5-HT_{2A}, ainsi que les canaux sodiques dans le cerveau et dans le cœur, pouvant causer des arythmies cardiaques, des arrêts cardiaques et des convulsions en cas de surdosage.

1.5.3. Les nouveaux antidépresseurs

A partir de la fin des années 80, de nouvelles substances commencèrent à faire leur apparition, agissant elles aussi en augmentant la

disponibilité des monoamines dans la synapse. Ces molécules sont souvent autant voire plus efficaces que les IMAO, et possèdent une action thérapeutique plus rapide tout en induisant moins d'effets secondaires. Cependant, malgré l'énorme développement de la recherche, il n'y a eu que peu de progrès dans la découverte de nouvelles cibles dans le traitement de la dépression depuis la mise sur le marché de ces molécules. Ceci peut s'expliquer par les gains astronomiques obtenus grâce à la commercialisation de certaines substances comme les inhibiteurs de recapture sélectifs de sérotonine, des médicaments de maniement facile et pourvus de peu d'effets collatéraux. En effet, selon une étude de la DREES¹ (Direction de la Recherche, des Etudes, de l'Evaluation et des Statistiques), le chiffre d'affaire des ventes d'antidépresseurs a été multiplié par près de 7 en 21 ans, passant de 84 millions d'euros (en euros de 2001) en 1980 à 543 millions d'euros en 2001. Dans le même temps, les ventes de médicaments sur le marché pharmaceutique global n'ont été multipliées que par 2,7. Au-delà de l'augmentation des prix qui explique en partie cette très forte hausse du chiffre d'affaire, l'évolution des ventes d'antidépresseurs peut aussi s'expliquer par le nombre grandissant de personnes souffrant de troubles de l'humeur et par une meilleure prise en charge des patients.

A l'inverse des tricycliques et des IMAO dont les effets antidépresseurs ont été découverts fortuitement, et qui ont été par la suite introduits dans un contexte clinique qui n'était pas leur objectif premier, les **inhibiteurs de recapture sélectifs de sérotonine** (IRSS) constituent la première famille de substances psychoactives développées pour le trouble dépressif avec une stratégie définie à l'avance, à savoir une molécule capable d'agir sur la recapture de sérotonine en évitant les cibles non essentielles et les potentiels effets indésirables. La fluoxétine fut le premier IRSS à voir le jour, et fut commercialisée pour la première fois en Belgique en 1987. Synthétisé et développé par la firme américaine Eli Lilly (Indianapolis, Indiana), cet IRSS est considéré comme la molécule prototypique de la famille des antidépresseurs, devenant le plus prescrit des antidépresseurs dans le monde. La première publication de la fluoxétine date de 1974 et décrit l'action d'une nouvelle molécule sur le système de recapture aminergique en postulant son utilité potentielle pour l'étude des fonctions sérotoninergiques dans certains troubles mentaux (Wong *et al.*, 1974). D'autres IRSS comme la sertraline, la paroxétine, et le citalopram, bien qu'appartenant à des familles chimiques distinctes, ont pour

¹ Les ventes d'antidépresseurs entre 1980 et 2001, Elise Amar et Didier Balsan, Octobre 2003.

caractéristique commune leur aptitude à inhiber la recapture de la sérotonine (Carrasco et Sandner, 2005). Même si ces substances agissent également sur la neurotransmission noradrénergique, cholinergique ou histaminergique, leurs effets thérapeutiques sont principalement dus à l'action sur la recapture de sérotonine. Ils ont peu à peu remplacé les tricycliques, spécialement chez des patients âgés.

D'autres substances vont augmenter préférentiellement la neurotransmission noradrénergique à travers deux mécanismes principaux : l'inhibition des récepteurs α -2 présynaptiques à la noradrénaline ou l'inhibition de la recapture de la noradrénaline. Le premier **inhibiteur de la recapture sélectif de noradrénaline** (IRSN) mis sur le marché fut la réboxétine en 1997 (Hajós *et al.*, 2004). Les effets thérapeutiques de ces substances peuvent être en partie expliqués par l'augmentation de la neurotransmission noradrénergique au niveau de l'hippocampe et du cortex préfrontal. Cependant, ces données reposent exclusivement sur des modèles animaux. Certains IRSN, comme la miansérine, peuvent également bloquer les récepteurs H1 à l'histamine, engendrant des effets sédatifs.

Les **inhibiteurs de la recapture de la sérotonine et de la noradrénaline** (IRSNa), tout comme les antidépresseurs tricycliques, stimulent la neurotransmission sérotoninergique et noradrénergique, et donc les récepteurs de ces deux neurotransmetteurs. On peut noter qu'à la différence des autres molécules précédemment citées, ces substances sont dépourvues d'effet sur les récepteurs α -1, sur les récepteurs cholinergiques ou sur les récepteurs histaminergiques, si bien que leur effet sur la sérotonine et la noradrénaline est sélectif. L'action mixte, à la fois sur la neurotransmission noradrénergique et sur la neurotransmission sérotoninergique, associée à l'absence d'action sur les autres cibles moléculaires, induit une synergie de l'action que ces composés exercent sur l'expression génétique, synergie qui n'est pas observée en cas d'action moins ciblée. La venlafaxine est le prototype des inhibiteurs de la recapture mixte sérotonine/noradrénaline : administrée à faibles doses, elle inhibe la sérotonine. Lorsque la dose augmente, on observe en outre le blocage de la recapture de la noradrénaline. La venlafaxine est un antidépresseur d'action plus rapide que les autres et est prescrite chez des patients atteints d'une dépression réfractaire à d'autres traitements (Smith *et al.*, 2002 ; Gutierrez *et al.*, 2003).

Il existe d'autres types d'antidépresseurs, dits atypiques, qui possèdent des profils neurochimiques différents, comme la tianeptine qui curieusement augmente la recapture de sérotonine et module la transmission glutamatergique (Fuchs *et al.*, 2002 ; McEwen et Olie,

2005), la mirtazapine (dérivée de la miansérine) qui agit en bloquant les récepteurs de type α -2 situés sur les neurones noradrénergiques (Haddjeri *et al.*, 1998), ou encore l'agomélatine, commercialisée en Europe en 2009, qui agit comme agoniste des récepteurs mélatoninergiques 1 et 2, et comme antagoniste des récepteurs sérotoninergiques 5-HT_{2C} (De Berardis *et al.*, 2011 ; Rainer *et al.*, 2011).

De plus, beaucoup de molécules actuellement en développement pour le traitement de la dépression impliquent des cibles très variées et généralement différentes des systèmes monoaminergiques (Holmes *et al.*, 2003). En effet, ces dernières années, de nombreuses recherches se sont focalisées sur des systèmes neuropeptidergiques comme la CRH et la vasopressine (Louis *et al.*, 2006 ; Madaan et Wilson, 2009 ; Urani *et al.*, 2011), la substance P et le récepteur 1 de la neurokinine (Gobbi et Blier, 2005 ; Muñoz et Coveñas, 2011), le neuropeptide Y (Madaan et Wilson, 2009) ou encore l'hormone de mélanocyte-concentration (*melanin-concentrating hormone*, MCH) (Shimazaki *et al.*, 2006 ; David *et al.*, 2007).

1.6. Modéliser la dépression

Pour comprendre la dépression majeure, on ne peut se contenter des études cliniques qui se heurtent à des considérations méthodologiques et éthiques. Il est donc nécessaire de pouvoir modéliser la maladie chez l'animal. Un modèle animal peut être défini comme « un modèle permettant l'étude de données de référence sur la biologie ou le comportement, ou chez lequel on peut étudier un processus pathologique spontané ou induit, celui-ci ayant un ou plusieurs aspects communs avec un phénomène équivalent chez l'humain ou d'autres espèces animales¹ ». Dans le cadre de maladies psychiatriques, les modèles animaux tentent de reproduire les différents aspects de la pathologie humaine tels que les altérations physiologiques et comportementales, l'étiologie du trouble et les effets des traitements thérapeutiques (Willner *et al.*, 1992).

Plusieurs critères de validité sont utilisés pour évaluer la fiabilité d'un modèle animal. Ce dernier, en plus d'être reproductible, doit notamment permettre de prédire les effets des traitements pharmacologiques chez l'Homme (validité prédictive), de reproduire chez l'animal des aspects de la maladie humaine (validité de face ou isomorphisme), et de résulter des mêmes mécanismes étiologiques et

¹ American National Research Council Committee on Animal Models for Research and Aging

neurobiologiques que chez l'humain (validité de construction ou étiologique) (Willner, 1984 ; Willner, 1997 ; McKinney, 2001). Un modèle animal idéal de la dépression majeure présenterait donc des symptômes et de causes similaires à la pathologie humaine, ainsi qu'une sensibilité aux traitements cliniquement efficaces.

La modélisation animale de maladies psychiatriques pose de nombreux problèmes théoriques et méthodologiques. Les modèles de dépression actuellement utilisés tentent par différents moyens de produire des corrélations quantifiables des symptômes humains chez des animaux de laboratoire. Or les symptômes les plus proéminents de la dépression majeure reposent sur des émotions subjectives spécifiquement humaines (humeur dépressive, idées de suicide ou de mort, sentiments de culpabilité), qui ne peuvent être modélisées chez l'animal. Ce sont par conséquent les symptômes de la dépression qui peuvent être traduits en comportements, et donc mesurables chez l'animal, qui vont être modélisés.

Ces critères de validité ne sont pas toujours considérés d'égale importance. La validité de construction est en effet considérée comme souhaitable, mais pas essentielle (Cryan et Holmes, 2005), et cela pour plusieurs raisons. C'est d'une part un critère qui, bien qu'ayant une valeur heuristique quant aux mécanismes physiopathologiques de la dépression, est difficile à reproduire chez l'animal de par la méconnaissance même des facteurs étiologiques de cette affection. D'autre part, bien que les modèles tentent de reproduire les caractéristiques physiologiques et comportementales de la dépression, celles-ci découlent probablement de processus très différents de ceux que l'on observe dans la pathologie humaine. Il s'agit là d'une limitation importante à l'utilisation de modèles animaux.

Actuellement, les modèles animaux sont principalement utilisés pour leurs aptitudes à détecter les mécanismes des traitements pharmacologiques. Ces modèles sont donc davantage sélectionnés sur leur capacité à éprouver le fonctionnement d'antidépresseurs dont le mode d'action est connu, plutôt que sur leur capacité à découvrir de nouveaux mécanismes physiopathologiques. Pour pouvoir aboutir à une meilleure compréhension de tous les mécanismes sous-tendant la dépression majeure, il est donc nécessaire d'utiliser des modèles animaux basés sur des processus analogues à la pathologie humaine.

On peut donc distinguer les « tests » ou bio-essais (parfois abusivement qualifiés de modèles) des « modèles » de dépression. Un « test » va permettre d'évaluer des phénomènes ponctuels comme l'effet d'un traitement pharmacologique sur un animal auparavant naïf, sans que ce test ne mesure nécessairement des comportements analogues à ceux

que l'on observerait chez un humain subissant le même traitement. Le « modèle » va quant à lui induire des perturbations mesurables à long terme et de façon stable. Les caractéristiques physiologiques et comportementales intrinsèques de l'animal sont donc modifiées durablement par des manipulations expérimentales, telles que des manipulations génétiques, des stressseurs survenant au cours du développement, des manipulations pharmacologiques, du stress chronique chez l'adulte, etc., permettant de modéliser un état « dépressif-like ».

1.6.1. Bio-essais ou tests du phénotype dépressif-like

1.6.1.1. Test de la nage forcée

Le test de la nage forcée (*forced swim test*), crée par Roger Porsolt en 1977, consiste à placer un rat ou une souris dans un cylindre comportant suffisamment d'eau (à une température comprise entre 23 et 25°C) pour que l'animal ne puisse ni toucher le sol avec ses pattes arrières, ni grimper et sortir du dispositif (Porsolt *et al.*, 1977a ; Porsolt *et al.*, 1977b ; Porsolt *et al.*, 1978).



Figure 4. Dispositif du test de la nage forcée.

Dans un premier temps, les animaux essayent de s'échapper en se débattant et en essayant de grimper contre la paroi du tube, jusqu'à abandonner cette stratégie en se laissant flotter et en restant immobiles, faisant juste les mouvements nécessaires pour garder la tête hors de l'eau (Figure 4). Ce comportement est qualifié de comportement de « désespoir ». L'immobilité est quantifiée durant une période de 6 minutes, et peut être accentuée par une exposition préalable au test 24 heures auparavant (Porsolt *et al.*, 1978). Ce test,

très utilisé en raison de sa rapidité d'utilisation, de sa facilité de mise en œuvre et de sa reproductibilité, permet d'évaluer les effets des antidépresseurs tels que les IMAO, les tricycliques, et les antidépresseurs atypiques qui vont diminuer le temps d'immobilité des animaux en fonction de la dose (Porsolt *et al.*, 1977a ; Porsolt *et al.*, 1977b ; Borsini et Meli, 1988). Il est également possible de distinguer les effets d'antidépresseurs noradrénergiques des antidépresseurs sérotoninergique en quantifiant les comportements de nage, plus spécifiques des IRSS, des comportements « d'escalade » de la paroi, prédominants lors de traitement aux IRSN (Detke *et al.*, 1995 ; Lucki, 1997). De plus, le test de la nage forcée est sensible aux variations génétiques relatives aux différentes souches de rats ou de souris utilisées (López-Rubalcava et Lucki, 2000).

Il existe cependant plusieurs limites au test de la nage forcée. D'une part, il est difficile de distinguer des différences entre un traitement aigu et un traitement chronique aux antidépresseurs classiques, sachant que ces derniers ne sont efficaces qu'après plusieurs semaines chez l'Homme. D'autre part, ce test a été validé chez des animaux normaux (*i.e.* « non dépressifs » ou non stressés).

1.6.1.2. Test de suspension par la queue

Le test de suspension par la queue (*tail suspension test*) est conceptuellement identique au test de la nage forcée, mais on admet qu'il possède une plus grande sensibilité. Celui-ci n'est cependant utilisé qu'avec des souris et non avec des rats, de par leur taille et leur poids. Les protocoles restent relativement similaires d'un laboratoire à l'autre, ne présentant que quelques variations mineures de procédures. En général, une souris est suspendue par la queue à environ 30 à 60 cm du sol, et on quantifie le temps d'immobilité (interprété comme une période de résignation) et de mouvements actifs durant cinq ou six minutes (Steru *et al.*, 1985). De la même manière que le test de la nage forcée, le test de suspension par la queue est aussi basé sur l'adoption d'une réponse passive face à une situation stressante, un comportement de « désespoir » (Figure 5). Un traitement aigu aux antidépresseurs (donné avant le test) réduit le temps d'immobilité. Ce test est donc considéré pour avoir une bonne validité prédictive (Steru *et al.*, 1985 ; Perrault *et al.*, 1992 ; Cryan *et al.*, 2005). Bien que conceptuellement similaire, le test de suspension par la queue et le test de la nage forcée ne présentent pas les mêmes sensibilités aux antidépresseurs ou aux souches de souris, suggérant que les réponses dans ces tests ne partagent pas exactement le même substrat neurobiologique (Bai *et al.*,

2001). Dans le test de suspension par la queue, l'immobilité basale, ainsi que la réponse aux antidépresseurs, est différente en fonction des souches de souris, indiquant que ce test est également sensible aux influences génétiques (Ripoll *et al.*, 2003).



Figure 5. Comportement d'immobilité, dit de résignation (à gauche), ou comportement actif (à droite) caractéristiques du test de suspension par la queue.

Même si le test de suspension par la queue et le test de la nage forcée ne reproduisent pas la pathophysiologie de la dépression, leur grande fiabilité et leur capacité à induire des changements qui sont sensibles aux effets thérapeutiques, leur conférant une bonne validité prédictive, ont contribué à leur utilisation massive dans de nombreux laboratoires. Cependant, ces deux tests possèdent les mêmes limites, à savoir une difficulté de distinguer les effets des traitements aigus et chroniques aux antidépresseurs classiques, et que ceux-ci sont efficaces chez des souris « non dépressives ».

1.6.1.3. Tests de sensibilité hédonique

Ces tests reposent sur les observations cliniques de la présence d'une anhédonie dans les pathologies dépressives. Il existe plusieurs méthodes pour quantifier la sensibilité hédonique, telle que la procédure de préférence de place conditionnée (dans laquelle un animal apprend à associer un environnement particulier à une expérience hédonique), les paradigmes de stimulations cérébrales, et la quantification de la consommation/préférence de solutions sucrées. C'est cette dernière méthode qui est l'une des plus utilisées pour évaluer l'efficacité d'un stress chronique.

Paul Willner fut l'un des premiers à introduire et valider le test de préférence au sucrose chez le rat comme caractéristique de la présence d'un symptôme anhédonique, mimant celui de la dépression. Dans ce test, les animaux peuvent accéder à deux bouteilles de liquide, l'une

contenant de l'eau ordinaire, l'autre une solution légèrement sucrée. On peut ainsi comparer leur préférence gustative. Typiquement, les animaux contrôles consomment davantage de solution sucrée, alors que les animaux exposés à un stress chronique présentent généralement une réduction de cette préférence pour le sucre (Papp *et al.*, 1991 ; Willner *et al.*, 1992). Le développement de « l'anhédonie » peut être démontré par des tests répétés au cours de l'exposition au stress chronique, et l'administration chronique, mais pas aiguë, d'antidépresseurs permet l'inversion de ces effets (Muscat et Willner, 1992 ; Willner *et al.*, 1996 ; D'Aquila *et al.*, 1997). Cependant, toutes les souches de souris et de rats ne sont pas sensibles à ces mesures anhédoniques après un stress chronique (Nielsen *et al.*, 2000 ; Pothion *et al.*, 2004).

Le test de consommation/préférence au sucre peut se révéler conceptuellement délicat dans son interprétation et sa mise en place, et pose un certain nombre de problèmes méthodologiques (Weiss, 1997). En effet, outre des difficultés de réplication, les changements de la préférence au sucre induits par le stress sont plus difficiles à établir chez les souris comparativement aux rats. Pour les souris, plutôt que de mesurer la préférence, il a donc été proposé de mesurer la consommation de sucre dans un test ne comportant qu'une seule bouteille, ce qui pose un problème d'interprétation en tant que mesure d'anhédonie (Monleon *et al.*, 1995 ; Pothion *et al.*, 2004). De plus, la réduction de cette consommation lors d'un stress chronique pourrait être associée à un effet aigu et non spécifique des stressseurs individuels plutôt qu'à un état « dépressif-like », étant donné que cette consommation revient à des niveaux normaux dès la fin de la procédure de stress chronique (Pothion *et al.*, 2004). En outre, l'expérimentation peut, malgré son apparente simplicité, être l'objet de variations qui pourront entraîner des différences de résultats comme la façon de placer les bouteilles, la concentration en sucre, la durée du test (quelques heures ou tout au long de la journée), le moment de la journée (pendant la période d'activité ou non), le poids corporel des animaux, etc. Enfin, l'utilisation de sucre peut aussi induire en erreur, l'attrait des animaux ne concernant peut-être pas l'aspect de plaisir du goût sucré, mais plutôt l'attrait pour l'aspect calorique.

Il est également possible de mesurer la réponse hédonique en utilisant des paradigmes d'auto-stimulation cérébrale. Dans ce type de modèle, l'animal est implanté avec des électrodes ciblant des zones du circuit de la récompense (comme l'aire tegmentale ventrale), puis entraîné à s'administrer une stimulation électrique récompensante par la réalisation d'un comportement opérant. Cette réponse opérante

relative à l'intensité de la stimulation est quantifiée comme une mesure de la sensibilité du système de récompense, et apparaît donc comme un indice de la motivation. Les paradigmes de stimulation cérébrale peuvent être utilisés pour étudier les effets du stress chronique sur le système de récompense, même si les résultats peuvent être variables et sujets aux différences inter-individuelles (Moreau *et al.*, 1992 ; Nielsen *et al.*, 2000).

1.6.1.4. Les paradigmes d'hyponéophagie

Les paradigmes d'hyponéophagie ont originellement été développés comme tests d'anxiété et évaluent le comportement alimentaire de rats ou de souris placés dans un contexte anxiogène. Les animaux sont confrontés à un conflit motivationnel entre le désir de manger ou de boire et l'appréhension du nouvel environnement. Comparés aux autres tests utilisés pour évaluer l'action des antidépresseurs, le stress engendré par ces modèles est très modéré.

Dans le test d'hypophagie induite par la nouveauté (*novelty-induced hypophagia*), une première session permet de mesurer la latence et le volume de consommation d'un aliment ou d'un liquide palatable dans la cage des animaux, ce qui constitue la situation contrôle. Dans un second temps, les mêmes mesures sont réalisées en modifiant légèrement l'environnement autour de la cage de l'animal (changement de lieu ou de lumière). La comparaison des deux situations permet d'obtenir un score d'hyponéophagie (Dulawa *et al.*, 2004).

Le test d'alimentation supprimée par la nouveauté (*novelty-suppressed feeding*) consiste à placer l'animal, préalablement mis à jeun, dans un nouvel environnement contenant en son centre de la nourriture. La latence mise pour commencer à consommer la nourriture est enregistrée au cours des 3 minutes suivantes (bien que cette durée puisse varier d'un protocole à l'autre) (Bodnoff *et al.*, 1988).

Ces modèles d'hyponéophagie ont une bonne validité prédictive, et répondent aux benzodiazépines et aux barbituriques, ainsi qu'aux antidépresseurs à composante anxiolytique. De plus, ces paradigmes sont sensibles à la durée du traitement, et ne détectent les effets anxiolytiques des antidépresseurs qu'après un traitement chronique, ce qui correspond aux données cliniques de leur mécanisme d'action (Bodnoff *et al.*, 1988 ; Bodnoff *et al.*, 1989 ; Dulawa et Hen, 2005).

1.6.2. Les modèles empiriques de la dépression

Les paradigmes empiriques ont pour objectif de modéliser la dépression, non pas en tentant d'imiter l'étiologie de la pathologie humaine, mais en se basant sur l'apparition d'un phénotype « dépressif-like » ou « antidépresseur-like ». De fait, le principal inconvénient de ces modèles est qu'ils présentent peu de relation avec l'étiologie clinique du trouble dépressif. Il existe différents types de modèles empiriques, dont la liste ci-dessous n'est pas exhaustive.

- L'hypomotilité induite par l'administration de réserpine (O'Neil et Moore, 2003) ou le traitement antidépresseur néonatal, comme l'administration de clomipramine (Vogel *et al.*, 1990b), se fondent sur une étiologie pharmacologique, ce qui ne représente qu'une faible portion des causes de dépression chez l'Homme.
- Le modèle de bulbectomie olfactive consiste à léser le bulbe olfactif de rongeurs. L'anosmie qui en résulte entraîne des perturbations de la neurotransmission (réduction de sérotonine et de noradrénaline) et comportementales (hyperactivité, diminution de l'apprentissage d'un évitement passif, agression) assimilées à un état « dépressif » qui peut être contrecarré par un traitement chronique aux antidépresseurs (Song et Leonard, 2005).
- Les modèles génétiques sont des lignées consanguines ou des souches sélectionnées de rats, tels que les rats Flinders Sensitive Line (FSL), Fawn-Hooded (FH) ou Wistar-Kyoto (WK) qui présentent des caractéristiques physiologiques et comportementales relativement proches de celles observées chez les patients dépressifs (Rezvani *et al.*, 2007 ; Malkesman et Weller, 2009). Cependant, ces souches sont sélectionnées initialement pour un phénotype précis ou un gène unique et ne sont pas représentatifs d'une population générale.
- Les modèles génétiques s'appuient quant à eux sur l'invalidation d'un unique gène, comme le gène des récepteurs aux glucocorticoïdes, au CRF, ou le gène du transporteur de la 5-HT (Muller et Holsboer, 2006 ; Lesch et Mossner, 2006). Or, si ces modèles peuvent être satisfaisants pour l'étude d'un facteur étiologique spécifique, l'ablation d'un gène unique ne modélise que très imparfaitement l'étiologie générale d'un état dépressif chez l'Homme, puisque cette pathologie est plurifactorielle.

1.6.3. Les modèles de dépression

1.6.3.1. Modèle de résignation acquise

Le modèle de résignation acquise (*learned helplessness*) a été initialement proposé par Martin Seligman en 1967 qui avait observé que des chiens exposés à des chocs électriques inévitables et incontrôlables étaient par la suite moins prompts à éviter les chocs alors même que la possibilité d'y échapper leur était offerte (Seligman et Maier, 1967). Ce modèle a ensuite été adapté chez les rongeurs grâce à un dispositif à deux compartiments séparés par une trappe (Seligman et Beagley, 1975) (Figure 6). Durant une ou plusieurs sessions, l'animal est placé dans un des compartiments et soumis à des chocs électriques auxquels il ne peut échapper. Puis, dans un second temps, on mesure la latence de l'animal à éviter les chocs électriques en lui laissant la possibilité d'aller dans le second compartiment qui ne délivre aucun choc. La latence à s'échapper est plus importante chez les animaux préalablement exposés à des chocs électriques qu'ils ne pouvaient éviter par rapport à des animaux naïfs.

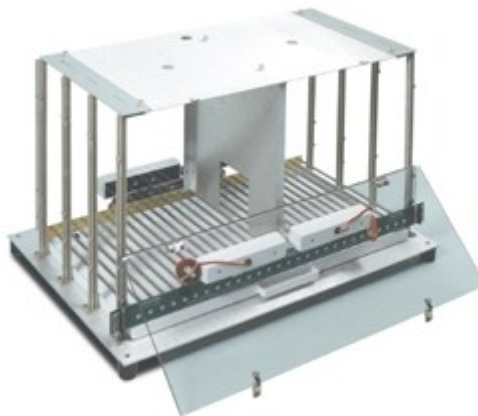


Figure 6. Exemple de dispositif utilisé dans le modèle de résignation acquise.

Ce comportement de résignation peut être contré par différents types d'antidépresseurs, comme les tricycliques, les IRSS, les IMAO, et les sismothérapies (Sherman *et al.*, 1982 ; Martin *et al.*, 1990). Ce modèle possède donc une bonne validité prédictive (Willner, 1984). En outre, les animaux soumis à ce modèle présentent, en plus du comportement de résignation, plusieurs composantes de la dépression humaine, comme une diminution de l'activité locomotrice, une perte de poids, une altération du sommeil, une diminution des comportements motivationnels, et une augmentation de la sécrétion des hormones du stress (Maier, 1984). Néanmoins, un des problèmes de ce modèle est

que seul un certain pourcentage des individus présente une résignation acquise et que, même dans ce cas, celle-ci persiste seulement deux ou trois jours (Nestler *et al.*, 2002 ; Cryan et Holmes, 2005). Enfin, de par la méthodologie employée pour induire ces altérations physiologiques et comportementales, ce paradigme est surtout considéré comme un modèle de vulnérabilité au stress (en permettant d'identifier des sous-groupes d'animaux plus susceptibles d'exprimer un comportement de résignation) plutôt que comme un modèle de dépression *stricto sensu*. Ce modèle serait donc davantage utile pour mettre en évidence les mécanismes qui sous-tendent la susceptibilité de développer un état « dépressif-like » dans des situations stressantes.

1.6.3.2. Stress périnataux

Comme nous l'avons vu plus haut, les expériences aversives périnatales sont d'importants facteurs prédisposant au développement de troubles psychopathologiques chez l'Homme. Des paradigmes expérimentaux ont donc été développés pour tenter de modéliser les stress périnataux chez l'animal, et sont utilisés en tant que modèle d'étude des facteurs environnementaux qui vulnérabilisent l'organisme et le prédispose au développement de troubles dépressifs.

Le principal stress périnatal utilisé comme modèle de dépression est la séparation maternelle. De nombreux travaux ont montré que les soins parentaux sont particulièrement déterminants pour faire face au stress durant le développement chez l'Homme, et les paradigmes de privations maternelles peuvent être utiles comme modèles animaux de prédisposition à la dépression (Heim et Nemeroff, 2001 ; Kendler *et al.*, 2002 ; Newport *et al.*, 2002 ; Holmes *et al.*, 2005). En effet, le comportement maternel peut considérablement influencer la future réactivité émotionnelle de la progéniture (Zhang *et al.*, 2006). Les paradigmes de séparation maternelle chez le rongeur ciblent donc des périodes critiques du développement postnatal, quand le cerveau est très sensible aux changements de l'environnement. Dans les nombreux paradigmes de séparation maternelle existants, les rongeurs sont donc généralement exposés de manière répétée à des épisodes quotidiens de 3 à 6 heures de séparation maternelle dans les deux premières semaines après leur naissance. Il est également possible de priver les jeunes des stimuli olfactifs liés à la litière de la mère. Les animaux préalablement séparés de leur mère peuvent ensuite se développer dans des conditions normales. A l'âge adulte, ces animaux présentent généralement des altérations comportementales et physiologiques se caractérisant par une augmentation de l'anxiété et des réponses de

peur, une activité locomotrice réduite, une réduction de la motivation sociale et des réponses hédoniques, des perturbations de l'appétit et du sommeil, et des altérations endocrines et neurochimiques touchant principalement l'axe HPA (Plotsky et Meaney, 1993 ; Ladd *et al.*, 2000 ; Mintz *et al.*, 2005 ; Pryce *et al.*, 2005 ; Ruedi-Bettschen *et al.*, 2005 ; Ruedi-Bettschen *et al.*, 2006). Beaucoup de ces changements comportementaux sont analogues aux symptômes de la dépression, particulièrement les changements neuroendocriniens (Pryce *et al.*, 2001 ; Heim *et al.*, 2004 ; Pryce *et al.*, 2005). La stabilité des changements phénotypiques permet à ces modèles d'être utiles pour l'étude des mécanismes liés aux troubles de l'humeur (Law *et al.*, 2009). Certains effets de la séparation maternelle sont contrecarrés par des traitements chroniques aux antidépresseurs ou des sismothérapies (Leventopoulos *et al.*, 2009), bien que la validité prédictive de ces modèles doive encore être évaluée par davantage d'études.

L'impact du stress peut aussi être modélisé dans des paradigmes de stress prénataux. Dans ces modèles, la mère est soumise à des stressors divers durant la gestation, comme des sons aversifs ou des contentions, ce qui entraîne des altérations de la progéniture caractérisées par une augmentation de l'anxiété, des comportements dépressifs-like, et des perturbations de l'activité de l'axe HPA (Alonso *et al.*, 1991 ; Weinstock *et al.*, 1992 ; McCormick *et al.*, 1995 ; Secoli et Teixeira, 1998 ; Maccari *et al.*, 2003 ; Morley-Fletcher *et al.*, 2003 ; Morilak et Frazer, 2004 ; Smith *et al.*, 2004). De plus, la plupart de ces altérations sont contrées par des traitements chroniques aux antidépresseurs (Morley-Fletcher *et al.*, 2004 ; Poltyrev et Weinstock, 2004). Il est intéressant de noter que les altérations de l'axe HPA engendrées par ces modèles sont les mêmes que ceux causés par les stress prénataux chez l'Homme (Weinstock, 1997). Les paradigmes de stress prénataux possèdent de bonnes validités de face et de construction, mais toutes les perturbations engendrées chez les jeunes sont dépendant du stress provoqué chez la mère, ce qui rend difficile l'interprétation de la relative contribution des effets gestationnels ou des soins postnataux.

D'un point de vue méthodologique, les paradigmes de stress périnataux sont relativement difficiles à mettre en œuvre, coûteux en temps, et les résultats obtenus dépendent du choix de la comparaison avec les groupes contrôles utilisés. Cependant, à la différence de certains modèles de stress à court-terme, les paradigmes de stress périnataux permettent d'obtenir des animaux présentant des altérations durables liées à la dépression et pouvant contribuer à l'étude des facteurs de

stress et aux prédispositions individuelles à l'anxiété chronique et au trouble dépressif.

1.6.3.3. Défaite sociale

Le stress social est une expérience aversive naturellement présente chez beaucoup d'espèces animales, mais semble jouer un rôle dans le développement de la dépression majeure et d'autres troubles psychologiques chez l'Homme lorsqu'il est excessif (Agid *et al.*, 2000 ; Bjorkqvist, 2001 ; Huhman, 2006). L'utilisation de conflits sociaux comme stressseurs et de l'interaction sociale comme indice quantifiable pour en mesurer les conséquences semble donc posséder une bonne validité de face et de construction dans le cadre de la dépression (Heim et Nemeroff, 2001). Les modèles expérimentaux chez les rongeurs utilisent fréquemment une situation de conflit dont résulte une relation de dominant/dominé, l'un des animaux acquérant ou conservant son statut de dominant, tandis que l'autre individu devenant ou restant dominé. Ces modèles vont induire chez les individus soumis un évitement social, qui peut être quantifié et qui se rapproche cliniquement du retrait social observé dans la dépression chez l'Homme (Koolhaas *et al.*, 1997 ; van Kampen *et al.*, 2002 ; Berton *et al.*, 2006), rendant ces paradigmes plus pertinents que d'autres modèles fondés sur des stress aigus et sévères.

Dans ces modèles, le conflit social est généré entre deux animaux mâles, en introduisant un animal inconnu (l'intrus) dans la cage d'un autre animal (le résident) devant subir le stress, en prenant en compte des facteurs comme la souche, le poids, et le statut social de l'animal pour s'assurer qu'il y aura bien un animal en situation de défaite. Les paradigmes utilisés varient selon le nombre de sessions de stress social et la nature des conflits, puisque les stress peuvent être physiques (en cas d'attaques directes), ou psychologiques lorsque l'animal est seulement confronté à un stimulus sensoriel stressant tout en étant séparé de l'autre animal pour prévenir les attaques. Les animaux contrôles sont aussi exposés à des contacts sociaux, mais sans conflits ni défaites.

Deux composantes importantes liées à la dépression sont observables chez l'animal en situation de défaite, à savoir une anhédonie et l'évitement social en présence d'un animal non familier (Meerlo *et al.*, 1996 ; Von Frijtag *et al.*, 2002 ; Rygula *et al.*, 2005). D'autres changements physiologiques et comportementaux sont parfois observés, comme une réduction du comportement sexuel, une augmentation des comportements défensifs et de l'anxiété, une diminution de l'activité locomotrice et exploratoire, des changements

du rythme circadien et du comportement alimentaire, des troubles du sommeil et des altérations des fonctions immunitaires (Bohus *et al.*, 1993 ; Meerlo *et al.*, 1996 ; Koolhaas *et al.*, 1997). De plus, chez les animaux en situation de défaite sociale, l'axe HPA est suractivé de manière similaire aux autres modèles (Buwalda *et al.*, 1999). L'évitement social et l'anhédonie engendrés par les modèles de défaite sociale perdurent et sont uniquement contrecarrés par des traitements chroniques aux antidépresseurs (Meerlo *et al.*, 1996 ; Meerlo *et al.*, 2002 ; Von Frijtag *et al.*, 2002 ; Huhman, 2006 ; Berton *et al.*, 2006). Cela souligne l'utilité de ces modèles pour explorer les processus physiopathologiques de la dépression qui surviennent à long terme. De plus, certains animaux sont plus sensibles que d'autres aux effets de la défaite sociale, permettant l'étude des substrats biologiques associés à une vulnérabilité accrue au développement de la maladie (Krishnan *et al.*, 2007).

1.6.3.4. Le stress chronique imprédictible modéré

Le stress peut conduire à une perturbation de l'homéostasie de l'organisme, mais seulement lorsqu'il est de longue durée. Il participe alors aux facteurs étiologiques de la dépression en engendrant un déséquilibre des neurotransmetteurs cérébraux, des dysfonctionnements neuroendocriniens et une altération de la neuroplasticité. *A contrario* des procédures qui s'appuient sur l'exposition à un stress aigu relativement aversif, le modèle de stress chronique imprédictible modéré (*unpredictable chronic mild stress*, UCMS) a été développé pour étudier les changements comportementaux, physiologiques et neurobiologiques qui résultent de l'aspect chronique du stress. Le modèle d'UCMS a donc pour objectif de reproduire un état « dépressif-like » qui se développe progressivement en réponse à la chronicité du stress, en analogie avec les données étiopathogéniques et physiopathologiques de la dépression.

La conception de ce paradigme fut tout d'abord initiée par Richard Katz et ses collègues en 1981, pour être par la suite plus largement développé par Paul Willner qui posa les fondements de base du modèle encore utilisé actuellement (Katz *et al.*, 1981a ; Katz *et al.*, 1981b ; Willner *et al.*, 1987 ; Willner, 1997). Classiquement, les rats ou les souris sont exposés à une série de stresseurs sociaux et environnementaux d'intensités faibles à modérées durant plusieurs semaines, à raison d'un à deux par jour durant plusieurs heures. L'exposition séquentielle et imprédictible aux stresseurs diminue la

probabilité d'habituation de l'animal (Magarinos et McEwen, 1995a ; Aguilera, 1998 ; Tannenbaum *et al.*, 2002). L'efficacité du modèle d'UCMS est ainsi davantage basée sur la chronicité et l'imprédictibilité des facteurs de stress plutôt que sur leurs caractéristiques individuelles, ce qui confère à ce paradigme une forte validité de construction.

L'exposition à un protocole d'UCMS entraîne des altérations comportementales, en particulier le développement d'une anhédonie, caractéristique commune à toutes les formes de dépression, dont la mesure est considérée comme un critère d'évaluation quantifiables de l'efficacité du modèle. D'autres changements comportementaux peuvent apparaître à la suite d'un protocole d'UCMS, comme une diminution des comportements auto-centrés, qu'il est possible de mesurer grâce à l'activité de toilettage (Surget et Belzung, 2008), ou des perturbations du sommeil relativement similaires à celles observées chez les sujets dépressifs, comme une réduction de la latence d'apparition du sommeil paradoxal et une augmentation de sa durée (Cheeta *et al.*, 1997 ; Grønli *et al.*, 2004). Le protocole d'UCMS engendre également des altérations neuroplastiques, neuroendocrines, neurochimiques et moléculaires en analogie avec les symptômes de la dépression, comme l'hyperactivité de l'axe HPA ou des anomalies du système immunitaire (Willner, 2005). Tous ces changements se développent progressivement au fil du temps suite à l'exposition aux différents stressseurs, ce qui suggère une très bonne validité de face comparée aux autres modèles utilisant un stress aigu.

Ces altérations peuvent être atténuées, voire abolies par un traitement chronique aux antidépresseurs de plusieurs classes (Willner *et al.*, 1992 ; Papp *et al.*, 1996 ; Willner, 1997), indiquant également une bonne validité prédictive. Cependant, toutes les souches de souris ne sont pas sensibles de la même manière à l'UCMS et aux antidépresseurs (Ibarguen-Vargas *et al.*, 2008). Une lignée de souris consanguine, la BALB/c, répond particulièrement bien à ce modèle de dépression, en présentant à la fois un grand nombre d'altérations neurobiologiques, physiques et comportementales, et en étant sensible à quatre types d'antidépresseurs, à savoir l'imipramine (antidépresseur tricyclique qui inhibe la recapture de la sérotonine et de la noradrénaline), la désipramine (antidépresseur tricyclique plus spécifique de la recapture de la noradrénaline), la maprotiline (antidépresseur tétracyclique qui inhibe fortement la recapture de la noradrénaline mais pas de la sérotonine), et la fluoxétine (antidépresseur inhibiteur de la recapture sélectif de la sérotonine) (Yalcin *et al.*, 2008). De plus, l'UCMS est capable d'induire des changements transcriptionnels dans l'amygdale,

le cortex cingulaire et le gyrus denté de l'hippocampe chez la souris BALB/c, qui sont contrecarrés par un traitement chronique à la fluoxétine ou à un antagoniste des récepteurs CRH1 (Surget *et al.*, 2009). En sélectionnant des souches particulières selon les différents aspects de la dépression que l'on souhaite investiguer, l'UCMS est donc adapté à l'étude de gènes associés à une vulnérabilité au stress, à des symptômes spécifiques de la dépression et à la résistance au traitement thérapeutique.

Ces observations sont capitales car elles soulignent l'idée que ce modèle induit un état dépressif-*like* avec un large pattern d'altérations alors que la plupart des autres paradigmes n'utilisent en général qu'une seule mesure. L'UCMS est donc un modèle approprié quand il s'agit d'étudier précisément les mécanismes neurobiologiques liés à la pathophysiologie et au traitement de la dépression (Surget et Belzung, 2008). Ces caractéristiques font de l'UCMS un outil de recherche précieux. En outre, la plupart des études basées sur ce modèle utilisent le rat et peu de travaux ont été réalisés chez la souris, qui est pourtant une espèce modèle dans bien des travaux comme par exemple les invalidations génétiques. Les caractéristiques uniques de l'UCMS lui permettent de résoudre des questions qui ne seraient pas accessibles par d'autres approches.

Malgré les nombreux avantages conceptuels de ce modèle, il possède néanmoins certains inconvénients. Tout d'abord, la mise en place d'un tel protocole est contraignante et très couteuse en temps. Ensuite, les résultats peuvent diverger d'un laboratoire à l'autre, voire d'un protocole à l'autre. Toutefois, il faut noter que les procédures d'UCMS varient souvent en terme de durée, de stressseurs et de leurs combinaisons, d'imprédictibilité, d'espèces et de lignées utilisées, de traitements et de mesures, ce qui pourrait participer à expliquer les différences observées entre laboratoires. Une bonne standardisation de la procédure permet de minimiser ces variations. Il est aussi nécessaire de garder à l'esprit que la dépression majeure se caractérise par une grande hétérogénéité des symptômes, qui sont extrêmement dépendants des caractéristiques individuelles de chaque sujet. Les individus ne réagissent pas de la même manière alors même qu'ils sont confrontés à des événements stressants relativement analogues. Cette hétérogénéité clinique pourrait donc également se retrouver dans ce modèle.

2. Le système orexinergique / hypocrétinergique

Comme nous avons pu le voir dans la première partie de cette introduction de thèse, la dépression est caractérisée par d'importants dysfonctionnements de nombreuses structures du système nerveux, dont les principales causes et/ou conséquences sont une dérégulation de l'axe du stress, des altérations de la neuroplasticité, et une perturbation de la neurotransmission monoaminergique. De tels désordres neurobiologiques engendrent nécessairement des altérations dans des systèmes neuronaux connexes qui, s'ils ne participent pas directement à l'étiopathogenèse de la dépression majeure, peuvent sous-tendre l'apparition de symptômes comme les troubles du sommeil, la perte ou prise de poids, l'anhédonie ou le sentiment de stress et d'anxiété. De fait, de par l'importance de leurs effets centraux, les neuropeptides ont été particulièrement étudiés dans le cadre des troubles de l'humeur, comme la CRH, la vasopressine, l'hormone de mélanocortine, la substance P, le neuropeptide Y, la galanine, etc.

Mais parmi tous les neuropeptides semblant jouer un rôle dans la physiopathogenèse des troubles dépressifs, les orexines ont particulièrement attiré l'attention des chercheurs, puisque ces peptides sont impliqués dans la régulation de plusieurs fonctions physiologiques et comportementales qui sont altérées dans la dépression majeure, comme le sommeil et de l'état de veille, les comportements alimentaires, la motivation et les émotions. Les orexines, également nommées hypocrétines, ont été découverts en 1998, et dès lors, de plus en plus d'études se sont attachées à en comprendre les caractéristiques et le fonctionnement, à en juger par le nombre croissant d'articles qui leur ont été consacrés depuis leur découverte (Figure 7).

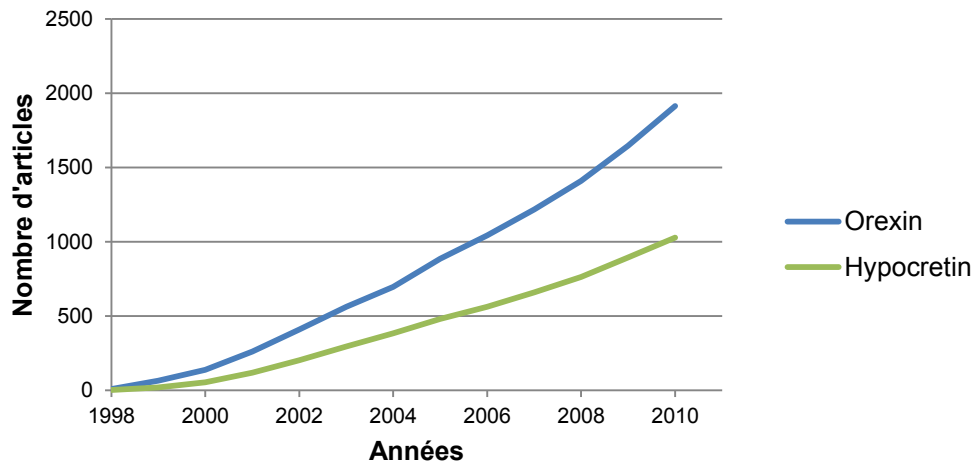


Figure 7. Nombre d'articles parus et recensés dans la base de données Medline depuis la découverte des orexines en 1998. En 2010, près de 2000 articles traitant du système orexinergique ont été publiés. Il est intéressant de noter que le terme « orexine » est presque deux fois plus utilisé que le terme « hypocréatine ».

2.1. La découverte des orexines et des hypocrélines

C'est dans le contexte de la recherche sur l'obésité, un des principaux problèmes de santé publique aux Etats-Unis (Shields *et al.*, 2011), qu'intervint la découverte des hypocrélines à la fin des années 90. Le groupe de Gregor Sutcliffe, basé au Scripps Research Institute de La Jolla en Californie, s'intéressait alors à l'identification de peptides pouvant jouer un rôle dans le contrôle de la prise alimentaire et de la régulation du poids corporel. Leur objectif était d'identifier des peptides synthétisés uniquement dans l'hypothalamus, puisque cette structure est connue depuis longtemps pour être le centre du contrôle de l'appétit. En effet, des lésions de l'hypothalamus médial chez le rat et d'autres animaux pouvait entraîner une obésité, alors qu'une lésion de l'hypothalamus latéral produisait une profonde anorexie (Levitt et Teitelbaum, 1975). De plus, il était raisonnable de penser que les récepteurs pour des peptides produits dans cette région seraient des cibles idéales pour des manipulations pharmacologiques. Ils utilisèrent donc la technique de clonage par soustraction pour identifier des ARN messagers (ARNm) exprimés spécifiquement dans l'hypothalamus. Cette technique leur permit en 1996 d'identifier trente-huit ARNm, dont ceux de peptides déjà bien connus comme l'ocytocine, la vasopressine et la pro-opiomélanocortine (POMC). Cependant un des clones d'ADN

complémentaires, le clone 35, codait un peptide encore inconnu (Gautvik *et al.*, 1996). L'expression de l'ARNm correspondant à ce clone 35 fut circonscrite au niveau postérieur et latéral de l'hypothalamus. En janvier 1998, ils identifièrent le polypeptide d'environ 130 acides aminés issu de la séquence nucléotidique du clone 35, qu'ils nommèrent prépro-hypocrétine, précurseur de deux peptides co-localisés d'environ 39 et 29 acides aminés (de Lecea *et al.*, 1998). De par leur localisation exclusivement hypothalamique et leur homologie avec la sécrétine, ils furent nommés hypocrétine-1 (HCRT-1) pour le peptide de 39 acides aminés et hypocrétine-2 (HCRT-2) pour celui de 29 acides aminés. Comme nous le verrons par la suite, le choix de ces noms s'avérera judicieux puisque ne s'attachant pas à une fonction biologique particulière.

Au même moment, le groupe de Masashi Yanagisawa basé à l'Université du Texas adopta le raisonnement inverse en recherchant des ligands pour plusieurs « récepteurs orphelins ». Ces récepteurs orphelins étaient issus d'ADN complémentaires (ADNc, monocaténaire artificiellement synthétisé à partir d'un ARNm) ressemblants à ceux de récepteurs couplés à une protéine G connus ; pour découvrir la fonction de ces récepteurs, il fallait identifier leurs ligands. Pour un de ces récepteurs (HFGAN72), ils identifièrent deux peptides de 33 et de 28 acides aminés, ce dernier possédant 46 % d'homologie avec celui de 33 acides aminés. Notant que ce deuxième peptide avait beaucoup moins d'affinité pour le récepteur que le premier, ils émirent l'hypothèse de l'existence d'un deuxième récepteur pour ces peptides. Des recherches dans les bases de données génomiques permirent l'identification d'un second récepteur encodé par un gène présentant certaines similarités avec le gène du premier récepteur. Conscients du rôle de l'hypothalamus dans la régulation du comportement alimentaire, ils observèrent que l'injection intracérébroventriculaire de ces peptides à des rats augmentait la prise alimentaire. Par conséquent, ils nommèrent ces peptides les orexines (orexine-A pour le peptide à 33 acides aminés et orexine-B pour celui à 28 acides aminés), dérivé du mot grec *orexis* (appétit). Cependant, ce choix s'avéra peu approprié puisque le rôle de ces peptides se révéla être beaucoup plus large qu'un simple effet sur l'appétit. Leurs travaux furent publiés moins d'un mois plus tard après ceux de l'équipe de Gregor Sutcliffe (Sakurai *et al.*, 1998), et il apparut rapidement que l'HCRT-1 et l'HCRT-2 étaient identiques respectivement à l'orexine-A (OX-A) et l'orexine-B (OX-B).

2.2. Physiologie du système orexinergique

L'hypothalamus est situé à la base du diencephale, et comprend un grand nombre de noyaux différents dont chacun possède sa propre combinaison de connexion et de fonctions. Ces noyaux aux interconnexions complexes permettent à l'hypothalamus de réguler une variété considérable d'activités physiologiques et comportementales incluant le contrôle de la température corporelle, les activités sexuelles et la reproduction, le sommeil et les états de vigilance, le comportement alimentaire, les comportements d'attaque et de défense, les émotions, le contrôle des activités végétatives et les fonctions homéostatiques en général.

2.2.1. Les orexines

Le terme générique « orexines » désigne donc deux neuropeptides, provenant de l'hydrolyse de la prépro-orexine, à savoir l'orexine-A (OX-A, correspondant à l'hypocretine-1) composé de 33 aminoacides avec deux ponts disulfures, et l'orexine-B (OX-B, correspondant à l'hypocrétine-2) composé de 28 aminoacides formant probablement deux hélices α (de Lecea *et al.*, 1998 ; Sakurai *et al.*, 1998 ; Lee *et al.*, 1999). Chaque peptide est amidé en position C-terminale, et la glutamine en position N-terminale de l'OX-A est cyclisée pour donner naissance à un résidu pyroglutamyl. Les orexines chez l'Homme et les rongeurs sont très similaires, et seul l'OX-B diffère de seulement deux acides aminés (Sakurai *et al.*, 1998). Beaucoup d'autres Vertébrés comme le poisson zèbre produisent aussi les orexines, mais les invertébrés semblent ne pas en synthétiser. Les orexines sont sécrétées par des neurones situés dans l'hypothalamus qui encerclent le fornix et s'étendent dans trois zones contigües : l'hypothalamus latéral (*lateral hypothalamus*, LH), l'aire périfornicale (*perifornical area*, PFA) et le noyau hypothalamique dorsomédian (*dorsomedial hypothalamus*, DMH) (de Lecea *et al.*, 1998 ; Peyron *et al.*, 1998 ; Sakurai *et al.*, 1998 ; Date *et al.*, 1999 ; Nambu *et al.*, 1999). Le cerveau humain contient entre 50000 et 80000 neurones orexinergiques (Thannickal *et al.*, 2000 ; Fronczek *et al.*, 2005), ce nombre étant estimé à 3000 dans celui du rat (Peyron *et al.*, 1998 ; Date *et al.*, 1999 ; Nambu *et al.*, 1999). *A contrario* de leur localisation hypothalamique restreinte, les neurones orexinergiques projettent vers de nombreuses régions du système nerveux central (Figure 8), en particulier le cortex cérébral, le système limbique (amygdale, noyau du lit de la strie terminale, et hippocampe), le thalamus (en particulier le noyau paraventriculaire), l'hypothalamus (noyau arqué et noyau tubéromamillaire), le tronc cérébral (substance

grise périaqueducale, locus cœruleus, aire tegmentale ventrale et noyaux du raphé) et la moelle épinière (Peyron *et al.*, 1998 ; Date *et al.*, 1999 ; Nambu *et al.*, 1999 ; van den Pol, 1999). Ces projections permettent au système orexinergique d'occuper une position essentielle au sein du système nerveux central lui permettant de coordonner et de réguler l'activation de nombreux autres systèmes neuronaux. Les neurones à orexines reçoivent également de nombreuses afférences, notamment d'autres noyaux hypothalamiques, de l'amygdale, du cortex insulaire, du noyau accumbens, de l'aire tegmentale ventrale, et des noyaux monoaminergiques du tronc cérébral (Chou *et al.*, 2003 ; Sakurai *et al.*, 2005 ; Yoshida *et al.*, 2006).

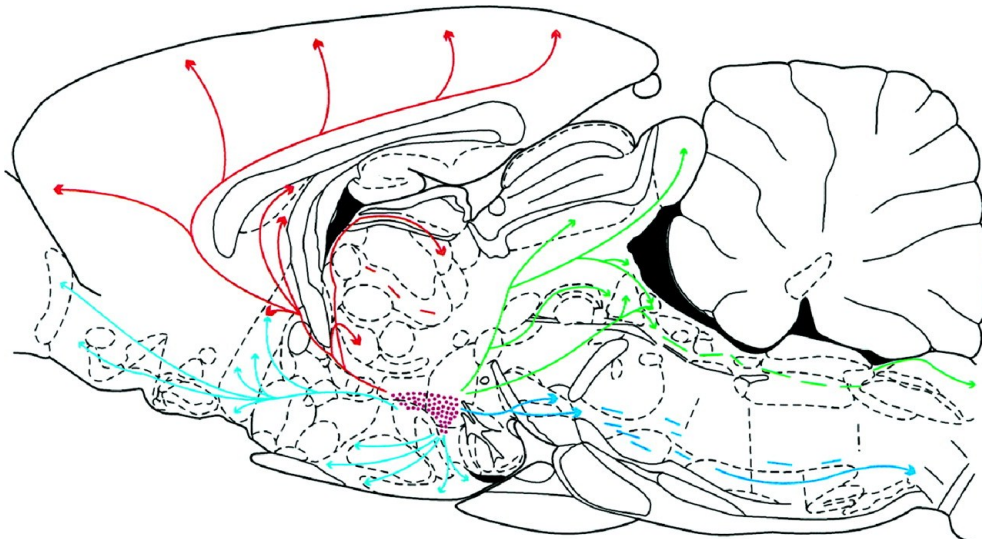


Figure 8. Schéma des principales projections orexinergiques ascendantes et descendantes du cerveau de rat. D'après Peyron *et al.*, 1998.

Les neurones à orexines ne forment pas un ensemble uniforme de cellules, puisque plusieurs études ont montré qu'il existait deux sous-populations de neurones orexinergiques qui possèdent des fonctions différentes comme nous le verrons dans les paragraphes suivants (Harris et Aston-Jones, 2006). Les neurones à orexines dans la partie latérale de l'hypothalamus (LH) semblent particulièrement impliqués dans le circuit de la récompense (Fadel et Deutch, 2002 ; Harris *et al.*, 2005 ; Harris *et al.*, 2007), alors que ceux localisés dans la partie dorsomédiale et périfornicale de l'hypothalamus (DMH-PFA) semble davantage sollicités pour le maintien de l'état de veille et la régulation

de la réponse de stress (Estabrooke *et al.*, 2001 ; Sakamoto *et al.*, 2004 ; Winsky-Sommerer *et al.*, 2004). Cette dichotomie fonctionnelle est renforcée par le fait que chaque sous-ensemble de neurones ne possèdent pas exactement les mêmes afférences (Yoshida *et al.*, 2006).

La plupart des recherches concernant le système orexinergique se sont concentrées sur le cerveau, mais quelques travaux ont montré la présence d'orexines, souvent en petite quantité, en dehors du système nerveux central. Les testicules contiennent un taux modéré d'ARNm de prépro-orexine, mais l'expression des récepteurs semble bas (Sakurai *et al.*, 1998 ; Jöhren *et al.*, 2001). La présence d'orexines et de récepteurs à orexines a aussi été démontrée au niveau des corticosurrénales (ce point sera discuté dans le paragraphe 2.3.2) (Jöhren *et al.*, 2001 ; López *et al.*, 2010). Enfin, des neurones orexinergiques ont aussi été décrits au niveau de l'estomac et du petit intestin (Kirchgessner et Liu, 1999), mais il pourrait s'agir d'un peptide différent qui interagirait avec les antisérums pour les orexines (Baumann *et al.*, 2008).

Les neurones sécrétant les orexines produisent également du glutamate, des dynorphines, et probablement d'autres neuropeptides dérivés de la préprodynorphine (Chou *et al.*, 2001 ; Crocker *et al.*, 2005). Actuellement, on ne connaît que peu de choses sur le rôle de ces co-neurotransmissions ou sur les conditions dans lesquelles ces neurotransmetteurs sont co-libérés, mais ils pourraient être physiologiquement significatifs, puisque la co-administration de dynorphines semble potentialiser l'action des orexines (Eriksson *et al.*, 2004).

2.2.2. Les récepteurs à orexines

Les effets physiologiques des orexines vont s'exercer en se liant sélectivement à deux récepteurs, le récepteur orexine-1 ou récepteur hypocrétine-1 (OX1 ou HCRT1R) et le récepteur orexine-2 ou hypocrétine-2 (OX2 ou HCRT2R) (Sakurai *et al.*, 1998). Ce sont des récepteurs couplés à une protéine G à 7 domaines transmembranaires, possédant certaines similarités avec d'autres récepteurs de neuropeptides. Les récepteurs à orexines sont très conservés chez les mammifères, leurs séquences d'acides aminés entre les humains et les rats étant similaires à 94 % (Sakurai *et al.*, 1998).

Les orexines ne se lient pas de la même manière aux deux types de récepteurs, puisque le récepteur OX1 possède une bien plus grande affinité pour l'OX-A, qui en situation de liaison compétitive possède une concentration inhibitrice à 50 % (CI₅₀) de 20 nM, alors que la CI₅₀ de

l'OX-B pour le récepteur OX1 est de 420 nM (Sakurai *et al.*, 1998). Même si le récepteur OX2 partage 64 % d'homologie avec le récepteur OX1, il est néanmoins moins sélectif, se liant à la fois à l'OX-A et l'OX-B avec une grande affinité (CI₅₀ de 38 et 36 nM respectivement) (Sakurai *et al.*, 1998). Même s'ils possèdent une certaine similarité structurale avec d'autres récepteurs neuropeptidiques, les récepteurs orexinergiques ne possèdent pas d'affinité significative pour le neuropeptide Y (NPY), la sécrétine ou des peptides similaires (Sakurai *et al.*, 1998 ; Holmqvist *et al.*, 2001).

En concordance avec les importantes projections des neurones orexinergiques dans tout le système nerveux central, les récepteurs à orexines se distribuent très largement au sein des différentes structures innervées par le système orexinergique (Trivedi *et al.*, 1998 ; Lu *et al.*, 2000 ; Hervieu *et al.*, 2001 ; Marcus *et al.*, 2001 ; Cluderay *et al.*, 2002). Cependant, cette distribution n'est pas identique pour les deux types de récepteurs, certains noyaux comme le locus cœruleus, le noyau tegmental latérodorsal et le noyau tegmental pédonculopontin expriment presque exclusivement l'ARNm du récepteur OX1, alors que d'autres structures comme le noyau tubéromamillaire, le noyau accumbens et le noyau septal n'expriment pratiquement que le récepteur OX2. Cette distribution différentielle suggère des fonctions qui le sont également, même si beaucoup de régions comme les noyaux du raphé, l'aire tegmentale ventrale, l'amygdale et le cortex expriment les deux types de récepteurs. Néanmoins, on ne sait pas encore si les deux types de récepteurs sont exprimés par les mêmes neurones.

De nombreuses études ont montré que les orexines dépolarisent les neurones et augmente l'excitabilité et les potentiels d'action pendant plusieurs minutes (Hagan *et al.*, 1999 ; Bourgin *et al.*, 2000 ; Liu *et al.*, 2002 ; Arrigoni *et al.*, 2010). En général, le récepteur OX1 se couple à une protéine Gq, et le récepteur OX2 à une protéine Gq ou Gi/Go, mais les mécanismes de couplage semblent différer selon le type cellulaire et n'ont pas encore été complètement étudiés dans les neurones (Karteris *et al.*, 2001 ; Randeva *et al.*, 2001). De plus, les orexines peuvent agir au niveau présynaptique sur les terminaisons nerveuses en induisant la libération de GABA ou de glutamate, générant des effets complexes sur l'élément postsynaptique (van den Pol *et al.*, 1998 ; Liu *et al.*, 2002).

2.3. Fonctions des orexines

2.3.1. Régulation du sommeil et de l'état de veille

Le neurologue Autrichien Constantin Von Economo fut l'un des premiers à suggérer le rôle clef de l'hypothalamus dans la régulation du sommeil et de l'état de veille. En effet, durant l'épidémie d'encéphalite léthargique qui s'est répandue en Europe entre 1916 et 1927, il observa que les lésions provoquées par l'encéphalite dans l'hypothalamus postérieur engendraient des hypersomnies, alors que des lésions de l'hypothalamus antérieur provoquaient des insomnies¹. Près de 80 années plus tard, et comme le laissait pressentir ces premiers travaux, l'hypothalamus est toujours au cœur du système de contrôle du cycle veille/sommeil, qui est régulé par un processus complexe impliquant de nombreuses structures cérébrales et de nombreux neurotransmetteurs, formant schématiquement plusieurs systèmes activateur et/ou inhibiteur de sommeil (Saper *et al.*, 2001).

La régulation du sommeil et de l'état de veille est sous-tendue par l'interaction complexe de différents systèmes de neurotransmissions :

- Les neurones monoaminergiques (neurones noradrénergiques du locus coeruleus, neurones sérotoninergiques des noyaux du raphé, neurones histaminergiques du noyau tubéromammillaire) qui projettent vers le cortex cérébral, le thalamus et le tronc cérébral.
- Les neurones cholinergiques (prosencéphale basal, noyau tegmental pédonculopontin noyau tegmental latérodorsal) qui projettent vers divers noyaux thalamiques régulant les phases du sommeil.
- Les neurones GABAergiques (noyau préoptique ventrolatéral de l'hypothalamus) qui projettent vers les neurones monoaminergiques et cholinergiques.

Les neurones monoaminergiques vont être très actifs durant l'éveil, très peu actifs durant le sommeil à ondes lentes, et totalement inactifs durant le sommeil paradoxal. Ces neurones vont à la fois inhiber les neurones cholinergiques ainsi que les neurones GABAergiques pour maintenir l'état de veille. Les neurones cholinergiques vont quant à eux jouer un rôle particulier puisqu'ils vont être à la fois actifs durant l'état de veille et le sommeil paradoxal, participant à promouvoir l'arrivée de

¹ Von Economo, C. 1930. Sleep as a problem of localization. *J Nervous Mental Disord*, 71:249-259.

ce dernier en inhibant les neurones monoaminergiques. Enfin, les neurones GABAergique vont être actifs durant la phase de sommeil, particulièrement durant le sommeil à ondes lentes, et promouvoir celui-ci en inhibant les deux autres systèmes de neurotransmission. Ces différents jeux d'activation et d'inhibition participent à l'équilibre entre état de veille, sommeil à ondes lentes et sommeil paradoxal (Saper *et al.*, 2001).

Les neurones orexinergique, qui innervent les noyaux monoaminergiques et cholinergiques riches en récepteurs à orexines (Peyron *et al.*, 1998 ; Trivedi *et al.*, 1998 ; Horvath *et al.*, 1999b ; Marcus *et al.*, 2001 ; Yamanaka *et al.*, 2002), vont participer activement à la régulation de ces différents systèmes puisque plusieurs études fonctionnelles mettent en évidence le rôle de promoteur d'éveil du système orexinergique. En effet, l'injection intracérébroventriculaire d'OX-A, de même que son infusion dans les différents noyaux impliqués dans la régulation du cycle veille/sommeil, réduit le sommeil à ondes lentes et le sommeil paradoxal, et augmente l'état de veille (Hagan *et al.*, 1999 ; Bourgin *et al.*, 2000 ; Methippara *et al.*, 2000 ; Espana *et al.*, 2001 ; Huang *et al.*, 2001 ; Xi *et al.*, 2001). De nombreuses études électrophysiologiques *in vitro* ont également montré que les orexines augmentaient la fréquence des potentiels d'actions des neurones monoaminergiques et cholinergiques (Horvath *et al.*, 1999b ; Bayer *et al.*, 2001 ; Brown *et al.*, 2001 ; Eggermann *et al.*, 2001 ; Eriksson *et al.*, 2001 ; Burlet *et al.*, 2002 ; Liu *et al.*, 2002 ; van den Pol *et al.*, 2002 ; Yamanaka *et al.*, 2002), sans toutefois avoir d'effet sur les neurones GABAergiques (Eggermann *et al.*, 2001). De plus, grâce aux techniques optogénétiques qui permettent de photo-stimuler spécifiquement et directement des neurones exprimant un canal ionique photo-activable (la channelrodopsine-2), il a été montré que la stimulation des neurones à orexines augmentait la probabilité de transition du sommeil vers l'état de veille (Adamantidis *et al.*, 2007).

Le système orexinergique agit également en interaction avec d'autres neurotransmetteurs pour réguler le sommeil et l'état de veille. Les neurones histaminergiques joueraient un rôle important dans l'effet activateur de l'éveil des orexines, puisque l'effet promoteur de veille de l'injection intracérébroventriculaire d'OX-A est largement atténué par l'administration concomitante d'un antagoniste des récepteurs H1 à l'histamine (Yamanaka *et al.*, 2002), et est absent chez des souris *knock-out* pour ce même récepteur (Huang *et al.*, 2001). Considérant que les récepteurs OX2 sont abondamment exprimés dans le noyau tubéromamillaire, et que les souris *knock-out* OX2 présentent des fragmentations du cycle veille/sommeil (Trivedi *et al.*, 1998 ; Marcus *et*

al., 2001 ; Willie *et al.*, 2003), ces résultats suggèrent que le système histaminergique joue un rôle prépondérant dans la régulation de l'effet activateur de l'éveil de l'OX-A. En effet, les neurones orexinergiques et histaminergiques participent au contrôle de l'état de veille de manière distincte : l'histamine serait davantage responsable de l'activation électroencéphalographique corticale et des activités cognitives liées à l'état de veille, alors que les orexines seraient plus impliquées dans le maintien de l'état de vigilance comportementale au travers de la régulation du système nerveux végétatif (Anaclet *et al.*, 2009).

Les neurones à orexines ne se limitent pas à la promotion de l'éveil en innervant et en régulant les structures impliquées dans le contrôle du sommeil et de l'état de veille, puisque ces dernières renvoient de nombreuses efférences vers le système orexinergique (Sakurai *et al.*, 2005 ; Yoshida *et al.*, 2006). Les neurones GABAergiques, promoteurs de sommeil, vont en effet pouvoir inhiber le système orexinergique (Li *et al.*, 2002 ; Yamanaka *et al.*, 2003a ; Xie *et al.*, 2006), alors que les neurones cholinergiques, promoteurs d'éveil, vont les activer (Yamanaka *et al.*, 2003b ; Sakurai *et al.*, 2005). Ces travaux confortent le rôle renforçateur et stabilisateur de l'éveil des neurones à orexines, bien que ces derniers reçoivent aussi des projections inhibitrices des neurones sérotoninergiques et noradrénergiques qui soutiennent également l'éveil (Yamanaka *et al.*, 2003b ; Muraki *et al.*, 2004 ; Sakurai *et al.*, 2005 ; Yamanaka *et al.*, 2006). Ces rétrocontrôles négatifs peuvent être d'importance pour l'ajustement fin de l'activité neuronale orexinergique afin de stabiliser l'état de veille. Enfin, en plus des informations que reçoivent les neurones orexinergiques d'autres structures cérébrales, ceux-ci sont également sous l'influence de leur propre libération au travers d'interneurones glutamatergiques activateurs et GABAergiques inhibiteurs (Li *et al.*, 2002 ; Matsuki *et al.*, 2009).

La position centrale du système orexinergique au sein des structures régulant le sommeil et l'état de veille lui confère un rôle essentiel dans la stabilisation du rythme circadien. En effet, les neurones GABAergiques promoteurs de sommeil et les neurones monoaminergiques activateurs de veille s'inhibent réciproquement, formant un circuit de telle sorte que quand l'activité d'un côté commence à prendre l'ascendant sur l'autre, le système s'inverse brutalement, engendrant deux extrêmes possibles (Saper *et al.*, 2001). Même si ce système est bien adapté pour éviter les états intermédiaires, une petite perturbation de l'activité d'un côté peut facilement causer un changement d'état brutal, provoquant de fréquentes transitions d'un état à un autre. Une telle condition ressemble au phénotype

narcoleptique, se balançant entre état de veille et sommeil. Les orexines semblent fonctionner comme des stabilisateurs de ce circuit, en renforçant l'activité des neurones monoaminergiques durant l'éveil, permettant d'éviter un état d'instabilité causé par de petites perturbations. En même temps, le rétrocontrôle négatif qu'exercent les neurones sérotoninergiques et noradrénergiques sur les neurones à orexines permet de maintenir l'activité de ces neurones en les stabilisant en retour. Durant le sommeil, les neurones orexinergiques et noradrénergiques sont inhibés par les neurones GABAergiques, qui sont activés par des substances promotrices du sommeil telle que l'adénosine. D'ailleurs, l'adénosine pourrait aussi inhiber les neurones à orexines directement via le récepteur adénosine A1 (Liu et Gao, 2007).

L'activité des neurones à orexines, en tant que système stabilisateur du sommeil et de l'état de veille, varie au cours du cycle circadien. En effet, l'expression de la protéine Fos (indicateur d'activité neuronale) dans les neurones à orexines de rats est plus importante durant la phase active (lumières éteintes) que durant la phase de repos (lumières allumées) (Estabrooke *et al.*, 2001). De plus, le niveau d'OX-A dans le liquide céphalo-rachidien atteint un pic durant la période active et diminue durant la période de sommeil (Yoshida *et al.*, 2001). L'enregistrement électrophysiologique *in vivo* de l'activité des neurones orexinergiques a également confirmé ce pattern d'activation, les neurones à orexines déchargent plus activement durant la phase d'éveil actif, un peu moins durant la phase d'éveil passif, restent silencieux durant le sommeil profond, et présentent quelques décharges occasionnelles durant le sommeil paradoxal. Durant la transition du sommeil à l'état de veille, les neurones à orexines déchargent avant l'apparition de signes d'éveil électroencéphalographiques (Lee *et al.*, 2005a ; Takahashi *et al.*, 2008). Le pattern d'activation de ces neurones contraste clairement avec celui des neurones histaminergiques, qui présentent des décharges uniquement durant les phases d'éveil (Takahashi *et al.*, 2006). De manière générale, ces études démontrent bien que les neurones orexinergiques vont être actifs durant l'éveil et inhibés durant le sommeil, et dont l'activation va sous-tendre l'état de vigilance. Plus précisément, le fait que les neurones à orexines soient plus activés durant la phase d'éveil actif que durant la phase d'éveil passif suggère assez clairement que le rôle des orexines s'étend au-delà de la simple vigilance. Récemment, il a été montré que la délivrance nasale et systémique d'OX-A réduisait les effets de la privation de sommeil sur les performances cognitives de primates non-humains, alors que l'OX-A n'avait pas d'effets bénéfiques si l'animal n'avait pas été privé de sommeil (Deadwyler *et al.*, 2007). De plus, des études *in vitro* ont démontré que les orexines induisaient une activation des

fibres thalamo-corticales au niveau du cortex préfrontal chez le rat, indiquant que le système orexinergique serait capable d'augmenter la vigilance et les processus attentionnels déterminants pour les fonctions exécutives du cortex préfrontal (Lambe et Aghajanian, 2003 ; Lambe *et al.*, 2005).

2.3.2. Orexines et régulation de l'axe HPA

L'axe HPA est le principal système endocrinien de réponse au stress. Comme nous l'avons vu précédemment, les neurones à orexines projettent aussi vers des noyaux hypothalamiques comme le noyau arqué, le noyau supraoptique et surtout le noyau paraventriculaire de l'hypothalamus (*paraventricular nucleus*, PVN), point de départ de l'axe du stress. Au sein de l'hypothalamus, la distribution des récepteurs orexinergiques est relativement hétérogène, des études chez le rat ayant démontré que l'expression des récepteurs OX1 était largement restreinte aux noyaux ventromédian et dorsomédian, alors que l'expression des récepteurs OX2 était principalement cantonnée dans la partie latérale, dans les noyaux arqués, mamillaires et tubéromamillaires, ainsi que dans le PVN (Trivedi *et al.*, 1998 ; Lu *et al.*, 2000 ; Marcus *et al.*, 2001). Parmi les travaux n'ayant étudié l'expression que d'un seul type de récepteur, Cluderay et collaborateurs confirmèrent cette distribution des récepteurs OX2 (Cluderay *et al.*, 2002), alors qu'Hervieu et collaborateurs rapportèrent la présence d'ARNm des récepteurs OX1 dans tous les noyaux sus-énoncés n'exprimant que les OX2 (Hervieu *et al.*, 2001). Au niveau de l'hypophyse, même si la présence des orexines n'a pas pu être mise en évidence chez l'Homme (Arihara *et al.*, 2000), l'expression des deux types de récepteurs a été rapportée à la fois chez l'Homme et chez le rat (Date *et al.*, 2000 ; Johren *et al.*, 2001 ; Blanco *et al.*, 2001 ; Johren *et al.*, 2003). Les récepteurs OX2 seraient particulièrement présents sur les cellules basophiles sécrétant l'ACTH (Blanco *et al.*, 2001), alors que l'expression hypophysaire des récepteurs OX1 serait plus importante que celle des récepteurs OX2 chez le rat (Johren *et al.*, 2001).

Même si les orexines agissent principalement au niveau du système nerveux central, de nombreux travaux parfois divergents ont montré la présence de ces peptides et de ses récepteurs sur la branche périphérique de l'axe HPA. En effet, au niveau des glandes surrénales, la présence en petite quantité de la prépro-orexine et de l'OX-A a été mise en évidence chez l'Homme (Karteris *et al.*, 2001 ; Randeva *et al.*, 2001 ; Nakabayashi *et al.*, 2003), bien que ces données n'aient pas été confirmées par la suite ni chez l'Homme (Spinazzi *et al.*, 2005a), ni chez

le rat (López *et al.*, 1999 ; Karteris *et al.*, 2005). A l'instar de ces résultats, les travaux cliniques et précliniques ayant étudié la présence des récepteurs à orexines au niveau surrénalien ont abouti à des résultats très contradictoires concernant la co-expression ou non des deux types de récepteurs (Nanmoku *et al.*, 2000 ; Johren *et al.*, 2001 ; Karteris *et al.*, 2001 ; Randeva *et al.*, 2001 ; Blanco *et al.*, 2002 ; Johren *et al.*, 2003). Cependant, des travaux plus précis ont confirmé la présence des deux récepteurs à orexines, exprimés de manière différentielle au sein de la médullosurrénale et des trois couches de la corticosurrénale (López *et al.*, 1999 ; López *et al.*, 2001 ; Malendowicz *et al.*, 2001 ; Mazzocchi *et al.*, 2001 ; Ziolkowska *et al.*, 2005 ; Spinazzi *et al.*, 2005a ; Spinazzi *et al.*, 2005b). Dans la *zona fasciculata*, couche centrale de la corticosurrénale qui synthétise les glucocorticoïdes, les deux types de récepteurs à orexines sont exprimés.

Si beaucoup de travaux démontrent que d'une part la partie centrale de l'axe HPA est riche en fibres nerveuses provenant du système orexinergique et que, d'autre part, cet axe dans son ensemble est parsemé de récepteurs à orexines, une abondante littérature s'est aussi attachée à étudier les effets physiologiques des orexines sur l'axe du stress. De nombreuses études *in vivo* et *in vitro* chez le rat ont montré que les orexines augmentaient l'activité du PVN et la libération de CRH et de vasopressine (Kuru *et al.*, 2000 ; Al-Barazani *et al.*, 2001 ; Russell *et al.*, 2001 ; Samson *et al.*, 2002 ; Brunton et Russell, 2003). De plus, l'injection périphérique d'OX-A augmente de manière importante les niveaux d'ACTH et de corticostérone sanguins chez le rat (Malendowicz *et al.*, 1999). En revanche, la même administration d'OX-B n'a pas d'effet, ce qui s'accorde bien avec le fait que l'OX-A traverse rapidement la barrière hémato-encéphalique par simple diffusion, alors que l'OX-B est rapidement dégradée dans le sang (Kastin et Akerstrom, 1999). Si les injections intracérébroventriculaires d'OX-A, plus efficaces que les administrations périphériques, confirment les données précédentes (Jaszberenyi *et al.*, 2000 ; Kuru *et al.*, 2000 ; Ida *et al.*, 2000b ; Al-Barazani *et al.*, 2001 ; Russell *et al.*, 2001 ; Brunton et Russell, 2003), il est intéressant de souligner que l'OX-B semble généralement moins efficace que l'OX-A (Jaszberenyi *et al.*, 2000 ; Kuru *et al.*, 2000 ; Jaszberenyi *et al.*, 2001). D'autres travaux ont également montré que l'activité orexinergique est augmentée lors de l'exposition à des stress, durant laquelle l'administration des orexines amplifie les réponses endocrines de l'axe HPA (Ida *et al.*, 2000b ; Sakamoto *et al.*, 2004). Mais le système orexinergique ne fait pas que réguler l'action du PVN, puisqu'une étude a aussi démontré que des afférences provenant des neurones sécrétant la CRH innervent en retour les neurones à orexines, dont une sous-population exprime les récepteurs CRH1 et CRH2

(Winsky-Sommerer *et al.*, 2004). De plus, les neurones orexinergiques sont directement excités par la CRH au travers des récepteurs CRH1, puisque l'activation des neurones à orexines par la CRH ou par le stress est sévèrement et respectivement diminuée par un antagoniste des récepteurs CRH1 ou chez les souris ne possédant plus ce récepteur (Winsky-Sommerer *et al.*, 2004).

Les effets des orexines sur la sécrétion d'ACTH et de corticostérone semblent principalement s'exercer par la stimulation de la production hypothalamique de CRH et de vasopressine. En effet, les orexines n'affectent ni la libération basale d'ACTH dans des cultures de cellules hypophysaires de rats (Samson et Taylor, 2001), ni l'augmentation de l'expression de la pro-opiomélanocortine (POMC), précurseur protéique de l'ACTH, dans l'hypophyse (Al-Barazani *et al.*, 2001). De plus, des études *in vivo* ont démontré qu'un prétraitement avec un antagoniste de la CRH bloque l'augmentation induite par l'OX-A de la concentration plasmatique d'ACTH et de corticostérone chez le rat (Ida *et al.*, 2000b ; Samson *et al.*, 2002). Toutefois, on ne peut pas exclure une action directe des orexines sur la branche périphérique de l'axe du stress comme un éventuel effet potentialisateur. Des travaux ont effectivement démontré que seule l'OX-A, de manière dose-dépendante, augmentait la sécrétion basale de cortisol ou de corticostérone des cellules de rats et d'humain de la *zona fasciculata* (Mazzocchi *et al.*, 2001 ; Spinazzi *et al.*, 2005a). L'inefficacité de l'OX-B, qui se lie uniquement au récepteur 2, exclut l'implication de ce récepteur dans l'action directe du système orexinergique sur la sécrétion de glucocorticoïdes. Cette hypothèse est corroborée par le fait que le blocage des récepteurs 1 par un anticorps spécifique abolit l'effet de l'OX-A sur des cultures de cellules provenant de la *zona fasciculata* d'Homme et de rat, alors que l'immunoneutralisation des récepteurs 2 est inefficace (Ziolkowska *et al.*, 2005).

L'action stimulatrice du système orexinergique sur l'axe HPA pourrait être, au moins en partie, régulée par le neuropeptide Y (NPY), puisque qu'il a été démontré que l'OX-A augmentait la libération du NPY, et que l'effet potentialisateur de l'OX-A sur la libération de CRH et de corticostérone était bloqué par des antagonistes ciblant le NPY (Jaszberenyi *et al.*, 2001 ; Russell *et al.*, 2001). Cependant, d'autres données ne confirment pas l'implication du NPY dans la stimulation de l'axe HPA par les orexines. En particulier, il a été montré qu'une lésion néonatale du noyau arqué (qui synthétise le NPY) chez le rat perturbe l'augmentation de la prise alimentaire induite par l'administration d'OX-A, mais épargne la libération des glucocorticoïdes (Moreno *et al.*, 2005).

La plupart des études fonctionnelles ont été réalisées chez l'animal, et aucune donnée claire n'existe chez l'Homme. Néanmoins, il est à noter que les patient narcoleptiques (qui ne possèdent plus de neurones à orexines, comme nous le verrons au § 2.4) présentent un émoussement de la sécrétion d'ACTH et de cortisol (Kok *et al.*, 2002), ce qui suggère indirectement que le système orexinergique est impliqué dans la régulation centrale de l'axe HPA également chez l'Homme.

Tous ces travaux démontrent clairement que les orexines peuvent augmenter la sécrétion de glucocorticoïdes via deux mécanismes : la stimulation de la libération de CRH/vasopressine entraînant la sécrétion d'ACTH, et la stimulation de la *zona fasciculata*, responsable de la libération des glucocorticoïdes, qui possède des récepteurs à orexines. Même si les données ne sont pas toujours convergentes, plusieurs études indiquent que l'OX-A agit directement sur les corticosurrénales en utilisant la circulation sanguine. Cependant, le niveau d'OX-A circulant dans le système sanguin chez l'Homme et le rat est faible (Arihara *et al.*, 2001 ; Johren *et al.*, 2001 ; Johren *et al.*, 2003). La branche périphérique de l'axe du stress pourrait n'être donc directement stimulée par l'OX-A que lors d'une suractivation du système orexinergique. Le rôle des orexines dans les réponses de stress n'est donc plus à démontrer, mais à préciser. Il semblerait d'ailleurs que ces peptides soient plus particulièrement impliqués dans les stress dits « psychologiques » et moins dans les stress physiques. Le système orexinergique serait particulièrement sollicité lorsque le stress est associé à une vigilance accrue, et contrôlerait, entre autres, les réponses végétatives (comme l'activation cardiovasculaire) liées au stress « psychologique » (Furlong *et al.*, 2009).

2.3.3. Orexines et régulation du système de récompense

Le rôle des neurones à orexines dans les phénomènes d'addiction et de motivation a été particulièrement bien documenté ces dernières années. Les projections dopaminergiques des neurones de l'aire tegmentale ventrale vers le noyau accumbens, ont classiquement été identifiées comme la « voie de la récompense », et les neurones à orexines partagent des connexions réciproques avec ces structures (Peyron *et al.*, 1998 ; Fadel et Deutch, 2002 ; Yoshida *et al.*, 2006). Les orexines activent directement les neurones dopaminergiques de l'aire tegmentale ventrale à travers les récepteurs 1 (Nakamura *et al.*, 2000 ; Korotkova *et al.*, 2003), tandis que la dopamine peut inhiber les neurones à orexines au travers des adrénorécepteurs α -2 et/ou des

récepteurs D2 de la dopamine (Yamanaka *et al.*, 2003b ; Li et van den Pol, 2005 ; Yamanaka *et al.*, 2006).

De nombreuses études sur l'addiction utilisent le paradigme de préférence conditionnée de lieu, qui évalue les préférences pour des stimuli environnementaux associés à des renforçateurs. Dans ce paradigme, l'activation des neurones orexinergiques du LH (et non pas du DMH-PFA) est fortement liée à la préférence d'indices associés à une récompense sous forme de nourriture, de cocaïne ou de morphine (Harris *et al.*, 2005). De plus, l'injection périphérique d'un antagoniste des récepteurs OX1, ou directement dans l'aire tegmentale ventrale, bloque la préférence conditionnée de lieu associée à la morphine (Harris *et al.*, 2005 ; Narita *et al.*, 2006 ; Harris *et al.*, 2007 ; Sharf *et al.*, 2010a). Au contraire, la stimulation des neurones orexinergiques du LH, tout comme l'administration d'OX-A directement dans l'aire tegmentale ventrale, rétablit le comportement de recherche de morphine après une phase d'extinction (Harris *et al.*, 2005). Chez des souris *knock-out* OX^{-/-}, l'injection de morphine n'induit pas de préférence conditionnée de lieu (Narita *et al.*, 2006), mais il est possible que le phénotype narcoleptique de ces souris puisse biaiser les résultats, puisqu'une autre étude n'a pas montré de différence entre les souris OX^{-/-} et les souris sauvages (Sharf *et al.*, 2010a). Dans des paradigmes d'auto-administration où l'appui de l'animal sur un levier entraîne la délivrance de drogues ou de nourriture palatable, l'injection d'un antagoniste des récepteurs OX1 diminue l'auto-administration d'alcool, de nourriture ou de drogues (Thorpe *et al.*, 2005 ; Lawrence *et al.*, 2006 ; Hollander *et al.*, 2008 ; Nair *et al.*, 2008 ; Sharf *et al.*, 2010b). Après une phase d'extinction, l'administration intracérébroventriculaire d'OX-A rétablit l'auto-administration de nourriture et de cocaïne (Boutrel *et al.*, 2005 ; Wang *et al.*, 2009).

Même si les études décrites ci-dessus indiquent que le système orexinergique est important pour l'association drogue/stimulus, l'administration volontaire et le rétablissement de la recherche de drogue et de nourriture, d'autres travaux ont été consacrés à l'étude de l'implication des orexines dans la motivation sous-tendant ces comportements. Les paradigmes utilisés demandent souvent peu d'efforts à l'animal pour obtenir la récompense. En augmentant progressivement le nombre d'appui nécessaire à la délivrance du renforçateur, on peut quantifier l'effort que fournit l'animal, et donc sa motivation pour obtenir la récompense. En utilisant ce paradigme, des études ont montré que le blocage du système orexinergique, de manière périphérique ou spécifiquement dans l'aire tegmentale ventrale, diminuait la motivation à obtenir le renforçateur (Hollander *et al.*, 2008

; Borgland *et al.*, 2009 ; Espana *et al.*, 2010), alors que l'administration d'OX-A augmentait la motivation à obtenir la récompense (Thorpe *et al.*, 2005).

Le système orexinergique est également capable de participer à la régulation du circuit de la récompense en agissant directement au niveau du noyau accumbens, en interaction avec les opioïdes endogènes. En effet, les neurones à orexines co-expriment des dynorphines, qui peuvent réguler l'activité du noyau accumbens (Mu *et al.*, 2011). L'injection d'OX-A dans l'aire tegmentale ventrale induit une augmentation de la libération de dopamine dans le noyau accumbens (Narita *et al.*, 2006 ; Narita *et al.*, 2007 ; Vittoz *et al.*, 2008). Enfin, l'infusion d'OX-A dans le noyau accumbens augmente le comportement alimentaire (Thorpe et Kotz, 2005), et l'injection périphérique, centrale et dans le noyau accumbens d'un antagoniste opioïdérique bloque la prise alimentaire induite par l'infusion d'OX-A dans l'hypothalamus latéral (Sweet *et al.*, 2004).

L'ensemble de ces travaux démontre le rôle clef des neurones à orexines, en particulier ceux localisés dans la partie latérale de l'hypothalamus, dans la régulation du système de récompense, à la fois dans sa composante motivationnelle (le « *wanting* »), en contrôlant la libération de dopamine dans l'aire tegmentale ventrale, et dans sa composante affective (le « *liking* »), en agissant directement sur le noyau accumbens en interaction avec les opioïdes endogènes. De plus, en augmentant la libération de CRH qui participe également à la régulation du système de récompense (Koob, 2008), le système orexinergique s'avère être un acteur majeur participant à l'ensemble des processus mis en œuvre pour initier et maintenir les comportements de motivation et de plaisir, à l'instar du rôle facilitant des orexines dans le comportement sexuel de rats mâles (Muschamp *et al.*, 2007).

2.3.4. Orexines et régulation du comportement alimentaire

L'hypothalamus latéral est depuis longtemps connu pour être le principal centre de régulation de l'appétit (Delgado et Anand, 1953 ; Brobeck *et al.*, 1956). De par la localisation spécifiquement hypothalamique des neurones à orexines et au regard des premières études sur les effets de ces peptides sur le comportement alimentaire, les scientifiques ont tôt fait de catégoriser les orexines comme de simples agents orexigènes. De fait, les premiers effets de l'augmentation

de la prise alimentaire suite aux injections intracérébroventriculaires d'OX-A (Sakurai *et al.*, 1998) furent par la suite confirmés par d'autres travaux (Edwards *et al.*, 1999 ; Haynes *et al.*, 1999 ; Ida *et al.*, 1999 ; Yamanaka *et al.*, 1999), soutenus davantage par le fait que le blocage pharmacologique ou génétique de tout ou partie du système orexinergique réduisait la prise calorique (Haynes *et al.*, 2000 ; Yamada *et al.*, 2000 ; Hara *et al.*, 2001 ; Willie *et al.*, 2001). D'un point de vue anatomique, les neurones à orexines possèdent de denses et réciproques connexions avec d'autres noyaux hypothalamiques régulant le comportement alimentaire, comme le noyau arqué (principal site de libération du neuropeptide Y qui participe à l'augmentation de la prise alimentaire) et le noyau hypothalamique ventromédial (*ventromedial hypothalamic nucleus*, VMH) (Broberger *et al.*, 1998 ; Elias *et al.*, 1998 ; Peyron *et al.*, 1998 ; Date *et al.*, 1999 ; Horvath *et al.*, 1999a ; Li *et al.*, 2002 ; Sakurai *et al.*, 2005). Plusieurs études ont montré que l'augmentation de la prise alimentaire induite par l'injection d'OX-A impliquait en partie l'activation de la sécrétion de neuropeptide Y et l'inhibition de l'axe HPA et des neurones pro-opiomélanocortinergiques (régulant la sensation de satiété en interaction avec la leptine) dans le noyau arqué (Yamanaka *et al.*, 2000 ; Ida *et al.*, 2000a ; Muroya *et al.*, 2004).

Il est intéressant de noter que les patients narcoleptiques présentent généralement une diminution de la prise alimentaire qui s'accompagne paradoxalement d'une prise de poids sur le long terme (Lammers *et al.*, 1996 ; Schuld *et al.*, 2000), phénomène qui est également observé chez des souris génétiquement modifiées pour ne plus posséder de neurones à orexines (Hara *et al.*, 2001). Il semble donc que la réalité soit plus complexe qu'un simple effet sur la consommation de nourriture, et que les orexines agissent sur le comportement alimentaire plus subtilement que ne le laissait présager les premiers travaux. Contrairement aux autres facteurs orexigéniques qui augmentent la prise alimentaire en diminuant la dépense énergétique, comme le NPY ou la MCH (Spiegelman et Flier, 2001), les orexines augmentent à la fois la prise alimentaire et la dépense énergétique (Lubkin et Stricker-Krongrad, 1998 ; Hara *et al.*, 2001). Cependant, en cas de pénurie alimentaire, cette dernière réponse semble beaucoup moins adaptative pour préserver les réserves caloriques. L'augmentation de la dépense énergétique par l'administration d'orexines semble être causée par l'augmentation de l'état de veille, de l'activité locomotrice, et de l'activité du système nerveux autonome en stimulant physiologiquement les décharges sympathiques (Kotz, 2006 ; Teske *et al.*, 2010 ; Kuwaki, 2011). Une déficience orexinergique diminuerait donc le tonus sympathique, réduisant ainsi la dépense énergétique, ce

qui pourrait expliquer pourquoi la narcolepsie chez l'Homme ou la souris est très souvent associée à une augmentation du poids corporel malgré leur hypophagie (Lammers *et al.*, 1996 ; Schuld *et al.*, 2000 ; Hara *et al.*, 2001). *A contrario*, en augmentant la dépense énergétique, le système orexinergique n'agirait pas simplement comme homéostat du poids corporel et du comportement alimentaire, mais serait également impliqué dans la recherche de nourriture, en particulier quand l'animal fait face à une pénurie alimentaire. Quand les mammifères font face à une balance énergétique négative due à une réduction de la disponibilité de nourriture, ils répondent comportementalement par une augmentation de l'état de veille et de la vigilance permettant d'optimiser la recherche de nourriture, mais entraînant en même temps une dépense énergétique accrue (Challet *et al.*, 1997 ; Yamanaka *et al.*, 2003a).

Plusieurs études ont d'ailleurs montré que les neurones à orexines étaient sensibles aux indicateurs de la balance énergétique en étant activés en cas d'hypoglycémie (Moriguchi *et al.*, 1999 ; Yamanaka *et al.*, 2003a ; Burdakov *et al.*, 2005 ; Venner *et al.*, 2011). De plus, le système orexinergique est respectivement activé et inhibé par la ghréline, une hormone stomacale qui stimule l'appétit, et par la leptine, une hormone sécrétée par les adipocytes induisant la satiété (Yamanaka *et al.*, 2003a). Un jeûne nocturne chez des souris augmente l'activation du système orexinergique par un phénomène de synaptogenèse et qui est diminuée par le retour de l'alimentation (Horvath et Gao, 2005). Ce renforcement de l'activité orexinergique sous-tendrait un état de vigilance accrue, alors que chez des souris ne possédant plus de neurones à orexines, le jeûne n'induit aucun éveil comportemental (Yamanaka *et al.*, 2003a), indiquant que le système orexinergique est bien nécessaire au comportement de vigilance adaptatif lors d'un manque de nourriture.

Tous ces travaux illustrent l'importance des neurones à orexines dans le maintien de l'homéostasie énergétique en régulant la vigilance, par le contrôle coordonné de l'axe HPA, du système nerveux sympathique et la prise alimentaire.

2.4. Orexines et narcolepsie/cataplexie

Décrite dès 1877 par Carl Westphal¹, puis en 1880 par Jean-Baptiste Gélinau², la narcolepsie est une maladie neurologique débilitante qui affecte approximativement 1 personne sur 2000 aux Etats-Unis (Mignot, 1998). L'âge d'apparition de la narcolepsie est très variable, mais la maladie survient généralement durant l'adolescence, avec un pic de diagnostic entre 12 et 15 ans. La symptomatologie clinique repose sur la tétrade narcoleptique :

- Somnolence diurne excessive culminant en des accès de sommeil quasiment incontrôlables et quotidiens. C'est habituellement le premier symptôme qui survient.
- Attaques de cataplexies ou relâchements musculaires (atonie musculaire) brusques survenant en plein éveil, favorisée par les émotions. Les cataplexies sont soit généralisées entraînant une chute, soit localisées aux membres supérieurs ou à la mâchoire.
- Hallucinations hypnagogiques (à l'endormissement) ou hypnopompiques (au réveil) visuelles, mais aussi auditives ou kinesthésiques parfois à tonalité très vive et effrayante.
- Paralysies du sommeil survenant également au moment de l'endormissement ou du réveil au cours desquels le sujet éveillé ne peut pas bouger.

A ces quatre signes cardinaux s'ajoutent la dyssomnie nocturne avec éveils, cauchemars, voire parasomnie (par exemple des troubles du comportement lors du sommeil paradoxal). De plus, la latence d'apparition du sommeil paradoxal est fortement réduite chez les patients narcoleptiques, jusqu'à apparaître parfois immédiatement après l'état de veille.

C'est en 1999, un an après la découverte des orexines, que furent publiées les premières études précliniques établissant un lien entre une déficience du système orexinergique et la narcolepsie/cataplexie. L'équipe de Masashi Yanagisawa de l'Université du Texas observa que des souris *knock-out* déficientes en orexines (OX^{-/-}) présentaient des relâchements musculaires fréquents et inopinés durant la phase active associés à des transitions directes de l'état de veille au sommeil paradoxal, en analogie aux attaques de cataplexie chez l'Homme

¹ Westphal C (1877). Eigenthümliche mit Einschlafen verbundene. *Anfälle. Archiv Psychiatr Nervenkr*, 7:631-635.

² Gélinau J (1880). De la narcolepsie. *Gazette des hôpitaux civils et militaires*, 53:626-628 et 54:635-637.

(Chemelli *et al.*, 1999). De plus, les souris OX^{-/-} souffraient d'une diminution de l'état de veille, une augmentation du sommeil à ondes lentes et paradoxal, une diminution de la latence d'apparition du sommeil paradoxal, ainsi qu'une incapacité à maintenir de longues périodes d'éveil. Au même moment, l'équipe d'Emmanuel Mignot de l'Université Stanford en Californie identifia des mutations dans le gène du récepteur OX2 responsable de la narcolepsie/cataplexie canine (Lin *et al.*, 1999).

Peu de temps après ces premières études, une déficience orexinergique chez les patients atteints de narcolepsie/cataplexie fut confirmée, puisqu'à la différence des individus sains, la grande majorité d'entre eux présentent un très faible voire indétectable niveau d'OX-A dans le liquide céphalo-rachidien (LCR) (Nishino *et al.*, 2000 ; Ripley *et al.*, 2001 ; Mignot *et al.*, 2002). De plus, des études *post-mortem* ont montré une diminution importante du nombre de neurones orexinergiques et de l'ARNm des orexines dans les cerveaux de patients narcoleptiques (Peyron *et al.*, 2000 ; Thannickal *et al.*, 2000). Si aucune mutation du gène prépro-orexine ou des récepteurs n'a été décelée chez des patients souffrant de narcolepsie/cataplexie, excepté chez un cas particulièrement sévère présentant une mutation sur le gène codant la prépro-orexine (Peyron *et al.*, 2000), plus de 90% des patients sont positifs pour le sous-type de l'antigène des leucocytes humains (*human leucocyte antigen*, HLA) DQB1*0602 (Kadotani *et al.*, 1998 ; Lin *et al.*, 2001). L'immense majorité des patients narcoleptiques/cataplexiques présentant cet allèle HLA possèdent des niveaux d'OX-A dans le LCR situés en dessous du seuil de détection (Ripley *et al.*, 2001 ; Dauvilliers *et al.*, 2007). La narcolepsie/cataplexie serait donc plutôt liée à une perte des neurones orexinergiques plutôt qu'à une inhibition de l'expression des orexines (Crocker *et al.*, 2005), et résulterait d'une dégénération auto-immune sélective pour les neurones orexinergiques.

Les modèles animaux ont beaucoup apporté à la compréhension des mécanismes physiopathologique de la narcolepsie/cataplexie, en particulier les modèles génétiques. Les souris *knock-out* pour le récepteur 2 (OX2^{-/-}) possèdent certaines des caractéristiques de la maladie, en particulier des fragmentations du cycle veille/sommeil avec des arrêts cataplexiques et attaques de sommeil paradoxal, même si leur phénotype comportemental et électroencéphalographique est moins sévère que ceux trouvés chez les souris ne possédant plus d'orexines (OX^{-/-}) (Willie *et al.*, 2003). En revanche, les souris OX1^{-/-} ne présentent pas de perturbations comportementales manifestes, seulement une augmentation de la fragmentation des états veille/sommeil (Willie *et al.*, 2001). Les souris présentant une double

déplétion pour les deux récepteurs (OXR^{-/-}) apparaissent comme des phénocopies des souris OX^{-/-} (Willie *et al.*, 2001), démontrant que ces deux récepteurs suffisent à réguler le cycle sommeil/veille par les orexines. Les résultats de ces études de souris transgéniques suggèrent que la régulation normale de la transition veille/sommeil à ondes lentes dépend essentiellement de l'activation des récepteurs OX2, alors que la perturbation du sommeil paradoxal, caractéristique au syndrome de narcolepsie/cataplexie, semble provenir d'un problème de la neurotransmission impliquant les deux récepteurs (Mieda *et al.*, 2011).

3. Orexines et dépression

Depuis la découverte des orexines en 1998, un nombre grandissant de travaux se sont penchés sur les liens qui pouvaient exister entre ces neuropeptides et les troubles affectifs, en particulier la dépression majeure. Comme nous l'avons décrit précédemment, le système orexinergique jouit d'une position singulière au sein du système nerveux central, de par ses nombreuses projections et ses effets physiologiques et comportementaux, comme la régulation du sommeil et de l'état de veille, les comportements alimentaires et la balance énergétique, les conduites addictives et la motivation, et la régulation des émotions à travers l'axe du stress. La dépression majeure, quant à elle, peut se caractériser par diverses altérations physiologiques et comportementales, comme des troubles du sommeil, la perte ou prise de poids, de la fatigue et un ralentissement psychomoteur, une anhédonie et un manque de motivation, et une humeur dépressive souvent associé à un stress excessif. Cette correspondance entre les troubles observés chez les patients dépressifs et les fonctions régulées par le système orexinergique fut le point de départ d'une profonde réflexion sur le rôle que pouvaient jouer le système orexinergique dans la physiopathologie de la dépression (Winsky-Sommerer *et al.*, 2003).

3.1. Les premières études

La première étude ayant mis en lumière un possible lien entre le système orexinergique et la dépression majeure est une étude clinique, publiée en 2003 et dirigée par Emmanuel Mignot de l'Université Stanford, réalisée chez 15 patients dépressifs (9 femmes et 6 hommes) et 14 sujets sains. Grâce à des ponctions lombaires de LCR, cette équipe réussit à mettre en évidence que la variation circadienne du niveau d'OX-A était réduite de l'ordre de 3 % chez les patients dépressifs par rapport aux sujets sains, dont l'amplitude de la variation circadienne était de 10 %. Etrangement, le taux d'OX-A était plus important durant la nuit que pendant le jour chez tous les sujets, résultat qui peut paraître contre-intuitif pour un neuropeptide promoteur d'éveil mais qui suggère un certain délai entre la libération cérébrale d'orexines et son apparition dans le LCR (Chiro *et al.*, 1976 ; Grady *et al.*, 2006). De manière générale, le niveau d'OX-A tendait à être plus important chez les patients dépressifs que chez les sujets contrôles, cet excès d'OX-A

étant contrecarré par cinq semaines de traitement avec un IRSS, la sertraline (Salomon *et al.*, 2003). Environ un an plus tard, des travaux précliniques vinrent contredire quelque peu ces données. Chez des rats Wistar-Kyoto, considérés comme un modèle animal génétique de dépression, les neurones orexinergiques furent décrits comme 15 % plus petits et 18 % moins nombreux comparés à ceux des rats Wistar servant de témoins (Allard *et al.*, 2004). À noter qu'une précédente étude datant de 2001 avait déjà observé un niveau bien inférieur d'OX-A, mesuré par dosage radio-immunologique (*radioimmunoassay*, RIA), et d'ARNm de la prépro-orexine dans différentes structures cérébrales de rats Wistar-Kyoto comparé à des rats Wistar, sans pour autant émettre d'hypothèses quant à la dépression majeure (Taheri *et al.*, 2001). À la suite de ces premiers travaux cliniques et précliniques, d'autres données contradictoires vinrent s'y ajouter, complexifiant davantage l'identification du rôle exact des orexines dans la dépression.

3.2. Les données cliniques

Il fallut attendre 2007 pour voir apparaître de nouvelles études cliniques principalement réalisées par l'équipe de Lil Träskman-Benz de l'Université de Lund en Suède. Dans une première étude corrélative, 101 patients (50 femmes et 51 hommes), diagnostiqués pour différents troubles psychiatriques (dont 31 patients souffrant de dépression majeure) furent enrôlés à la suite de leur admission à l'hôpital pour des tentatives de suicide. Après une période de sevrage médicamenteux comprise entre 1 et 3 semaines, des ponctions lombaires furent pratiquées pour mesurer le niveau d'OX-A dans le LCR. Deux symptômes psychiatriques de l'échelle d'évaluation psychopathologique générale, à savoir la lassitude et le ralentissement moteur, ainsi que l'indice global de sévérité, furent corrélés négativement avec le taux d'OX-A (Brundin *et al.*, 2007b). Trois mois plus tard, cette même équipe publia une autre étude comparant le niveau d'OX-A dans le LCR, prélevé entre 8 et 9 heures du matin, entre des patients souffrant de dépression majeure (32 patients, dont 17 femmes et 15 hommes), de troubles de l'adaptation (23 patients, dont 11 femmes et 12 hommes) et de dysthymie (11 patients, dont 7 femmes et 3 hommes) et après une période de sevrage médicamenteux comprise entre 7 et 19 jours. Les résultats montrèrent que le niveau d'OX-A était significativement plus bas chez les patients dépressifs que chez les autres patients (Brundin *et al.*, 2007a). Cependant, aucun groupe contrôle ne fut inclus dans cette étude. Il est également intéressant de noter que le niveau d'OX-A était corrélé positivement

avec le niveau de CRH. Enfin, la même équipe mesura le niveau d'OX-A (toujours prélevé entre 8 et 9 heures du matin) de patients ayant participé à la première étude 6 et 12 mois après leur tentative de suicide, avec ou sans traitement pharmacologique. Après ces deux laps de temps, le niveau d'OX-A avait significativement augmenté (Brundin *et al.*, 2009). Cependant, cette étude ne concerna que 10 patients qui acceptèrent de poursuivre l'étude après 6 mois (dont 4 patients diagnostiqués avec une dépression majeure), et uniquement 5 après 12 mois.

Une étude fut récemment menée dans le but de comparer les niveaux d'OX-A de plusieurs populations de patients, à savoir 12 patients dépressifs (7 hommes et 5 femmes), 14 patients souffrant de la maladie de Parkinson (8 hommes et 6 femmes), et 12 patients diagnostiqués pour les deux affections (6 hommes et 5 femmes), avant et après traitement avec un IRSS, le citalopram (Palhagen *et al.*, 2010). Aucune différence significative ne fut observée entre les différents groupes avant ou après le traitement antidépresseur. Néanmoins, une augmentation significative du taux d'OX-A fut observée chez les patients souffrant seulement de dépression par rapport aux patients atteints de la maladie de Parkinson, indépendamment du diagnostic de dépression majeure. De plus, le traitement antidépresseur avait tendance à diminuer le taux d'OX-A dans le LCR chez les patients dépressifs uniquement.

Une autre étude récente comparant des patients souffrant de manie, de dépression majeure et des sujets sains n'a pas été en mesure de retrouver de différences significatives entre les niveaux d'OX-A dans le LCR de ces individus (prélevé entre 12h30 et 13h30) (Schmidt *et al.*, 2010). Mais l'absence de résultats pourrait être mise sur le compte du faible effectif (seulement 5 individus par groupe) et sur l'hétérogénéité des traitements, puisqu'aucun patient n'était traité avec le même médicament.

En 2011, une étude s'est intéressée aux gènes codant les orexines et ses deux récepteurs en analysant le génotype de 229 patients souffrant de dépression majeure ou de troubles bipolaires (159 femmes et 70 hommes) et en les comparant à des sujets témoins (Rainero *et al.*, 2011). Le génotypage mit en évidence l'existence d'un polymorphisme « rs2271933 » du gène du récepteur OX1 qui était significativement plus présent chez les patients dépressifs par rapport aux sujets contrôles et aux patients bipolaires. De plus, les porteurs homozygotes ou hétérozygotes de l'allèle A de ce polymorphisme avaient deux fois plus de risque de développer la maladie que les porteurs de l'allèle G. Même si le nombre de sujets dans cette étude était restreint, ces

données offrent de nouvelles perspectives sur l'implication spécifique des récepteurs OX1 dans les états dépressifs, bien que les fonctions précises des variations alléliques du polymorphisme soient encore inconnues.

Très récemment, de nouvelles études cliniques ont vu le jour, permettant d'asseoir davantage le lien entre orexines et dépression, mais participant à entretenir la confusion quant à son rôle exact dans la physiopathogénie du trouble. En effet, une étude a mesuré l'expression de l'ARNm de l'OX-A dans le sang de 29 patients dépressifs (15 femmes et 14 hommes) le jour de leur admission à l'hôpital, puis 14 et 28 jours après le début de la prise en charge médicamenteuse constituée de divers types d'antidépresseurs (Rotter *et al.*, 2011). Même s'il n'est pas apparu de changements significatifs dans l'expression de l'ARNm de l'OX-A entre les différents moments de mesure, une diminution non significative de l'OX-A fut détectée chez les patients dépressifs par rapport aux sujets sains le jour de leur admission. De plus, pour les trois points de mesure, une corrélation négative entre les niveaux d'OX-A et la sévérité des symptômes fut mise en évidence. Cette étude renforce l'idée qu'une hypoactivité du système orexinergique semble associée à la dépression, en corroborant les travaux de Brundin et collaborateurs (Brundin *et al.*, 2007a ; Brundin *et al.*, 2007b ; Brundin *et al.*, 2009). Cependant, une autre étude réalisée chez 34 patients alcooliques (9 femmes et 25 hommes) mit en évidence une corrélation positive entre les niveaux plasmatiques d'OX-A et les symptômes dépressifs lors de la période de sevrage, de sorte que la concentration d'OX-A permettait de prédire la sévérité des symptômes psychologiques liés à la dépression après la cure de désintoxication (von der Goltz *et al.*, 2011). Ces auteurs mirent également en évidence une diminution de la concentration plasmatique d'OX-A après 15 jours de sevrage alcoolique. L'ensemble de ces données cliniques est résumé dans le tableau 3 ci-après.

Tableau 3. Résumé des études cliniques montrant des modifications du système orexinergique chez les patients atteints de troubles dépressifs.

Études cliniques				
Patients	Système orexinergique avant traitement	Système orexinergique après traitement	Références	
15 patients dépressifs	↑ OX-A dans le LCR	↓ OX-A dans le LCR (sertraline)	Salomon <i>et al.</i> , 2003	
101 patients psychiatriques après tentative de suicide dont 31 patients dépressifs	Corrélation négative entre les symptômes et le taux d'OX-A dans le LCR	↑ OX-A dans le LCR (10 patients psychiatriques dont 4 dépressifs)	Brundin <i>et al.</i> , 2007b, Brundin <i>et al.</i> , 2009	
32 patients dépressifs (comparés à d'autres patients psychiatriques)	↓ OX-A dans le LCR	Aucune donnée	Brundin <i>et al.</i> , 2007a	
12 patients dépressifs (comparés à des patients souffrant de la maladie de Parkinson)	↑ OX-A dans le LCR	↓ OX-A dans le LCR (citalopram)	Palhagen <i>et al.</i> , 2010	
5 patients dépressifs en cours de traitement	Aucun changement	Aucune donnée	Schmidt <i>et al.</i> , 2010	
229 patients souffrant de dépression majeure et de troubles bipolaires	Polymorphisme rs2271933 du gène du récepteur OX1 chez les sujets dépressifs	Aucune donnée	Rainero <i>et al.</i> , 2011	
29 patients dépressifs	↓ OX-A dans le sang, corrélation négative entre les symptômes et le taux d'OX-A	Aucune données	Rotter <i>et al.</i> , 2011	
34 patients alcooliques	Corrélation positive entre le taux d'OX-A dans le sang et symptômes dépressifs	↓ OX-A dans le sang après 15 jours de sevrage	von der Goltz <i>et al.</i> , 2011	

3.3. Les données précliniques

A la suite des travaux d'Allard et collaborateurs effectués sur les rats Wistar-Kyoto en 2004, la même équipe poursuivit ses recherches en se focalisant sur le sommeil. En effet, comme nous avons pu le voir dans un précédent paragraphe, la privation sélective de sommeil paradoxal peut avoir des effets antidépresseurs. Dans cette étude, des rats Wistar-Kyoto furent privés sélectivement de sommeil paradoxal (grâce à un dispositif de plateformes situées au-dessus de l'eau) dans le but de comparer le nombre et la taille des neurones orexinergiques à ceux d'animaux de même souche mais confrontés à un dispositif similaire sans être privés de sommeil, et à d'autres individus témoins restés dans leurs cages. L'expérimentation fut également réalisée avec des rats Wistar (Allard *et al.*, 2007). Leur hypothèse principale était d'observer une plus grande augmentation du nombre et de la taille des neurones immunoréactifs pour l'OX-A, suite aux privations de sommeil paradoxal, chez les rats Wistar-Kyoto que chez les rats Wistar. Tout en confirmant les différences histologiques relatives aux neurones orexinergiques chez les deux souches de rats, ils montrèrent une augmentation de 20 % du nombre de ces neurones suite à la privation de sommeil paradoxal chez les rats Wistar-Kyoto comparés aux individus contrôles de même souche. De manière surprenante, une augmentation plus importante de 31 % du nombre de neurones orexinergiques par rapport aux rats contrôles de même souche fut observée chez les rats Wistar-Kyoto placés sur le dispositif de plateformes sans privation de sommeil. Bien que non significatif, le même pattern de différences fut décrit avec les rats Wistar. De plus, aucune différence de taille des neurones orexinergiques ne fut observée entre les différents groupes de rats de même souche. Cette étude ne put donc pas conclure clairement sur l'effet bénéfique de la privation de sommeil dans ce modèle animal de dépression.

Une autre équipe, celle de Kingman P. Strohl de l'Université Case Western Reserve à Cleveland, s'intéressa aux effets des privations maternelles néonatales chez le rat (PMN, cf. § 1.6.3.2) sur le système orexinergique et sur le sommeil (Feng *et al.*, 2007). Les analyses électroencéphalographiques permirent de montrer que la PMN avait induit une diminution générale de sommeil sur les 48 heures d'enregistrement, et un dosage immunoenzymatique (*enzyme-linked immunosorbent assay*, ELISA) a permis de montrer que les rats soumis à une PMN présentaient un niveau plus important de CRH et d'OX-A dans l'hypothalamus comparé à celui des individus contrôles. L'analyse de l'expression des deux récepteurs aux orexines en Western Blot démontra que la PMN avait induit des expressions plus importantes de

récepteurs OX1 et OX2 respectivement dans le cortex préfrontal et l'hippocampe, comparées aux rats témoins, alors qu'un dosage RIA montra une légère diminution de l'OX-B dans l'hippocampe.

En utilisant un autre modèle animal de dépression, l'injection néonatale de clomipramine (CLI), un antidépresseur tricyclique, ce même groupe de chercheurs poursuivirent leurs investigations chez le rat (Feng *et al.*, 2008). De l'âge de 8 à 21 jours, ils réalisèrent des injections quotidiennes de CLI. A 35 jours, des analyses en RIA permirent de montrer que les rats juvéniles CLI présentaient une diminution du taux d'OX-A dans le pont, l'hypothalamus (incluant tous les noyaux) et le cortex préfrontal, ainsi qu'une diminution d'OX-B dans l'hypothalamus latéral, le septum, le thalamus, le cortex préfrontal et l'amygdale. Ces données pourraient souligner l'effet à moyen-terme de l'injection de CLI, puisque la sérotonine, la dopamine et la noradrénaline sont connues pour réduire l'activité orexinergique (Muraki *et al.*, 2004 ; Li et van den Pol, 2005), même si les analyses furent effectuées 14 jours après la dernière injection. De manière intéressante, outre une augmentation du temps d'immobilité dans le test de la nage forcée chez les rats adultes ayant été soumis aux injections précoces de CLI, le taux d'OX-A (dosé grâce à l'ELISA) chez ces animaux était plus important dans l'hypothalamus et celui de l'OX-B plus important dans l'hippocampe. Cette augmentation de l'activité orexinergique dans un modèle animal de dépression est donc en contradiction avec les données obtenues par Allard et collaborateurs, dont les résultats des travaux tendaient vers une hypoactivité du système orexinergique dans les états dépressifs-like.

L'équipe de de Kingman P. Strohl décrivit par la suite que l'injection aiguë de CLI chez des rats adultes induisait une diminution du sommeil paradoxal (sans perturber la durée totale de sommeil) et augmentait le taux de d'ARNm de la prépro-orexine dans l'hypothalamus et le cortex préfrontal, sans changement significatif de l'expression de l'ARNm des récepteurs à orexines (mesurée par RT-PCR). Cette augmentation de l'activité orexinergique suite à l'injection de CLI pourrait participer à expliquer l'effet inducteur de dépression de cet antidépresseur lors de son injection néonatale. De plus, une analyse en RIA montra une diminution de l'OX-B dans l'hypothalamus (Feng *et al.*, 2009). Toutes ces études soulignent également que les troubles du sommeil observés chez les patients dépressifs pourraient être liés à la perturbation du système orexinergique.

Jusqu'à présent, les études s'étaient principalement focalisées sur la description des perturbations du système orexinergique dans différents modèles de dépression, sans véritablement explorer les mécanismes

physiopathologiques dans lesquels ce système pourrait être impliqué. Comme il a été démontré que le stress et la dépression pouvait générer des diminutions de la neurogenèse hippocampique, et que celle-ci était nécessaire aux effets bénéfiques de certains antidépresseurs, une équipe japonaise dirigée par Toshihiko Hanawa de l'Université Kitasato à Tokyo s'est intéressée aux effets de l'OX-A sur la neurogenèse dans le cadre de la dépression (Ito *et al.*, 2008). Au niveau comportemental, l'injection intracérébroventriculaire d'OX-A conduisit à une réduction de l'immobilité dans le test de la nage forcée, sans modifier le niveau sanguin de corticostérone. Quatre jours après cette injection, le marquage à la bromodéoxyuridine (BrdU), un analogue de la thymidine, mit en lumière une augmentation de la prolifération cellulaire au niveau du gyrus denté chez les souris ayant reçu de l'OX-A, sans pour autant affecter le nombre de cellules positives à la doublecortine, un marqueur de neurones immatures. L'utilisation d'un antagoniste sélectif pour le récepteur OX1 empêcha l'effet de l'OX-A à la fois sur le comportement et sur la prolifération cellulaire hippocampique. Cependant, *in vitro*, l'OX-A n'eut aucun effet sur la prolifération de cellules progénitrices neurales, aucune d'entre-elles n'exprimant le récepteur OX1. Cette étude montra aussi que l'OX-A induisait une augmentation du nombre de neurones exprimant le neuropeptide Y (NPY) dans le hilus du gyrus denté. Les auteurs conclurent que le potentiel effet « antidépresseur » de l'OX-A proviendrait en partie de l'augmentation de la prolifération cellulaire hippocampique, et serait modulée partiellement par le NPY, promoteur connu de prolifération cellulaire dans l'hippocampe (Howell *et al.*, 2005). Dans une autre étude, l'administration chronique d'extraits de kososan, une plante médicinale Kampo, ou de l'IRSN milnacipran contrecarra la diminution du nombre de neurones immunopositifs à l'OX-A et de la prolifération cellulaire induite par un stress chronique (Ito *et al.*, 2009). Le kososan induisit également une augmentation du nombre de neurones exprimant le NPY. Tous les effets de cette plante médicinale furent bloqués par l'utilisation d'un antagoniste des récepteurs OX1. Même si ces deux études souffrent de quelques problèmes méthodologiques pour pouvoir clairement répondre à la problématique du lien entre orexines, neurogenèse hippocampique et dépression, elles eurent le mérite de poser le cadre pour de nouvelles explorations quant à la place du système orexinergique dans les états dépressifs.

Si un nombre croissant d'études se sont intéressés aux neurones à orexines et à l'expression de l'OX-A et de l'OX-B dans le phénotype dépressif, à notre connaissance, une seule étude s'est concrètement penchée sur la différence fonctionnelle entre les deux récepteurs orexinergiques dans cette pathologie (Scott *et al.*, 2011). L'utilisation de

souris transgéniques sélectivement *knock-out* pour le récepteur OX1 ou le récepteur OX2 permet de mettre en évidence que les souris OX1^{-/-} présentaient une diminution de l'immobilité, considérée comme un comportement de « désespoir » symptomatique de la dépression, dans le test de la nage forcée et le test de suspension par la queue. Le même pattern fut observé chez des animaux non transgéniques recevant un antagoniste sélectif pour le récepteur OX1. En revanche, dans deux autres tests mesurant l'anxiété, la croix surélevée et la boîte claire-obscur, aucune différence ne fut constatée entre les souris OX1^{-/-} et les souris contrôles. Les souris OX2^{-/-}, quant à elles, présentaient une augmentation de l'immobilité dans les tests de la nage forcée et de la suspension par la queue, sans non plus présenter de changement dans les tests anxiété-dépendants. Cette étude comportementale semble démontrer une spécificité très marquée du système orexinergique pour les états dépressifs. De plus, elle démontre une différence fonctionnelle importante entre les deux types de récepteurs orexinergiques dans le cadre des troubles dépressifs où l'inactivation du récepteur OX1 induirait un effet antidépresseur, tandis que l'inactivation de OX2 produisant exactement le contraire.

Très récemment, une nouvelle étude utilisant un autre modèle animal génétique de dépression, les rats Flinders Sensitive Line (FSL), mit en évidence que cette souche de rats comparée aux rats témoins Flinders Resistant Line (FRL), en plus de présenter une augmentation du temps d'immobilité dans le test de la nage forcée, présentait un nombre plus important de neurones orexinergiques alors que le nombre de neurones à MCH restait inchangé (Mikrouli *et al.*, 2011). Le traitement chronique à l'IRSS escitalopram ne permit de réduire le temps d'immobilité dans le test de la nage forcée que chez les rats FRL, chez lesquels le nombre de neurones immunopositifs pour la MCH augmenta après traitement.

Enfin, une autre étude sur les restrictions caloriques chez la souris souligna davantage le rôle que pourrait avoir le système orexinergique dans les troubles dépressifs (Lutter *et al.*, 2008). Comme nous l'avons déjà précisé, la dépression majeure peut se caractériser par une diminution ou une augmentation de la prise calorique, entraînant une perte ou un gain de poids (cf. § 2.3.4). Dans cette étude, dix jours de restriction calorique, correspondant à une perte de poids d'environ 20 à 25 %, entraîna une augmentation de la latence et une diminution de l'immobilité dans le test de la nage forcée (soit un effet antidépresseur-like) chez les souris contrôles mais pas chez les souris *knock-out* OX^{-/-}. De la même manière, dans le modèle de défaite sociale, la restriction calorique augmenta le nombre d'interactions sociales chez les souris

contrôles mais pas chez les souris OX^{-/-}. De plus, la défaite sociale entraîna une diminution prolongée de l'expression de l'ARNm de la prépro-orexine, via des modifications épigénétiques du promoteur du gène dont elle est issue, alors que la restriction calorique augmenta l'activation des neurones orexinergiques (mesurée grâce à l'expression de la protéine c-Fos) après la défaite sociale. Cette étude indique que les orexines semblent essentielles pour réguler l'effet de la restriction de nourriture, et appuie l'hypothèse selon laquelle une hypoactivité du système orexinergique sous-tendrait le phénotype dépressif. Néanmoins, les conclusions de cette étude restent limitées car l'effet « antidépresseur » de la privation alimentaire a été observé chez des souris qui n'étaient pas dans un état dépressif-*like*, et parce que la restriction calorique est aussi connue pour physiologiquement augmenter l'activité des neurones à orexines (cf. § 2.3.4). De plus, dans le modèle de défaite sociale, la privation de nourriture, en augmentant l'état de vigilance pourrait favoriser l'adoption d'un comportement de recherche de nourriture, et ainsi augmenter le contact social. Enfin, l'absence d'effet bénéfique de la privation calorique se base sur un modèle génétique avec les limites que l'on peut formuler quant aux effets d'une déplétion totale et continue d'un système neuronal. L'ensemble de ces données précliniques est résumé dans le tableau 4 ci-après.

Tableau 4. Résumé des études réalisées chez l'animal montrant des modifications du système orexinergique dans différents modèles animaux de troubles dépressifs.

Modèle animal	Modifications du système orexinergique	Mesures comportementales	Références
Rats Wistar-Kyoto	↓ OX-A, neurones orexinergiques plus petits et moins nombreux que chez les rats Wistar	<i>Aucune donnée</i>	Taheri <i>et al.</i> , 2001 Allard <i>et al.</i> , 2004
Privations maternelles néonatales	↑ OX-A, ↓ OX-B ↑ expression des récepteurs OX1 et OX2	↓ du sommeil suite aux privations maternelles	Feng <i>et al.</i> , 2007
Injections néonatales de clomipramine	↑ OX-A et OX-B	<i>Aucune donnée</i>	Feng <i>et al.</i> , 2008
Injection de clomipramine chez des rats sauvages	↑ prépro-orexine, ↓ OX-B	↓ du sommeil paradoxal suite aux injections de clomipramine	Feng <i>et al.</i> , 2009
Injections d'OX-A chez des souris sauvages	↑ prolifération cellulaire dans l'hippocampe suite à l'injection d'OX-A	Diminution des comportements dépressifs- <i>like</i>	Ito <i>et al.</i> , 2008
Stress chronique	↓ neurones immunoréactifs pour l'OX-A, contrecarrée par du kososan et du milnacipran	<i>Aucune donnée</i>	Ito <i>et al.</i> , 2009
Défaite sociale	↓ prépro-orexine ↑ activation des neurones orexinergiques après restriction calorique	↑ des interactions sociales après restriction calorique	Lutter <i>et al.</i> , 2008
Rats Flinders Sensitive Line	Neurones orexinergiques plus nombreux que les rats Flinders Resistant Line	Comportements dépressifs- <i>like</i> des rats Flinders Sensitive Line	Mikrouli <i>et al.</i> , 2011
Souris KO OXR1 ^{-/-} et KO OXR2 ^{-/-}	<i>Aucune donnée</i>	↓ des comportements dépressifs- <i>like</i> chez OXR1 ^{-/-} ↑ des comportements dépressifs- <i>like</i> chez OXR2 ^{-/-}	Scott <i>et al.</i> , 2011

Etudes chez l'animal

3.4. L'hormone de mélation-concentration

Nous pouvons difficilement aborder les liens entre orexines et dépression sans évoquer rapidement l'existence d'une autre population de neurones localisés dans les mêmes zones hypothalamiques que les neurones orexinergiques, l'hormone de mélation-concentration (*melanin-concentrating hormone*, MCH), dont les rôles physiologiques semblent complémentaires à ces derniers (Modirrousta *et al.*, 2005 ; Hassani *et al.*, 2009). La MCH est un peptide de 17 acides aminés découvert en 1983 (Kawauchi *et al.*, 1983), mais dont les sites d'actions n'ont été mis en évidence par plusieurs équipes que bien plus tard, en 1999, avec la découverte d'un premier récepteur couplé à une protéine G, le récepteur MCH1 (Bachner *et al.*, 1999 ; Chambers *et al.*, 1999 ; Lembo *et al.*, 1999 ; Saito *et al.*, 1999 ; Shimomura *et al.*, 1999 ; Hawes *et al.*, 2000). La MCH est exclusivement exprimée dans des neurones localisés dans l'hypothalamus postérolatéral et la zona incerta, alors que le récepteur MCH1 (MCHR1) est largement distribué dans le système nerveux central, en particulier dans le cortex, l'hippocampe, l'amygdale, et le noyau accumbens (Saito *et al.*, 2001), et aussi en périphérie dans la glande pituitaire, les intestins, les lymphocytes et le tissu adipeux (Hill *et al.*, 2001). Cette large distribution de récepteur MCH1 suggère une grande variété d'effets physiologiques et comportementaux, à la fois centraux et périphériques. De plus, la présence d'un autre récepteur pour la MCH, le récepteur MCH2, a été mis en évidence uniquement chez l'humain (Hill *et al.*, 2001 ; Saito *et al.*, 2001).

A la fin des années 90, la MCH a été identifiée comme étant impliquée dans la régulation alimentaire (Pissios, 2009). Cependant, quelques contradictions existent, puisqu'il a été montré, d'une part, que l'injection centrale de MCH augmente la prise alimentaire et que les souris dépourvues en précurseur du MCH présentent une hypophagie (Qu *et al.*, 1996 ; Shimada *et al.*, 1998), alors que, d'autre part, les souris *knock-out* pour le récepteur MCH1 sont hyperphagiques et hyperactives (Marsh *et al.*, 2002). Néanmoins, les études pharmacologiques utilisant des antagonistes des récepteurs MCH1 ont révélé que leur administration chronique diminuait la prise alimentaire mais également le poids corporel induit par la consommation de nourriture hautement calorique en augmentant le métabolisme (McBriar, 2006 ; Luthin, 2007 ; Johansson, 2011), démontrant bien que la MCH est impliquée dans la régulation de la balance énergétique et de la prise alimentaire.

Le rôle de la MCH dans la régulation du sommeil n'a été mis en évidence qu'en 2003, et plusieurs travaux se sont depuis attachés à étudier les

effets de ce peptide sur les différents stades du sommeil. A l'opposé de l'activité des neurones orexinergiques, les neurones MCH-ergiques sont particulièrement actifs durant le sommeil paradoxal, et ne présentent pratiquement aucune activation durant le sommeil à ondes lentes ou pendant les périodes d'éveil (Verret *et al.*, 2003 ; Modirrousta *et al.*, 2005 ; Hassani *et al.*, 2009). De même, l'injection centrale de MCH augmente le sommeil paradoxal (Verret *et al.*, 2003 ; Lagos *et al.*, 2009), alors que les souris *knock-out* dépourvues de MCH ou de récepteurs MCH1 présentent des troubles du sommeil (Adamantidis *et al.*, 2008 ; Willie *et al.*, 2008). Les résultats d'études utilisant des antagonistes MCH-ergiques sont plus conflictuels, puisque l'on a pu observer que certains antagonistes non sélectifs réduisaient à la fois le sommeil à ondes lentes et le sommeil paradoxal (Ahnaou *et al.*, 2008), alors qu'un autre antagoniste n'avait aucun effet sur le sommeil (Able *et al.*, 2009). L'importance de la MCH dans la régulation du sommeil, en particulier le sommeil paradoxal, n'est cependant plus remis en cause et apparaît comme une cible intéressante pour le traitement de certains troubles du sommeil.

De par l'expression du récepteur MCH1 dans le système mésolimbique dopaminergique (Saito *et al.*, 2001), et particulièrement dans le noyau accumbens (Chung *et al.*, 2009), le système MCH-ergique pourrait également jouer un rôle dans la régulation du circuit de la récompense. En effet, au même titre que ce que l'on observe chez des souris *knock-out* pour le récepteur MCH1, l'injection aiguë d'un antagoniste de ce récepteur diminue l'auto-administration de cocaïne ainsi que le retour de ce comportement d'addiction après son extinction (Chung *et al.*, 2009). De plus, le blocage pharmacologique du système MCH-ergique chez le rat diminue la motivation à consommer de la nourriture grasse, et réduit également le rétablissement du comportement de recherche de nourriture induit par l'injection de la MCH (Nair *et al.*, 2009). Ces résultats suggèrent que le système MCH-ergique joue un rôle non négligeable dans les mécanismes physiologiques du système de récompense.

Le système MCH-ergique pourrait également participer à la régulation du stress et de l'anxiété, même si certaines données de la littérature paraissent contradictoires. L'injection centrale de MCH a aussi bien des effets anxiogéniques (Smith *et al.*, 2006) qu'anxiolytiques (Monzon et De Barioglio, 1999 ; Monzon *et al.*, 2001), alors que des souris *knock-out* pour le récepteur MCH1 présentent moins de comportements anxieux que les souris sauvages (Smith *et al.*, 2006 ; Roy *et al.*, 2007). De nombreuses études utilisant des antagonistes MCH1 en injections aiguës ou chroniques ont montré des effets anxiolytiques dans de

nombreux tests comportementaux (Borowsky *et al.*, 2002 ; Chaki *et al.*, 2005 ; Smith *et al.*, 2006 ; David *et al.*, 2007 ; Millan *et al.*, 2008 ; Gehlert *et al.*, 2009). Ajoutés au fait que l'administration de MCH augmente les niveaux d'ACTH et de corticostérone (Smith *et al.*, 2006), tous ces travaux démontrent que le système MCH-ergique semble participer également à la régulation du stress et de l'anxiété.

Compte tenu du fait que le système MCH-ergique était à la fois impliqué dans la régulation de la prise alimentaire, du circuit de la récompense, du sommeil et de l'anxiété, des études se sont donc aussi focalisées sur les liens pouvant exister entre la neurotransmission MCH-ergique et les troubles dépressifs. Il a en effet été montré que des antagonistes du récepteur MCH1 possèdent des effets antidépresseurs-*like* dans plusieurs tests comportementaux (Borowsky *et al.*, 2002 ; Chaki *et al.*, 2005 ; Gehlert *et al.*, 2009). Cependant, certains antagonistes présentent une affinité pour les récepteurs 5-HT_{1A} et 5-HT_{1B} (Chaki *et al.*, 2005), ce qui rend certains résultats difficiles à interpréter. L'antagoniste SNAP-94847 s'est révélé particulièrement intéressant puisqu'il possède des effets antidépresseurs-*like* à la fois dans des tests comportementaux (David *et al.*, 2007), mais également dans un modèle de dépression fondé sur le stress chronique (Smith *et al.*, 2009a). De plus, cet antagoniste est capable d'augmenter la neurogenèse hippocampique, même si celle-ci n'est pas nécessaire à ses effets comportementaux (David *et al.*, 2007), ce qui suggère un mécanisme d'action différent de ceux des antidépresseurs monoaminergiques. Le stress chronique chez la souris est aussi capable d'induire une augmentation de l'expression de récepteur MCH1 dans l'hippocampe, qui peut être contré par l'injection de fluoxétine (Roy *et al.*, 2007). Très récemment, une étude a montré que l'infusion de MCH dans le noyau du raphé dorsal induisait des comportements dépressifs-*like* chez le rat qu'il était possible de contrecarrer avec l'injection concomitante de fluoxétine (Lagos *et al.*, 2011). Malgré ces résultats congruents et les potentiels débouchés thérapeutiques envisageables (Shimazaki *et al.*, 2006), ces données ont pour l'instant suscité beaucoup moins d'enthousiasme que celles concernant les orexines dans la recherche sur la dépression en raison probablement du fait que la MCH semble moins impliquée dans les mécanismes physiopathologiques de la dépression que le système orexinergique (Mikrouli *et al.*, 2011).

4. Objectifs

Nous venons de voir que la dépression majeure s'accompagne de multiples et complexes dysfonctionnements neurobiologiques, en particulier des déséquilibres au niveau des neurotransmetteurs monoaminergiques, des altérations de la neuroplasticité et une dérégulation de l'axe du stress (HPA). Cependant, si ces mécanismes neurobiologiques sous-tendent une grande partie des troubles observés chez les sujets dépressifs, il n'est pas exclu que d'autres processus viennent participer à l'hétérogénéité symptomatologique caractéristique de la dépression majeure. Parmi ces processus, une perturbation de la neurotransmission orexinergique semble être une hypothèse particulièrement intéressante, de par l'implication des orexines dans la régulation de multiples fonctions neurobiologiques et comportementales. Toutefois, malgré le vif intérêt qu'a suscité cette hypothèse depuis plusieurs années, de nombreuses données contradictoires ont vu le jour, rendant nécessaire l'entreprise de nouvelles études concernant le lien entre trouble dépressif et système orexinergique.

Ce travail de thèse a donc pour objectif de mieux comprendre l'implication réelle du système orexinergique dans les mécanismes pathophysiologiques de la dépression majeure, afin de tenter d'en cerner l'importance dans les perturbations neurobiologiques, neurophysiologiques et comportementales associées au trouble dépressif.

4.1. Le choix du modèle animal de dépression

Pour étudier la dépression majeure, selon ce que l'on désire mettre en évidence, le choix du modèle animal adéquat est primordial. Pour mener à bien notre objectif, nous avons choisi d'utiliser le modèle de stress chronique imprédictible modéré (*unpredictable chronic mild stress*, UCMS) chez la souris. Ce modèle semble être le paradigme le plus approprié pour l'étude des mécanismes neurobiologiques liés à la pathophysiologie et au traitement de la dépression. En étant basé sur l'exposition chronique à des stressseurs socio-environnementaux, il permet d'initier des altérations neurobiologiques, neurophysiologiques et comportementales en analogie avec le rôle du stress dans l'émergence de la dépression. De plus, nous avons décidé d'utiliser des

souris de souche BALB/c, qui sont particulièrement sensibles au stress chronique et à l'effet des antidépresseurs. En effet, dans une étude menée au sein de notre laboratoire, sept souches de souris (A/J, BALB/c, C3H, C57BL/6, CBA, DBA/2 et FVB) ont été exposées à un régime de 9 semaines d'UCMS et traitées avec un antidépresseur tricyclique, l'imipramine, durant les 5 dernières semaines. De nombreuses altérations comportementales et neuroendocriniennes reflétant les symptômes de la dépression ont été observées dans les différentes souches, semblant apparaître indépendamment les uns des autres, mais dépendamment de la lignée de souris. De plus, certaines souches n'étaient pas sensibles au traitement chronique à l'imipramine. Les souris de la souche BALB/c se sont révélées être particulièrement appropriées dans le modèle d'UCMS, puisqu'elles présentaient un grand nombre de perturbations liées au stress chronique, ces dernières étant contrecarrées par un traitement chronique avec un antidépresseur (Ibarguen-Vargas *et al.*, 2008).

Comme nous l'avons décrit précédemment, ce modèle UCMS consiste en une succession de stressseurs légers durant plusieurs semaines (Tableau 5). Ces stressseurs étaient appliqués en général le matin et l'après-midi de manière aléatoire, pour ne pas provoquer d'habituation et conserver le caractère imprédictible du stress pour l'animal.

Tableau 5. Exemple de stressseurs utilisés lors d'un protocole d'UCMS.

Stresseurs	Procédure
Stress social	Une souris est placée dans la cage vide d'une autre souris.
Cage penchée	Les cages sont inclinées à 45°.
Confinement	La souris est placée dans un dispositif de contention pendant 30 minutes à 1 heure.
Sans litière	La litière de la cage est retirée pendant une période allant de 2 à 48 heures.
Litière usagée	La litière des animaux est remplacée par de la litière souillée.
Litière humide	La litière des animaux est imbibée d'eau pendant 2 à 12 heures.
Changements de litière répétés	La litière est changée trois fois toutes les 30 minutes ou toutes les heures.
Stress d'eau	La litière de l'animal est retirée et remplacée par 1 cm d'eau pendant 15 minutes à 1 heure.
Odeur de prédateur	De la litière usagée de rats ou de chats est placée dans la cage.

Nous avons également fait le choix de ne pas utiliser certains stressseurs, comme les privations d'eau ou de nourriture, jugées trop intenses, et les perturbations du cycle circadien (extinction de la lumière durant la période de sommeil, lumière allumée et éteinte successivement toutes les 15 minutes, etc.) pour ne pas engendrer de perturbations du rythme nycthéméral qui auraient pu biaiser nos résultats sur les modifications d'activation du système orexinergique.

4.2. Objectifs expérimentaux

Au cours de ce travail de thèse, nous avons réalisé trois expérimentations principales dont le but était d'étudier l'implication fonctionnelle du système orexinergique dans l'UCMS. Chacun de ces travaux a fait l'objet de la rédaction d'un article, tous présentés dans la partie **Résultats**.

Dans un premier temps, compte tenu des disparités de résultats observées dans la littérature scientifique, nous avons cherché à mettre en évidence la potentielle implication du système orexinergique dans les états dépressifs modélisés chez la souris grâce à l'UCMS. En plus de mesurer l'activation des neurones orexinergiques et l'expression des récepteurs à orexines dans ce modèle animal de dépression, cette étude avait pour objectif d'analyser l'effet d'un traitement chronique avec un antidépresseur IRSS « classique », la fluoxétine, sur ces deux composantes. Pour compléter cette étude, étant donnée la complémentarité fonctionnelle des orexines et de la MCH, nous avons également appliqué la même méthodologie pour l'analyse du système MCH-ergique. Pour finir, sans recourir à l'UCMS, nous avons mesuré l'effet d'un antagoniste des deux récepteurs orexinergiques dans un test comportemental permettant d'évaluer les effets antidépresseurs. Cette étude a fait l'objet d'une publication dans *Neuropharmacology* (article 1).

Etant donné que la dépression majeure est généralement caractérisée par une importante perturbation du sommeil et que les orexines participent activement au maintien de l'éveil, nous avons tenté d'établir un lien entre une possible altération du système orexinergique et les troubles du sommeil associés aux états dépressifs. Pour cela, nous avons entrepris une deuxième étude en utilisant le modèle d'UCMS pour évaluer l'activation des neurones à orexines lors d'un état dépressif-like durant la période de repos des animaux, et en la comparant à celle obtenue suite à des perturbations externes du sommeil. De plus, l'effet d'un traitement chronique avec la fluoxétine sur l'activation des neurones orexinergiques suite à l'UCMS et/ou aux perturbations du sommeil a également été étudié. Cette étude fait l'objet d'un court article actuellement en préparation (article 2).

Enfin, nous avons mis en place une troisième étude tentant de mettre en évidence les mécanismes physiopathologiques unissant le système orexinergique et la dépression majeure. En effet, nous avons précédemment décrit que le système orexinergique était capable de réguler l'axe HPA, dont les altérations sont communément observées chez les sujets dépressifs. En outre, de récentes avancées démontrent

que les nouveaux neurones au sein de l'hippocampe, en plus d'être indispensables aux effets bénéfiques des antidépresseurs monoaminergiques tels que la fluoxétine, vont permettre le rétablissement du fonctionnement de l'axe HPA par le retour du rétrocontrôle négatif qu'exercent les glucocorticoïdes au travers de l'hippocampe. Ainsi, nous avons cherché à mettre en lumière l'importance du système orexinergique dans les troubles dépressifs en étudiant les effets de l'injection chronique d'un antagoniste des deux récepteurs orexinergiques, l'almorexant, chez des souris soumises à un protocole d'UCMS, en les comparant à ceux d'un antidépresseur IRSS classique, la fluoxétine. Dans un premier temps, nous avons caractérisé les effets comportementaux du blocage pharmacologique du système orexinergique chez des animaux dépressifs-*like*. Dans un second temps, nous avons étudié les effets physiologiques d'un tel blocage sur l'activation de l'axe HPA et sur la prolifération cellulaire et la neurogenèse hippocampique. Cette étude a fait l'objet d'un article actuellement en soumission pour une publication dans *Biological Psychiatry* (article 3).

RÉSULTATS

1. Caractérisation de l'activation du système orexinergique lors d'un état dépressif-*like* chez la souris

La dépression est caractérisée par de nombreuses perturbations physiologiques et comportementales qui sont susceptibles d'être régulées par des neuropeptides hypothalamiques, comme les orexines ou l'hormone de mélanin-concentration (*melanin-concentrating hormone*, MCH). Cependant, les liens qui pourraient exister entre ces neuropeptides et la dépression sont encore largement méconnus.

A l'aide d'un double marquage immunohistochimique pour l'orexine-A ou la MCH et la protéine Fos, nous avons étudié les effets de 6 semaines de traitement avec un inhibiteur de recapture sélectif de sérotonine, la fluoxétine, sur l'activation orexinergique et MCH-ergique chez des souris BALB/c soumises durant 8 semaines à un protocole de stress chronique imprédictible modéré (*unpredictable chronic mild stress*, UCMS). Une analyse de l'expression des deux récepteurs orexinergique (OX1 et OX2) et du récepteur MCH1 dans plusieurs régions du système nerveux central (cortex préfrontal, hippocampe dorsal et ventral, amygdale, thalamus, hypothalamus, mésencéphale et tronc cérébral) a également été réalisée en Western Blot. Enfin, l'effet de l'administration aiguë et chronique d'un antagoniste des deux récepteurs orexinergiques, l'almorexant, a été mesuré dans le test de suspension par la queue.

L'UCMS a induit des perturbations physiques et comportementales qui ont été contrecarrés par 6 semaines de traitement à la fluoxétine (20 mg/kg/jour, i.p.). De plus, les souris soumises à l'UCMS présentaient une activation plus importante des neurones orexinergiques dans la région dorsomédiale et périfornicale de l'hypothalamus (*dorsomedial hypothalamus and perifornical hypothalamic area*, DMH-PFA) par rapport à ceux localisés dans la région latérale de l'hypothalamus (*lateral hypothalamus*, LH). Le traitement chronique à la fluoxétine a été en mesure de diminuer l'activation des neurones orexinergiques du DMH-PFA.

L'UCMS a aussi induit une diminution de l'expression des récepteurs OX2 dans le thalamus et l'hypothalamus, mais pas chez les animaux traités avec la fluoxétine. Les souris stressées présentaient également

une diminution de l'expression des récepteurs OX2 dans l'hippocampe ventral, alors que les souris stressées et traitées avec la fluoxétine présentaient une augmentation de l'expression des récepteurs OX2 dans le cortex préfrontal. Aucune différence n'a été observée concernant le récepteur OX1.

L'activation des neurones MCH-ergiques n'a pas été affectée par l'UCMS ou par le traitement antidépresseur, même si l'expression du récepteur MCHR1 était uniquement diminuée chez les souris stressées et non traitées dans l'hippocampe ventral, et augmenté chez les souris stressées et traitées dans le thalamus.

Enfin, seule l'administration chronique de l'almorexant a été capable d'induire un effet antidépresseur-*like* dans le test de suspension par la queue.

Ces données suggèrent que les neurones orexinergiques au niveau du DMH-PFA contribuent à la physiopathogénie de la dépression.

Ces résultats ont fait l'objet d'une publication dans *Neuropharmacology*.

**Activation of orexin neurons in
dorsomedial/perifornical hypothalamus
and antidepressant reversal in a rodent
model of depression**



Contents lists available at ScienceDirect

Neuropharmacology

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

Activation of orexin neurons in dorsomedial/perifornical hypothalamus and antidepressant reversal in a rodent model of depression

Mathieu Nollet^a, Philippe Gaillard^{a,b}, Frédéric Minier^a, Arnaud Tanti^a,
Catherine Belzung^a, Samuel Leman^{a,*}

^aINSERM U930, ERL 3106, Université François Rabelais de Tours, 37200 Tours, France

^bClinique Psychiatrique Universitaire, CHRU de Tours, 37044 Tours, France

ARTICLE INFO

Article history:

Received 9 September 2010

Received in revised form

7 April 2011

Accepted 8 April 2011

Keywords:

Depression

Orexin/hypocretin

Melanin-concentrating hormone

Antidepressant

Dorsomedial/perifornical hypothalamic area

Dual orexin receptor antagonist

ABSTRACT

Chronic stressful life events are risk factors for depression often accompanied by homeostatic disturbances. Hypothalamic neuropeptides, such as orexins (OXs) and melanin-concentrating hormone (MCH), are involved in regulation of several autonomic functions that are altered in depression. However, little is known about the link between orexinergic or MCH-ergic systems and depression. Using double immunohistochemical labeling for OX- or MCH-containing neurons and Fos protein, we studied the effects of a chronic selective serotonin reuptake inhibitor antidepressant treatment (fluoxetine) on the OX and MCH neuronal activation in mice exposed to unpredictable chronic mild stress (UCMS), a rodent model of depression. Western blot was also performed to assess OX and MCH receptor expression in various brain areas. Finally, almoxant, a dual OX receptor antagonist, was assessed in the tail suspension test. UCMS induced physical and behavioral disturbances in mice reversed by 6-week fluoxetine treatment. Orexinergic neurons were more activated in the dorsomedial and perifornical hypothalamic area (DMH-PFA) of UCMS-subjected mice compared to the lateral hypothalamus (LH), and this increase was reversed by 6-week fluoxetine treatment. UCMS also reduced expression of OX-receptor 2 in the thalamus and hypothalamus, but not in animals chronically treated with fluoxetine. MCH neurons were neither affected by UCMS nor by antidepressant treatment, while UCMS modulated MCH receptor 1 expression in thalamus and hippocampus. Finally, chronic but not acute administration of almoxant, induced antidepressant-like effect in the tail suspension test. These data suggest that OX neurons in the DMH-PFA and MCH-ergic system may contribute to the pathophysiology of depressive disorders.

© 2011 Elsevier Ltd. All rights reserved.

1. Introduction

Major depressive disorder (MDD) is characterized by different behavioral and neurobiological features, including mood disturbances, anhedonia, sleep abnormalities, significant weight changes, dysregulation of hypothalamic–pituitary–adrenal (HPA) axis and alteration of serotonin (5-HT) neurotransmission (Drevets et al., 2008). Interestingly, several studies have demonstrated that hypothalamic neuropeptides, such as orexins (OXs) (also known as hypocretins) and melanin-concentrating hormone (MCH), are

* Corresponding author. UMR Inserm 930 – Imaging and Brain, Team 4: Affective Disorders, Université François Rabelais, UFR Sciences et Techniques – Bâtiment O, Parc Grandmont, 37200 Tours, France. Tel.: +33 (0) 2 47 36 69 97; fax: +33 (0) 2 47 36 72 85.

E-mail address: samuel.leman@univ-tours.fr (S. Leman).

involved in the regulation of homeostatic and autonomic functions such as energy balance, sleep–wake cycle, food/drug reward and emotions (Pissios et al., 2006; Mieda and Sakurai, 2009).

Neurons expressing orexin A (OX-A) and orexin B (OX-B) (de Lecea et al., 1998; Sakurai et al., 1998) are located in the posterior hypothalamus and send projections broadly all over the central nervous system (Peyron et al., 1998). OXs act through two receptors (OXR1 and OXR2) differentially distributed throughout the brain, especially in cortical regions, hippocampus, thalamic, hypothalamic and brain stem nuclei (Trivedi et al., 1998; Marcus et al., 2001). OXR1 selectively binds OX-A, whereas OXR2 is nonselective for both OXs (Sakurai et al., 1998). The OX-ergic system is well-known to promote behavioral arousal, and extracellular measurement of OX-A levels in the rat hypothalamus indicates a circadian fluctuation with an increase and a decrease of OX-A levels during active and rest phase respectively (Yoshida et al., 2001). In rodents, central administration of OX increases food intake (Sakurai et al., 1998), locomotor activity

(Nakamura et al., 2000), and induces wakefulness (Hagan et al., 1999). Activation of OX neurons is also associated with consummatory rewards such as food, morphine and cocaine (Harris et al., 2005). In addition, OXs seem to regulate stress response since intracerebroventricular (i.c.v.) injection of OX-A increases HPA axis activity (Kuru et al., 2000; Al-Barazani et al., 2001).

Recent studies underline the differential role of two putative sub-populations of OX neurons (Harris and Aston-Jones, 2006). OX-expressing neurons in the lateral hypothalamus (LH) seem to be involved in reward-related behaviors (Fadel et al., 2002; Harris et al., 2005, 2007), whereas those in the dorsomedial and perifornical hypothalamic area (DMH-PFA) seem to be involved in sleep/wake regulation and stress (Estabrooke et al., 2001; Sakamoto et al., 2004; Winsky-Sommerer et al., 2004).

MCH-containing neurons, intermingled with OX-expressing cells, have large projections throughout the brain (Adamantidis and de Lecea, 2008), and regulate a number of autonomic functions. Central administration of MCH also increases food intake (Qu et al., 1996) and enhances cocaine-induced hyperactivity (Chung et al., 2009). Furthermore, the administration of MCH into the rat paraventricular nucleus of the hypothalamus (PVN) increases plasmatic adrenocorticotrophic hormone (ACTH) and corticosterone levels (Kennedy et al., 2003). Finally, it has been demonstrated that MCH neurons also play a role in arousal in a reciprocal manner to the OX-ergic system, with an increase of cell firing during REM sleep (Hassani et al., 2009).

Although alterations in MDD concern homeostatic and autonomic functions that are modulated by OXs and MCH, little is known about the link between these hypothalamic peptides and mood disorders. The involvement of OXs and MCH in the pathophysiology of depression was recently highlighted by several studies. Acute and chronic administration of MCH receptor 1 (MCHR1) antagonist (SNAP 94847) has an antidepressant-like effect in mice (David et al., 2007), and chronic mild stress induces an increase of hippocampal gene expression of MCHR1 in mice, reversed by chronic fluoxetine treatment (Roy et al., 2007). Moreover, some preclinical and clinical data suggests a reduction of number and size of OX neurons in a genetic animal model of depression and a low cerebrospinal fluid (CSF) level of OX-A in MDD patients (Allard et al., 2004; Brundin et al., 2007). However, the opposite was found in other studies, with increase of OX-A and OX-B expression in the hypothalamus in an animal model of depression, and a trend to a higher CSF level of OX-A in depressed patients (Salomon et al., 2003; Feng et al., 2008). Considering all these results, the putative involvement of OX-ergic and MCH-ergic system in the depressive-like state is still unclear.

We therefore undertook further studies to establish a role of OX and MCH neurons in an appropriate animal model of depression. The unpredictable chronic mild stress (UCMS) is particularly useful

to investigate the neural mechanisms of MDD. This animal model of depression, consisting of chronic exposure to various social and environmental stressors of low intensity, presents a high predictive, face and construct validity (Surget and Belzung, 2008).

The objective of this study is to explore the neuronal activation, using Fos protein expression, in LH and DMH-PFA OX-ergic neurons during the depressive-like state of mice, with or without chronic selective serotonin reuptake inhibitor (SSRI, fluoxetine) antidepressant treatment. MCH-ergic neuronal activation as well as OX-receptors 1 and 2 and MCH-receptor 1 expression in various brain areas were also assessed. Finally, the effect of acute or chronic administration of dual OX receptor antagonist almorexant (ACT-078573, Brisbare-Roch et al., 2007) was investigated in the tail suspension test, a widely used paradigm for assessing antidepressant-like effect in mice.

2. Methods

2.1. Animals

Ninety two male BALB/c mice (15 weeks old) (Centre d'Elevage Janvier, Le Genest St-Isle, France) were housed in groups of four to five per cage under standard condition ($22 \pm 2^\circ\text{C}$, 40% humidity, inverted 12-h light–dark cycle with lights off at 8:00 am, food and water *ad libitum*) for 1 week prior to the experiments. These mice are high responders to a UCMS regimen (Surget and Belzung, 2008). All experimental procedures were carried out in strict accordance with European Communities Council Directive (86/609/EEC).

2.2. Experimental design

Sixty four mice were daily subjected to various stressors (usually in the morning and in the afternoon) according to a semi-random schedule for eight weeks (Fig. 1). UCMS-subjected mice were maintained under standard laboratory conditions but were isolated in individual cages ($24 \times 11 \times 12$ cm), while non-stressed controls were group housed (4 per cage) in standard laboratory cages ($42 \times 27 \times 16$ cm) with a shelter and tubes. Drug or vehicle treatment started two weeks after the beginning of UCMS. The stressors used consisted of alterations of the bedding (repeated changes of sawdust, removal of sawdust, damp sawdust, substitution of sawdust with 21°C water), cage-tilting, cage shift (mice were positioned in the empty cage of another male), and restraint stress (see Surget and Belzung, 2008 for details). Changes of circadian cycle were not used here in order to avoid external sleep disturbances. Body weight and coat state were assessed weekly as markers of the progression of the UCMS-evoked symptoms. Coat state, which represents an indirect evaluation of grooming behavior, was evaluated by examining the coat on seven different body parts. The total score resulted from the sum of scores (0 well-groomed, 0.5 moderate degradation, 1 unkempt); a high score indicates that the coat is in poor condition. This index has been pharmacologically validated (Santarelli et al., 2003; Surget et al., 2008). Behavioral tests were performed in week 7 ($n = 16$ mice per group) by trained experimenters blind to the treatment. The use of the behavioral tests was done to validate the stress-induced effects in the present experiment, which then enables to test the activity of the OX-ergic system in a validated procedure. Finally, to test the behavioral effect of dual OX receptor antagonist almorexant, twenty eight mice were subjected to the tail suspension test. Fourteen mice received vehicle or almorexant 1 h before testing, while fourteen mice received daily vehicle or almorexant over 28 days (last injection 18 h before testing).

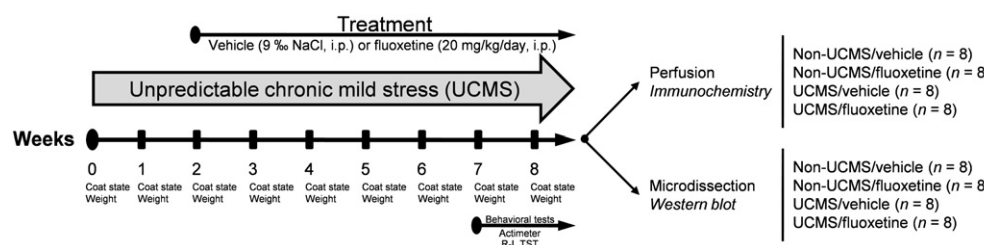


Fig. 1. Experimental design. Four groups of mice ($n = 16$ mice per group) were used depending on the environment (non-UCMS/UCMS) and the treatment (vehicle/fluoxetine). The UCMS regimen lasted 8 weeks. The coat state and the body weight were assessed weekly by an experimenter blind to the treatment. Fluoxetine (20 mg/kg/day) and vehicle (0.9% NaCl, 10 ml/kg/day) intraperitoneal administration began after two weeks of UCMS and continued until the end of the experiment (week 8). On the seventh week, behavioral tests (actimeter, resident–intruder test and tail suspension test) were carried out. At the end of the UCMS regimen, half of mice were intracardially perfused for immunohistochemical analysis, while the brains of the other mice were microdissected for western blot study.

2.3. Drugs

Non-UCMS and UCMS mice received daily intraperitoneal (i.p.) injections of freshly prepared vehicle (saline 9‰, 10 ml/kg/day) or fluoxetine (20 mg/kg/day) two weeks after the start of the experimental protocol. Injections were made between 1:00 pm and 3:00 pm, irrespective of the stress schedule. The dual OX receptor antagonist almorexant (ACT-078573) was a gift from Actelion Pharmaceuticals (Switzerland). The dose used was 100 mg/kg/day in a 0.20% methyl-cellulose (Methocel, Sigma–Aldrich) water solution, administered orally by gavage between 1:00 and 3:00 pm (10 ml/kg/day).

2.4. Basal locomotor activity

An actimeter assessed the activity of mice in their home cage. Control animals were isolated 24 h before the beginning of the sessions. The cage was placed in the center of the device, which consisted of a 20 × 20 cm square plane with photobeam detectors crossing the plane. The movement of the animal was automatically detected when it crossed the beam, allowing a score to be established. The higher the score was, the more the mouse moved. Testing started at 10:00 am for a period of 2 h to get an estimation of the basal locomotor activity.

2.5. Resident–intruder test

The resident–intruder (R–I) test consists of the introduction of a novel mouse (C57BL/6 male mice) in the cage in order to measure the aggressiveness of resident mice. Non-UCMS mice were placed in individual cages 24 h before the test, and the stressed mice litter was changed 24 h before the test in order to have all animals in the same experimental conditions. The intruder was placed into the home cage of the test animal (resident) in such a way that mice were in opposite corners. The latency of the resident first attack (in s) and the number of resident attacks were measured over a 6-min period (latency of 360 s for non-attacking mice). Attacking intruders were excluded, without excluding the resident. Depressive-like animals are more agonistic and likely to attack more often and sooner than non-stressed animals (Surget et al., 2009).

2.6. Tail suspension test

The procedure of the tail suspension test (TST) followed in this study was derived from the protocol previously described (Steru et al., 1985). Mice were suspended by the tail (approximately 1 cm from the tip of the tail) using adhesive tape to a rod 60 cm above the floor. The trials were conducted for a period of 5 min. The behavioral measure was the duration of immobility, interpreted as behavioral despair. Mice were considered immobile only when they hung motionless.

2.7. Immunohistochemistry

Intracardiac perfusions were performed directly after the end of UCMS regimen between 8:00 am and 12:00 am, corresponding to the beginning of the animal's activity phase (dark period), an intermediate period when OX neurons have not reached their maximal activation (Estabrooke et al., 2001; Martinez et al., 2002), in order to avoid any ceiling effect. All perfusions were done 2 or 3 days after the last behavioral test in order to investigate the basal activity of OX-ergic neurons reflecting the activity of depressed-like state mice resulting from long-term stress. After deep anesthesia (sodium pentobarbital, 40 mg/kg, i.p.), mice ($n = 8$ mice/group) were perfused through the heart with 80 ml of saline followed by 200 ml of 4% paraformaldehyde in 0.1 M PBS (pH 7.4). Brains were removed, postfixed 2 h in the same fixative, and cryoprotected in a 20% sucrose solution overnight at 4 °C. Coronal sections (35 μ m thickness) were cut in a cryostat (Leica CM 3050S) and collected every two sections separated in two different lots. Free-floating sections were processed according to a double immunohistochemical reaction for c-Fos protein and OX (first lot) or c-Fos protein and MCH (second lot). After a series of washes in 50% ethanol and 3% H₂O₂, sections were incubated at room temperature in a rabbit anti-Fos antibody (Calbiochem, PC38, 1:5000) and in a goat anti-OX-A antibody (Santa Cruz, SC-8070, 1:500). Thirty-six hours later, sections were washed in 0.1 M PBS, incubated 2 h in a biotinylated anti-rabbit IgG (Jackson ImmunoResearch, 1:500) followed by ABC Kit (Vector Laboratories, 1:100, 1 h), and reacted with diaminobenzidine (DAB) (Sigma) in the presence of cobalt and H₂O₂. The sections were washed and re-incubated 2 h with a biotinylated anti-goat IgG (Jackson ImmunoResearch, 1:500), followed by ABC Kit (Vector Laboratories, 1:100, 1 h) and finally reacted with DAB only (no cobalt) (Sigma). Sections were rinsed, mounted on gelatinized glass slides, dehydrated, cleared in Claral® and coverslipped with Eukitt®. The same procedure was used for Fos protein and MCH double immunolabeling (with a rabbit anti-MCH antibody, Phoenix Pharmaceuticals, H-070-47, 1:5000), followed by 2h incubation with a biotinylated anti-rabbit IgG (Jackson ImmunoResearch, 1:500). Sections were finally reacted with VECTOR VIP Substrate Kit (Vector Laboratories). Various negative controls were performed, omitting either the primary or the secondary antibodies.

2.8. Western blot

Brain microdissections ($n = 8$ mice/group) were performed directly after the end of UCMS protocol between 8:00 am and 12:00 am. Brains were rapidly removed from CO₂-killed mice and placed in an ice-cold slurry of 0.9% NaCl. Eight brain structures were dissected under microscope and prepared for immunoblotting: prefrontal cortex, ventral and dorsal hippocampus, amygdala, thalamus, hypothalamus, midbrain and brain stem. These structures were chosen because of their involvement in MDD and in autonomic and homeostatic functions regulated by OXs and MCH (Pissios et al., 2006; Adamantidis and de Lecea, 2008; Drevets et al., 2008; Mieda and Sakurai, 2009). Brain structures were homogenized in PBS, an equal volume of 2× SDS sample buffer was added, and the samples were boiled. Two sets of each brain structure were pooled in order to obtain 4 samples per group. Protein levels in the collected samples were determined using the Bradford method. One hundred micrograms of protein were loaded in each lane for a subsequent western blot analysis. Proteins were separated with 10% SDS–PAGE (1.5 mm thickness) and transferred to a nitrocellulose membrane (Amersham Hybond-P, GE Healthcare). Membranes were incubated with 5% (w/v) skim milk in Tris-buffered saline containing 0.05% Tween 20 overnight at 4 °C. Membranes were washed and incubated with primary goat antibodies (Santa Cruz) either against OX1 (SC-8072, 1:500), OX2 (SC-8074, 1:500), and housekeeping protein Histone H2B (SC-8650, 1:15000) for 24 h at 4 °C. Membranes were then incubated with donkey anti-goat HRP conjugated antibody (Santa Cruz, SC-2020, 1:10000) for 1 h at room temperature. This protocol was used to analyze the MCH receptor 1, with primary goat antibodies (Santa Cruz) against MCHR1 (SC-5534, 1:500) and Histone H2B (SC-8650, 1:15000). Immunoreactive bands were detected with ECL kit (Pierce, Thermo Scientific) and captured on Hyperfilm (Amersham, GE Healthcare).

2.9. Data analyses

All sections were examined with a Leica DM 2000 microscope (approximately bregma –0.8 mm to –2.30 mm according to the atlas of Franklin and Paxinos, 2008). The immunoreagents OX neurons were marked by a cytoplasmic brown color and MCH neurons were marked by a cytoplasmic purple color, while immunoreagents Fos protein neurons had a black nucleus (Fig. 2A). All neurons immunoreactive for OX (OX-IR) that were immunoreactive for Fos (Fos-IR) or not were counted in the LH and DMH-PFA (Fig. 2B) by an investigator unaware of the treatment. Separation of these two areas was made according to the previous study of Harris and colleagues (all OX-labeled neurons lateral to the fornix were considered to be in the LH, and all OX-labeled neurons located above and below the fornix were considered to be in the DMH-PFA) (Harris et al., 2007). The same procedure was followed for MCH immunoreactive neurons (MCH-IR) (Fig. 2C), which were counted in the LH, DMH-PFA and zona incerta (ZI) (the boundaries of ZI were drawn according to the atlas of Franklin and Paxinos, 2008) (Fig. 2D). The percentage of double-labeled (OX/Fos or MCH/Fos) neurons of LH and DMH-PFA (plus ZI for MCH) was calculated, taking the total number of OX or MCH neurons observed in each part of all sections as reference. For western blot analysis, films were digitally scanned and analyzed for optical density (OD) using ImageJ software. We calculated relative value (RV) obtained by dividing the OD of OX1 (56 kDa), OX2 (38 kDa) or MCHR1 (48 kDa) with the OD of H2B protein (18 kDa).

Because the assumptions for parametric statistics (normality and homogeneity of variances) were not ensured, Kruskal–Wallis “ANOVA by ranks” *H*-test was performed using Statistica® software, followed by a Mann–Whitney *U*-test including corrections for multiple comparisons (Bonferroni-corrected Mann–Whitney *U*-test) when required (i.e., $p < 0.05$). This correction consists in adjusting the significance level in order to protect against type I errors. An α' risk was used, with $\alpha' = \alpha/k$, k being the number of hypotheses that are tested (Shaffer, 1995). When two independent samples were compared, the statistical significances were defined as $p < 0.0125$ ($k = 4$), except for western blot analysis because of the size of each group ($n = 4$, $p \geq 0.0143$). Wilcoxon signed-rank test, a non-parametric test for paired samples, was used to compare OX-ergic neuronal activation between hypothalamic areas. The Friedman test, a non-parametric “ANOVA by ranks” for repeated measures and dependant samples, was used to compare the neuronal activation of MCH-ergic system between DMH-PFA, LH and ZI. All data are expressed as mean $\pm$ standard error of the mean (SEM).

3. Results

3.1. UCMS-induced physical changes are reversed by 6 weeks exposure to fluoxetine

Coat state was assessed once a week. Kruskal–Wallis *H*-test revealed significant differences between each group for each week (Supplementary Table 1). Comparison with corrected Mann–Whitney *U*-test between non-UCMS/vehicle and UCMS/vehicle groups, as well as comparison of non-UCMS/fluoxetine and UCMS/

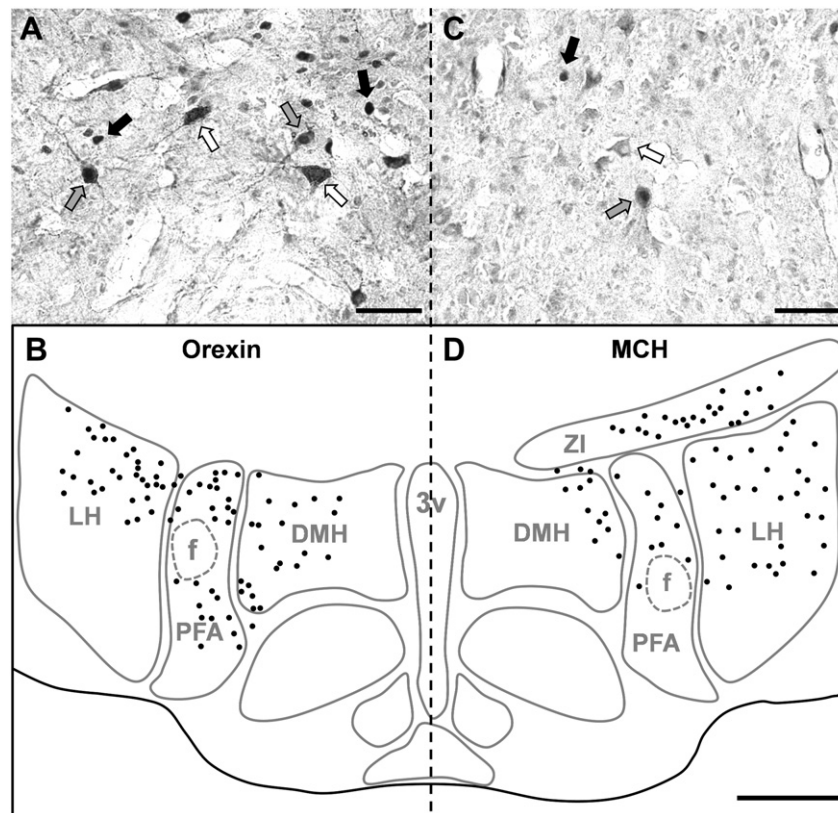


Fig. 2. Photomicrographs and schematic view (Franklin and Paxinos, 2008) of hypothalamic coronal sections depicting (A) single-labeled OX-IR neurons (stained brown with DAB, white arrows), single-labeled Fos-IR neurons (stained black in the nucleus with DAB-Ni, black arrows), and double-labeled OX-IR/Fos-IR neurons (gray arrows); (B) example of distribution of OX-IR neurons in the hypothalamus; (C) single-labeled MCH-IR neuron (stained purple with Vector VIP substrate kit, white arrows), single-labeled Fos-IR neuron (stained black in the nucleus with DAB-Ni, black arrows), and double-labeled MCH-IR/Fos-IR neuron (gray arrows); (D) example of distribution of MCH-IR neurons in the hypothalamus (PFA, perifornical area; DMH, dorsomedial hypothalamic area; ZI, zona incerta; f, fornix; 3v, third ventricle; magnification bars, 50 μ m (A and C), 500 μ m (B and D)).

fluoxetine groups, showed a significantly increased degradation of coat state for stressed groups from week 1 to the end of experiment (Fig. 3A and Supplementary Table 2). Differences also appeared between the two UCMS groups from week 5 until the end of the procedure, the fluoxetine-treated group presenting significantly less degradation of the coat (Fig. 3A and Supplementary Table 2). There were no significant differences between non-UCMS/vehicle

and non-UCMS/fluoxetine groups, except for week 6 (Fig. 3A and Supplementary Table 2).

Body weight was measured at the same time as the coat state. Data shown in Fig. 3B represents weight changes based on the variation from the last body weight measured. Kruskal–Wallis H -test highlighted differences between groups each week (Supplementary Table 3). Corrected Mann–Whitney U -test revealed significant

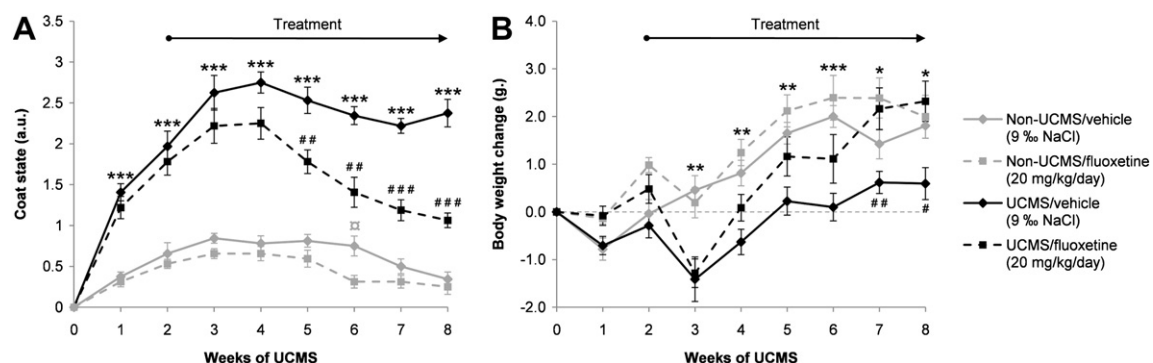


Fig. 3. Effects of the unpredictable chronic mild stress (UCMS) and 6-week fluoxetine treatment (20 mg/kg/day) on physical state. (A) The UCMS induced a significant deterioration of the coat state, as demonstrated by increasing coat state scores (***corrected $p < 0.00025$; non-UCMS/vehicle versus UCMS/vehicle). Drug treatments initiated in the third week of the UCMS exposure reversed this deterioration after 3 weeks of fluoxetine treatment (##corrected $p < 0.0025$; ###corrected $p < 0.00025$; UCMS/vehicle versus UCMS/fluoxetine). No significant difference was observed between the two non-UCMS groups, except for week 6 (α corrected $p < 0.0125$; non-UCMS/vehicle versus non-UCMS/fluoxetine). (B) The UCMS significantly disrupts the body weight gain (*corrected $p < 0.0125$; **corrected $p < 0.0025$; ***corrected $p < 0.00025$; non-UCMS/vehicle versus UCMS/vehicle), and this disruption is reversed by 6-week fluoxetine treatment (#corrected $p < 0.0125$ and ##corrected $p < 0.0025$; non-UCMS/vehicle versus UCMS/vehicle) (mean $\pm$ SEM; $n = 16$ mice/group).

differences between non-UCMS/vehicle and UCMS/vehicle groups from week 3 until the end of experiment, and between non-UCMS/fluoxetine and UCMS/fluoxetine groups for week 3 and 4, with a more important and expected body weight gain for all non-UCMS mice (Fig. 3B and Supplementary Table 3). No significant differences were observed between the two non-UCMS mice, but UCMS/fluoxetine group had significant higher body weight gain than UCMS/vehicle mice on week 7 and 8 (Fig. 3B and Supplementary Table 3).

3.2. UCMS-induced behavioral changes are reversed by 6 weeks exposure to fluoxetine

There were no group differences in locomotor activity as indicated by actimeter according to Kruskal–Wallis *H*-test (Fig. 4A). Therefore, none of the effects observed in R–I or TST were due to changes in locomotor activity.

Differences in agonistic behavior between groups were observed in R–I for the latency and the number of attacks ($H_{(3,64)} = 34.84$, $p < 0.001$; $H_{(3,64)} = 36.17$, $p < 0.001$). Corrected Mann–Whitney *U*-test highlighted significant decrease of attack latency for UCMS/vehicle animals compared to non-UCMS/vehicle ($U = 30$, corrected $p < 0.00025$) and UCMS/fluoxetine groups ($U = 11.5$, corrected $p < 0.00025$) (Fig. 4B). The number of attacks was higher for the UCMS/vehicle group compared to non-UCMS/vehicle group ($U = 17.5$, corrected $p < 0.00025$) and UCMS/fluoxetine group ($U = 18$, corrected $p < 0.00025$) (Fig. 4C). Therefore, UCMS increased agonistic behavior while fluoxetine reduced it.

In TST, Kruskal–Wallis *H*-test revealed significant differences between groups ($H_{(3,64)} = 21.23$, $p < 0.001$). Comparison between UCMS/vehicle and non-UCMS/vehicle groups showed an increase of immobility in stressed mice ($U = 62$, corrected $p < 0.0125$)

(Fig. 4D). Fluoxetine treatment decreased the time of immobility in UCMS mice ($U = 48.5$, corrected $p < 0.0025$) and in non-UCMS mice ($U = 34$, corrected $p < 0.00025$) (Fig. 4D).

3.3. Fos expression in OX-ergic and MCH-ergic neurons after UCMS and 6 weeks fluoxetine treatment

Kruskal–Wallis *H*-test revealed no significant effect of UCMS regimen or treatment on the total number of immunoreactive OX (OX-IR) or MCH (MCH-IR) neurons (Table 1). We found an average of 930.75 ± 20.71 OX-IR neurons and 1044.22 ± 23.47 MCH-IR neurons in the hypothalamus (neurons counted in every fourth brain section).

Concerning Fos protein expression in OX-IR neurons located in DMH-PFA and in the LH, Kruskal–Wallis *H*-test revealed significant differences between groups, whereas no difference was observed between groups for MCH neurons (Table 1).

In DMH-PFA, corrected Mann–Whitney *U*-test highlighted that the UCMS procedure induced a significant increase of Fos expression in OX neurons (1; $U = 8$, corrected $p < 0.0125$) (Fig. 5). Six weeks antidepressant treatment abolished the UCMS effect and led to a reduction of Fos expression in DMH-PFA OX-ergic neurons (2; $U = 0$, corrected $p < 0.00025$) (Fig. 5). There was no significant difference between fluoxetine and vehicle non-UCMS mice or between the UCMS/fluoxetine and non-UCMS/fluoxetine mice.

In LH, no significant effect of UCMS regimen was found. Nevertheless, fluoxetine treatment reduced the Fos protein expression in LH OX-IR neurons when UCMS/vehicle and UCMS/fluoxetine groups were compared with corrected Mann–Whitney *U*-test (3; $U = 5$, corrected $p < 0.0125$) (Fig. 5). No significant differences were seen between the two non-UCMS groups and between the two fluoxetine-treated groups.

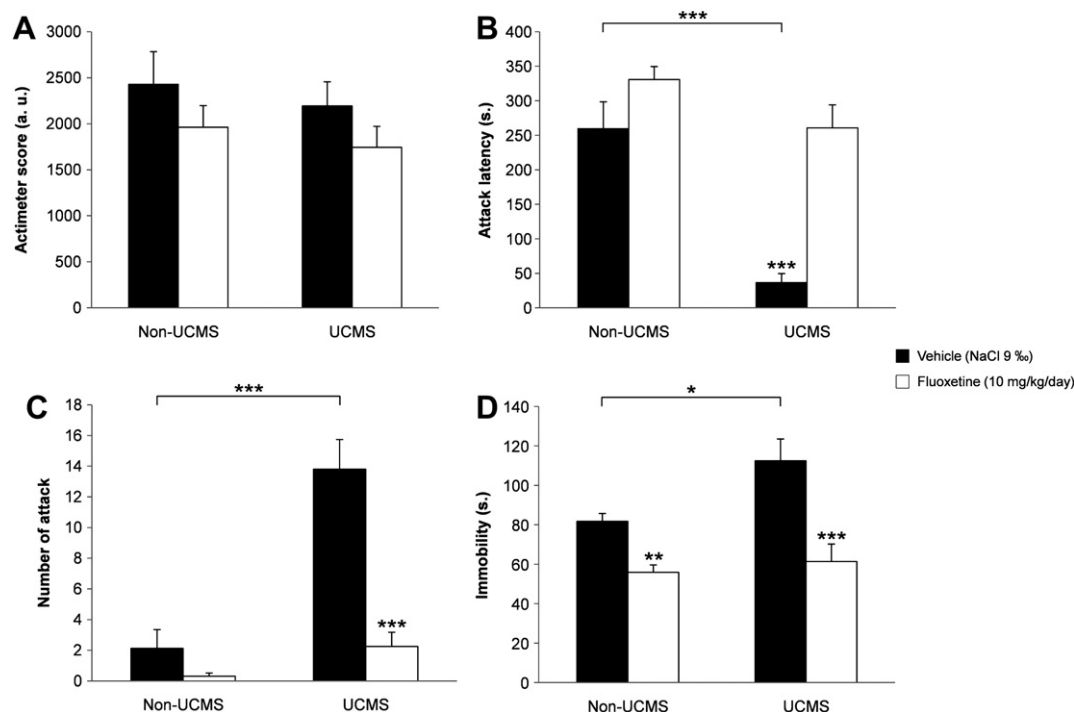


Fig. 4. Effects of unpredictable chronic mild stress (UCMS) and 6-week fluoxetine treatment (20 mg/kg/day) on behavior. (A) Locomotor activity in the actimeter was not affected by the UCMS regimen or fluoxetine treatment. (B) The UCMS decreased the attack latency and (C) increased the number of attacks toward the intruder in the resident–intruder test (***corrected $p < 0.00025$; non-UCMS/vehicle versus UCMS/vehicle), while 6-week fluoxetine treatment reversed these effects (***corrected $p < 0.00025$; UCMS/vehicle versus UCMS/fluoxetine). (D) The UCMS increased the time of immobility in the tail suspension test (*corrected $p < 0.0125$; non-UCMS/vehicle versus UCMS/vehicle), and 6-week fluoxetine treatment decreased the time of immobility in both UCMS and non-UCMS groups (**corrected $p < 0.0025$, ***corrected $p < 0.00025$; non-UCMS/vehicle versus non-UCMS/fluoxetine and UCMS/vehicle versus UCMS/fluoxetine) (mean $\pm$ SEM, $n = 16$ mice/group).

Table 1

Effects of UCMS and chronic fluoxetine treatment on number and activation of orexin and MCH neurons.

		Experimental groups				Kruskal–Wallis
		Non-UCMS/vehicle	Non-UCMS/fluoxetine	UCMS/vehicle	UCMS/fluoxetine	
DMH-PFA	OX-IR	422.63 ± 8.72	432.88 ± 29.63	391.88 ± 27.52	429.75 ± 16.31	$H_{(3,32)} = 1.2, p > 0.05$
	Fos-IR/OX-IR (%)	3.93 ± 1.34	4.22 ± 1.45	11.58 ± 3.04	2.19 ± 0.6	$H_{(3,32)} = 11.67, p < 0.01^{**}$
	MCH-IR	442.75 ± 18.68	441.38 ± 25.56	477.88 ± 33.38	439.88 ± 29.11	$H_{(3,32)} = 1.01, p > 0.05$
	Fos-IR/MCH-IR (%)	0.54 ± 0.08	0.44 ± 0.09	0.73 ± 0.11	0.53 ± 0.14	$H_{(3,32)} = 3.57, p > 0.05$
LH	OX-IR	509.63 ± 19.1	507.88 ± 31.86	525.38 ± 30.02	503 ± 19.37	$H_{(3,32)} = 0.59, p > 0.05$
	Fos-IR/OX-IR (%)	2.1 ± 0.57	1.55 ± 0.31	4.44 ± 1.01	1.35 ± 0.4	$H_{(3,32)} = 10.63, p < 0.05^{*}$
	MCH-IR	329.38 ± 10.97	348 ± 15.18	327.75 ± 20.07	354.88 ± 15.39	$H_{(3,32)} = 1.94, p > 0.05$
	Fos-IR/MCH-IR (%)	0.3 ± 0.1	0.29 ± 0.09	0.47 ± 0.13	0.64 ± 0.21	$H_{(3,32)} = 2.34, p > 0.05$
ZI	MCH-IR	245.25 ± 9.4	249.88 ± 20.02	268.25 ± 15.78	251.63 ± 17.63	$H_{(3,32)} = 1.09, p > 0.05$
	Fos-IR/MCH-IR (%)	0.76 ± 0.08	0.47 ± 0.18	0.48 ± 0.18	0.39 ± 0.15	$H_{(3,32)} = 4.94, p > 0.05$

Each value represents the mean ± SEM of 8 animals. DMH-PFA, perifornical area and dorsomedial hypothalamus; LH, lateral hypothalamus; ZI, zona incerta (* $p < 0.05$ and ** $p < 0.01$).

According to Wilcoxon signed-rank test, a greater increase in Fos-IR nucleus of OX-IR neurons was seen in the DMH-PFA than in the LH in non-UCMS/vehicle ($T = 1, p < 0.05$), non-UCMS/fluoxetine ($T = 0, p < 0.05$), UCMS/vehicle ($T = 0, p < 0.05$) and UCMS/fluoxetine groups ($T = 2, p < 0.05$) (Fig. 5).

Concerning the comparison between MCH-ergic neurons with Fos positive nuclei in hypothalamic areas, Friedman test revealed only significant differences in the non-UCMS/vehicle animals ($F_{(2,8)} = 12.25, p < 0.01$), with more Fos protein expression in MCH-IR neurons located in ZI compared to LH ($T = 0, p < 0.05$) (Fig. 6).

3.4. OX receptors 1 and 2 expression after UCMS and 6 weeks fluoxetine treatment

We found differential distribution of OX receptors in the eight brain structures studied, with greater OX1 and OX2 density in hypothalamus, and fewer OX1 densities in ventral hippocampus, thalamus, midbrain and brain stem compared to other brain areas, as well as fewer OX2 density in dorsal hippocampus and amygdala. Analysis of group differences in each structure using

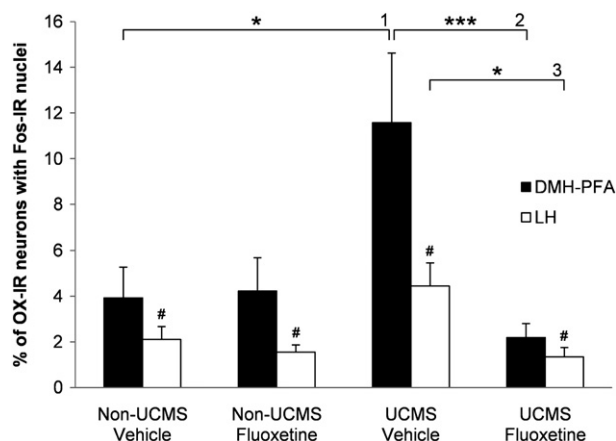


Fig. 5. Effects of the unpredictable chronic mild stress (UCMS) and 6-week fluoxetine treatment (20 mg/kg/day) on OX-ergic activity in the dorsomedial and perifornical hypothalamic area (DMH-PFA) and in the lateral hypothalamus (LH). The UCMS regimen significantly increased OX-ergic activation in the DMH-PFA (1), 6-week fluoxetine treatment reversed this activation (2). In the LH, no effect of UCMS was observed, but 6-week fluoxetine treatment decreased OX-ergic activation in UCMS-subjected mice (3). Fos protein expression in OX neurons was higher in the DMH-PFA compared to the LH in all groups (mean ± SEM, *corrected $p < 0.0125$, ***corrected $p < 0.00025$, $n = 8$ mice/group).

Kruskal–Wallis H -test revealed no variation of OX1 expression in any of the brain structures following UCMS and/or 6 weeks of fluoxetine treatment (Fig. 7A). However, significant variations of OX2 expression were found in prefrontal cortex ($H_{(3,16)} = 9.33, p < 0.05$), ventral hippocampus ($H_{(3,16)} = 11.14, p < 0.05$), thalamus ($H_{(3,16)} = 8.74, p < 0.05$) and hypothalamus ($H_{(3,16)} = 9.86, p < 0.05$). In the prefrontal cortex, fluoxetine induced an increase of OX2 expression in UCMS mice when compared with UCMS/vehicle and non-UCMS/fluoxetine groups ($U = 0, p < 0.05$) (Fig. 7B). In contrast, UCMS induced a decrease of OX2 expression in thalamus and hypothalamus ($U = 0, p < 0.05$), reversed by fluoxetine treatment ($U = 0, p < 0.05$) (Fig. 7B). Finally, in the ventral hippocampus, the two UCMS/vehicle and UCMS/fluoxetine groups exhibit a decrease of OX2 when respectively compared with non-UCMS/vehicle and non-UCMS/fluoxetine groups ($U = 0, p < 0.05$).

3.5. MCH receptor 1 expression after UCMS and 6 weeks fluoxetine treatment

We found a greater density of MCHR1 in the prefrontal cortex, the ventral and dorsal hippocampus and in the hypothalamus compared to other brain areas (Fig. 8). Analysis of group differences in each structure using Kruskal–Wallis H -test revealed significant

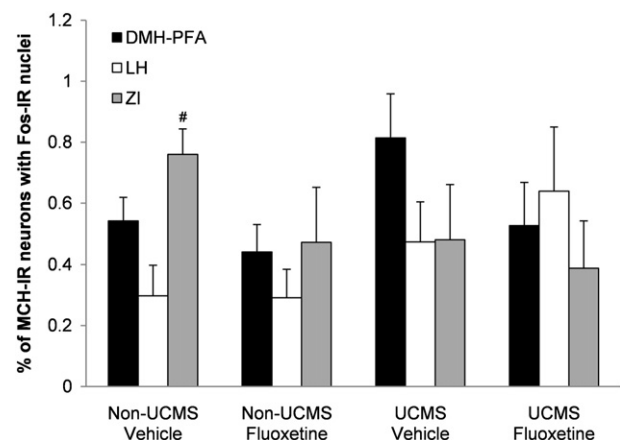


Fig. 6. Effects of the unpredictable chronic mild stress (UCMS) and 6-week fluoxetine treatment (20 mg/kg/day) on MCH-ergic activity in the dorsomedial and perifornical hypothalamic area (DMH-PFA), the lateral hypothalamus (LH) and the zona incerta (ZI). No effects of the UCMS or 6-week fluoxetine treatment were observed. Differential neuronal activation was seen between ZI and LH in non-UCMS mice (mean ± SEM, # $p < 0.05$, $n = 8$ mice/group).

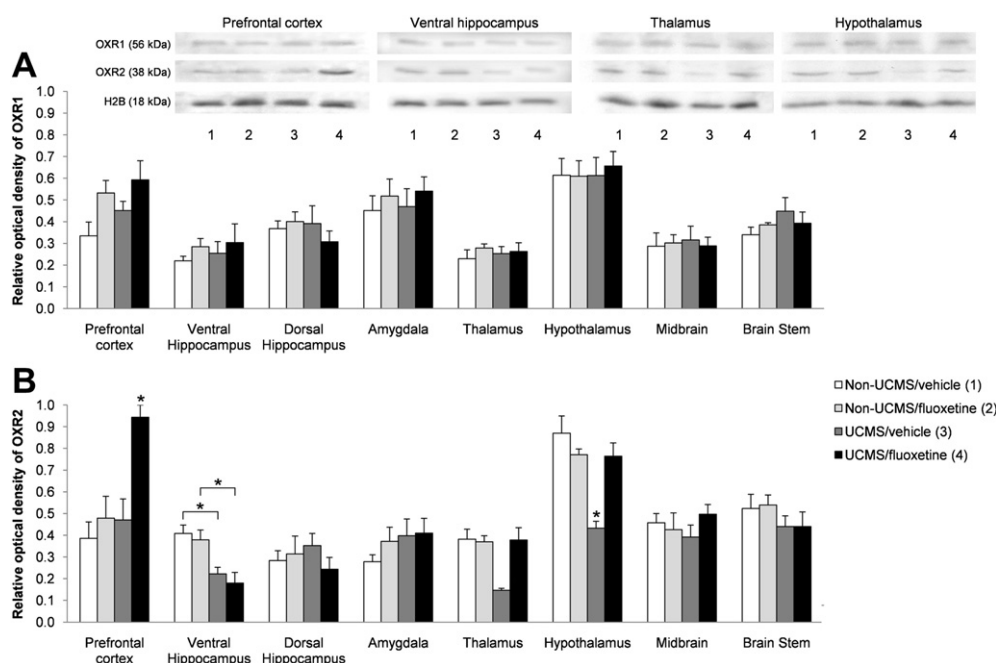


Fig. 7. Effects of the unpredictable chronic mild stress (UCMS) and 6-week fluoxetine treatment (20 mg/kg/day) on OX receptors expression. (A) No effects of the UCMS or 6-week fluoxetine treatment on OX1 expression were observed in the eight brain structures studied. (B) The UCMS protocol significantly decreased OX2 expression in thalamus and hypothalamus, while 6-week fluoxetine treatment reversed this reduction ($*p < 0.05$; UCMS/vehicle versus non-UCMS/vehicle and UCMS/vehicle versus UCMS/fluoxetine). 6-week antidepressant treatment increased OX2 expression in prefrontal cortex in UCMS-exposed mice ($*p < 0.05$; UCMS/vehicle versus UCMS/fluoxetine). The UCMS induced a decrease of OX2 in ventral hippocampus ($*p < 0.05$; non-UCMS/vehicle versus UCMS/vehicle and non-UCMS/fluoxetine versus UCMS/fluoxetine) (mean $\pm$ SEM, $n = 4$ mice/group).

variations of MCHR1 expression in ventral hippocampus ($H_{(3,16)} = 8.54$, $p < 0.05$) and thalamus ($H_{(3,16)} = 8.93$, $p < 0.05$). In ventral hippocampus, UCMS induced a decrease of MCHR1 expression ($U = 0$, $p < 0.05$), reversed by fluoxetine treatment ($U = 0$, $p < 0.05$) (Fig. 8). In thalamus, the UCMS/fluoxetine group exhibited an increase of MCHR1 when respectively compared with UCMS/vehicle and non-UCMS/fluoxetine groups ($U = 0$, $p < 0.05$).

3.6. Effect of almorexant in the tail suspension test

The effect of the dual OX receptor antagonist almorexant in non-stressed animals was investigated to further test the role of OX with a test classically used for screening antidepressants in mice. Kruskal–Wallis H -test revealed significant differences between groups ($H_{(3,28)} = 8.69$, $p < 0.05$) (Fig. 9). Comparison between vehicle and almorexant groups showed a decrease of immobility in chronically

treated mice ($U = 5.5$, corrected $p < 0.0125$) but not in acute treated animals (Fig. 9).

4. Discussion

The aim of this study was to provide a possible link between a depressive like state and the OX-ergic and MCH-ergic system. In this study, UCMS induced physical and behavioral changes which were reversed by 6 weeks fluoxetine treatment. Neither UCMS nor antidepressant treatment affected the number of OX-IR neurons. Fos expression in DMH-PFA OX-ergic neurons was greater in mice subjected to UCMS compared to control animals, and reversed by 6 weeks fluoxetine treatment. The western blot study demonstrates that UCMS regimen decreased the expression of OX2 in the ventral hippocampus, thalamus and hypothalamus, and this reduction is prevented by antidepressant treatment in the two last structures. In contrast, OX2 expression in the PFC was increased in UCMS-

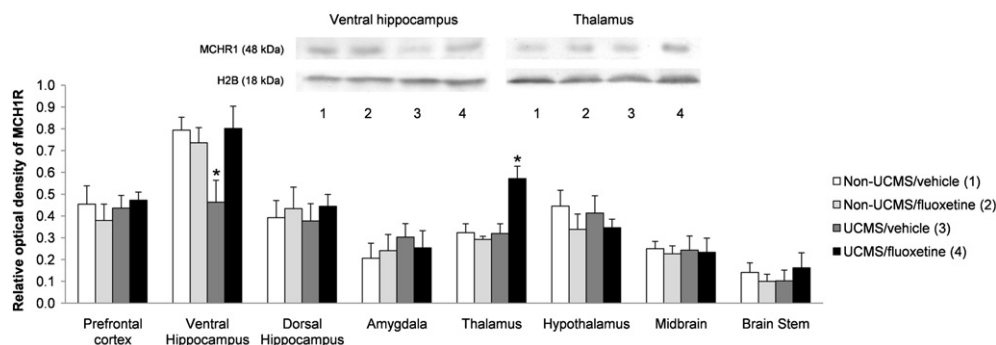


Fig. 8. Effects of the unpredictable chronic mild stress (UCMS) and 6-week fluoxetine treatment (20 mg/kg/day) on MCH receptor 1 expression. MCHR1 expression in ventral hippocampus was significantly decreased in UCMS-subjected mice, and 6-week fluoxetine treatment reversed this reduction ($*p < 0.05$; UCMS/vehicle versus non-UCMS/vehicle and UCMS/vehicle versus UCMS/fluoxetine). UCMS increased MCHR1 expression in thalamus of fluoxetine-treated mice ($*p < 0.05$; UCMS/fluoxetine versus UCMS/vehicle and non-UCMS/fluoxetine) (mean $\pm$ SEM, $n = 4$ mice/group).

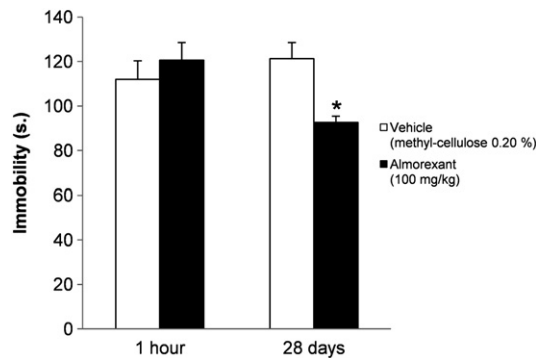


Fig. 9. Effects of acute (1 h before the test) or 28 days almorexant treatment in tail suspension test (TST). No effect was observed 1 h after almorexant administration, whereas 28 days of treatment significantly decreased immobility in the TST (*corrected $p < 0.0125$; 28 days/vehicle versus 28 days/almorexant) (mean $\pm$ SEM, $n = 7$ mice/group).

subjected mice receiving fluoxetine while no effect of UCMS or antidepressant treatment was found on the expression of OX_{R1}. The number and percentage of MCH neurons with Fos-IR nuclei were not affected by UCMS regimen and/or fluoxetine treatment. However, western blot analysis revealed that in stressed animals, MCH_{R1} expression was increased in thalamus and decreased in the ventral hippocampus, while 6 weeks fluoxetine treatment reversed this decrease. Finally, chronic but not acute treatment with the dual OX receptor antagonist almorexant in non-stressed animals reduced the time of immobility in tail suspension test.

4.1. Physical and behavioral changes affected by the UCMS model of depression and chronic antidepressant treatment

The UCMS procedure induced a depressive-like state in mice regarding their physical condition, with a clear deterioration of coat state. Chronic fluoxetine treatment reversed this deterioration corresponding to previous work conducted in our laboratory (Santarelli et al., 2003; Surget et al., 2008, 2009). We found a regular increase of body weight during the protocol, but less weight gain for UCMS-exposed mice. Chronic fluoxetine administration also increased the weight gain in stressed mice, an effect that we previously observed in our laboratory (Surget et al., 2009).

Behavioral analyses highlighted that UCMS increased aggressiveness in the resident–intruder (R–I) test and increased the time of immobility in the tail suspension test (TST). These behavioral effects were reversed by chronic SSRI antidepressant treatment, confirming previous studies (Roy et al., 2007; Surget et al., 2009). In addition, we observed that in non-depressive-like animals, fluoxetine decreased the immobility time in TST, in accordance with what has been observed when TST is used as a bioassay for screening antidepressants (Kulkarni and Dhir, 2007). The current protocol did not use classical anhedonia tests (such as sucrose intake) since this parameter is not adapted to measure UCMS-induced anhedonia in BALB/c mice (Surget and Belzung, 2008). Thus, this methodological approach is pertinent since observations, including poor personal hygiene, lessen weight gain, social disturbance and despair behavior, characterize depressive state in the human pathology. Altogether, these results support the relevance of this animal model of depression and confirm that UCMS has induced a depression-like phenotype in our mice.

4.2. Region-specific OX-ergic neuronal activation and antidepressant reversal in a validated rodent model of depression

One major finding of the present study is the increased activation of the OX-ergic system in response to UCMS as measured by

immediate early gene *c-fos* expression. Fos protein was used to assess the basal activity 2 h before sacrifice in depressive-like state resulting from long-term stress in OX-immunoreactive neurons. Previous studies demonstrated an increase of OX-ergic neuronal activation during strong and acute stress (Ida et al., 2000; Winsky-Sommerer et al., 2004), and to the best of our knowledge, we are the first to demonstrate this increase after unpredictable chronic mild stress.

Interestingly, the UCMS protocol only affected OX neurons located in the DMH-PFA areas, and not those located in LH. Previous studies investigating the involvement of the OX-ergic system in the regulation of sleep and arousal (Estabrooke et al., 2001), reward seeking (Harris et al., 2005, 2007) or in HPA axis response to stress (Sakamoto et al., 2004; Winsky-Sommerer et al., 2004) suggest a putative differential activation of OX-expressing neurons: OX neurons in LH may regulate reward processing whereas OX neurons in DMH-PFA regulate arousal and stress response (Harris and Aston-Jones, 2006). Furthermore, lateral and medial parts of the OX field do not share the same afferences (Yoshida et al., 2006), and the DMH is involved in various physiological and behavioral responses to emotional or exteroceptive stressors (DiMicco et al., 2002). Our data are consistent with these observations and demonstrate that, in depressive state modelised in mice, OX neurons located in the DMH-PFA are specifically activated.

Another important finding of this study is that chronic fluoxetine treatment (an SSRI antidepressant) reverses the effect of UCMS on OX neuronal activation. Previous studies reported a modulation of the OX-ergic system by the tricyclic antidepressant clomipramine: two weeks of treatment with this compound induced a reduction of both OX-A and OX-B levels in multiple brain regions in juvenile rats, while two days of treatment induced higher mRNA expression of prepro-OX in adult rat hypothalamus and prefrontal cortex as well as less OX-B in the hypothalamus (Feng et al., 2008, 2009). Considering that fluoxetine increases 5-HT levels, 5-HT may exert an inhibitory effect on OX neurons through 5-HT_{1A} receptors (Muraki et al., 2004; Kumar et al., 2007). Nevertheless, there is no evidence of causative links between a high level of 5-HT, the reduced OX neuronal activation and the decreased depressive-like symptoms observed in our fluoxetine-treated mice. However, the decrease of 5-HT_{1A} autoreceptor sensitivity described after unpredictable chronic stress (Bambico et al., 2009) and the fact that, in this study, fluoxetine acts only in depressive-like animals, suggest either that simple inhibition of OX neurons by 5-HT may not be a satisfactory explanation or that no effect of fluoxetine could be observed in treated non-stressed animals due to a low level of Fos neuronal activation. Further studies are thus needed to investigate the putative causative links between OX, 5-HT and depression.

4.3. Modifications of OX_{R1} and OX_{R2} expression following the UCMS and chronic fluoxetine treatment

We demonstrated that UCMS-exposed mice displayed a lower expression of OX_{R2} protein in hypothalamus and thalamus, and this was reversed by chronic antidepressant treatment. This decreased expression of the OX_{R2} could be the result of an endogenous mechanism to counteract the increased activation of OX-ergic system seen in UCMS-exposed mice. However, further investigations are needed to confirm this hypothesis. Our data also demonstrate that, in the prefrontal cortex (PFC), chronic fluoxetine administration induced an increase of OX_{R2} expression specifically in UCMS-subjected mice, without any effect of UCMS *per se*. The PFC, which is known to be affected in MDD, is strongly connected to the thalamus, through the thalamic paraventricular nucleus (PVT) (Hsu and Price, 2007). The PVT is innervated by 5-HT, OX and corticotrophin-releasing hormone, making it particularly sensitive

to depressive disorders (Hsu and Price, 2009). The link between thalamus and PFC may contribute to the higher density of OX2 observed in the PFC of UCMS/fluoxetine mice. Finally, besides higher expression of OX2 in ventral hippocampus compared to OX1, UCMS induced a decrease of OX2 expression in this area, without any effect of fluoxetine treatment. This provides new evidence of the involvement of ventral hippocampus in regulating affective states (Fanselow and Dong, 2010). To summarize, our results show that only OX2 expression in PFC, ventral hippocampus, thalamus and hypothalamus was modified by UCMS regimen and chronic fluoxetine treatment. These structures are known to be involved in regulation of emotions (Price and Drevets, 2010), and it demonstrates that OX2 might be a good candidate to account for the effect of UCMS and chronic antidepressant treatment (Chang et al., 2007).

4.4. Effects of UCMS and chronic fluoxetine treatment on MCH-ergic system and MCH receptor 1 expression

The present study found no effect of UCMS or chronic fluoxetine on neuronal activation in MCH-containing neurons. Indeed, immunohistochemical analysis was unable to confirm the involvement of MCH in depressive-like state of mice, most likely as a result of the intracardiac perfusions being performed at the beginning of active phase, when MCH-containing neurons are inactive (Hassani et al., 2009). Thus, differential MCH-ergic neuronal activation might be observed later during the day when dysregulation of MCH-ergic system could participate in daytime sleepiness.

Nevertheless, fluoxetine induced an increase of MCHR1 expression in thalamus of UCMS-subjected mice, and a decrease in ventral hippocampus, which was reversed by chronic fluoxetine treatment in the latter area. These modifications in MCHR1 expression are in line with previous studies demonstrating the involvement of MCH-ergic system in depression, through MCHR1. Acute and chronic treatments with MCHR1 antagonist (SNAP 94847) induce a decrease in latency to feed in the novelty-suppressed feeding test and an increase in the time spent in the light compartment in the light/dark paradigm (David et al., 2007). Furthermore, knockout mice for the MCHR1 gene exhibit anxiolytic-like behavior in open field with no sex differences, while only female mice had antidepressant-like behavior in TST and forced swim test (Roy et al., 2007). In the same study, C57Bl/6J mice subjected to 5-week chronic mild stress had increased MCHR1 expression in the hippocampus reversed by chronic fluoxetine treatment. In our study, we found the opposite pattern in the ventral hippocampus, possibly a result of strain difference and/or the duration of chronic stress. Nonetheless, these data are consistent with an involvement of MCH-ergic system in depressive-like state.

4.5. Antidepressant-like effect of almorexant in the tail suspension test

In order to further study the relevance of these findings, the recently synthesized dual OX receptor antagonist almorexant (ACT-078573), that selectively blocks both the two OX receptors (Brisbare-Roch et al., 2007), was tested in the tail suspension test paradigm. Mice exhibited more activity indicating antidepressant-like effect after 28 days of treatment with the antagonist. There was no effect after one single injection 1 h before testing. Thus, OX neurons must be chronically blocked to exert the antidepressant-like effect in the TST. To the best of our knowledge, this is the first demonstration of restorative effect of OX antagonist on depressive symptom. Interestingly, OX seems to be particularly

involved in psychological stress, since almorexant does not have the same effect in other kind of stressors, such as physical stress (Furlong et al., 2009). These data, with our OX activation study, underline the link between OX system and depressive-like state, but further investigations are needed to confirm its precise role.

In accordance with these results, Salomon et al. (2003) described that patients suffering from MDD, beside a reduced diurnal variation of OX level in CSF compared with healthy control subjects, had a trend to higher OX level in CSF than control group, and a significant decrease after five weeks of SSRI antidepressant treatment sertraline. In preclinical studies, an increase of OX-A levels has also been described in the hypothalamus of rats following a maternal separation (Feng et al., 2007), an early life stress considered as a model of depression. Additionally, an increase of OX-A and OX-B was observed in the hypothalamus of rats receiving neonatal administration of clomipramine, considered as an animal model of endogenous depression (Feng et al., 2008).

In contrast to our findings, fewer and smaller OX neurons as well as lower prepro-OX mRNA levels were found in Wistar–Kyoto rats, a genetic animal model of depression, compared to Wistar rats (Taheri et al., 2001; Allard et al., 2004). Moreover, CSF quantification in suicidal patients with MDD revealed a reduction of OX-A level compared with other patients suffering from dysthymia or adjustment disorders (Brundin et al., 2007). Recently, this research group demonstrated that CSF OX-A level of treated patients increased six month and one year after a suicide attempt (Brundin et al., 2009). However, few patients diagnosed with MDD were included in this last study and CSF quantification of OX is not bias-free since there might be a relatively long delay between the release of OXs and their appearance in CSF (Grady et al., 2006).

Taken together and despite inconsistencies of these correlative studies, it is still likely that the OX-ergic system is involved in the pathophysiology of depressive disorders. The antagonist study even suggests that changes in the activity of OX system is not secondary to a reduction of symptoms but may be causative.

4.6. Conclusion

In this study, the specific increase of OX neuron activation in the DMH-PFA in response to UCMS, the reversing action of the SSRI antidepressant fluoxetine on this higher activation and the antidepressant-like effect of OX antagonist in the TST may be critical in understanding the pathophysiology of major depressive disorders. In addition, our western blot data demonstrate a putative key role of OX2 in the physiological mechanism underlying OX-ergic system activation in depressive-like state. It demonstrates a link between depression and OXs, and suggests that OXs may play a significant role in the causation of depressive disorders.

Indeed, dysregulation of OX-ergic system may participate in several disturbances observed in MDD. OXs regulate sleep and wakefulness through interactions with regions that regulate energy homeostasis, reward and emotions (Mieda and Sakurai, 2009), all of these functions being altered in MDD. OX neurons also promote wakefulness (Hagan et al., 1999), and OX-ergic perturbation, particularly during sleep, may contribute to sleep abnormalities observed in depressed patients (Armitage and Hoffmann, 2001). Furthermore, OXs regulate feeding behavior and energy expenditure through increased arousal (Yamanaka et al., 2003), and the antidepressant-like effect of calorie restriction in two different rodent models of depression is dependent of the OX-ergic system (Lutter et al., 2008). These outcomes also underline the involvement of OXs in depression, since MDD is characterized by disordered eating pattern and loss of energy. Moreover, OX-ergic neurons have reciprocal connections with the mesolimbic dopamine reward system, and activate neurons in the ventral tegmental

area (Nakamura et al., 2000). The mesolimbic dopamine system is mainly linked with the rewarding effects of food, sex, and drugs of abuse, and has recently been proposed to contribute to the pathophysiology of depression, since this condition is associated with anhedonia and reduced motivation (Nestler and Carlezon, 2006). Finally, the OX-ergic system is strongly linked to HPA axis, with reciprocal innervations from the PVN (Spinazzi et al., 2006), which is disturbed in MDD. Central administration of OX-A increases plasma levels of ACTH and corticosterone, and activates CRF-expressing neurons in the PVN (Hagan et al., 1999; Kuru et al., 2000). The MCH-ergic system is also implicated in the regulation of sleep, feeding behavior, drug reward and emotions (Pissios et al., 2006; Adamantidis and de Lecea, 2008), demonstrating a putative involvement of this neuropeptide in the pathophysiology of MDD. Taken together, our findings open new perspectives regarding the involvement of the OX-ergic system in depression.

Acknowledgments

We would like to thank Dr. Petra S. van Nieuwenhuijzen for thoughtful comments on this article. We wish to thank Dr. François Jenck and Actelion Pharmaceuticals for the gift of almorexant. The authors do not have any competing interests with the present work.

Appendix. Supplementary data

Supplementary information associated with this article can be found in the online version, at [doi:10.1016/j.neuropharm.2011.04.022](https://doi.org/10.1016/j.neuropharm.2011.04.022).

References

- Adamantidis, A., de Lecea, L., 2008. Physiological arousal: a role for hypothalamic systems. *Cell. Mol. Life Sci.* 65, 1475–1488.
- Al-Barazanj, K.A., Wilson, S., Baker, J., Jessop, D.S., Harbuz, M.S., 2001. Central orexin-A activates hypothalamic–pituitary–adrenal axis and stimulates hypothalamic corticotropin releasing factor and arginine vasopressin neurones in conscious rats. *J. Neuroendocrinol.* 13, 421–424.
- Allard, J.S., Tizabi, Y., Shaffery, J.P., Trough, C.O., Manaye, K., 2004. Stereological analysis of the hypothalamic hypocretin/orexin neurons in an animal model of depression. *Neuropeptides* 38, 311–315.
- Armitage, R., Hoffmann, R.F., 2001. Sleep EEG, depression and gender. *Sleep Med. Rev.* 5, 237–246.
- Bambico, F.R., Nguyen, N.T., Gobbi, G., 2009. Decline in serotonergic firing activity and desensitization of 5-HT1A autoreceptors after chronic unpredictable stress. *Eur. Neuropsychopharmacol.* 19, 215–228.
- Brisbare-Roch, C., Dingemans, J., Koberstein, R., Hoeber, P., Aissaoui, H., Flores, S., Mueller, C., Nayler, O., van Gerven, J., de Haas, S.L., Hess, P., Qiu, C., Buchmann, S., Scherz, M., Weller, T., Fischli, W., Clozel, M., Jenck, F., 2007. Promotion of sleep by targeting the orexin system in rats, dogs and humans. *Nat. Med.* 13, 150–155.
- Brundin, L., Bjorkqvist, M., Petersen, A., Traskman-Bendz, L., 2007. Reduced orexin levels in the cerebrospinal fluid of suicidal patients with major depressive disorder. *Eur. Neuropsychopharmacol.* 17, 573–579.
- Brundin, L., Bjorkqvist, M., Traskman-Bendz, L., Petersen, A., 2009. Increased orexin levels in the cerebrospinal fluid the first year after a suicide attempt. *J. Affect. Disord.* 113, 179–182.
- Chang, H., Saito, T., Ohiwa, N., Tateoka, M., Deocaris, C.C., Fujikawa, T., Soya, H., 2007. Inhibitory effects of an orexin-2 receptor antagonist on orexin A- and stress-induced ACTH responses in conscious rats. *Neurosci. Res.* 57, 462–466.
- Chung, S., Hopf, F.W., Nagasaki, H., Li, C.Y., Belluzzi, J.D., Bonci, A., Civelli, O., 2009. The melanin-concentrating hormone system modulates cocaine reward. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 106, 6772–6777.
- David, D.J., Klemenhagen, K.C., Holick, K.A., Saxe, M.D., Mendez, I., Santarelli, L., Craig, D.A., Zhong, H., Swanson, C.J., Hegde, L.G., Ping, X.I., Dong, D., Marzabadi, M.R., Gerald, C.P., Hen, R., 2007. Efficacy of the MCH1 antagonist N-[3-(1-[[4-(3,4-difluorophenoxy)phenyl]methyl](4-piperidyl))-4-methylphenyl]-2-methylpropanamide (SNAP 94847) in mouse models of anxiety and depression following acute and chronic administration is independent of hippocampal neurogenesis. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 321, 237–248.
- de Lecea, L., Kilduff, T.S., Peyron, C., Gao, X., Foye, P.E., Danielson, P.E., Fukuhara, C., Battenberg, E.L., Gautvik, V.T., Bartlett, F.S., Frankel, W.N., van den Pol, A.N., Bloom, F.E., Gautvik, K.M., Sutcliffe, J.G., 1998. The hypocretins: hypothalamus-specific peptides with neuroexcitatory activity. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 95, 322–327.
- DiMicco, J.A., Samuels, B.C., Zaretskaia, M.V., Zaretsky, D.V., 2002. The dorsomedial hypothalamus and the response to stress: part renaissance, part revolution. *Pharmacol. Biochem. Behav.* 71, 469–480.
- Drevets, W.C., Price, J.L., Furey, M.L., 2008. Brain structural and functional abnormalities in mood disorders: implications for neurocircuitry models of depression. *Brain Struct. Funct.* 213, 93–118.
- Estabrooke, I.V., McCarthy, M.T., Ko, E., Chou, T.C., Chemelli, R.M., Yanagisawa, M., Saper, C.B., Scammell, T.E., 2001. Fos expression in orexin neurons varies with behavioral state. *J. Neurosci.* 21, 1656–1662.
- Fadel, J., Bubser, M., Deutch, A.Y., 2002. Differential activation of orexin neurons by antipsychotic drugs associated with weight gain. *J. Neurosci.* 22, 6742–6746.
- Fanselow, M.S., Dong, H.W., 2010. Are the dorsal and ventral hippocampus functionally distinct structures? *Neuron* 65, 7–19.
- Feng, P., Hu, Y., Li, D., Vurbic, D., Fan, H., Wang, S., Strohl, K.P., 2009. The effect of clomipramine on wake/sleep and orexinergic expression in rats. *J. Psychopharmacol.* 23, 559–566.
- Feng, P., Vurbic, D., Wu, Z., Hu, Y., Strohl, K.P., 2008. Changes in brain orexin levels in a rat model of depression induced by neonatal administration of clomipramine. *J. Psychopharmacol.* 22, 784–791.
- Feng, P., Vurbic, D., Wu, Z., Strohl, K.P., 2007. Brain orexins and wake regulation in rats exposed to maternal deprivation. *Brain Res.* 1154, 163–172.
- Franklin, K.B.J., Paxinos, G., 2008. *The Mouse Brain in Stereotaxic Coordinates*, third ed. Elsevier Academic Press, New York.
- Furlong, T.M., Vianna, D.M., Liu, L., Carrière, P., 2009. Hypocretin/orexin contributes to the expression of some but not all forms of stress and arousal. *Eur. J. Neurosci.* 30, 1603–1614.
- Grady, S.P., Nishino, S., Czeisler, C.A., Hepner, D., Scammell, T.E., 2006. Diurnal variation in CSF orexin-A in healthy male subjects. *Sleep* 29, 295–297.
- Hagan, J.J., Leslie, R.A., Patel, S., Evans, M.L., Wattam, T.A., Holmes, S., Benham, C.D., Taylor, S.G., Routledge, C., Hemmati, P., Munton, R.P., Ashmeade, T.E., Shah, A.S., Hatcher, J.P., Hatcher, P.D., Jones, D.N., Smith, M.I., Piper, D.C., Hunter, A.J., Porter, R.A., Upton, N., 1999. Orexin A activates locus coeruleus cell firing and increases arousal in the rat. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 96, 10911–10916.
- Harris, G.C., Aston-Jones, G., 2006. Arousal and reward: a dichotomy in orexin function. *Trends Neurosci.* 29, 571–577.
- Harris, G.C., Wimmer, M., Aston-Jones, G., 2005. A role for lateral hypothalamic orexin neurons in reward seeking. *Nature* 437, 556–559.
- Harris, G.C., Wimmer, M., Randall-Thompson, J.F., Aston-Jones, G., 2007. Lateral hypothalamic orexin neurons are critically involved in learning to associate an environment with morphine reward. *Behav. Brain Res.* 183, 43–51.
- Hassani, O.K., Lee, M.G., Jones, B.E., 2009. Melanin-concentrating hormone neurons discharge in a reciprocal manner to orexin neurons across the sleep–wake cycle. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 106, 2418–2422.
- Hsu, D.T., Price, J.L., 2007. Midline and intralaminar thalamic connections with the orbital and medial prefrontal networks in macaque monkeys. *J. Comp. Neurol.* 504, 89–111.
- Hsu, D.T., Price, J.L., 2009. Paraventricular thalamic nucleus: subcortical connections and innervation by serotonin, orexin, and corticotropin-releasing hormone in macaque monkeys. *J. Comp. Neurol.* 512, 825–848.
- Ida, T., Nakahara, K., Murakami, T., Hanada, R., Nakazato, M., Murakami, N., 2000. Possible involvement of orexin in the stress reaction in rats. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 270, 318–323.
- Kennedy, A.R., Todd, J.F., Dhillon, W.S., Seal, L.J., Ghatei, M.A., O’Toole, C.P., Jones, M., Witty, D., Winborne, K., Riley, G., Hervieu, G., Wilson, S., Bloom, S.R., 2003. Effect of direct injection of melanin-concentrating hormone into the paraventricular nucleus: further evidence for a stimulatory role in the adrenal axis via SL-1. *J. Neuroendocrinol.* 15, 268–272.
- Kulkarni, S.K., Dhir, A., 2007. Effect of various classes of antidepressants in behavioral paradigms of despair. *Prog. Neuropsychopharmacol. Biol. Psychiatry* 31, 1248–1254.
- Kumar, S., Szymusiak, R., Bashir, T., Rai, S., McGinty, D., Alam, M.N., 2007. Effects of serotonin on perifornical-lateral hypothalamic area neurons in rat. *Eur. J. Neurosci.* 25, 201–212.
- Kuru, M., Ueta, Y., Serino, R., Nakazato, M., Yamamoto, Y., Shibuya, I., Yamashita, H., 2000. Centrally administered orexin/hypocretin activates HPA axis in rats. *Neuroreport* 11, 1977–1980.
- Lutter, M., Krishnan, V., Russo, S.J., Jung, S., McClung, C.A., Nestler, E.J., 2008. Orexin signaling mediates the antidepressant-like effect of calorie restriction. *J. Neurosci.* 28, 3071–3075.
- Marcus, J.N., Aschenasi, C.J., Lee, C.E., Chemelli, R.M., Saper, C.B., Yanagisawa, M., Elmquist, J.K., 2001. Differential expression of orexin receptors 1 and 2 in the rat brain. *J. Comp. Neurol.* 435, 6–25.
- Martinez, G.S., Smale, L., Nunez, A.A., 2002. Diurnal and nocturnal rodents show rhythms in orexinergic neurons. *Brain Res.* 955, 1–7.
- Mieda, M., Sakurai, T., 2009. Integrative physiology of orexins and orexin receptors. *CNS Neurol. Disord. Drug Targets* 8, 281–295.
- Muraki, Y., Yamanaka, A., Tsujino, N., Kilduff, T.S., Goto, K., Sakurai, T., 2004. Serotonergic regulation of the orexin/hypocretin neurons through the 5-HT1A receptor. *J. Neurosci.* 24, 7159–7166.
- Nakamura, T., Uramura, K., Nambu, T., Yada, T., Goto, K., Yanagisawa, M., Sakurai, T., 2000. Orexin-induced hyperlocomotion and stereotypy are mediated by the dopaminergic system. *Brain Res.* 873, 181–187.
- Nestler, E.J., Carlezon Jr., W.A., 2006. The mesolimbic dopamine reward circuit in depression. *Biol. Psychiatry* 59, 1151–1159.

- Peyron, C., Tighe, D.K., van den Pol, A.N., de Lecea, L., Heller, H.C., Sutcliffe, J.G., Kilduff, T.S., 1998. Neurons containing hypocretin (orexin) project to multiple neuronal systems. *J. Neurosci.* 18, 9996–10015.
- Pissios, P., Bradley, R.L., Maratos-Flier, E., 2006. Expanding the scales: the multiple roles of MCH in regulating energy balance and other biological functions. *Endocr. Rev.* 27, 606–620.
- Price, J.L., Drevets, W.C., 2010. Neurocircuitry of mood disorders. *Neuropsychopharmacology* 35, 192–216.
- Qu, D., Ludwig, D.S., Gammeltoft, S., Piper, M., Pellemounter, M.A., Cullen, M.J., Mathes, W.F., Przyppek, R., Kanarek, R., Maratos-Flier, E., 1996. A role for melanin-concentrating hormone in the central regulation of feeding behaviour. *Nature* 380, 243–247.
- Roy, M., David, N., Cueva, M., Giorgetti, M., 2007. A study of the involvement of melanin-concentrating hormone receptor 1 (MCHR1) in murine models of depression. *Biol. Psychiatry* 61, 174–180.
- Sakamoto, F., Yamada, S., Ueta, Y., 2004. Centrally administered orexin-A activates corticotropin-releasing factor-containing neurons in the hypothalamic paraventricular nucleus and central amygdaloid nucleus of rats: possible involvement of central orexins on stress-activated central CRF neurons. *Regul. Pept.* 118, 183–191.
- Sakurai, T., Amemiya, A., Ishii, M., Matsuzaki, I., Chemelli, R.M., Tanaka, H., Williams, S.C., Richardson, J.A., Kozlowski, G.P., Wilson, S., Arch, J.R., Buckingham, R.E., Haynes, A.C., Carr, S.A., Annan, R.S., McNulty, D.E., Liu, W.S., Terrett, J.A., Elshourbagy, N.A., Bergsma, D.J., Yanagisawa, M., 1998. Orexins and orexin receptors: a family of hypothalamic neuropeptides and G protein-coupled receptors that regulate feeding behavior. *Cell* 92, 573–585.
- Salomon, R.M., Ripley, B., Kennedy, J.S., Johnson, B., Schmidt, D., Zeitzer, J.M., Nishino, S., Mignot, E., 2003. Diurnal variation of cerebrospinal fluid hypocretin-1 (orexin-A) levels in control and depressed subjects. *Biol. Psychiatry* 54, 96–104.
- Santarelli, L., Saxe, M., Gross, C., Surget, A., Battaglia, F., Dulawa, S., Weisstaub, N., Lee, J., Duman, R., Arancio, O., Belzung, C., Hen, R., 2003. Requirement of hippocampal neurogenesis for the behavioral effects of antidepressants. *Science* 301, 805–809.
- Shaffer, J.P., 1995. Multiple hypothesis testing. *Annu. Rev. Clin. Psychol.* 46, 561–584.
- Spinazzi, R., Andreis, P.G., Rossi, G.P., Nussdorfer, G.G., 2006. Orexins in the regulation of the hypothalamic–pituitary–adrenal axis. *Pharmacol. Rev.* 58, 46–57.
- Steru, L., Chermat, R., Thierry, B., Simon, P., 1985. The tail suspension test: a new method for screening antidepressants in mice. *Psychopharmacol. (Berl.)* 85, 367–370.
- Surget, A., Belzung, C., 2008. Unpredictable chronic mild stress in mice. In: Kalueff, A.V., LaPorte, J.L. (Eds.), *Experimental Animal Models in Neurobehavioral Research*. Nova Science Publishers, New York, pp. 79–112.
- Surget, A., Saxe, M., Leman, S., Ibarguen-Vargas, Y., Chalon, S., Griebel, G., Hen, R., Belzung, C., 2008. Drug-dependent requirement of hippocampal neurogenesis in a model of depression and of antidepressant reversal. *Biol. Psychiatry* 64, 293–301.
- Surget, A., Wang, Y., Leman, S., Ibarguen-Vargas, Y., Edgar, N., Griebel, G., Belzung, C., Sibille, E., 2009. Corticolimbic transcriptome changes are state-dependent and region-specific in a rodent model of depression and of antidepressant reversal. *Neuropsychopharmacology* 34, 1363–1380.
- Taheri, S., Gardiner, J., Hafizi, S., Murphy, K., Dakin, C., Seal, L., Small, C., Ghatel, M., Bloom, S., 2001. Orexin A immunoreactivity and preproorexin mRNA in the brain of Zucker and WKY rats. *Neuroreport* 12, 459–464.
- Trivedi, P., Yu, H., MacNeil, D.J., Van der Ploeg, L.H., Guan, X.M., 1998. Distribution of orexin receptor mRNA in the rat brain. *FEBS Lett.* 438, 71–75.
- Winsky-Sommerer, R., Yamanaka, A., Diano, S., Borok, E., Roberts, A.J., Sakurai, T., Kilduff, T.S., Horvath, T.L., de, L.L., 2004. Interaction between the corticotropin-releasing factor system and hypocretins (orexins): a novel circuit mediating stress response. *J. Neurosci.* 24, 11439–11448.
- Yamanaka, A., Beuckmann, C.T., Willie, J.T., Hara, J., Tsujino, N., Mieda, M., Tominaga, M., Yagami, K., Sugiyama, F., Goto, K., Yanagisawa, M., Sakurai, T., 2003. Hypothalamic orexin neurons regulate arousal according to energy balance in mice. *Neuron* 38, 701–713.
- Yoshida, K., McCormack, S., Espana, R.A., Crocker, A., Scammell, T.E., 2006. Afferents to the orexin neurons of the rat brain. *J. Comp. Neurol.* 494, 845–861.
- Yoshida, Y., Fujiki, N., Nakajima, T., Ripley, B., Matsumura, H., Yoneda, H., Mignot, E., Nishino, S., 2001. Fluctuation of extracellular hypocretin-1 (orexin A) levels in the rat in relation to the light-dark cycle and sleep-wake activities. *Eur. J. Neurosci.* 14, 1075–1081.

Supplementary data

Supplementary Table 1

Statistical analysis with Kruskal-Wallis H -test of differences between groups.

	Week 1	Week 2	Week 3	Week 4	Week 5	Week 6	Week 7	Week 8
Coat state	$H_{(3,64)} = 46.14$ $p < 0.001^{***}$	$H_{(3,64)} = 38.64$ $p < 0.001^{***}$	$H_{(3,64)} = 49.35$ $p < 0.001^{***}$	$H_{(3,64)} = 34.54$ $p < 0.001^{***}$	$H_{(3,64)} = 49.91$ $p < 0.001^{***}$	$H_{(3,64)} = 42.73$ $p < 0.001^{***}$	$H_{(3,64)} = 47.5$ $p < 0.001^{***}$	$H_{(3,64)} = 48.81$ $p < 0.001^{***}$
Body weight	$H_{(3,64)} = 9.85$ $p < 0.05^*$	$H_{(3,64)} = 12.55$ $p < 0.01^{**}$	$H_{(3,64)} = 20.53$ $p < 0.001^{***}$	$H_{(3,64)} = 19.85$ $p < 0.001^{***}$	$H_{(3,64)} = 15.14$ $p < 0.01^{**}$	$H_{(3,64)} = 19.3$ $p < 0.001^{***}$	$H_{(3,64)} = 15.79$ $p < 0.01^{**}$	$H_{(3,64)} = 10.61$ $p < 0.05^*$

* $p < 0.05$, ** $p < 0.01$ and *** $p < 0.001$.

Supplementary Table 2

Statistical analysis with Bonferroni-corrected Mann-Whitney U -test of UCMS and fluoxetine treatment effects on coat state.

	Week 1	Week 2	Week 3	Week 4	Week 5	Week 6	Week 7	Week 8
Non-UCMS/vehicle	$U = 112$	$U = 116$	$U = 80$	$U = 92$	$U = 90.5$	$U = 58.5$	$U = 92$	$U = 107$
versus	$n = 16$	$n = 16$	$n = 16$	$n = 16$	$n = 16$	$n = 16$	$n = 16$	$n = 16$
Non-UCMS/fluoxetine	Corr. $p > 0.0125$	Corr. $p > 0.0125$	Corr. $p > 0.0125$	Corr. $p > 0.0125$	Corr. $p > 0.0125$	Corr. $p < 0.0125^*$	Corr. $p > 0.0125$	Corr. $p > 0.0125$
UCMS/vehicle	$U = 87$	$U = 94$	$U = 90.5$	$U = 71$	$U = 42$	$U = 39$	$U = 16.5$	$U = 7.5$
versus	$n = 16$	$n = 16$	$n = 16$	$n = 16$	$n = 16$	$n = 16$	$n = 16$	$n = 16$
UCMS/fluoxetine	Corr. $p > 0.0125$	Corr. $p > 0.0125$	Corr. $p > 0.0125$	Corr. $p > 0.0125$	Corr. $p < 0.0025^{**}$	Corr. $p < 0.0025^{**}$	Corr. $p < 0.00025^{***}$	Corr. $p < 0.00025^{***}$
Non-UCMS/vehicle	$U = 0$	$U = 21$	$U = 0$	$U = 32$	$U = 0$	$U = 4.5$	$U = 0$	$U = 0$
versus	$n = 16$	$n = 16$	$n = 16$	$n = 16$	$n = 16$	$n = 16$	$n = 16$	$n = 16$
UCMS/vehicle	Corr. $p < 0.00025^{***}$	Corr. $p < 0.00025^{***}$	Corr. $p < 0.00025^{***}$	Corr. $p < 0.00025^{***}$	Corr. $p < 0.00025^{***}$	Corr. $p < 0.00025^{***}$	Corr. $p < 0.00025^{***}$	Corr. $p < 0.00025^{***}$
Non-UCMS/fluoxetine	$U = 15$	$U = 7$	$U = 2.5$	$U = 14$	$U = 7$	$U = 24.5$	$U = 18.5$	$U = 20$
versus	$n = 16$	$n = 16$	$n = 16$	$n = 16$	$n = 16$	$n = 16$	$n = 16$	$n = 16$
UCMS/fluoxetine	Corr. $p < 0.00025^{***}$	Corr. $p < 0.00025^{***}$	Corr. $p < 0.00025^{***}$	Corr. $p < 0.00025^{***}$	Corr. $p < 0.00025^{***}$	Corr. $p < 0.00025^{***}$	Corr. $p < 0.00025^{***}$	Corr. $p < 0.00025^{***}$

Significance level was adjusted in order to protect against type I errors. An α' risk was used, with $\alpha' = \alpha / k$, k being the number of hypotheses that are tested. With four hypotheses ($k = 4$), statistical significances were defined as * $p < 0.0125$, ** $p < 0.0025$ and *** $p < 0.00025$.

Supplementary Table 3

Statistical analysis with Bonferroni-corrected Mann-Whitney U -test of UCMS and fluoxetine treatment effects on weight gain.

	Week 1	Week 2	Week 3	Week 4	Week 5	Week 6	Week 7	Week 8
Non-UCMS/vehicle	$U = 68.5$	$U = 64$	$U = 115.5$	$U = 101$	$U = 100.5$	$U = 94.5$	$U = 92$	$U = 118$
versus	$n = 16$	$n = 16$	$n = 16$	$n = 16$	$n = 16$	$n = 16$	$n = 16$	$n = 16$
Non-UCMS/fluoxetine	Corr. $p > 0.0125$	Corr. $p > 0.0125$	Corr. $p > 0.0125$	Corr. $p > 0.0125$	Corr. $p > 0.0125$	Corr. $p > 0.0125$	Corr. $p > 0.0125$	Corr. $p > 0.0125$
UCMS/vehicle	$U = 69.5$	$U = 87$	$U = 116.5$	$U = 83$	$U = 78$	$U = 90.5$	$U = 45.5$	$U = 53.5$
versus	$n = 16$	$n = 16$	$n = 16$	$n = 16$	$n = 16$	$n = 16$	$n = 16$	$n = 16$
UCMS/fluoxetine	Corr. $p > 0.0125$	Corr. $p > 0.0125$	Corr. $p > 0.0125$	Corr. $p > 0.0125$	Corr. $p > 0.0125$	Corr. $p > 0.0125$	Corr. $p < 0.0025^{**}$	Corr. $p < 0.0125^*$
Non-UCMS/vehicle	$U = 122$	$U = 106.5$	$U = 45.5$	$U = 44.5$	$U = 41.5$	$U = 17.5$	$U = 56$	$U = 61.5$
versus	$n = 16$	$n = 16$	$n = 16$	$n = 16$	$n = 16$	$n = 16$	$n = 16$	$n = 16$
UCMS/vehicle	Corr. $p > 0.0125$	Corr. $p > 0.0125$	Corr. $p < 0.0025^{**}$	Corr. $p < 0.0025^{**}$	Corr. $p < 0.0025^{**}$	Corr. $p < 0.00025^{***}$	Corr. $p < 0.0125^*$	Corr. $p < 0.0125^*$
Non-UCMS/fluoxetine	$U = 127$	$U = 79.5$	$U = 43$	$U = 55.5$	$U = 86$	$U = 78$	$U = 128$	$U = 107.5$
versus	$n = 16$	$n = 16$	$n = 16$	$n = 16$	$n = 16$	$n = 16$	$n = 16$	$n = 16$
UCMS/fluoxetine	Corr. $p > 0.0125$	Corr. $p > 0.0125$	Corr. $p < 0.0025^{**}$	Corr. $p < 0.0125^*$	Corr. $p > 0.0125$	Corr. $p > 0.0125$	Corr. $p > 0.0125$	Corr. $p > 0.0125$

Significance level was adjusted in order to protect against type I errors. An α' risk was used, with $\alpha' = \alpha / k$, k being the number of hypotheses that are tested. With four hypotheses ($k = 4$), statistical significances were defined as * $p < 0.0125$, ** $p < 0.0025$ and *** $p < 0.00025$.

2. Etude de l'effet de la privation partielle de sommeil sur le système orexinergique lors d'un état dépressif-like chez la souris

La dépression est souvent associée à une anhédonie et des perturbations du sommeil, et les privations de sommeil peuvent exercer un effet antidépresseur. De récentes études ont mis en évidence l'implication du système orexinergique dans la physiopathogénie de la dépression. Les orexines sont des neuropeptides promoteur d'éveil également capable de réguler du système de récompense. En particulier, l'augmentation de l'activité des neurones orexinergiques situés dans la partie latérale de l'hypothalamus (*lateral hypothalamus*, LH) participent à l'activation du système de récompense, alors que l'activation des neurones situés dans la partie dorsomédiale et périfornicale de l'hypothalamus (*dorsomedial hypothalamus and perifornical hypothalamic area*, DMH-PFA) contribuent au maintien de l'état de veille.

Les relations entre le système orexinergique, le sommeil et la dépression sont à ce jour peu connues. Pour mieux comprendre ces relations, nous avons soumis des souris BALB/c à un protocole de stress chronique imprédictible modéré (*unpredictable chronic mild stress*, UCMS) pendant 8 semaines, puis avons réalisé un double marquage immunohistochimique pour l'orexine-A et la protéine Fos dans le but d'étudier, lors d'un état dépressif-like, l'effet de 24h de privation partielle de sommeil (*partial sleep deprivation*, PSD) seul ou associé à 6 semaines de traitement avec un antidépresseur inhibiteur de recapture sélectif de sérotonine (fluoxétine, 15 mg/kg/jour, i.p.).

L'UCMS a induit des altérations physiques et comportementales, ainsi qu'une augmentation de l'activation des neurones orexinergique spécifiquement dans le DMH-PFA, qui ont été contrecarrées par 6 semaines de traitements à la fluoxétine. Chez les souris non stressées, la PSD a induit une augmentation de l'expression de la protéine Fos uniquement dans les neurones à orexines situés dans le DMH-PFA, que le traitement chronique à la fluoxétine a été en mesure de contrecarrer. Enfin, chez les souris stressées, la PSD a provoqué une augmentation générale de l'activation orexinergique dans le DMH-PFA et dans le LH, également contrecarrée par 6 semaines de traitement à la fluoxétine.

Cette étude confirme l'implication des neurones orexinergiques du DMH-PFA dans la régulation de l'état de veille et dans les états dépressifs-*like*, et propose une nouvelle hypothèse quant au possible rôle des orexines à la fois dans les troubles du sommeil associés à la dépression, mais aussi dans l'effet antidépresseurs des privations de sommeil chez les individus dépressifs.

**Activation of orexin neurons following
partial sleep deprivation and
unpredictable chronic mild stress in mice**

Activation of orexin neurons following partial sleep deprivation and unpredictable chronic mild stress in mice

Mathieu Nollet ^a, Philippe Gaillard ^{a, b}, Catherine Belzung ^a, Samuel Leman ^a

^a Inserm U930, Université François Rabelais, 37200 Tours, France;

^b Clinique Psychiatrique Universitaire, CHRU de Tours, 37044 Tours, France.

Corresponding author: Samuel Leman (samuel.leman@univ-tours.fr)

Key Words: depression, orexin/hypocretin, dorsomedial/perifornical hypothalamic area, lateral hypothalamus, partial sleep deprivation, antidepressant

Abstract

Background: Major depression (MD) is often associated with anhedonia and sleep disturbances, while sleep deprivation can induces antidepressant effects. Interestingly, orexins (or hypocretins) are wake-promoting peptides also implicated in reward system, and an increase of orexin signaling has recently been involved in pathophysiology of MD. Increase activation of orexin neurons located in the lateral hypothalamus (LH) sustains hedonic features, while increase activation of those located in the dorsomedial hypothalamus and perifornical hypothalamic area (DMH-PFA) promote wakefulness. Nevertheless, the link between orexinergic system, sleep and depression is unclear.

Methods: BALB/c mice were exposed to an unpredictable chronic mild stress (UCMS), a rodent model of depression, for 8 weeks. Double immunohistochemical labeling for orexin-containing neurons and Fos protein was performed in order to investigate in depressive-like state the effect of with a 24h-partial sleep deprivation (PSD) alone or associated with chronic antidepressant treatment (SSRI fluoxetine, 15 mg/kg/day) on the orexin neuronal activation of the LH and the DMH-PFA.

Results: UCMS induced physical and behavioral alterations, as well as an increase of orexinergic neuronal activation specifically in the DMH-PFA, that were reversed by 6-weeks fluoxetine treatment. In non-UCMS mice, PSD induced an increase of Fos expression in orexin neurons in the DMH-PFA but not in the LH, while 6-weeks fluoxetine treatment counteracted this PSD-induced effect. In UCMS mice, PSD led to an overall increase of the orexinergic activity in both parts of the hypothalamus, also counteracted by chronic antidepressant treatment.

Conclusion: This study confirms the involvement of the DMH-PFA orexinergic system in the regulation of sleep and wakefulness and in depressive-like state, and proposes a new

insight regarding the putative involvement of orexines in both sleep impairments and in antidepressant effect of sleep deprivation observed in depressed individuals.

Introduction

Sleep abnormalities have been considered for a long time as a predominant symptom of major depression (MD), since more than 80% of depressed individuals experienced sleep impairments, particularly insomnia, which persistence is correlated with re-occurrence of depressive episodes and suicidal acts (Armitage and Hoffmann, 2001). Alterations of sleep architecture include disturbed sleep continuity (fragmented sleep), loss of slow wave (SW) sleep and changes in rapid eye movement (REM) sleep with a shortened latency to REM sleep onset and an increase of its duration (Benca *et al.*, 1997; Winokur *et al.*, 2001). Furthermore, most types of antidepressants induce a robust suppression of REM sleep (Winokur *et al.*, 2001), and sleep deprivation can accelerate the antidepressant response, especially REM sleep deprivation (Wu and Bunney, 1990; Gillin *et al.*, 2001; Ringel and Szuba, 2001).

Orexin neurons (also called hypocretin) are well-known to play an important role in maintaining arousal state (Sakurai, 2007), and regulate other physiological and behavioral features such as feeding behavior (Cason *et al.*, 2010), reward-related motivation (Thompson and Borgland, 2011) and stress responses (Berridge *et al.*, 2010). Orexin neurons produce two neuropeptides, orexin-A (OX-A) and -B (OX-B), and are exclusively located in the three contiguous hypothalamic areas, the dorsomedial hypothalamus (DMH), the perifornical hypothalamic area (PFA) and the lateral hypothalamus (LH) (de Lecea *et al.*, 1998; Sakurai *et al.*, 1998), from which they send projections throughout the

brain and spinal cord (Peyron *et al.*, 1998; Date *et al.*, 1999; Nambu *et al.*, 1999). Extracellular measurement of OX-A level in the rat hypothalamus indicates a circadian fluctuation with an increase and a decrease of OX-A release respectively during active and rest phase (Yamanaka *et al.*, 2003). Studies of Fos protein expression in orexin neurons also shown an increase of orexinergic system activity during wakefulness and sleep deprivation and a decrease during sleep phase in rats (Estabrooke *et al.*, 2001; Modirrousta *et al.*, 2005). In addition, intracerebroventricular (ICV) administration of OX-A in rats during sleep period increases arousal two and three hours later, and induces a decrease in REM sleep (Hagan *et al.*, 1999). In addition, orexinergic neurons are divided into two neuronal sub-populations (Harris and Aston-Jones, 2006). Orexin neurons located in the LH are mainly involved in reward-related behaviors (Fadel *et al.*, 2002; Harris *et al.*, 2005; Harris *et al.*, 2007; Aston-Jones *et al.*, 2010), whereas those located in the DMH-PFA are involved in the regulation arousal and stress responses (Estabrooke *et al.*, 2001; Sakamoto *et al.*, 2004; Winsky-Sommerer *et al.*, 2004).

Interestingly, growing evidence suggests the pivotal role of orexins in the pathophysiology of MD, with contradictory results however. While a decrease of orexinergic system activity was noticed in both depressed patients and animal model of depression (Taheri *et al.*, 2001; Allard *et al.*, 2004; Brundin *et al.*, 2007), other clinical and preclinical data suggest that depressive state is underpinned by an increase of orexinergic neurotransmission (Salomon *et al.*, 2003; Feng *et al.*, 2008; von der Goltz *et al.*, 2011; Mikrouli *et al.*, 2011). Recently, we have shown that orexin neurons were more activated in the DMH-PFA of mice subjected to the unpredictable chronic mild stress (UCMS), a naturalistic model of depression, and that this increase was reversed by 6-weeks antidepressant treatment with

fluoxetine, a selective serotonin reuptake inhibitor (SSRI) antidepressant (Nollet *et al.*, 2011). Nevertheless, if involvement of orexins in MD is now well-established, the link between orexinergic system and depressive symptoms remains unclear, especially whether its increase may sustain sleep impairments observed in depression.

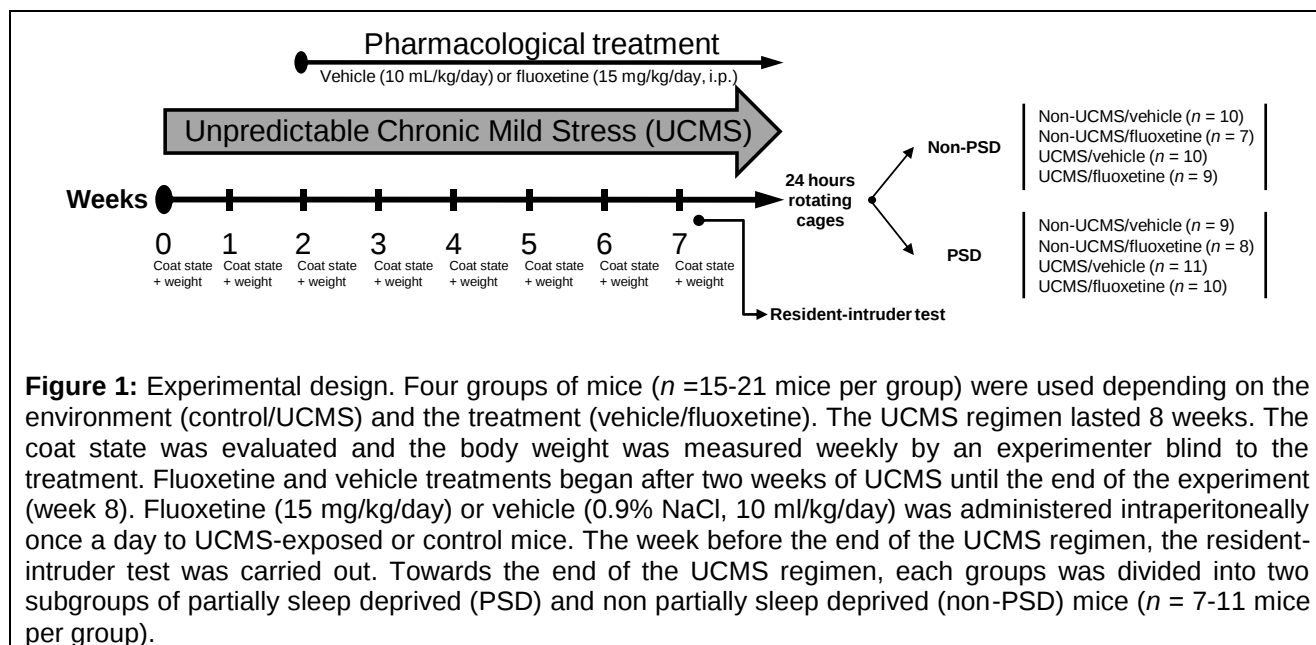
Therefore, the present study aimed to assess the orexinergic neuronal activation, through Fos protein expression, in the LH and the DMH-PFA during sleep period in mice exposed to UCMS or subjected to 24 hours of partial sleep deprivation (PSD) leading to fragmented sleep in order to compare PSD- and UCMS-induced orexin neuronal activity. Moreover, the effect of chronic antidepressant treatment with fluoxetine was also assessed in each condition.

Methods

Animals

Seventy four male BALB/c mice (Centre d'Elevage Janvier, Le Genest St-Isle, France) were used in the present study as this strain of mice is known to be a higher responder to a UCMS procedure (Surget and Belzung, 2008). Mice were aged of 6 weeks on their arrival and were housed in groups of four to five per cage. They were maintained at a temperature- ($22 \pm 2^\circ\text{C}$) and humidity- (40%) controlled room on an inverted 12-hours light-dark cycle (lights off at 8:00 am) with free access to food and water. Mice were first acclimatized to the laboratory for 1 week before the start of the experiment. All experimental procedures were carried out in strict accordance with European Communities Council Directive (86/609/EEC).

Experimental procedure



Mice were initially distributed into two groups. Mice from one group were subjected to an unpredictable chronic mild stress (UCMS group) procedure for eight weeks, whereas mice from the other group served as control (non-UCMS group). At the start of the experiment, UCMS mice were maintained under the same standard conditions, but they were isolated in individual home cages (8.5 x 22 cm). Animals from the non-UCMS group were kept in groups of four or five, with a shelter and some tubes placed in their home cages. After two weeks, both two groups were divided into two sub-groups, one receiving antidepressant treatment, the other being administrated with vehicle. Several variables were used to assess the stress-induced effects, *i.e.* state of the coat, body weight, and behavior in the resident-intruder test. State of the coat and body weight were recorded weekly for all mice. The behavioral test was realized during week 7. After the test, each group was further divided into two subgroups of 24h-sleep-deprived and non 24h-sleep-deprived mice (Figure 1). At the end of the sleep deprivation period (*i.e.* 8 weeks after the beginning of the UCMS procedure), mice were deeply anesthetized and transcardially perfused to assess the marker of neuronal activation (protein c-Fos).

UCMS protocol

Mice were exposed to various mild social and environmental stressors, none of them being sufficient alone to induce long-lasting effects. The stressors used were applied in a different sequence each week to avoid any habituation. We excluded nociceptive stressors and food/water deprivation for ethical reasons. The emphasis in this model is on the chronic and variable nature of the stressors. The stressors used consisted of removal of bedding, wetting the bedding, several repeated changes of bedding, tilting cages by 45° for various times, placing for 1h an average of 2 cm of water in the home cage (after

removing the bedding), exposure to rat bedding for 15 min, different social stress (placing a mouse in a cage that had previously belonged to another mouse, or placing a mouse in another animal's cage and then returning it to its own cage, where it would find that the cage had been occupied by another mouse), restrained stress in small tubes for various duration. Perturbations of circadian cycle (like lights on during the dark phase and conversely) were not used in order to avoid external sleep disturbances.

Drugs

Non-UCMS and UCMS mice received daily intraperitoneal injections of freshly prepared vehicle (Saline 9‰, 10 ml/kg/day) or fluoxetine (15 mg/kg/day) two weeks after the beginning of experimental protocol. Injections were made between 1:00 pm and 3:00 pm, irrespective of the stress schedule.

Coat state and body weight

The state of the coat was evaluated each week by examining the coat on different parts of the body (head, neck, dorsal area, ventral area, tail, front and hind paws, and genital area). For each seven areas, a score of 0 was applied if the coat was in good condition, a score of 0.5 for a moderate degradation, and a score of 1 if it was in very poor condition (disordered, piloerection). The total score was the sum of the score for each area; thus a high score indicated that the coat was in poor condition. Body weight was also measured each week until the end of the UCMS procedure. All measures were evaluated by an experimenter blind to the treatment.

Behavioral test

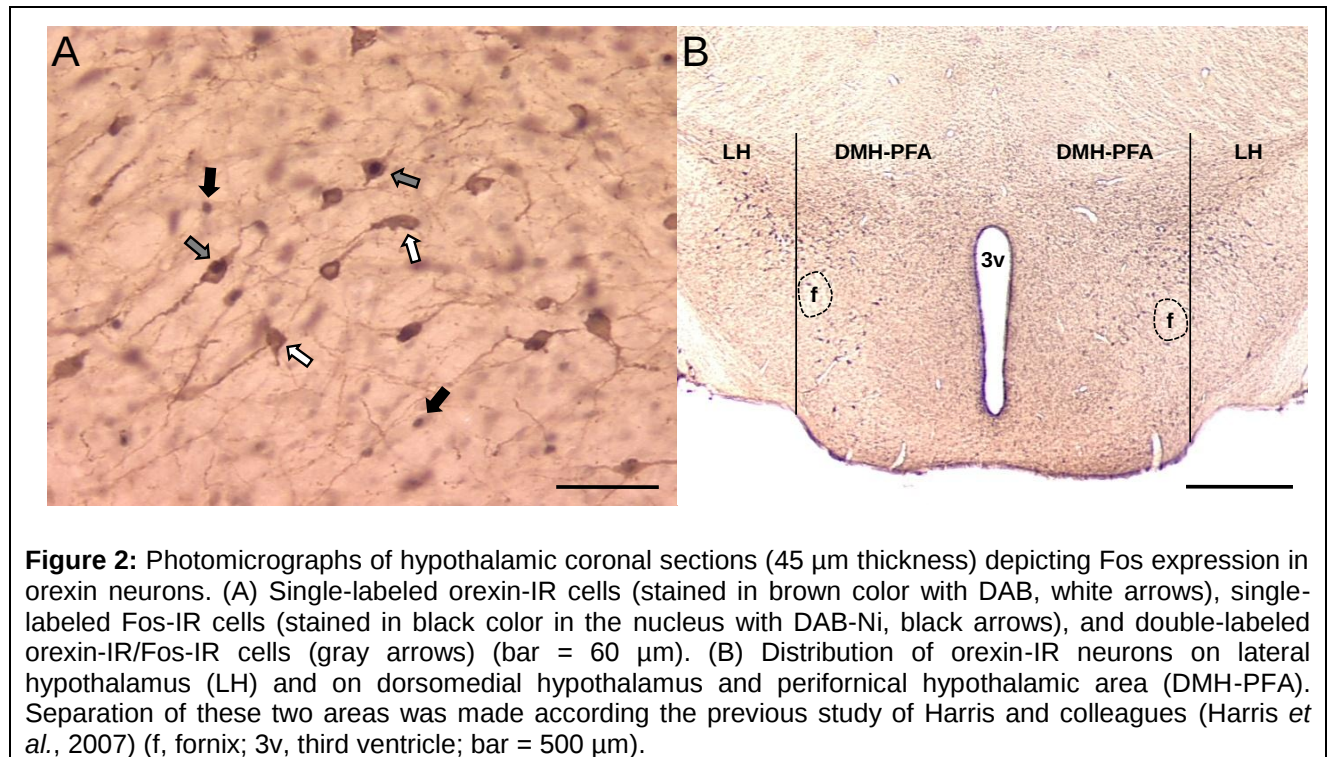
The resident-intruder (RI) test consists of the introduction of a novel mouse (A/J male mice) in the cage in order to measure agonistic behavior of resident mice. Non-UCMS mice were placed in individual cages 24 h before the test, and the stressed mice litter was changed 24 h before the test in order to put all animals in the same experimental conditions. The intruder was placed into the home cage of the test animal (resident) in such a way that mice were in opposite corners. The latency of the resident first attack (in seconds) and the number of resident attacks were measured over a 6-min period (latency of 360 seconds for non-attacking mice). Attacking intruders were excluded, without excluding the resident. Depressive-like animals are more agonistic and likely to attack more often and sooner than non-stressed animals (Mineur *et al.*, 2003).

Partial sleep deprivation

The 24 hours partial sleep deprivation (PSD) were conducted the day after the end of the behavioral test with an apparatus manufactured in the laboratory and consisting of rotating individual cages (width: 8 cm; diameter: 25 cm; *ad libitum* access to food and water) at a speed of 0.13 rotation/min (*i.e.* about 6 meter per hour). These rotating cages allowed animals to fall asleep just only for few seconds since they were constantly awakened by the rotation movement and forced to reposition themselves at the bottom of the cages for not being swept away by the rotation. Several tests were made at the laboratory with video recording to ensure that this apparatus induced regular and frequent awakening in mice to avoid animal's immobility superior to 5 to 10 seconds duration. In order to prevent any bias related to locomotor activity induced by the apparatus, the non-PSD mice were also placed 24 hours in another similar apparatus, but whose speed was twice as much as the

previous one but running only during the 12 hours of their active period (*i.e.* during the dark phase). In this condition, control animals have travelled the same distance that PSD mice without experiencing sleep perturbations during their inactivity phase.

Brain collection and immunohistochemistry



Intracardiac perfusions were held immediately after the 24 hours sleep disturbance, which corresponds to the end of the animal's inactivity period (light period). After a deep anesthesia (Ketamine: 100 mg/kg ; Xylazine: 7 mg/kg), mice were perfused through the heart with 80 ml of saline followed by 150 ml of 4% paraformaldehyde in 0.1M phosphate buffer (PB) (pH 7.4). Brains were removed and postfixed 2 hours in the same fixative. Tissues were then cryoprotected in a 20% sucrose solution overnight at 4°C. Coronal sections (45 μm thickness) were cut in a cryostat (Leica CM 3050S) and collected every third section. Sections were processed free floating according to a double

immunohistochemical reaction for c-Fos and orexin. After a series of washes in 50% ethanol and 3% H₂O₂, sections were incubated at RT in a rabbit anti-Fos antibody (Calbiochem, 1:10 000) and in a goat anti-OX-A antibody (Santa Cruz, 1:300). Thirty-six hours later, sections were washed in 0.1M PB, incubated two hours in a biotinylated anti-rabbit IgG (Jackson Immunoresearch, 1:500) followed by ABC Kit (Vector Laboratories, 1:100, 1 hour) and reacted with diamino-benzidine (DAB) (Sigma) in the presence of cobalt and H₂O₂. The sections were then rinsed and re-incubated two hours with a biotinylated anti-goat IgG (Jackson Immunoresearch, 1:500), followed by ABC Kit (Vector Laboratories, 1:100, 1 hour) and finally reacted with DAB only (no cobalt) (Sigma). Sections were then rinsed, mounted on gelatinized glass slides, dehydrated, cleared in Claral (Réactifs RAL) and coverslipped with Eukitt. Various negative controls were performed, omitting either the primary or the secondary antibodies.

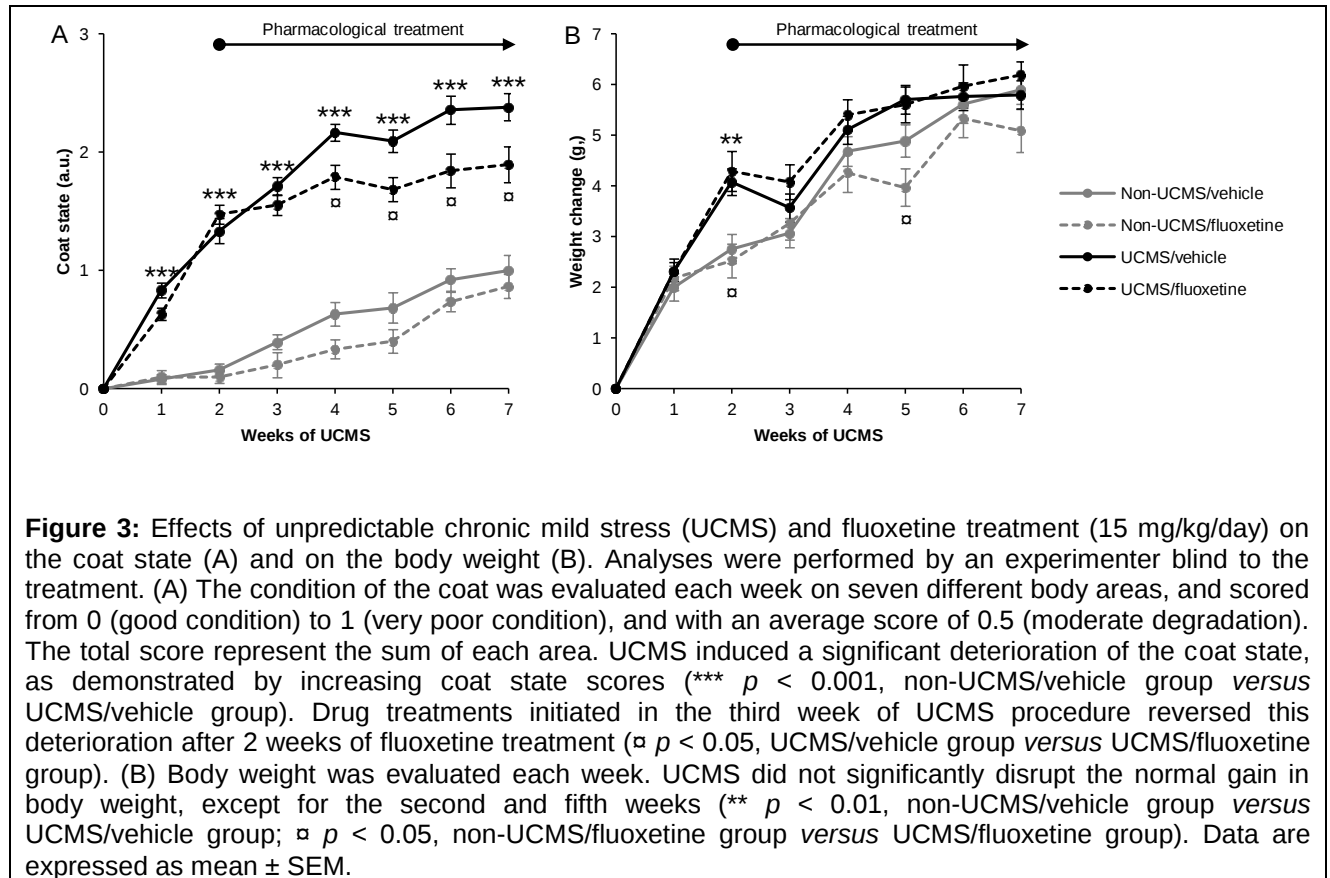
Data analyses and statistics

All sections were examined with a Leica DM 2000 microscope. The immunoreagents orexin neurons were marked by a cytoplasmic brown color, while immunoreactive-Fos protein neurons had a black nucleus (Figure 2A). All neurons immunoreactive for orexin (orexin-IR) that are Fos positive or not, were counted in the LH and DMH-PFA, according to the nomenclature defined by Franklin and Paxinos's mouse brain atlas (Franklin and Paxinos, 2008) and by Harris and colleagues (Harris *et al.*, 2007) (Figure 2B), by an investigator unaware of the treatment. The percentage of double-labeled (orexin/Fos) neurons of LH and DMH-PFA was calculated, taking the total number of orexin neurons observed in each part of all sections as reference.

Because the assumptions for parametric statistics (normality and homoscedasticity) were not fully ensured, data were analyzed using the non-parametric Kruskal-Wallis “ANOVA by ranks” *H*-test using Statistica software, followed up by post-hoc Mann-Whitney *U*-test with Holm-Bonferroni correction when required (*i.e.*, $p < 0.05$). All data are expressed as mean $\pm$ standard error of the mean (SEM). Sample sizes are provided in the Figure 1.

Results

Coat state and body weight

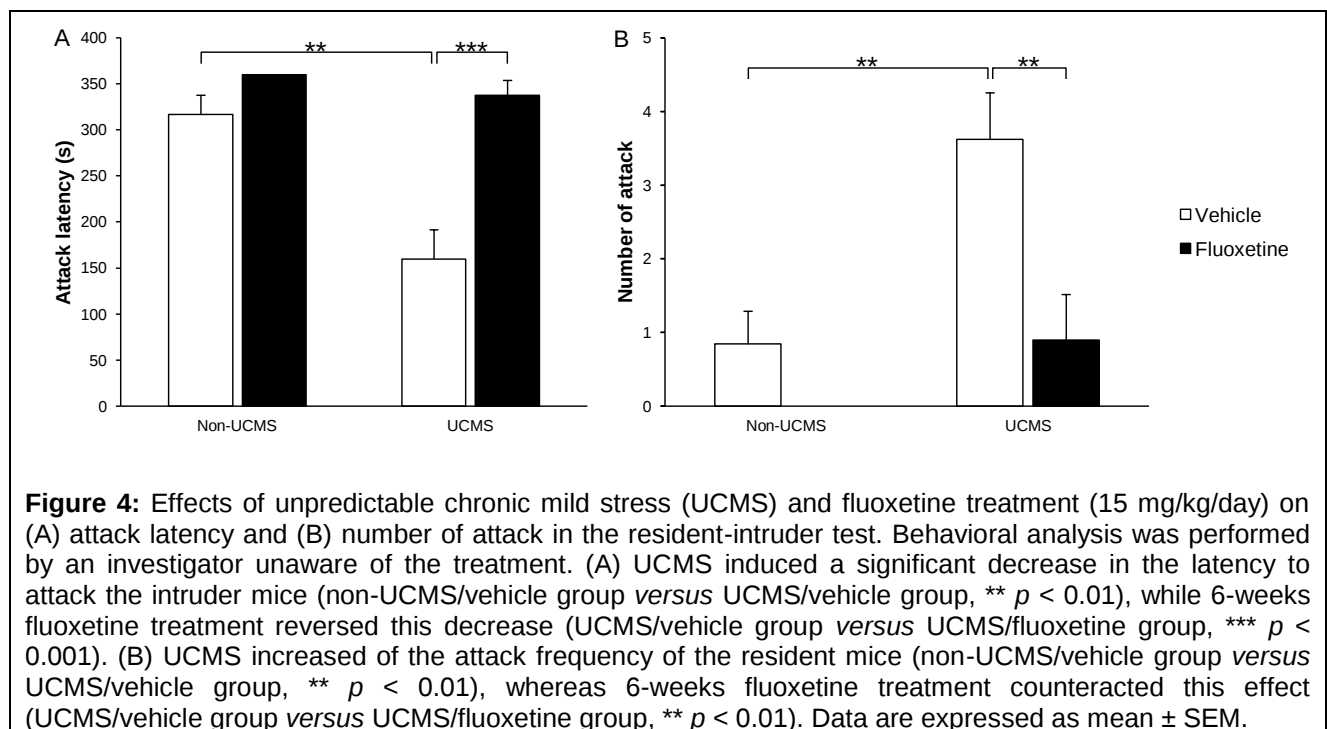


The coat state was evaluated once a week until the end of the UCMS protocol. Kruskal-Wallis H -test revealed significant differences between groups for each week ($p < 0.001$; Figure 3A and Supplementary Table 1). Comparison with Mann-Whitney U -test between non-UCMS/vehicle and UCMS/vehicle groups, as well as comparison between non-UCMS/fluoxetine and UCMS/fluoxetine groups, showed a significantly more important degradation of coat state for stressed groups that arose from week 1 and lasted until the end of the experiment ($p < 0.001$; Figure 3A and Supplementary Table 1). Differences between the two UCMS groups appeared from the week 4 (i.e. 2 weeks after the

beginning of treatment) until the end of the UCMS regimen, the fluoxetine-treated group presenting a significantly less important degradation of the coat ($p < 0.05$; Figure 3A and Supplementary Table 1).

The body weight was measured weekly, at the same time as coat state. Kruskal-Wallis H -test showed significant differences between groups only for week 2 and 5 ($H_{3, N=74} = 16.84$, $p < 0.001$; $H_{3, N=74} = 12.64$, $p < 0.01$). For week 2, Mann-Whitney U -test revealed significant differences between non-UCMS/vehicle and UCMS/vehicle groups ($U = 90$, $p < 0.01$) and between non-UCMS/fluoxetine and UCMS/fluoxetine groups ($U = 60$, $p < 0.05$), with a more important body weight gain for all UCMS mice. At week 5, significant difference only appeared between non-UCMS/fluoxetine and UCMS/fluoxetine groups ($U = 68$, $p < 0.05$) (Figure 3B).

Behavioral analysis



The resident-intruder test was done on the week 7. Concerning the attack latency, Kruskal-Wallis H -test showed significant differences between groups ($H_{3, N=74} = 31.65, p < 0.001$). Corrected Mann-Whitney U -test highlighted significant differences between UCMS/vehicle and non-UCMS/vehicle groups ($U = 83.5, p < 0.01$), and between UCMS/vehicle and UCMS/fluoxetine groups ($U = 64, p < 0.001$) revealing a significant decrease of attack latency for UCMS/vehicle animals, reversed by the 6-weeks treatment with fluoxetine. It may be noted that non-UCMS animals treated with fluoxetine displayed no aggressive behavior throughout the test (Figure 4A).

Kruskal-Wallis H -test also showed significant differences between groups for the number of attack ($H_{3, N=74} = 29.08, p < 0.001$). There are significant differences between UCMS/vehicle and non-UCMS/vehicle groups ($U = 81.5, p < 0.01$), and between UCMS/vehicle and UCMS/fluoxetine groups ($U = 81.5, p < 0.01$), with a higher attack frequency for UCMS/vehicle animals, counteracted by 6-weeks fluoxetine treatment (Figure 4B).

Total number of orexin immunoreactive neurons

All orexin immunoreactive (orexin-IR) neurons were counted in every third brain sections. Kruskal-Wallis H -test revealed no difference between groups. An average of 1118.43 ± 20.43 orexin-IR neurons was counted in all groups with a distribution of 527.97 ± 11.56 orexin-IR neurons in the DMH-PFA and 589.11 ± 10.17 orexin-IR neurons in the LH.

Orexinergic neuronal activation

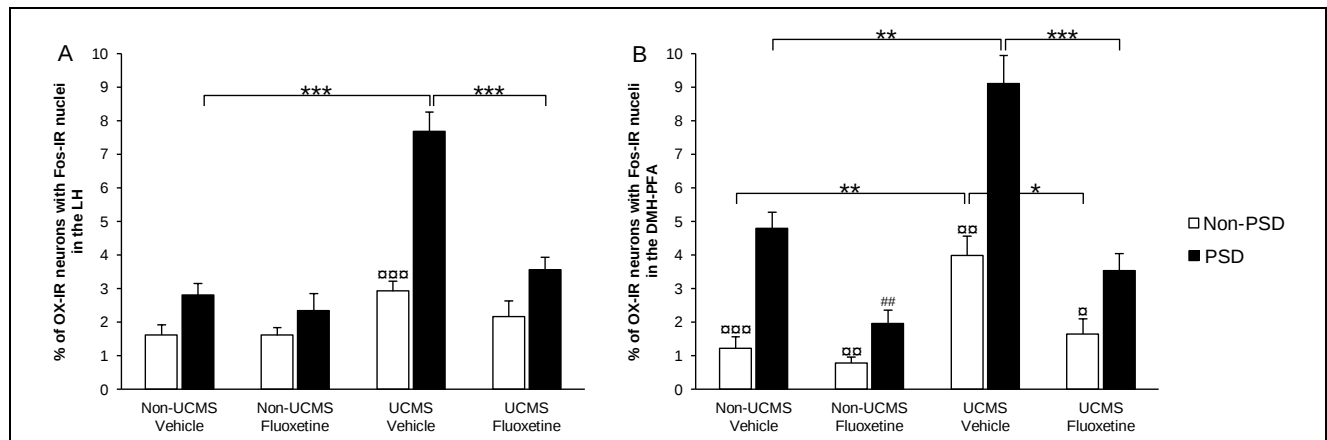


Figure 5: Effects of unpredictable chronic mild stress (UCMS), fluoxetine treatment (15 mg/kg/day) and 24h partial sleep deprivation (PSD) on orexinergic activity in the lateral hypothalamus (LH) (A) and in the dorsomedial hypothalamus and perifornical area (DMH-PFA) (B). The percentage of orexin-IR cells that contained Fos-IR nuclei were counted bilaterally (Figure 2B) by an investigator unaware of the treatment. (A) PSD induced an increase of orexinergic activation in UCMS/vehicle mice (*** $p < 0.001$, non-PSD UCMS/vehicle group versus PSD UCMS/vehicle group; *** $p < 0.001$, PSD non-UCMS/vehicle group versus PSD UCMS/vehicle group), reversed by fluoxetine treatment (*** $p < 0.001$, PSD UCMS/vehicle group versus PSD UCMS/fluoxetine group). (B) In non-PSD mice, UCMS regimen significantly increased orexinergic activation (** $p < 0.01$, non-PSD non-UCMS/vehicle group versus non-PSD UCMS/vehicle group), while this increase was counteracted by 6-weeks fluoxetine treatment (* $p < 0.05$, non-PSD UCMS/vehicle group versus non-PSD UCMS/fluoxetine group). The same pattern of activation was observed in PSD groups (** $p < 0.01$, PSD non-UCMS/vehicle group versus PSD UCMS/vehicle group; *** $p < 0.001$, PSD UCMS/vehicle group versus PSD UCMS/fluoxetine group). The PSD induced an overall increase of orexinergic activation (□ $p < 0.05$, □□ $p < 0.01$, □□□ $p < 0.001$, non-PSD groups versus corresponding PSD groups). This activation was decrease by 6-weeks fluoxetine treatment in non-UCMS mice (## $p < 0.01$, PSD non-UCMS/vehicle group versus PSD non-UCMS/fluoxetine group). Data are expressed as mean $\pm$ SEM.

Kruskal-Wallis H -test revealed significant differences for orexinergic neuronal activation between groups in the LH ($H_{7, N=74} = 42.08$, $p < 0.001$) and in the DMH-PFA ($H_{7, N=74} = 54.28$, $p < 0.001$).

Concerning the LH of non-PSD mice, no difference in the percentage of double labeled orexin neurons was noticed between the four non-PSD groups of mice (Figure 5A), suggesting no stress and no treatment effects in the activation of these neurons. Concerning the LH of PSD mice, a significant increase of orexin neurons activation in UCMS/vehicle mice was observed ($U = 0$, $p < 0.001$), counteracted by 6-week fluoxetine treatment regarding the UCMS/fluoxetine group ($U = 2$, $p < 0.001$) (Figure 5A). Significant

difference was also observed between in the LH of non-PSD and PSD mice subjected to UCMS regimen only ($U = 0$, $p < 0.001$).

Concerning the DMH-PFA of non-PSD mice, the UCMS procedure induced a significant increase of orexin neuronal activation according to the comparison between non-UCMS/vehicle and UCMS/vehicle mice ($U = 9$, $p < 0.01$), whereas 6-weeks fluoxetine treatment reversed this increase, leading to a percentage of activated orexinergic neurons similar to non-UCMS group ($U = 10$, $p < 0.05$) (Figure 5B). Furthermore, in the DMH-PFA of PSD mice, a significant increase of orexinergic neuronal activation in UCMS/vehicle mice was observed ($U = 5$, $p < 0.01$), reversed by 6-week fluoxetine treatment when UCMS/vehicle and UCMS/fluoxetine groups are compared ($U = 4$, $p < 0.001$). Moreover, in the DMH-PFA of the non-UCMS groups, fluoxetine treatment also decreased orexinergic neuronal activation following 24h-PSD ($U = 5$, $p < 0.01$) (Figure 5B). Finally, when comparing non-PSD and PSD groups, we observed that the 24h-PSD induced an overall increase of the DMH-PFA orexin neurons activation of non-UCMS/vehicle ($U = 1$, $p < 0.001$), non-UCMS/fluoxetine ($U = 1$, $p < 0.01$), UCMS/vehicle ($U = 5$, $p < 0.01$) and UCMS/fluoxetine ($U = 12$, $p < 0.05$) mice (Figure 5B).

Discussion

Since few years, increasing number of studies has investigated the role of orexinergic system in depression, with inconsistent results. Furthermore, to the best of our knowledge, the only study trying to examine the effect of sleep deprivation on orexinergic system in a genetic model of depression lead to unclear conclusions (Allard *et al.*, 2007). Then, the objective of this study was to examine the activation of orexin-containing neurons in the LH and in the DMH-PFA during sleep period in mice subjected to an unpredictable chronic mild stress (UCMS) protocol and/or after 24-hours partial sleep deprivation (PSD), in order to test the effect of PSD on orexinergic activation in depressive-like state. We also examined the effect of a chronic treatment with fluoxetine, a selective serotonin reuptake inhibitor. First, we confirmed that in non-PSD mice, UCMS specifically increased orexinergic neuronal activation in the DMH-PFA, reversed by chronic fluoxetine treatment. Second, in non-UCMS mice, PSD induced an increase of Fos expression in orexin neurons in the DMH-PFA but not in the LH, while chronic fluoxetine treatment counteracted this PSD-induced effect. Finally, in UCMS mice, PSD leaded to an overall increase of the orexinergic activity in both parts of the hypothalamus, also counteracted by chronic antidepressant treatment.

First of all, the UCMS procedure was able to induce a depressive-like state in mice, with a clear deterioration of coat state and an increase of aggressive behavior in the resident-intruder test. The deterioration of the coat state was reversed by chronic fluoxetine treatment, along with a reduction of aggressiveness of UCMS-subjected mice in the Resident-Intruder test. Altogether, these results support the relevance of this animal model

of depression, as it has previously described in our laboratory (Surget *et al.*, 2008; Surget *et al.*, 2009; Nollet *et al.*, 2011; Surget *et al.*, 2011). Our data concerning body weight demonstrate a regular increase during weeks of UCMS, with no clear differences between UCMS-subjected and control mice. This parameter have already shown conflicting results in UCMS protocol (Surget and Belzung, 2008), and may suggest a putative correspondence with clinical data of depression where weight loss or weight gain can be observed.

Regarding orexinergic neuronal activation in non-PSD mice, no effects of UCMS or fluoxetine treatment was observed in the LH, whereas the UCMS induced a clear increase of Fos expression in orexin neurons located in the DMH-PFA, reversed by chronic fluoxetine treatment. Although less important, this pattern of activation is similar to what we have previously described (Nollet *et al.*, 2011). Indeed, in our former study, assessment of Fos-expressing orexin neurons was performed at the beginning of the active period, whereas in the present work, the same analysis was carried out at the end of the inactive period, when orexinergic activation is normally at its lowest rate (Estabrooke *et al.*, 2001; Martinez *et al.*, 2002). Then, this result is in line with what is expected for a wake-promoting peptide (Hagan *et al.*, 1999; Yamanaka *et al.*, 2003), and confirms that depressive-like state is associated with an increase of orexinergic activation in the DMH-PFA which is counteracted by antidepressant treatment (Nollet *et al.*, 2011).

We also observed that in non-UCMS mice, the PSD only affected orexin neurons in the DMH-PFA by increasing their c-fos gene expression. This is in line with previous studies showing that sleep deprivation increased orexin neurons activation (Estabrooke *et al.*,

2001; Modirrousta *et al.*, 2005) even if these studies did not clearly assess the differential activation of LH and DMH/PFA neurons. Furthermore, it has been shown that REM sleep deprivation can increase level of OX-A in rats CSF (Pedrazzoli *et al.*, 2004) and increases the number of orexin immunoreactive neurons in Wistar-Kyoto rats (Allard *et al.*, 2007). Importantly, these findings corroborate the fact that orexinergic neurons in the DMH-PFA are particularly involved in the regulation of sleep and wakefulness (Harris and Aston-Jones, 2006). In the DMH-PFA of non-UCMS mice chronically treated with fluoxetine, there is no such significant increase of Fos expression in orexin neurons during PSD, suggesting that modulation of serotonergic neurotransmission can prevent this PSD-induced neuronal activation probably *via* a direct action of serotonin (hyperpolarization) on orexin neurons through 5-HT_{1A} receptors (Muraki *et al.*, 2004; Kumar *et al.*, 2007).

Furthermore, in UCMS-exposed mice, the PSD dramatically increased the orexinergic activation in both parts of the hypothalamus, suggesting that UCMS induced deep alteration of orexinergic sensitivity. In addition, these over-activations were reversed by chronic fluoxetine treatment. If the effect of fluoxetine in non-UCMS mice can be related to inhibitory action of serotonin on orexin neurons (Muraki *et al.*, 2004; Kumar *et al.*, 2007), its effect in UCMS mice could also be the consequence of an overall improvement of depressive-like state as we have previously demonstrated (Nollet *et al.*, 2011). These results are critical as they do not sustain, regarding the DMH-PFA orexin neurons, the therapeutic effect of sleep deprivation observed in depressed patients (Wu and Bunney, 1990; Gillin *et al.*, 2001; Ringel and Szuba, 2001). Nevertheless, in the LH, the PSD specifically increased Fos expression in orexin neurons of UCMS-exposed mice but not in non-UCMS-exposed ones. Interestingly, this neuronal population has been described to be

involved in hedonic features that potentiate the activity of the reward system (Harris *et al.*, 2005; Harris *et al.*, 2007; Aston-Jones *et al.*, 2010). Since symptoms of depression include anhedonia, this activation following PSD could participate in reinforcing motivation and pleasurable effects. Indeed, it has been shown in rats that REM sleep deprivation induces an immediate increase of sucrose intake (Andersen *et al.*, 2009). However, further investigations are needed to confirm this hypothesis.

Finally, since PSD induced an orexinergic activation in non-UCMS mice similar to the one observed in non-PSD UCMS-exposed mice, it is then possible that the increase of orexin neurons activation observed in depressive-like states may contribute to their associated sleep disturbances. Indeed, it has been shown that OX-A central infusion can decrease REM and non-REM sleep and increase wakefulness (Hagan *et al.*, 1999). Then, the higher activation of the DMH-PFA orexin neuronal population during mice inactivity period could be one of the causes of the occurrence of sleep disorders previously described in depressive-like animals subjected to UCMS, particularly in creating the instability of sleep cycle (Cheeta *et al.*, 1997; Grønli *et al.*, 2004). In the same line, another study demonstrated that the important rate of orexinergic activity system in Zebrafish could be related to an insomnia-like phenotype (Prober *et al.*, 2006). These findings might therefore constitute an interesting track to explain the sleep abnormalities observed in most depressed patients.

In conclusion, this study confirms the involvement of the DMH-PFA orexinergic system in the regulation of sleep and wakefulness and in depressive-like state, and opens new perspectives regarding its implication in sleep perturbations often associated with

depression. Additionally, the increase of orexin neuronal activation following PSD in the LH, strongly linked to reward system, could be one of the features that participate to the beneficial effect of sleep deprivation in depressed patients.

Acknowledgments

We would like to thank Mr. Raymond Jegat for his technical assistance.

Bibliography

Allard JS, Tizabi Y, Shaffery JP, Manaye K (2007). Effects of rapid eye movement sleep deprivation on hypocretin neurons in the hypothalamus of a rat model of depression. *Neuropeptides*, 41:329-337.

Allard JS, Tizabi Y, Shaffery JP, Trouth CO, Manaye K (2004). Stereological analysis of the hypothalamic hypocretin/orexin neurons in an animal model of depression. *Neuropeptides*, 38:311-315.

Andersen ML, Hoshino K, Tufik S (2009). Increased susceptibility to development of anhedonia in rats with chronic peripheral nerve injury: involvement of sleep deprivation? *Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry*, 33:960-966.

Armitage R, Hoffmann RF (2001). Sleep EEG, depression and gender. *Sleep Med Rev*, 5:237-246.

Aston-Jones G, Smith RJ, Sartor GC, Moorman DE, Massi L, Tahsili-Fahadan P, Richardson KA (2010). Lateral hypothalamic orexin/hypocretin neurons: A role in reward-seeking and addiction. *Brain Res*, 1314:74-90.

Benca RM, Okawa M, Uchiyama M, Ozaki S, Nakajima T, Shibui K, Obermeyer WH (1997). Sleep and mood disorders. *Sleep Med Rev*, 1:45-56.

Berridge CW, Espana RA, Vittoz NM (2010). Hypocretin/orexin in arousal and stress. *Brain Res*, 1314:91-102.

Brundin L, Bjorkqvist M, Petersen A, Traskman-Bendz L (2007). Reduced orexin levels in the cerebrospinal fluid of suicidal patients with major depressive disorder. *Eur Neuropsychopharmacol*, 17:573-579.

Cason AM, Smith RJ, Tahsili-Fahadan P, Moorman DE, Sartor GC, Aston-Jones G (2010). Role of orexin/hypocretin in reward-seeking and addiction: implications for obesity. *Physiol Behav*, 100:419-428.

Cheeta S, Ruigt G, van Proosdij J, Willner P (1997). Changes in sleep architecture following chronic mild stress. *Biol Psychiatry*, 41:419-427.

- Date Y, Ueta Y, Yamashita H, Yamaguchi H, Matsukura S, Kangawa K, Sakurai T, Yanagisawa M, Nakazato M** (1999). Orexins, orexigenic hypothalamic peptides, interact with autonomic, neuroendocrine and neuroregulatory systems. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 96:748-753.
- de Lecea L, Kilduff TS, Peyron C, Gao X, Foye PE, Danielson PE, Fukuhara C, Battenberg EL, Gautvik VT, Bartlett FS, Frankel WN, van den Pol AN, Bloom FE, Gautvik KM, Sutcliffe JG** (1998). The hypocretins: hypothalamus-specific peptides with neuroexcitatory activity. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 95:322-327.
- Estabrooke IV, McCarthy MT, Ko E, Chou TC, Chemelli RM, Yanagisawa M, Saper CB, Scammell TE** (2001). Fos expression in orexin neurons varies with behavioral state. *J Neurosci*, 21:1656-1662.
- Fadel J, Bubser M, Deutch AY** (2002). Differential activation of orexin neurons by antipsychotic drugs associated with weight gain. *J Neurosci*, 22:6742-6746.
- Feng P, Vurbic D, Wu Z, Hu Y, Strohl KP** (2008). Changes in brain orexin levels in a rat model of depression induced by neonatal administration of clomipramine. *J Psychopharmacol*, 22:784-791.
- Franklin KBJ, Paxinos G** (2008) The mouse brain in stereotaxic coordinates. New York: Academic Press, Elsevier.
- Gillin JC, Buchsbaum M, Wu J, Clark C, Bunney W, Jr.** (2001). Sleep deprivation as a model experimental antidepressant treatment: findings from functional brain imaging. *Depress Anxiety*, 14:37-49.
- Grønli J, Murison R, Bjorvatn B, Sørensen E, Portas CM, Ursin R** (2004). Chronic mild stress affects sucrose intake and sleep in rats. *Behav Brain Res*, 150:139-147.
- Hagan JJ, Leslie RA, Patel S, Evans ML, Wattam TA, Holmes S, Benham CD, Taylor SG, Routledge C, Hemmati P, Munton RP, Ashmeade TE, Shah AS, Hatcher JP, Hatcher PD, Jones DN, Smith MI, Piper DC, Hunter AJ, Porter RA, Upton N** (1999). Orexin A activates locus coeruleus cell firing and increases arousal in the rat. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 96:10911-10916.
- Harris GC, Aston-Jones G** (2006). Arousal and reward: a dichotomy in orexin function. *Trends Neurosci*, 29:571-577.
- Harris GC, Wimmer M, Aston-Jones G** (2005). A role for lateral hypothalamic orexin neurons in reward seeking. *Nature*, 437:556-559.
- Harris GC, Wimmer M, Randall-Thompson JF, Aston-Jones G** (2007). Lateral hypothalamic orexin neurons are critically involved in learning to associate an environment with morphine reward. *Behav Brain Res*, 183:43-51.
- Kumar S, Szymusiak R, Bashir T, Rai S, McGinty D, Alam MN** (2007). Effects of serotonin on perifornical-lateral hypothalamic area neurons in rat. *Eur J Neurosci*, 25:201-212.
- Martinez GS, Smale L, Nunez AA** (2002). Diurnal and nocturnal rodents show rhythms in orexinergic neurons. *Brain Res*, 955:1-7.
- Mikrouli E, Wortwein G, Soylu R, Mathe AA, Petersen S** (2011). Increased numbers of orexin/hypocretin neurons in a genetic rat depression model. *Neuropeptides*.
- Mineur YS, Prasol DJ, Belzung C, Crusio WE** (2003). Agonistic behavior and unpredictable chronic mild stress in mice. *Behav Genet*, 33:513-519.
- Modirrousta M, Mainville L, Jones BE** (2005). Orexin and MCH neurons express c-Fos differently after sleep deprivation vs. recovery and bear different adrenergic receptors. *Eur J Neurosci*, 21:2807-2816.

- Muraki Y, Yamanaka A, Tsujino N, Kilduff TS, Goto K, Sakurai T** (2004). Serotonergic regulation of the orexin/hypocretin neurons through the 5-HT_{1A} receptor. *J Neurosci*, 24:7159-7166.
- Nambu T, Sakurai T, Mizukami K, Hosoya Y, Yanagisawa M, Goto K** (1999). Distribution of orexin neurons in the adult rat brain. *Brain Res*, 827:243-260.
- Nollet M, Gaillard P, Minier F, Tanti A, Belzung C, Leman S** (2011). Activation of orexin neurons in dorsomedial/perifornical hypothalamus and antidepressant reversal in a rodent model of depression. *Neuropharmacology*, 61:336-346.
- Pedrazzoli M, D'Almeida V, Martins PJ, Machado RB, Ling L, Nishino S, Tufik S, Mignot E** (2004). Increased hypocretin-1 levels in cerebrospinal fluid after REM sleep deprivation. *Brain Res*, 995:1-6.
- Peyron C, Tighe DK, van den Pol AN, de Lecea L, Heller HC, Sutcliffe JG, Kilduff TS** (1998). Neurons containing hypocretin (orexin) project to multiple neuronal systems. *J Neurosci*, 18:9996-10015.
- Prober DA, Rihel J, Onah AA, Sung RJ, Schier AF** (2006). Hypocretin/orexin overexpression induces an insomnia-like phenotype in zebrafish. *J Neurosci*, 26:13400-13410.
- Ringel BL, Szuba MP** (2001). Potential mechanisms of the sleep therapies for depression. *Depress Anxiety*, 14:29-36.
- Sakamoto F, Yamada S, Ueta Y** (2004). Centrally administered orexin-A activates corticotropin-releasing factor-containing neurons in the hypothalamic paraventricular nucleus and central amygdaloid nucleus of rats: possible involvement of central orexins on stress-activated central CRF neurons. *Regul Pept*, 118:183-191.
- Sakurai T** (2007). The neural circuit of orexin (hypocretin): maintaining sleep and wakefulness. *Nat Rev Neurosci*, 8:171-181.
- Sakurai T, Amemiya A, Ishii M, Matsuzaki I, Chemelli RM, Tanaka H, Williams SC, Richardson JA, Kozlowski GP, Wilson S, Arch JR, Buckingham RE, Haynes AC, Carr SA, Annan RS, McNulty DE, Liu WS, Terrett JA, Elshourbagy NA, Bergsma DJ, Yanagisawa M** (1998). Orexins and orexin receptors: a family of hypothalamic neuropeptides and G protein-coupled receptors that regulate feeding behavior. *Cell*, 92:573-585.
- Salomon RM, Ripley B, Kennedy JS, Johnson B, Schmidt D, Zeitzer JM, Nishino S, Mignot E** (2003). Diurnal variation of cerebrospinal fluid hypocretin-1 (Orexin-A) levels in control and depressed subjects. *Biol Psychiatry*, 54:96-104.
- Surget A, Belzung C** (2008) Unpredictable chronic mild stress in mice. In: Experimental animal models in neurobehavioral research (Kalueff AV, LaPorte JL, eds), pp 79-112. New York: Nova Science Publishers.
- Surget A, Saxe M, Leman S, Ibarguen-Vargas Y, Chalon S, Griebel G, Hen R, Belzung C** (2008). Drug-dependent requirement of hippocampal neurogenesis in a model of depression and of antidepressant reversal. *Biol Psychiatry*, 64:293-301.
- Surget A, Tanti A, Leonardo ED, Laugeray A, Rainer Q, Touma C, Palme R, Griebel G, Ibarguen-Vargas Y, Hen R, Belzung C** (2011). Antidepressants recruit new neurons to improve stress response regulation. *Mol Psychiatry*, in press.
- Surget A, Wang Y, Leman S, Ibarguen-Vargas Y, Edgar N, Griebel G, Belzung C, Sibille E** (2009). Corticolimbic transcriptome changes are state-dependent and region-specific in a rodent model of depression and of antidepressant reversal. *Neuropsychopharmacology*, 34:1363-1380.
- Taheri S, Gardiner J, Hafizi S, Murphy K, Dakin C, Seal L, Small C, Ghatel M, Bloom S** (2001). Orexin A immunoreactivity and preproorexin mRNA in the brain of Zucker and WKY rats. *Neuroreport*, 12:459-464.

Thompson JL, Borgland SL (2011). A role for hypocretin/orexin in motivation. *Behav Brain Res*, 217:446-453.

von der Goltz C, Koopmann A, Dinter C, Richter A, Grosshans M, Fink T, Wiedemann K, Kiefer F (2011). Involvement of orexin in the regulation of stress, depression and reward in alcohol dependence. *Horm Behav*, in press.

Winokur A, Gary KA, Rodner S, Rae-Red C, Fernando AT, Szuba MP (2001). Depression, sleep physiology, and antidepressant drugs. *Depress Anxiety*, 14:19-28.

Winsky-Sommerer R, Yamanaka A, Diano S, Borok E, Roberts AJ, Sakurai T, Kilduff TS, Horvath TL, de LL (2004). Interaction between the corticotropin-releasing factor system and hypocretins (orexins): a novel circuit mediating stress response. *J Neurosci*, 24:11439-11448.

Wu JC, Bunney WE (1990). The biological basis of an antidepressant response to sleep deprivation and relapse: review and hypothesis. *Am J Psychiatry*, 147:14-21.

Yamanaka A, Beuckmann CT, Willie JT, Hara J, Tsujino N, Mieda M, Tominaga M, Yagami K, Sugiyama F, Goto K, Yanagisawa M, Sakurai T (2003). Hypothalamic orexin neurons regulate arousal according to energy balance in mice. *Neuron*, 38:701-713.

Supplementary Table 1: complete statistics for coat state analysis							
Weeks	Kruskal-Wallis H -tests		Effects	Mann-Whitney U -tests (with Holm-Bonferroni correction)			
	$H_{3, N = 74}$	p		Comparisons	U	p	
1	52.19	$p < 0,001$ ***	UCMS effects	Non-UCMS/vehicle	vs. UCMS/vehicle	12	$p < 0.001$ ***
			Treatments effects	Non-UCMS/fluoxetine	vs. UCMS/fluoxetine	21	$p < 0.001$ ***
2	56.17	$p < 0,001$ ***	UCMS effects	UCMS/vehicle	vs. UCMS/fluoxetine	126	ns
				Non-UCMS/vehicle	vs. Non-UCMS/fluoxetine	135.5	ns
			Treatments effects	Non-UCMS/vehicle	vs. UCMS/vehicle	9	$p < 0.001$ ***
				Non-UCMS/fluoxetine	vs. UCMS/fluoxetine	0	$p < 0.001$ ***
3	56.61	$p < 0,001$ ***	UCMS effects	UCMS/vehicle	vs. UCMS/fluoxetine	170.5	ns
				Non-UCMS/vehicle	vs. Non-UCMS/fluoxetine	126	ns
			Treatments effects	Non-UCMS/vehicle	vs. UCMS/vehicle	0.5	$p < 0.001$ ***
				Non-UCMS/fluoxetine	vs. UCMS/fluoxetine	6	$p < 0.001$ ***
4	56.8	$p < 0,001$ ***	UCMS effects	UCMS/vehicle	vs. UCMS/fluoxetine	156.5	ns
				Non-UCMS/vehicle	vs. Non-UCMS/fluoxetine	85.5	ns
			Treatments effects	Non-UCMS/vehicle	vs. UCMS/vehicle	3	$p < 0.001$ ***
				Non-UCMS/fluoxetine	vs. UCMS/fluoxetine	1	$p < 0.001$ ***
5	51.92	$p < 0,001$ ***	UCMS effects	UCMS/vehicle	vs. UCMS/fluoxetine	105.5	$p < 0.05$ *
				Non-UCMS/vehicle	vs. Non-UCMS/fluoxetine	89.5	ns
			Treatments effects	Non-UCMS/vehicle	vs. UCMS/vehicle	11	$p < 0.001$ ***
				Non-UCMS/fluoxetine	vs. UCMS/fluoxetine	4.5	$p < 0.001$ ***
6	47.99	$p < 0,001$ ***	UCMS effects	UCMS/vehicle	vs. UCMS/fluoxetine	102.5	$p < 0.05$ *
				Non-UCMS/vehicle	vs. Non-UCMS/fluoxetine	100.5	ns
			Treatments effects	Non-UCMS/vehicle	vs. UCMS/vehicle	12.5	$p < 0.001$ ***
				Non-UCMS/fluoxetine	vs. UCMS/fluoxetine	19	$p < 0.001$ ***
7	42.73	$p < 0,001$ ***	UCMS effects	UCMS/vehicle	vs. UCMS/fluoxetine	105.5	$p < 0.05$ *
				Non-UCMS/vehicle	vs. Non-UCMS/fluoxetine	105.5	ns
			Treatments effects	Non-UCMS/vehicle	vs. UCMS/vehicle	19	$p < 0.001$ ***
				Non-UCMS/fluoxetine	vs. UCMS/fluoxetine	33	$p < 0.001$ ***
ns: non-significant							
						107.5	$p < 0.05$ *
						118	ns

3. Implication fonctionnelle du système orexinergique dans un état dépressif-*like* chez la souris

La dépression est généralement associée à une activation excessive de l'axe du stress (*hypothalamo-pituitary-adrenal*, HPA) que les antidépresseurs monoaminergiques peuvent rétablir au travers d'un mécanisme dépendant de la neurogenèse hippocampique. De nombreux travaux ont montré que les orexines sont impliqués dans la physiopathogénie de la dépression, mais le possible lien de causalité entre le système orexinergique et les états dépressifs est encore largement méconnu.

Nous avons donc étudié ce lien grâce au blocage pharmacologique des récepteurs orexinergiques lors d'un état dépressif-*like* induit par 9 semaines de stress chronique imprédictible modéré (*unpredictable chronic mild stress*, UCMS).

Des souris BALB/c ont été exposées à l'UCMS et traités quotidiennement pendant 7 semaines avec un inhibiteur de recapture sélectif de sérotonine (fluoxétine, 20 mg/kg/jour, p.o.) ou un antagoniste des deux récepteurs orexinergiques (almorexant, 100 mg/kg/jour, p.o.). Les effets de l'UCMS et des traitements pharmacologiques ont été étudiés à l'aide de mesures de l'état physique des animaux et de tests comportementaux. Le test de suppression à la dexaméthasone (DEX) a été réalisé pour vérifier l'intégrité du rétrocontrôle négatif de l'axe HPA. Enfin, différents marqueurs immunohistochimiques ont été utilisés pour quantifier, au sein de l'hippocampe dorsal et ventral, la prolifération cellulaire (Ki-67), le nombre de neurones immatures (doublecortine) et le nombre de neurones matures (BrdU/NeuN).

Nous avons mis en évidence que 7 semaines de traitements avec la fluoxétine ou l'almorexant ont été en mesure de contrecarrer les effets physiques et comportementaux induits par l'UCMS. De plus, les deux traitements pharmacologiques ont induit un rétablissement du rétrocontrôle négatif sur l'axe du stress qui avait été préalablement altéré par l'UCMS. Cependant, seule la fluoxétine a contrecarré la diminution de la prolifération cellulaire et de la neurogenèse dans l'hippocampe, alors que le traitement avec l'almorexant a, au contraire,

provoqué une diminution de la prolifération cellulaire et de la neurogenèse dans l'hippocampe ventral.

Dans cette étude, nous démontrons que l'antagoniste des deux récepteurs orexinergiques, l'almorexant, induit un effet antidépresseur-*like* en participant à la restauration du rétrocontrôle négatif sur l'axe HPA au travers d'un mécanisme indépendant de la neurogenèse.

Ces résultats font l'objet d'un article en soumission dans *Biological Psychiatry*.

Neurogenesis-independent antidepressant-like effects of a dual orexin receptor antagonist in a rodent model of depression

Neurogenesis-independent antidepressant-like effects of a dual orexin receptor antagonist in a rodent model of depression

Mathieu Nollet¹, Philippe Gaillard^{1,2}, Arnaud Tanti¹, Virginie Girault¹, François Jenck³, Catherine Belzung¹, Samuel Leman^{1*}

¹ Inserm U930 Imaging and Brain, Université François Rabelais, 37200 Tours, France

² Clinique Psychiatrique Universitaire, CHRU de Tours, 37044 Tours, France

³ Actelion Pharmaceuticals Ltd, Gewerbestrasse 16, 4123 Allschwil, Switzerland

* Corresponding author at:

Samuel LEMAN

UMR Inserm 930 – Imaging and Brain

Team 4: Affective Disorders

Université François Rabelais

UFR Sciences et Techniques

Parc Grandmont - 37200 Tours (FRANCE)

Tel: +33 (0)2 47 36 69 97

Fax: +33 (0)2 47 36 72 85

samuel.leman@univ-tours.fr

Abstract

BACKGROUND: Major depression (MD) has been related to dysfunction of the hypothalamo-pituitary-adrenal (HPA) axis that antidepressants can restore through a hippocampal neurogenesis dependent mechanism. Growing evidence indicates that increase of orexin (or hypocretin) signaling is involved in the pathophysiology of MD, but little is known regarding the causal link between orexinergic system and depressive-like states. Here we investigated this link through the chronic pharmacological blockade of orexin receptors in the unpredictable chronic mild stress (UCMS), a rodent model of depression.

METHODS: Balb/c mice were exposed to 9 weeks of UCMS and daily treated from the third week onward with fluoxetine (20 mg/kg/day, p.o.) or the dual orexin receptor antagonist almorexant (100 mg/kg/day, p.o.). The effects of UCMS regimen and pharmacological treatments were assessed by physical measures and behavioral testing. The dexamethasone (DEX) suppression test was performed to examine the integrity of the negative feedback of the HPA axis, immunohistochemical markers were used for assessing cell proliferation (Ki-67), immature newborn neurons (doublecortin) and mature newborn neurons (BruU/NeuN) in the dorsal and ventral parts of hippocampus.

RESULTS: Our results showed that 7-weeks of fluoxetine or almorexant treatments counteract the UCMS-induced physical and behavioral alterations. Both treatments improve the HPA axis dysregulation caused by UCMS, but only fluoxetine reversed the UCMS-induced decrease of hippocampal cell proliferation and neurogenesis.

CONCLUSIONS: We demonstrated that the dual orexin receptor antagonist almorexant has a robust antidepressant-like effect in restoring the HPA axis negative feedback through a neurogenesis-independent mechanism.

Keywords

Depression

Orexin/Hypocretin

Antidepressant

Dual orexin/hypocretin receptor antagonist

Hippocampal neurogenesis

Hypothalamic-pituitary-adrenal axis

Introduction

Major depression (MD), a pathology that can be triggered by chronic psychosocial stress in vulnerable subjects (Keller *et al.*, 2007; El Hage *et al.*, 2009) is characterized by mood disturbance, anhedonia, sleep abnormalities, weight changes, and dysregulation of the hypothalamic-pituitary-adrenal HPA axis (Nestler *et al.*, 2002). Recently, adult hippocampal neurogenesis has been suggested either to participate in the etiology of depression (Snyder *et al.*, 2011) or to be involved in the aptitude of antidepressant drugs to elicit a therapeutic response (Santarelli *et al.*, 2003; Jiang *et al.*, 2005; Airan *et al.*, 2007; Surget *et al.*, 2008; Wang *et al.*, 2008; David *et al.*, 2009; Perera *et al.*, 2011). Evidence for this also came from the observation that currently used antidepressants, but also all putative antidepressants including CRH1 or V1b receptor antagonists, induce an increase in hippocampal new neurons formation (Malberg *et al.*, 2000; Santarelli *et al.*, 2003; Alonso *et al.*, 2004; Jiang *et al.*, 2005; Airan *et al.*, 2007; Surget *et al.*, 2008; Wang *et al.*, 2008; Perera *et al.*, 2011). Recently, we have shown that this occurs via the aptitude of antidepressants to recruit new hippocampal neurons to rescue the HPA axis regulation defects (Surget *et al.*, 2011), suggesting that restoration of the HPA axis dysregulation would be sufficient to induce therapeutic effects, even in a context in which a given treatment would not stimulate hippocampal neurogenesis.

Orexins, also known as hypocretins, are a pair of excitatory neuropeptides called orexin-A (OX-A) and orexin-B (OX-B) (hypocretin-1 and hypocretin-2), synthesized from the common precursor prepro-orexin (de Lecea *et al.*, 1998; Sakurai *et al.*,

1998). They are produced by a population of neurons located in the dorsomedial hypothalamus (DMH), perifornical hypothalamic area (PFA) and lateral hypothalamus (LH), from which they send projections broadly all over the brain (Peyron *et al.*, 1998). Physiological effects of orexins result from the activation of two G protein-coupled receptors differentially distributed throughout the brain (Trivedi *et al.*, 1998; Marcus *et al.*, 2001), orexin receptor 1 and 2 (OXR1 and OXR2), with OX-A showing equal affinity for both receptors while OX-B demonstrates a higher affinity for OXR2 (Sakurai *et al.*, 1998).

Interestingly, orexins have been implicated in several processes that are dysregulated in depressive subjects including sleep/wake transitioning (Sakurai *et al.*, 2010; Cao and Guilleminault, 2011), control of food intake (Cason *et al.*, 2010; Thompson and Borgland, 2011), reward seeking (Harris *et al.*, 2005; Aston-Jones *et al.*, 2010), and HPA axis regulation (Spinazzi *et al.*, 2006; Lopez *et al.*, 2010), suggesting that orexins could be partly involved in the pathophysiology of MD. Nonetheless, studies that investigated the link between orexinergic system and depression still report conflicting results, showing either that depressive-like and depressive states are associated with an overall decrease of orexinergic signaling (Allard *et al.*, 2004; Brundin *et al.*, 2007; Ito *et al.*, 2008), or an increase of orexin activity in depressed patients and animal models of depression (Salomon *et al.*, 2003; Feng *et al.*, 2008; Mikrouli *et al.*, 2011; Nollet *et al.*, 2011; von der Goltz *et al.*, 2011).

To further study the exact role of orexin in depressive-like states, we exposed mice to the unpredictable chronic mild stress (UCMS), a widely used informative and naturalistic animal model of depression (Willner, 1997; Cryan and Holmes, 2005; Sibille *et al.*, 2009; Surget *et al.*, 2009). We then studied the behavioral and neurobiological effects of a chronic treatment with the dual orexin receptor antagonist almorexant (Brisbare-Roch *et al.*, 2007), compared to the classical antidepressant fluoxetine, a selective serotonin reuptake inhibitor (SSRI), with an emphasis on adult hippocampal neurogenesis and HPA stress axis. Here, we demonstrate that behavioral disturbances induced by chronic stress exposure are reversed by the dual orexin receptor antagonist, which improved HPA axis dysregulation through a neurogenesis-independent mechanism.

Methods and Materials

Animals

Ninety five BALB/c mice (Centre d'élevage Janvier, Le Genest St-Isle, France), aged between 6 and 7 weeks at the time of their arrival in the laboratory, were housed in groups of four per cage under standard conditions ($22 \pm 2^\circ\text{C}$, 40% humidity, inverted 12-hours light-dark cycle with lights off at 9:00 am, food and water *ad libitum*) for 1 week prior to the beginning of experimental procedures. All experimental procedures were carried out in strict accordance with the European Communities Council directive (86/609/EEC) and received the approval of the ethical committee (agreement # 2011-06-10, Comité d'Ethique en Expérimentation Animale Val de Loire, CEEAVdL).

Experimental design

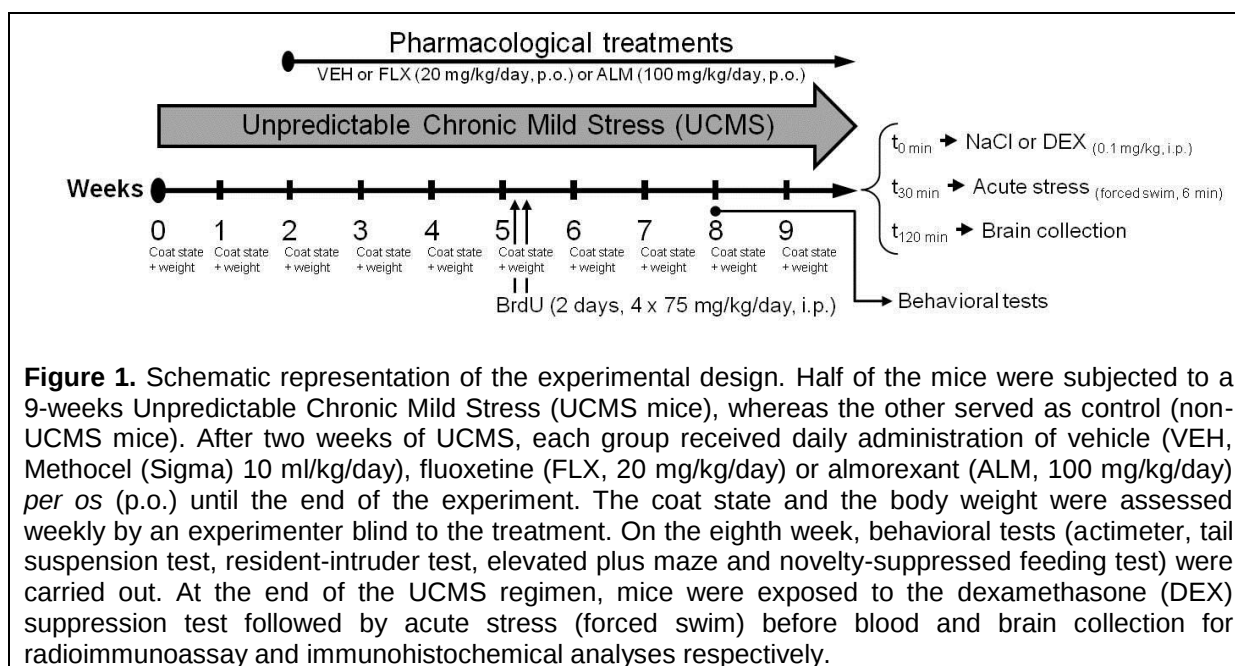


Figure 1. Schematic representation of the experimental design. Half of the mice were subjected to a 9-weeks Unpredictable Chronic Mild Stress (UCMS mice), whereas the other served as control (non-UCMS mice). After two weeks of UCMS, each group received daily administration of vehicle (VEH, Methocel (Sigma) 10 ml/kg/day), fluoxetine (FLX, 20 mg/kg/day) or almorexant (ALM, 100 mg/kg/day) *per os* (p.o.) until the end of the experiment. The coat state and the body weight were assessed weekly by an experimenter blind to the treatment. On the eighth week, behavioral tests (actimeter, tail suspension test, resident-intruder test, elevated plus maze and novelty-suppressed feeding test) were carried out. At the end of the UCMS regimen, mice were exposed to the dexamethasone (DEX) suppression test followed by acute stress (forced swim) before blood and brain collection for radioimmunoassay and immunohistochemical analyses respectively.

Unpredictable chronic mild stress (UCMS) regimen used in this study has been previously presented in detail (Nollet *et al.*, 2011) and is a variant of chronic mild stress procedures described by Willner in rats (Willner, 1997). Briefly, mice were daily subjected to various socio-environmental low intensity stressors according to an unpredictable schedule for a total period of 9 weeks (Figure 1). Pharmacological treatment started two weeks after the beginning of the UCMS protocol, and was always maintained until the end of the experiment. Body weight and coat state (high score indicates a coat is in poor condition) were assessed weekly as markers of the progression of the UCMS-evoked syndrome. Behavioral tests were performed in week 9 ($n = 14-19$ mice/group), at least 18 hours after last treatment. To label newborn adult cells in the dentate gyrus (DG), the thymidine analogous 5-bromo-2'-deoxyuridine (BrdU, B5002, Sigma-Aldrich) was injected intraperitoneally (i.p.) 4 weeks before intracardiac perfusions (4 injections of 75 mg/kg every 2 hours, during 2 days). At the end of the UCMS protocol, all mice were subjected to dexamethasone suppression test 2 hours before being perfused.

Drugs

The SSRI fluoxetine-HCl (Sequoia Research Products, Pangbourne, UK) and the dual orexin receptor antagonist almorexant (ACT-078573-hydrochloride, Actelion Pharmaceuticals, Switzerland) were dissolved in 0.2 % methyl-cellulose (Methocel, 64620, Sigma-Aldrich) water solution. Non-UCMS and UCMS mice daily received *per os* (*p.o.*, 10 ml/kg/day) freshly prepared vehicle (VEH, 0.2 % methyl-cellulose), fluoxetine (FLX, 20 mg/kg/day), or almorexant (ALM, 100 mg/kg/day). Oral drug

administrations were made between 1:00 pm and 3:00 pm, irrespective of the stress schedule.

Behavioral testing

A brief description of the behavioral tests is presented here. For a full and detailed description, please refer to the Supplement 1.

Basal locomotor activity

An actimeter was used 2 hours (afternoon, i.e. during the dark phase of the cycle), 10 hours (night, i.e. during the light phase of the cycle) and 18 hours (morning, i.e. at the beginning of the dark phase) after drug administration to assess the long-lasting effects of UCMS and pharmacological treatments on basal locomotor activity of mice in their home cage. Locomotor activity was measured during 2 hours for each time point.

Resident-intruder test

The resident-intruder (R-I) test was performed as previously described (Nollet *et al.*, 2011) and allows to measure the agonistic behavior of mice. The latency of the first attack and the number of attack(s) (data not shown) were measured over a 6-min period. Depressive-like animals are more agonistic and likely to attack more often and sooner than non-stressed animals (Mineur *et al.*, 2003).

Tail suspension test

As previously described (Steru *et al.*, 1985), mice were suspended by the tail using adhesive tape to a rod 60 cm above the floor. The trials were conducted for a period of 6 min and were video recorded. The behavioral measure was the duration of immobility, interpreted as behavioral despair.

Novelty-suppressed feeding test

The novelty-suppressed feeding (NSF) test used in this study has been formerly described (Surget *et al.*, 2008). Fasted mice were placed in a corner of a square arena where a single pellet of food was placed on a white paper positioned in the box center. The latency to manifestly chew the pellet was recorded within a 3-min period. This test induced a conflicting motivation between the drive to eat the food pellet and the fear of venturing into the arena.

Elevated plus maze

The elevated plus maze (EPM) consists in a plus-cross-shaped maze, elevated from the floor, with two opposite enclosed arms and two others opened and brightly lit. Mice were placed in the center area facing one of the closed arms and their movements and time spent in the different arms were analyzed for 5 min. The time spent in the open arms is associated with a reduction of anxiety.

Dexamethasone suppression test

To assess the effects of UCMS and treatments on the HPA axis negative feedback, the glucocorticoid receptor agonist dexamethasone-phosphate (D-1759, Sigma-

Aldrich) was used to carry out a dexamethasone (DEX) suppression test. For this purpose, all mice were intraperitoneally injected with either DEX (0.1 mg/kg in 0.9 % NaCl, $n = 5$ mice/group) or saline (0.9% NaCl, $n = 5$ mice/group). Thirty minutes later, mice were subjected to an acute stressor (forced swim) for 6 minutes. Then, 90 minutes later (i.e. 120 minutes after DEX injection), mice were deeply anesthetized with sodium pentobarbital (40 mg/kg, i.p.), transcardially perfused and their brains were collected for immunohistochemical analyses of Fos expression in the PVN. Blood was also collected for plasma corticosterone level analyses. Plasma was separated and stored at -20°C until radioimmunoassay.

Quantification of corticosterone levels

Plasma was analyzed for total corticosterone levels using a ^{125}I -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. Percentages of plasma corticosterone level's suppression induced by DEX injection were calculated taking the mean level of plasmatic corticosterone in animals of corresponding group treated with saline solution.

Immunohistochemistry

Several immunohistochemical staining were performed in order to assess the neuronal activity (c-Fos protein) within the PVN of the hypothalamus, the cell proliferation (Ki67 protein) and the neurogenesis (immature newborn neurons with doublecortin staining and mature new neurons with BrdU+NeuN double staining) in

the dentate gyrus of hippocampus (Figure 2, full details are provided in Supplement 1).

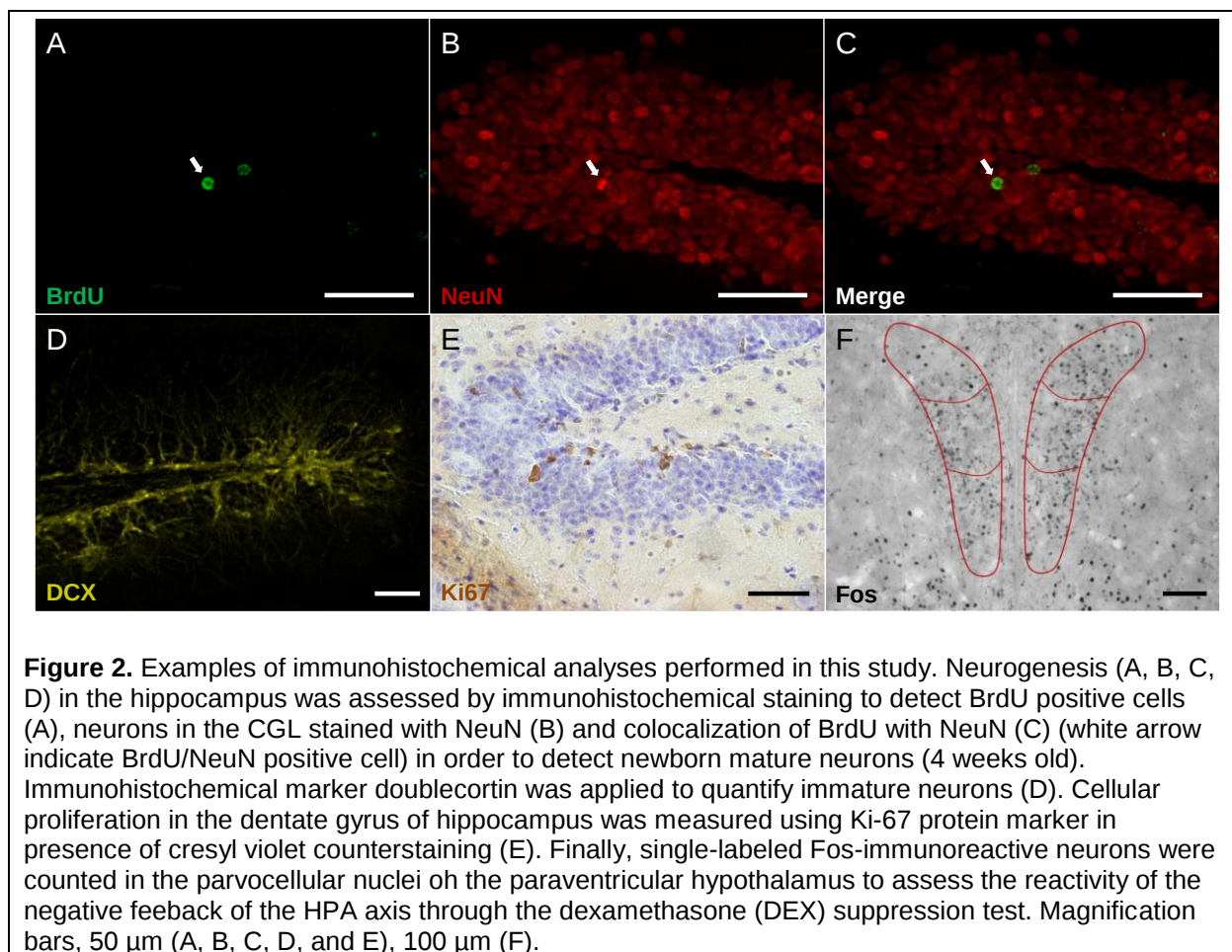


Image analyses and cell quantification

Activity of hypothalamic nuclei related to HPA axis activity was assessed by analysis of Fos-labeled neurons in the parvocellular nuclei of the PVN whose axons are known to release CRH. The nomenclature and nuclei boundaries used were those defined by Franklin and Paxinos's mouse brain atlas (Franklin and Paxinos, 2008). Hippocampal cell proliferation and neurogenesis were assessed by analysis of Ki67-labeled (cell proliferation), DCX-labeled (newborn immature neurons) and

BrdU/NeuN-labeled (newborn mature neurons) cells in the granular cell layer (GCL). As dorsal and ventral parts of the hippocampus do not share the same afferences and efferences (Fanselow and Dong, 2010) and the fact that the ventral part is known to regulate the HPA axis through polysynaptic neuronal circuit towards the PVN (Mizoguchi *et al.*, 2003; Herman *et al.*, 2005; Ulrich-Lai and Herman, 2009), cell proliferation and neurogenesis were examined separately in the dorsal, intermediate and ventral parts of the hippocampus (Franklin and Paxinos, 2008). In this study, since results for dorsal and intermediate hippocampus are identical, only comparisons between dorsal and ventral parts are presented here (results for the intermediate part are presented in Figure 1 of the Supplement 3). Full explanation of image analyses and cell quantification are available in Supplement 1.

Statistics

Considering that relatively small sample sizes were used ($n \leq 19$ mice/group for behavioral analysis and $n \leq 8$ mice/group for neurobiological analysis) and that assumptions for parametric statistics could not be ensured (normality and homoscedasticity), data were analyzed using the non-parametric Kruskal–Wallis “ANOVA by ranks” *H*-test. Significant effects (i.e., $p < 0.05$) were followed up with *post-hoc* Mann-Whitney *U*-tests with Holm-Bonferroni correction when appropriate (Aickin and Gensler, 1996). The Holm-Bonferroni method was not applied for DEX suppression test analysis due to the small sample size ($n = 5$ mice/group). *p*-values that are indicated in the Results section always derived from the between-groups comparisons using the Kruskal-Wallis *H*-test while *p*-values resulting from *post-hoc*

comparisons are indicated in the figures. All data are expressed as mean $\pm$ standard error of the mean (SEM), and the sample sizes are provided in the figure legends.

Results

Chronic stress induces physical and behavioral disruptions reversed by 7-weeks treatment with almorexant and fluoxetine

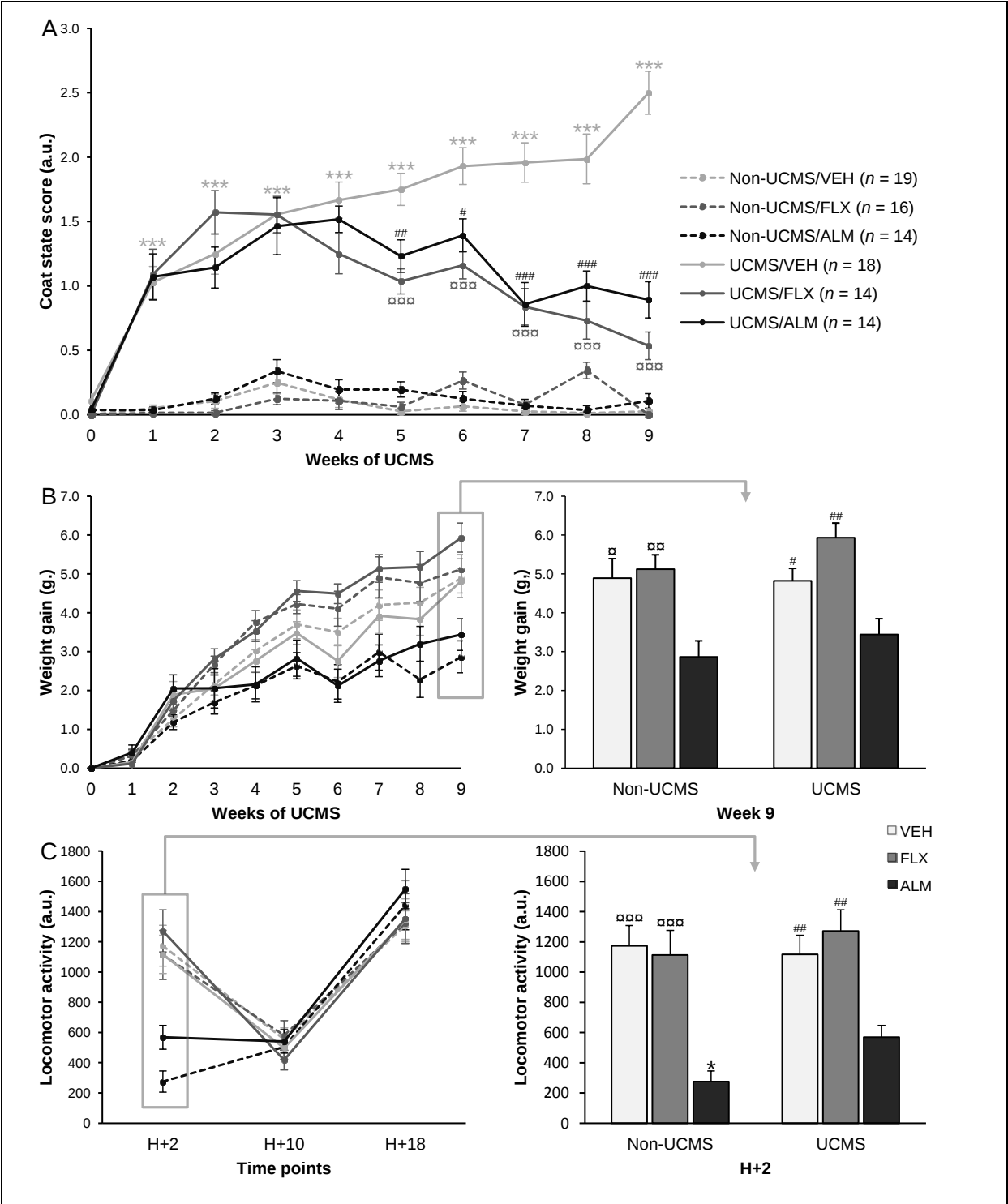


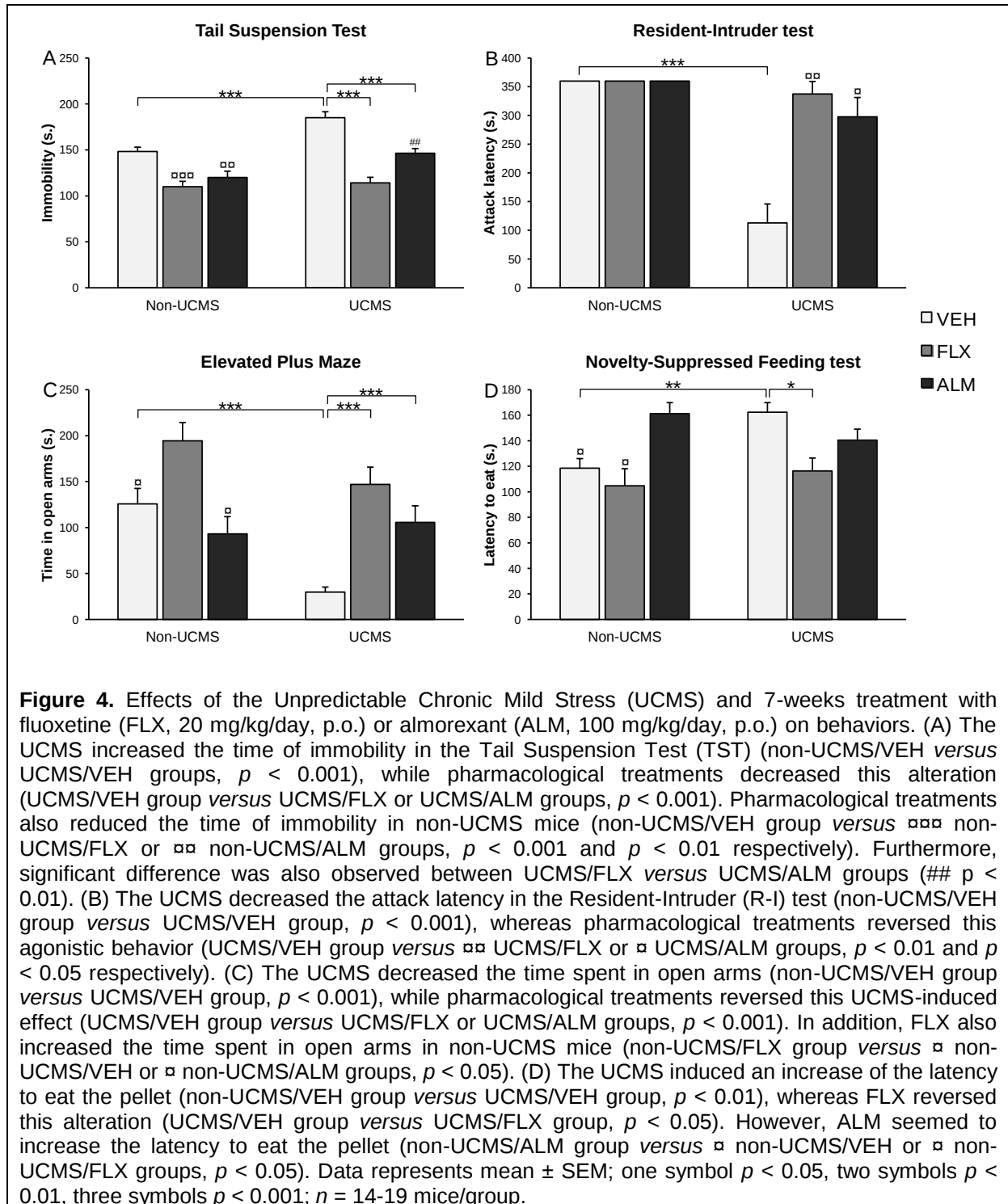
Figure 3. Effects of the Unpredictable Chronic Mild Stress (UCMS) and 7-weeks treatment with fluoxetine (20 mg/kg/day, p.o.) or almorexant (100 mg/kg/day, p.o.) on the coat state, the body weight and the locomotor activity. (A) The UCMS induced a significant deterioration of the coat state, as demonstrated by increasing coat state scores, from the week 1 until the end of the UCMS protocol (non-UCMS/VEH group *versus* UCMS/VEH group, *** $p < 0.001$). Drug treatments initiated in the beginning of the third week of the UCMS exposure reversed this deterioration after 3 weeks treatment (UCMS/VEH group *versus* *** UCMS/FLX or # UCMS/ALM groups, $p < 0.001$ and $p < 0.05$ respectively). No significant difference was observed between the non-UCMS groups. (B) A gradual increase of body weight was observed during the 9 weeks of UCMS without effects of chronic stress or FLX treatment, but with significant differences at the end of the experiment. ALM-treated mice presented slower weight gain in both non-UCMS mice (non-UCMS/ALM group *versus* □ non-UCMS/VEH or □□ non-UCMS/FLX groups, $p < 0.05$ or $p < 0.01$) and in UCMS mice (UCMS/ALM group *versus* # UCMS/VEH or ## UCMS/FLX groups, $p < 0.05$ or $p < 0.01$). (C) ALM induced a decrease of locomotor activity only two hours after administration in non-UCMS mice (non-UCMS/ALM group *versus* □□□ non-UCMS/VEH or □□□ non-UCMS/FLX groups, $p < 0.01$) and in UCMS mice (UCMS/ALM group *versus* ## UCMS/VEH or ## UCMS/FLX groups, $p < 0.01$). In addition, this ALM-induced decrease of locomotor activity was greater in unstressed animals (non-UCMS/ALM *versus* UCMS/ALM, * $p < 0.05$). Data represents mean $\pm$ SEM; one symbol $p < 0.05$, two symbols $p < 0.01$, three symbols $p < 0.001$; $n = 14-19$ mice/group.

We first assessed the effects of chronic administration of ALM and FLX on physical state and behavior in mice subjected to 9-weeks UCMS or maintained under non-stressful conditions (non-UCMS mice).

UCMS induced a gradual deterioration of the coat state that appeared after 1 week of stress, whereas no degradation was observed in non-UCMS mice (Figure 3A). Interestingly, in contrast to UCMS/VEH mice whose physical state worsened until the end of the UCMS procedure, chronic administration of FLX or ALM improved coat state that reached significance after 3 weeks of treatments (Figure 3A; Table 1 in Supplement 2). A gradual increase of body weight was observed during the 9 weeks of UCMS (Figure 3B). Although no effect of UCMS or chronic FLX treatment was noticed, chronic ALM administration significantly reduced the weight gain as it can be seen at the end of UCMS regimen ($p < 0.001$; Figure 3C).

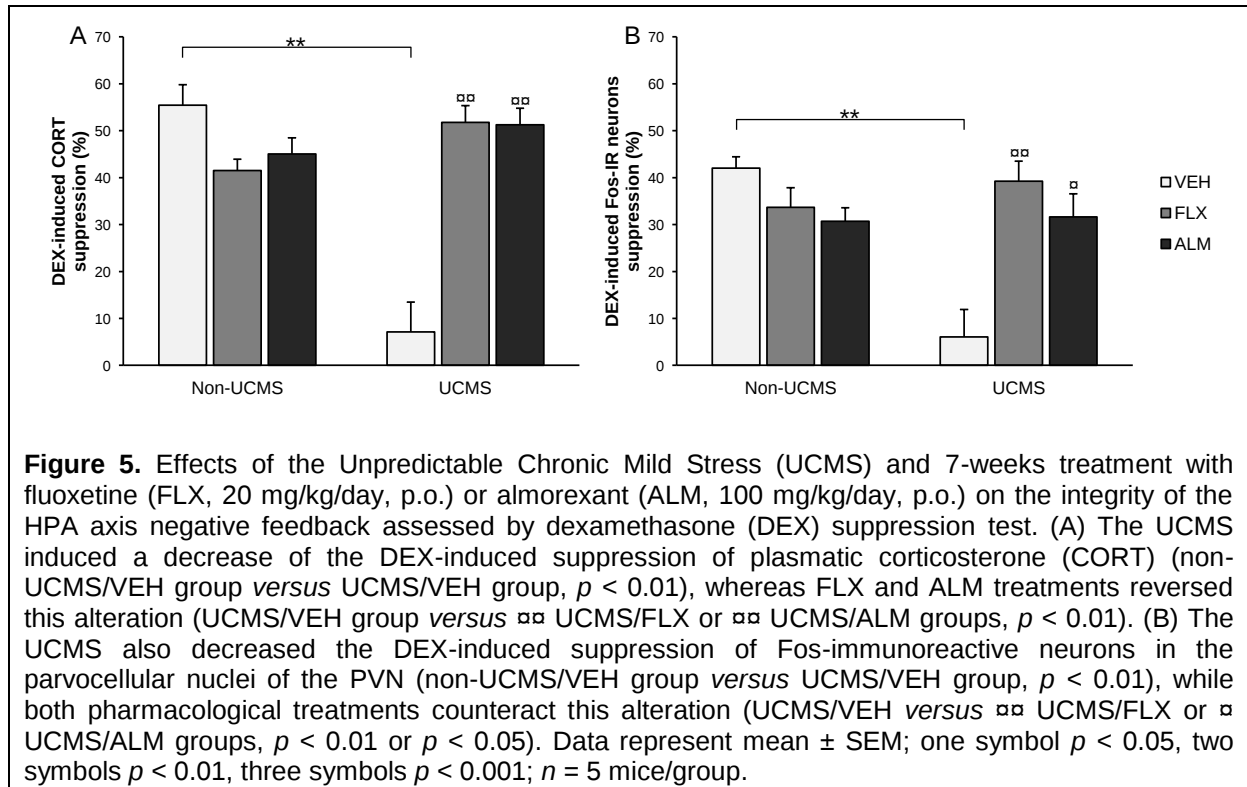
Locomotor activity was neither affected by UCMS or treatments 18 hours after the last oral administration (at the time of the behavioral test), nor 10 hours after (Figure 3D). Nevertheless, 2 hours after administration of treatments, ALM significantly

decreased the locomotor activity of mice in both UCMS and non-UCMS groups ($p < 0.001$; Figure 3E).



The UCMS also induced behavioral alterations that have been consistently reversed by pharmacological treatments (except in the NSF test for ALM-treated mice). Importantly, none of these alterations were due to changes in locomotor activity, since behavioral tests were carried out at a time point at which no change in locomotion can be observed (at least 18 hours after the last oral drug administration). In the TST, UCMS induced an increase of immobility, whereas FLX and ALM treatments reduced this immobility in both UCMS and non-UCMS mice ($p < 0.001$; Figure 4A). Furthermore, in the R-I test, a decrease of attack latency was observed in UCMS/VEH mice, reversed by FLX and ALM treatments ($p < 0.001$; Figure 4B). No effect of treatments was observed in non-UCMS mice. Moreover, in the EPM, UCMS reduced the time spent in open arms, reversed by FLX and ALM treatments, while FLX also increased the time spent in open arms in non-UCMS mice ($p < 0.001$; Figure 4C). Finally, in the NSF test, UCMS increased the latency to eat, reversed by FLX treatment ($p < 0.001$; Figure 4D). No effect of FLX was observed in non-UCMS mice. Nevertheless, ALM did not reverse behavioral alteration induced by UCMS, since this treatment significantly increases the latency to eat the pellet in non-UCMS group. However, when returned to their home cage, mice did not display any difference in the latency to smell the pellet or in the food consumption 5 min after the test (data not shown).

UCMS-induced disruption of HPA negative feedback is restored by almorexant and fluoxetine



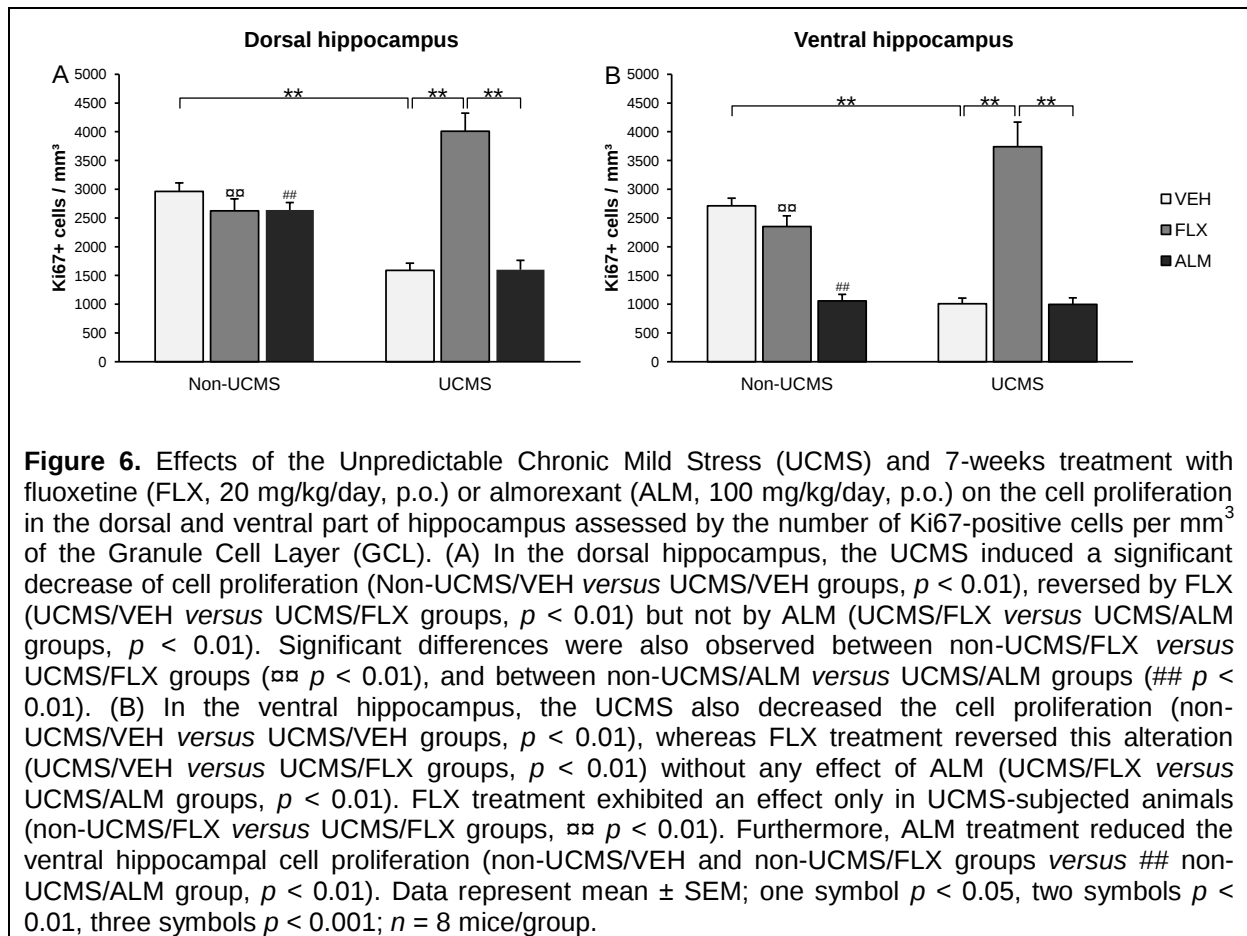
As depressive states are often associated with hyperactivity of HPA axis that can be reversed by antidepressants (Ising *et al.*, 2007), we then examined the integrity of the negative feedback of the HPA axis through the DEX suppression test following UCMS and chronic pharmacological treatments. In this test, the administration of the glucocorticoid receptor agonist DEX-phosphate (0.1 mg/kg, i.p.) is known to decrease the plasmatic corticosterone level and to attenuate or suppress the activation of the PVN parvocellular nuclei through the activation of the negative feedback when it is undamaged.

We found that UCMS dampened the effectiveness of the negative feedback loop of HPA axis regarding plasmatic corticosterone concentration and Fos-expressing

neurons in the parvocellular nuclei of the PVN, effects that were reversed by both pharmacological treatments. Indeed, the percentage of suppression induced by DEX injection was strikingly decreased by UCMS (non-UCMS/VEH mice ~ 55 % *versus* UCMS/VEH mice ~ 7 %), and this effect was reversed after chronic FLX (~ 52 %) and ALM (~ 51 %) treatments ($p < 0.01$; Figure 5A). The percentage of Fos-positive neurons in the PVN was also reduced following the UCMS (non-UCMS/VEH mice ~ 42 % *versus* UCMS/VEH mice ~ 6 %), whereas FLX (~ 39 %) and ALM (~ 32 %) treatments restored the Fos activation of PVN neurons ($p < 0.01$; Figure 5B). Importantly, no significant effect of UCMS or treatments on plasma corticosterone level or Fos expression in the parvocellular nuclei of the PVN in non-UCMS mice receiving saline solution was noticed (data not shown).

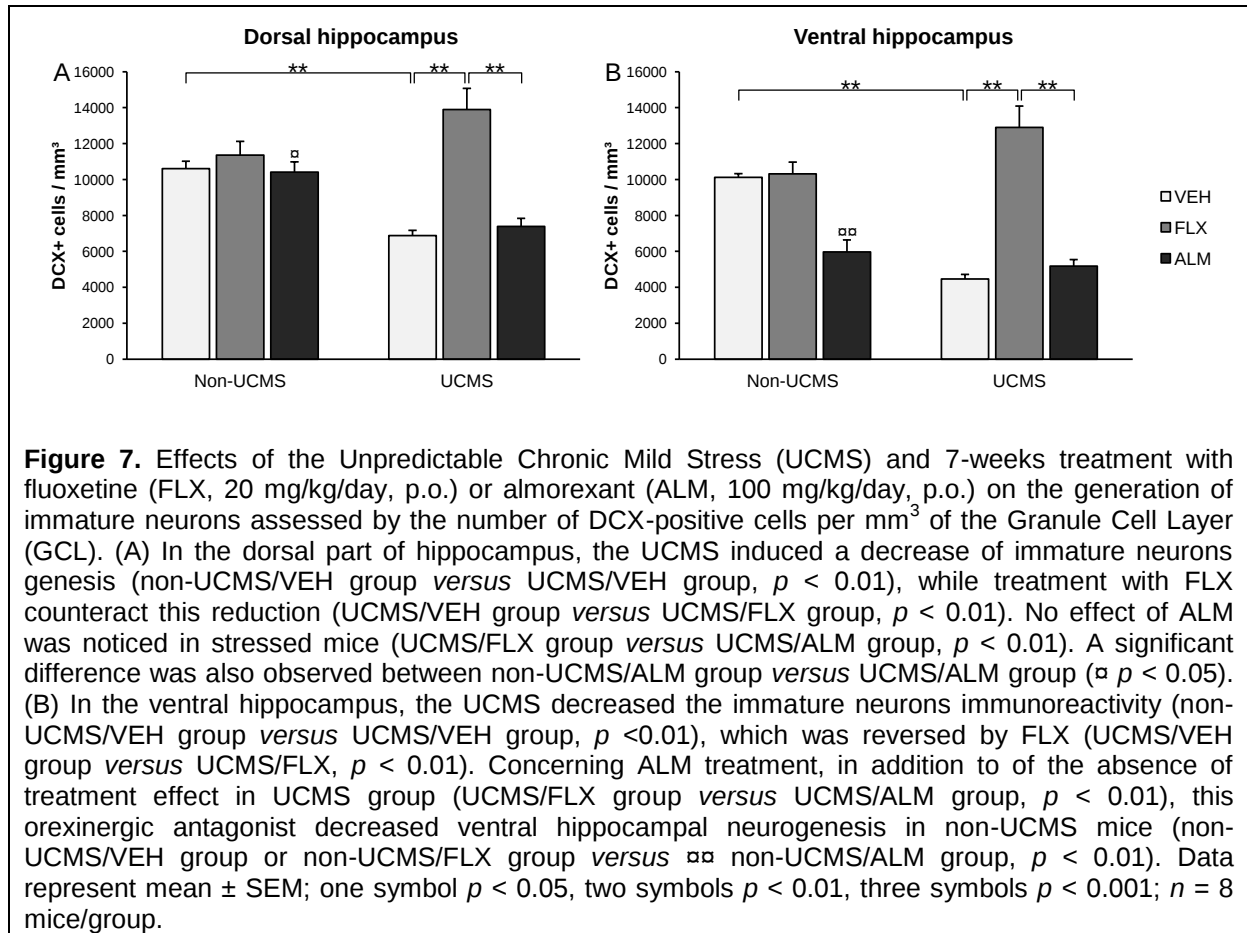
Decrease of hippocampal cell proliferation and neurogenesis induced by chronic stress is reversed by fluoxetine but not by almorexant

Since antidepressant drugs require or modulate hippocampal cell proliferation or neurogenesis (Santarelli *et al.*, 2003; Surget *et al.*, 2008; Surget *et al.*, 2011), we thus studied the ability of chronically administrated ALM and FLX to modulate hippocampal cell proliferation and neurogenesis in UCMS and non-UCMS subjected mice.



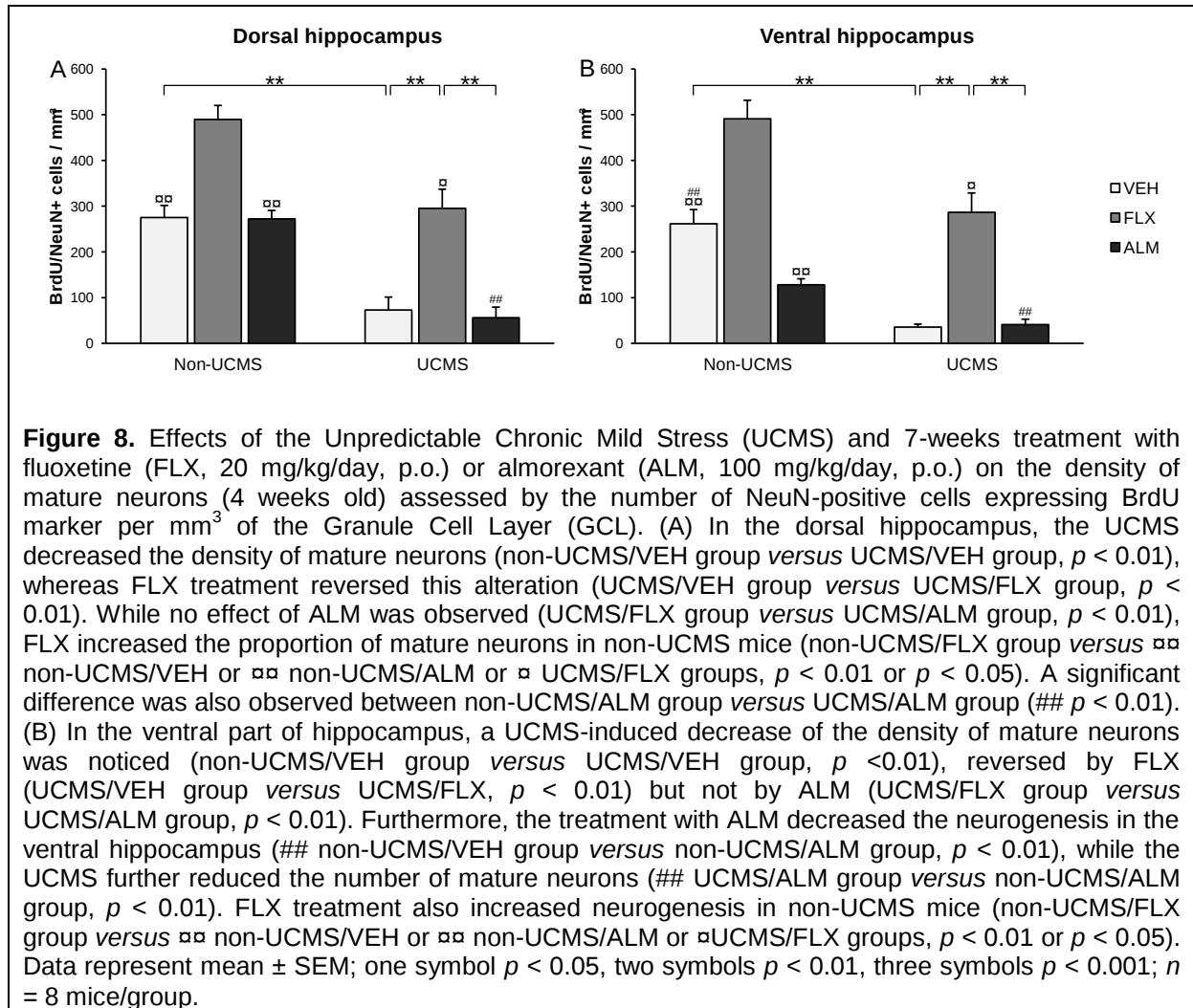
For this purpose, we first assessed UCMS and treatments effects on hippocampal cell proliferation using Ki67 protein marker. We observed that UCMS induced a decrease of Ki67-positive cell density in the dorsal hippocampus (~ -46 %, non-UCMS/vehicle versus UCMS/vehicle, $p < 0.001$; Figure 6A), and a more important decrease in the ventral part of hippocampus (~ -63 %, non-UCMS/vehicle versus UCMS/vehicle, $p < 0.001$; Figure 6B). These disruptions were reversed by FLX treatment in both parts of the DG. UCMS/FLX mice exhibited a significantly higher Ki67-positive cell density than in non-UCMS/FLX group, with no effect of FLX in the non-UCMS group, suggesting that FLX increase cell proliferation only in stressed mice. Interestingly, in addition to the absence of increasing Ki67-positive cell density

in both parts of the hippocampus following chronic ALM treatment in UCMS mice, this dual orexinergic receptor antagonist even decreased Ki67-positive cell density in the ventral hippocampus in non-UCMS animals ($\sim -61\%$, non-UCMS/vehicle *versus* non-UCMS/almorexant, $p < 0.001$; Figure 6B).



We then focused on the newborn immature neurons by assessing the density of DCX-expressing cells in the DG. We found that UCMS decreased hippocampal DCX-positive cell density in the dorsal hippocampus ($\sim -35\%$, non-UCMS/vehicle *versus* UCMS/vehicle, $p < 0.001$; Figure 7A), and even more in ventral hippocampus ($\sim -56\%$, non-UCMS/vehicle *versus* UCMS/vehicle, $p < 0.001$; Figure 7B). FLX treatment clearly reversed this disruption, while no increase of DCX-positive cell density was

seen in ALM-treated UCMS or non-UCMS mice. Furthermore, in the ventral hippocampus, non-UCMS mice chronically treated with ALM had a decrease of DCX-positive cell density ($\sim -41\%$, non-UCMS/vehicle *versus* non-UCMS/almorexant, $p < 0.001$; Figure 7B).



Finally, we examined the adult newborn neurons through double-labeled cells with the neuronal marker NeuN and the cellular division marker BrdU (injected 4 weeks before sacrifice). We observed that UCMS decreased hippocampal BrdU/NeuN-positive cell density in the dorsal ($\sim -73\%$, non-UCMS/vehicle *versus* UCMS/vehicle,

$p < 0.001$; Figure 8A) and especially in the ventral part of hippocampus ($\sim -86\%$, non-UCMS/vehicle *versus* UCMS/vehicle, $p < 0.001$; Figure 8B), counteracted by FLX treatment, but not by ALM treatment. This latter treatment also specifically decreased the density of BrdU/NeuN-positive neurons in the ventral hippocampus in non-UCMS mice ($\sim -51\%$, non-UCMS/vehicle *versus* non-UCMS/almorexant, $p < 0.001$; Figure 8B). In addition, we found that in non-UCMS mice, FLX significantly increased the proportion of mature neurons compared with other non-stressed animals.

To summarize, ALM treatment was unable to counteract the UCMS effects on cell proliferation and neurogenesis in the entire DG, and even decreased these two phenomena in the ventral hippocampus.

Discussion

From the first studies that report a putative link between orexins and MD, there has been little progress in understanding the importance of such neuropeptidergic system in depressive-like and anxiety states. Indeed, the involvement of orexinergic system in depressive-like and depressive states gave rise to conflicting results regarding preclinical and clinical studies, balancing between hypoactivity (Taheri *et al.*, 2001; Allard *et al.*, 2004; Brundin *et al.*, 2007; Ito *et al.*, 2008), or hyperactivity of orexinergic signaling system (Salomon *et al.*, 2003; Feng *et al.*, 2007; Feng *et al.*, 2008; Mikrouli *et al.*, 2011; von der Goltz *et al.*, 2011). It has also been shown that i.c.v. administration or amygdalar infusion of OX-A induces anxiety behaviors (Suzuki *et al.*, 2005; Avolio *et al.*, 2011). Furthermore, Johnson and collaborators have recently shown that orexin neurons, especially in the DMH-PFA, are necessary for the occurrence of anxiety-like behavior in panic-prone rats since silencing hypothalamic OX gene (*Hcrt*) or i.p. pre-treatment with OXR1 antagonists blocks the panic responses (Johnson *et al.*, 2010). In line with these latter results, we recently reported that UCMS-subjected mice exhibited an increase of neuronal activation in the DMH-PFA orexinergic neurons compared to LH orexinergic neurons and that this effect was reversed by chronic fluoxetine treatment (Nollet *et al.*, 2011).

In this study, our findings demonstrate for the first time a clear involvement of orexin signaling in depressive states. One of our meaningful outcomes is the robust physical and behavioral antidepressant-like effects of the dual orexin receptor antagonist almorexant. The UCMS procedure induced a depressive-like state in mice regarding

their physical condition, with a clear deterioration of coat state. Chronic fluoxetine treatment reversed this deterioration, corresponding to previous works conducted in our laboratory (Santarelli *et al.*, 2003; Surget *et al.*, 2008; Surget *et al.*, 2009; Nollet *et al.*, 2011). In a similar way, chronic treatment with almorexant also reversed the UCMS-induced worsening of the coat state. Additionally, we found a regular increase of body weight during the entire protocol, while almorexant slackened the weight gain, corresponding to the decrease of food-intake following orexinergic system blockage by antagonists, since orexins are known to be involved in food and drug reward (Cason *et al.*, 2010). Concerning behavior, the UCMS regimen led to an increase of agonistic behavior in the R-I test, of despair behavior in the TST, and of anxiety in the EPM and the NSF test. These behavioral alterations were totally reversed by chronic treatment with fluoxetine in accordance with previous studies (Kurt *et al.*, 2000; Surget *et al.*, 2008; Surget *et al.*, 2009; Nollet *et al.*, 2011) and more interestingly, similar effects were also observed following chronic treatment with almorexant with one exception for the NSF test. Indeed, chronic almorexant treatment increased the latency to eat the pellet in both non-stressed and stressed mice. This effect could be attributed to a decreased motivation to eat in a novel environment rather than a specific anorexigenic effect of the antagonist, since no difference in the food consumption 5 minutes after the test was observed when mice returned to their home cages. In addition, fluoxetine and almorexant treatments exerted an effect in non-UCMS animals in the TST, accordingly with what is generally observed when the TST is used as a bioassay for screening antidepressant drugs (Kulkarni and Dhir, 2007), and also with what we have previously described in non-stressed mice chronically treated with almorexant (Nollet *et al.*, 2011).

Since the restoration of the stress-induced HPA axis dysregulation have been linked to the beneficial effects of antidepressant, we assessed the effect of chronic almorexant treatment on the putative UCMS-induced disruption of the HPA axis negative feedback loop through the DEX suppression test. Our findings show that chronic stress induced a dysregulation of HPA axis through the decrease of the response following the DEX suppression test. Both plasma corticosterone levels in stressed animals and the Fos expression in parvocellular neurons of the PVN indicated a strong decrease of the negative feedback regulation of the HPA axis. This negative feedback control was restored after fluoxetine or almorexant chronic treatments, suggesting that antidepressant effects obtained after both treatments could be linked to the restoration of a normal and functional negative feedback loop on HPA axis. These results corroborate the fact that, in most depressed patients with altered HPA axis negative feedback, remission and decreased risk of relapse are associated with the improvement of HPA axis functioning (Holsboer-Trachsler *et al.*, 1991; Appelhof *et al.*, 2006; Kunugi *et al.*, 2006; Ising *et al.*, 2007). Here, we have demonstrated that almorexant restored UCMS-induced HPA negative feedback disruption, sustaining the interaction between the PVN and the orexinergic system which are strongly linked with reciprocal innervations (Winsky-Sommerer *et al.*, 2004; Winsky-Sommerer *et al.*, 2005; Spinazzi *et al.*, 2006). Moreover, orexin receptor 2 (OXR2) is abundant in the PVN (Trivedi *et al.*, 1998; Marcus *et al.*, 2001), and it has been shown that i.c.v. injection of selective OXR2 antagonist attenuates OX-A-induced increase of adrenocorticotrophic hormone (ACTH) level in rats (Chang *et al.*, 2007). Then, the mechanism through which the dual orexin receptor antagonist

almorexant restored the negative feedback on the HPA axis could be mediated by this OXR2 of neurons located in the PVN.

In the present study, we found that chronic stress suppressed cell proliferation (Ki67-expressing cells) and neurogenesis (DCX- and BrdU/NeuN-labeled cells), confirming previous reports (Czeh *et al.*, 2001; Pham *et al.*, 2003; Mineur *et al.*, 2007). Furthermore, this suppression affected more specifically the ventral part of hippocampus, which strengthen evidences linking this region to stress and emotions (Fanselow and Dong, 2010). Additionally, in accordance with what have been formerly shown, chronic fluoxetine treatment reversed the UCMS-induced hippocampal cell proliferation and neurogenesis suppression (Malberg *et al.*, 2000; Santarelli *et al.*, 2003; Surget *et al.*, 2008; Surget *et al.*, 2011). Furthermore, while no effect of fluoxetine was observed in non-stressed mice regarding cell expressing immature neuronal marker doublecortin, these non-stressed animals treated with fluoxetine exhibited a significant increase of mature neurons (4-week old) stained with BrdU/NeuN markers. This suggests that fluoxetine treatment is able to accelerate the maturation of new neurons in non-stressed animals (Wang *et al.*, 2008; Perera *et al.*, 2011), without increasing cell proliferation (Ki67-labeled cells) or immature neurons density (DCX-expressing cells).

In our study, chronic treatment with the dual orexin receptor antagonist almorexant neither did increase hippocampal cell proliferation nor neurogenesis. This result could be linked to the fact that, on the opposite, OX-A infusion increases cell proliferation (probably through the release of the neuropeptide Y) without affecting the percentage of DCX-positive cells (Ito *et al.*, 2008). This is critical as it has been

shown that hippocampal neurogenesis is not required for the reversal of the behavioral and physical disruptions of UCMS by compounds targeting directly the HPA stress axis response (CRF1 or Vasopressin1b antagonists) (Surget *et al.*, 2008). Intriguingly, the blockade of orexinergic system even reduced cell proliferation and neurogenesis specifically in the ventral part of the hippocampus, without inducing depressive-like states *per se*, in line with several (but not all, (Snyder *et al.*, 2011)) studies where no induced-depressive-like phenotypes have been observed in hippocampal neurogenesis ablated mice (Santarelli *et al.*, 2003; Surget *et al.*, 2008; Surget *et al.*, 2011). Considering that the ventral hippocampus is more related to emotional states and stress responses than its dorsal part, this result reinforces the idea that orexins play a central role in regulating emotional states and psychological stress (Furlong *et al.*, 2009). Nevertheless, additional investigations will be necessary to fully understand this process.

In this study, the antidepressant-like effect underpinned by orexinergic system was obtained by blocking undifferentially both orexin receptors. Nevertheless, a differential role of orexin receptors in depression has also been underlined by recent researches. Deletion of OXR1 in mice have no effect in behavioral tests for anxiety, but OXR1 knockout mice exhibited reduced depression-like behaviors, confirmed by injection of a selective OXR1 antagonist (Scott *et al.*, 2011). In contrast, OXR2-null mice exhibit an increase of depression-like behaviors, without changes of anxiety responses in behavioral tests (Scott *et al.*, 2011). Interestingly, we have shown by western blot analysis that OXR2 expression was higher in ventral hippocampus compared to OXR1, and that UCMS induced a decrease of OXR2 expression in this

area, without any effect of fluoxetine treatment (Nollet *et al.*, 2011). These results indicate the need for further studies to dissect the exact role of each orexin receptor.

Taken together, our findings open new perspectives regarding the implication of the orexinergic system in depression. The fact that the dual orexin receptor antagonist almorexant reinstates glucocorticoid feedback inhibition likely through the direct modulation of the PVN, the main central regulator of the stress axis and independently to the restoration of the hippocampal cell proliferation and neurogenesis, strongly suggests that orexinergic system plays a significant role in depressive disorders.

Acknowledgment

We would like to thank Dr. François Jenck (Actelion Pharmaceuticals) and Actelion Pharmaceuticals for the gift of almorexant, Dr. Petra S. van Nieuwenhuijzen (University of Sydney) for thoughtful comments on this article, as well as Anne-Marie Le Guisquet, Séverine Devers, Maryse Pingaud, Bruno Brizard, Lucette Garreau, Zuhail Gulhan, Jade Ezzedine and Teddy Delavallée for assistance.

References

- Aickin M, Gensler H** (1996). Adjusting for multiple testing when reporting research results: the Bonferroni vs Holm methods. *Am J Public Health*, 86:726-728.
- Airan RD, Meltzer LA, Roy M, Gong Y, Chen H, Deisseroth K** (2007). High-speed imaging reveals neurophysiological links to behavior in an animal model of depression. *Science*, 317:819-823.
- Allard JS, Tizabi Y, Shaffery JP, Trouth CO, Manaye K** (2004). Stereological analysis of the hypothalamic hypocretin/orexin neurons in an animal model of depression. *Neuropeptides*, 38:311-315.
- Alonso R, Griebel G, Pavone G, Stemmelin J, le FG, Soubrie P** (2004). Blockade of CRF(1) or V(1b) receptors reverses stress-induced suppression of neurogenesis in a mouse model of depression. *Mol Psychiatry*, 9:278-86, 224.
- Appelhof BC, Huyser J, Verweij M, Brouwer JP, Van DR, Fliers E, Hoogendijk WJ, Tijssen JG, Wiersinga WM, Schene AH** (2006). Glucocorticoids and relapse of major depression (dexamethasone/corticotropin-releasing hormone test in relation to relapse of major depression). *Biol Psychiatry*, 59:696-701.
- Aston-Jones G, Smith RJ, Sartor GC, Moorman DE, Massi L, Tahsili-Fahadan P, Richardson KA** (2010). Lateral hypothalamic orexin/hypocretin neurons: A role in reward-seeking and addiction. *Brain Res*, 1314:74-90.
- Avolio E, Alo R, Carelli A, Canonaco M** (2011). Amygdalar orexinergic-GABAergic interactions regulate anxiety behaviors of the Syrian golden hamster. *Behav Brain Res*, 218:288-295.
- Brisbare-Roch C, Dingemanse J, Koberstein R, Hoever P, Aissaoui H, Flores S, Mueller C, Nayler O, van Gerven J, de Haas SL, Hess P, Qiu C, Buchmann S, Scherz M, Weller T, Fischli W, Clozel M, Jenck F** (2007). Promotion of sleep by targeting the orexin system in rats, dogs and humans. *Nat Med*, 13:150-155.
- Brundin L, Bjorkqvist M, Petersen A, Traskman-Bendz L** (2007). Reduced orexin levels in the cerebrospinal fluid of suicidal patients with major depressive disorder. *Eur Neuropsychopharmacol*, 17:573-579.
- Cao M, Guilleminault C** (2011). Hypocretin and its emerging role as a target for treatment of sleep disorders. *Curr Neurol Neurosci Rep*, 11:227-234.
- Cason AM, Smith RJ, Tahsili-Fahadan P, Moorman DE, Sartor GC, Aston-Jones G** (2010). Role of orexin/hypocretin in reward-seeking and addiction: implications for obesity. *Physiol Behav*, 100:419-428.
- Chang H, Saito T, Ohiwa N, Tateoka M, Deocaris CC, Fujikawa T, Soya H** (2007). Inhibitory effects of an orexin-2 receptor antagonist on orexin A- and stress-induced ACTH responses in conscious rats. *Neurosci Res*, 57:462-466.
- Cryan JF, Holmes A** (2005). The ascent of mouse: advances in modelling human depression and anxiety. *Nat Rev Drug Discov*, 4:775-790.
- Czeh B, Michaelis T, Watanabe T, Frahm J, de BG, van KM, Bartolomucci A, Fuchs E** (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*, 98:12796-12801.

David DJ, Samuels BA, Rainer Q, Wang JW, Marsteller D, Mendez I, Drew M, Craig DA, Guiard BP, Guilloux JP, Artymyshyn RP, Gardier AM, Gerald C, Antonijevic IA, Leonardo ED, Hen R (2009). Neurogenesis-dependent and -independent effects of fluoxetine in an animal model of anxiety/depression. *Neuron*, 62:479-493.

de Lecea L, Kilduff TS, Peyron C, Gao X, Foye PE, Danielson PE, Fukuhara C, Battenberg EL, Gautvik VT, Bartlett FS, Frankel WN, van den Pol AN, Bloom FE, Gautvik KM, Sutcliffe JG (1998). The hypocretins: hypothalamus-specific peptides with neuroexcitatory activity. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 95:322-327.

El Hage W, Powell JF, Surguladze SA (2009). Vulnerability to depression: what is the role of stress genes in gene x environment interaction? *Psychol Med*, 39:1407-1411.

Fanselow MS, Dong HW (2010). Are the dorsal and ventral hippocampus functionally distinct structures? *Neuron*, 65:7-19.

Feng P, Vurbic D, Wu Z, Hu Y, Strohl KP (2008). Changes in brain orexin levels in a rat model of depression induced by neonatal administration of clomipramine. *J Psychopharmacol*, 22:784-791.

Feng P, Vurbic D, Wu Z, Strohl KP (2007). Brain orexins and wake regulation in rats exposed to maternal deprivation. *Brain Res*, 1154:163-172.

Franklin KBJ, Paxinos G (2008) The mouse brain in stereotaxic coordinates. New York: Academic Press, Elsevier.

Furlong TM, Vianna DM, Liu L, Carrive P (2009). Hypocretin/orexin contributes to the expression of some but not all forms of stress and arousal. *Eur J Neurosci*, 30:1603-1614.

Harris GC, Wimmer M, Aston-Jones G (2005). A role for lateral hypothalamic orexin neurons in reward seeking. *Nature*, 437:556-559.

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

Holsboer-Trachsler E, Stohler R, Hatzinger M (1991). Repeated administration of the combined dexamethasone-human corticotropin releasing hormone stimulation test during treatment of depression. *Psychiatry Res*, 38:163-171.

Ising M, Horstmann S, Kloiber S, Lucae S, Binder EB, Kern N, Kunzel HE, Pfennig A, Uhr M, Holsboer F (2007). Combined dexamethasone/corticotropin releasing hormone test predicts treatment response in major depression - a potential biomarker? *Biol Psychiatry*, 62:47-54.

Ito N, Yabe T, Gamo Y, Nagai T, Oikawa T, Yamada H, Hanawa T (2008). I.c.v. administration of orexin-A induces an antidepressive-like effect through hippocampal cell proliferation. *Neuroscience*, 157:720-732.

Jiang W, Zhang Y, Xiao L, Van CJ, Ji SP, Bai G, Zhang X (2005). Cannabinoids promote embryonic and adult hippocampus neurogenesis and produce anxiolytic- and antidepressant-like effects. *J Clin Invest*, 115:3104-3116.

Johnson PL, Truitt W, Fitz SD, Minick PE, Dietrich A, Sanghani S, Traskman-Bendz L, Goddard AW, Brundin L, Shekhar A (2010). A key role for orexin in panic anxiety. *Nat Med*, 16:111-115.

Keller MC, Neale MC, Kendler KS (2007). Association of different adverse life events with distinct patterns of depressive symptoms. *Am J Psychiatry*, 164:1521-1529.

Kulkarni SK, Dhir A (2007). Effect of various classes of antidepressants in behavioral paradigms of despair. *Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry*, 31:1248-1254.

Kunugi H, Ida I, Owashi T, Kimura M, Inoue Y, Nakagawa S, Yabana T, Urushibara T, Kanai R, Aihara M, Yuuki N, Otsubo T, Oshima A, Kudo K, Inoue T, Kitaichi Y, Shirakawa O, Isogawa K, Nagayama H, Kamijima K, Nanko S, Kanba S, Higuchi T, Mikuni M (2006). Assessment of the dexamethasone/CRH test as a state-dependent marker for hypothalamic-pituitary-adrenal (HPA) axis abnormalities in major depressive episode: a Multicenter Study. *Neuropsychopharmacology*, 31:212-220.

Kurt M, Arik AC, Celik S (2000). The effects of sertraline and fluoxetine on anxiety in the elevated plus-maze test in mice. *J Basic Clin Physiol Pharmacol*, 11:173-180.

Lopez M, Tena-Sempere M, Dieguez C (2010). Cross-talk between orexins (hypocretins) and the neuroendocrine axes (hypothalamic-pituitary axes). *Front Neuroendocrinol*, 31:113-127.

Malberg JE, Eisch AJ, Nestler EJ, Duman RS (2000). Chronic antidepressant treatment increases neurogenesis in adult rat hippocampus. *J Neurosci*, 20:9104-9110.

Marcus JN, Aschkenasi CJ, Lee CE, Chemelli RM, Saper CB, Yanagisawa M, Elmquist JK (2001). Differential expression of orexin receptors 1 and 2 in the rat brain. *J Comp Neurol*, 435:6-25.

Mikrouli E, Wortwein G, Soylu R, Mathe AA, Petersen S (2011). Increased numbers of orexin/hypocretin neurons in a genetic rat depression model. *Neuropeptides*.

Mineur YS, Belzung C, Crusio WE (2007). Functional implications of decreases in neurogenesis following chronic mild stress in mice. *Neuroscience*, 150:251-259.

Mineur YS, Prasol DJ, Belzung C, Crusio WE (2003). Agonistic behavior and unpredictable chronic mild stress in mice. *Behav Genet*, 33:513-519.

Mizoguchi K, Ishige A, Aburada M, Tabira T (2003). Chronic stress attenuates glucocorticoid negative feedback: involvement of the prefrontal cortex and hippocampus. *Neuroscience*, 119:887-897.

Nestler EJ, Barrot M, DiLeone RJ, Eisch AJ, Gold SJ, Monteggia LM (2002). Neurobiology of depression. *Neuron*, 34:13-25.

Nollet M, Gaillard P, Minier F, Tanti A, Belzung C, Leman S (2011). Activation of orexin neurons in dorsomedial/perifornical hypothalamus and antidepressant reversal in a rodent model of depression. *Neuropharmacology*, 61:336-346.

Perera TD, Dwork AJ, Keegan KA, Thirumangalakudi L, Lipira CM, Joyce N, Lange C, Higley JD, Rosoklija G, Hen R, Sackeim HA, Coplan JD (2011). Necessity of hippocampal neurogenesis for the therapeutic action of antidepressants in adult nonhuman primates. *PLoS One*, 6:e17600.

Peyron C, Tighe DK, van den Pol AN, de Lecea L, Heller HC, Sutcliffe JG, Kilduff TS (1998). Neurons containing hypocretin (orexin) project to multiple neuronal systems. *J Neurosci*, 18:9996-10015.

Pham K, Nacher J, Hof PR, McEwen BS (2003). Repeated restraint stress suppresses neurogenesis and induces biphasic PSA-NCAM expression in the adult rat dentate gyrus. *Eur J Neurosci*, 17:879-886.

Sakurai T, Amemiya A, Ishii M, Matsuzaki I, Chemelli RM, Tanaka H, Williams SC, Richardson JA, Kozlowski GP, Wilson S, Arch JR, Buckingham RE, Haynes AC, Carr SA, Annan RS,

McNulty DE, Liu WS, Terrett JA, Elshourbagy NA, Bergsma DJ, Yanagisawa M (1998). Orexins and orexin receptors: a family of hypothalamic neuropeptides and G protein-coupled receptors that regulate feeding behavior. *Cell*, 92:573-585.

Sakurai T, Mieda M, Tsujino N (2010). The orexin system: roles in sleep/wake regulation. *Ann N Y Acad Sci*, 1200:149-161.

Salomon RM, Ripley B, Kennedy JS, Johnson B, Schmidt D, Zeitzer JM, Nishino S, Mignot E (2003). Diurnal variation of cerebrospinal fluid hypocretin-1 (Orexin-A) levels in control and depressed subjects. *Biol Psychiatry*, 54:96-104.

Santarelli L, Saxe M, Gross C, Surget A, Battaglia F, Dulawa S, Weisstaub N, Lee J, Duman R, Arancio O, Belzung C, Hen R (2003). Requirement of hippocampal neurogenesis for the behavioral effects of antidepressants. *Science*, 301:805-809.

Scott MM, Marcus JN, Pettersen A, Birnbaum SG, Mochizuki T, Scammell TE, Nestler EJ, Elmquist JK, Lutter M (2011). Hcrtr1 and 2 signaling differentially regulates depression-like behaviors. *Behav Brain Res*, 222:289-294.

Sibille E, Wang Y, Joeyen-Waldorf J, Gaiteri C, Surget A, Oh S, Belzung C, Tseng GC, Lewis DA (2009). A molecular signature of depression in the amygdala. *Am J Psychiatry*, 166:1011-1024.

Snyder JS, Soumier A, Brewer M, Pickel J, Cameron HA (2011). Adult hippocampal neurogenesis buffers stress responses and depressive behaviour. *Nature*, 476:458-461.

Spinazzi R, Andreis PG, Rossi GP, Nussdorfer GG (2006). Orexins in the regulation of the hypothalamic-pituitary-adrenal axis. *Pharmacol Rev*, 58:46-57.

Steru L, Chermat R, Thierry B, Simon P (1985). The tail suspension test: a new method for screening antidepressants in mice. *Psychopharmacology (Berl)*, 85:367-370.

Surget A, Saxe M, Leman S, Ibarguen-Vargas Y, Chalon S, Griebel G, Hen R, Belzung C (2008). Drug-dependent requirement of hippocampal neurogenesis in a model of depression and of antidepressant reversal. *Biol Psychiatry*, 64:293-301.

Surget A, Tanti A, Leonardo ED, Laugeray A, Rainer Q, Touma C, Palme R, Griebel G, Ibarguen-Vargas Y, Hen R, Belzung C (2011). Antidepressants recruit new neurons to improve stress response regulation. *Mol Psychiatry*, in press.

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

Suzuki M, Beuckmann CT, Shikata K, Ogura H, Sawai T (2005). Orexin-A (hypocretin-1) is possibly involved in generation of anxiety-like behavior. *Brain Res*, 1044:116-121.

Taheri S, Gardiner J, Hafizi S, Murphy K, Dakin C, Seal L, Small C, Ghatei M, Bloom S (2001). Orexin A immunoreactivity and preproorexin mRNA in the brain of Zucker and WKY rats. *Neuroreport*, 12:459-464.

Thompson JL, Borgland SL (2011). A role for hypocretin/orexin in motivation. *Behav Brain Res*, 217:446-453.

Trivedi P, Yu H, MacNeil DJ, Van der Ploeg LH, Guan XM (1998). Distribution of orexin receptor mRNA in the rat brain. *FEBS Lett*, 438:71-75.

Ulrich-Lai YM, Herman JP (2009). Neural regulation of endocrine and autonomic stress responses. *Nat Rev Neurosci*, 10:397-409.

von der Goltz C, Koopmann A, Dinter C, Richter A, Grosshans M, Fink T, Wiedemann K, Kiefer F (2011). Involvement of orexin in the regulation of stress, depression and reward in alcohol dependence. *Horm Behav*, in press.

Wang JW, David DJ, Monckton JE, Battaglia F, Hen R (2008). Chronic fluoxetine stimulates maturation and synaptic plasticity of adult-born hippocampal granule cells. *J Neurosci*, 28:1374-1384.

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

Winsky-Sommerer R, Boutrel B, de LL (2005). Stress and arousal: the corticotrophin-releasing factor/hypocretin circuitry. *Mol Neurobiol*, 32:285-294.

Winsky-Sommerer R, Yamanaka A, Diano S, Borok E, Roberts AJ, Sakurai T, Kilduff TS, Horvath TL, de LL (2004). Interaction between the corticotropin-releasing factor system and hypocretins (orexins): a novel circuit mediating stress response. *J Neurosci*, 24:11439-11448.

Supplement 1

Experimental design

Unpredictable chronic mild stress (UCMS) regimen used in this study has been previously presented in detail (Nollet *et al.*, 2011) and is a variant of chronic mild stress procedures described by Willner in rats (Willner, 1997). Briefly, mice were daily subjected to various socio-environmental low intensity stressors according to an unpredictable schedule for a total period of 9 weeks (Figure 1). UCMS-subjected mice were maintained under standard laboratory conditions but were isolated in individual cages (24 cm x 11 cm x 12 cm), while non-stressed controls (non-UCMS mice) were group-housed ($n = 4$ mice/cage) in standard laboratory cages (42 cm x 27 cm x 16 cm) with shelters and tubes. Pharmacological treatment started two weeks after the beginning of the UCMS protocol, and was always maintained until the end of the experiment. Body weight and coat state were assessed weekly as markers of the progression of the UCMS-evoked syndrome. Coat state, which represents an indirect evaluation of grooming behavior, was evaluated by examining the coat on different body parts (head, neck, dorsal area, ventral area, tail, front and hind paws, and genital area). The total score resulted from the sum of scores (0 = well-groomed, 0.5 = moderate degradation, 1 = unkempt); a high score indicates that the coat is in poor condition. Behavioral tests were performed in week 9 ($n = 14$ -19 mice/group), at least 18 hours after last treatment. To label newborn adult cells in the dentate gyrus (DG), the thymidine analogous 5-bromo-2'-deoxyuridine (BrdU, B-5002, Sigma-Aldrich) was used as it can incorporate into DNA of proliferating cells (Kuhn and Cooper-Kuhn,

2007). BrdU was dissolved in 0.9% NaCl and was administrated to mice intraperitoneally (i.p.) 4 weeks before intracardiac perfusions, at the beginning of the sixth week (4 injections of 75 mg/kg every 2 hours, during 2 days). At the end of the UCMS protocol, all mice were subjected to dexamethasone-suppression test 2 hours before being perfused. All measures were evaluated by trained experimenters blind to the treatment.

Behavioral testing

Basal locomotor activity

An actimeter was used 2 hours (afternoon, i.e. during the dark phase of the cycle), 10 hours (night, i.e. during the light phase of the cycle) and 18 hours (morning, i.e. at the beginning of the dark phase) after drug administration to assess the long-lasting effects of UCMS and pharmacological treatments on basal locomotor activity of mice in their home cage. Control animals were isolated 24 hours before the beginning of the sessions. The cage was placed in the center of the device, which consisted of a 20 x 20 cm square plane with photobeam detectors crossing the plane. The movement of the animal was automatically detected when it crossed the beam, allowing a score to be established. Locomotor activity was measured during 2 hours for each time point.

Resident-intruder test

The resident-intruder (R-I) test was performed as previously described (Nollet *et al.*, 2011) and consists of the introduction of a novel littermate (C57BL/6 male mice) in

the cage in order to measure the aggressiveness of resident mice. Non-UCMS mice were placed in individual cages 24 hours before the test, and the UCMS-mice litter was changed 24 hours before the test in order to have all animals in the same experimental conditions. The intruder was placed into the home cage of the test animal (resident) in such a way that mice were in opposite corners. The latency of the resident first attack and the number of resident attack(s) (data not shown) were measured over a 6-mins period (latency of 360 seconds for non-attacking mice). Attacking intruders were excluded, without excluding the resident. Depressive-like animals are more agonistic and likely to attack more often and sooner than non-stressed animals (Mineur *et al.*, 2003).

Tail suspension test

The procedure of the tail suspension test (TST) followed in this study was derived from the protocol previously described (Steru *et al.*, 1985). Mice were suspended by the tail (approximately 1 cm from the tip of the tail) using adhesive tape to a rod 60 cm above the floor. The trials were conducted for a period of 6 min and were video recorded. The behavioral measure was the duration of immobility, interpreted as behavioral despair. Mice were considered immobile only when they hung motionless.

Novelty-suppressed feeding test

The novelty-suppressed feeding (NSF) test used in this study has been formerly described (Surget *et al.*, 2008). It consisted of a 33 x 33 x 30 cm box whose floor was covered with 2 cm sawdust. Twelve hours before the test, mice were fasted in removing food from their cages. At the time of testing, a single pellet of food (regular

chow) was placed on a white paper positioned in the box center. Mice were placed in the corner, and the latency to manifestly chew the pellet was recorded within a 3-min period. This test induced a conflicting motivation between the drive to eat the food pellet and the fear of venturing into the arena. In addition, since drug treatments could have various effects on appetite, the feeding drive of each animal was thus assessed by returning it to their home cage immediately after the test and measuring the amount of food consumed over 5 mins. No difference was observed (data not shown).

Elevated plus maze

The elevated plus maze (EPM) consists in a plus-cross-shaped maze (27x5 cm) originating from a central platform (5x5 cm) and elevated 38.5 cm above the floor. Two opposite arms were enclosed by walls (15 cm) while two others were opened and brightly lit. Mice were placed in the center area facing one of the closed arms and their movements were tracked by video camera for 5 min. After each test, the maze was cleaned with 2.0 % ethanol and dried to prevent interference of subsequent tests by olfactory cues. The time spend in open and closed arms, as well as the number of entries to open and closed arms (data not shown), were recorded and analyzed using Ethovision XT 7.1 software (Noldus, Wageningen, The Netherlands). The time spent in the open arms is associated with a reduction of anxiety.

Immunohistochemistry

Anesthetized mice (sodium pentobarbital, 40 mg/kg, i.p.) were transcardially perfused through the heart with 80 ml of saline solution followed by 200 ml of 4% paraformaldehyde in 0.1M phosphate buffer (PB) (pH 7.4). Brains were removed, postfixed 2 hours in the same fixative, and cryoprotected in a 20% sucrose solution overnight at 4°C before being processed. Coronal sections (35 µm thickness) were cut in a cryostat (Leica CM 3050S) and divided in four series (i.e. one section every four sections per lot) allowing different immunohistochemical procedures. Neuronal activity within the PVN of the hypothalamus was analyzed in labeling the c-Fos protein. After a series of washes in 50% ethanol and 3% H₂O₂, free-floating sections were incubated at room temperature (RT) in a rabbit anti-Fos antibody (Calbiochem, PC38, 1:5000). Thirty-six hours later, sections were washed in 0.1M PB, incubated 2 hours in a biotinylated anti-rabbit IgG (1:500, Jackson ImmunoResearch,) followed by Elite avidin-biotin complex (ABC) kit (Vector Laboratories, PK-6100, 1:100) for 1 hour, and reacted with diamino-benzidine (DAB) (Sigma-Aldrich, D0426) in the presence of cobalt and H₂O₂. Sections were rinsed, mounted on gelatinized glass slides, dehydrated, cleared in Claral (Réactifs RAL) and coverslipped with Eukitt mounting medium (O. Kindler GmbH, Freiburg). In order to assess the effects of UCMS and pharmacological treatments on cell proliferation, the Ki67 protein marker was used. Immunohistochemistry was performed as above with a rabbit anti-Ki67 primary antibody (abcam, ab15580, 1:1000) and biotinylated anti-rabbit IgG (1:500, Jackson ImmunoResearch) secondary antibody. Sections were reacted with DAB without metal enhancement (Sigma-Aldrich, D4293). Just before being dehydrated, cleared and coverslipped, all sections were counterstained with cresyl violet (Santa

Cruz, SC-214775). To assess the effects of the UCMS and the pharmacological treatments on neurogenesis, we labeled immature newborn neurons with doublecortin (DCX) protein immunostaining, and mature new neurons (4-weeks old) by means of immunodetection of both the neuronal-specific nuclear protein NeuN and the marker of cell division BrdU. Free-floating sections were denatured with 2N HCl (30 min at RT) and incubated with primary antibodies for 24 hours followed by fluorochrome-labelled secondary antibodies for 2 hours at RT and then mounted on slides with Vectashield mounting medium (Vector Laboratories, H-1000). The primary antibodies used were a mouse anti-NeuN (Millipore, MAB377, 1:500), a rat anti-BrdU (Santa Cruz, SC-70441, 1:500), and a goat anti-DCX (Santa Cruz, SC-8066, 1:500). The secondary antibodies were Alexa Fluor dyes (Invitrogen) as follow: 647 nm anti-mouse (A-31571, 1:500), 488 nm anti-rat (A-21208, 1:500), and 546 nm anti-goat (A-11056, 1:500). Various negative controls were performed, omitting either the primary or the secondary antibodies.

Image analysis and cell quantification

When staining was obtained with DAB, the number of positive cells was counted using x10 and x20 objective lens with a Leica DM 2000 microscope, whereas with fluorochrome-labeled secondary antibodies, the number of positive cells was counted using a x20 and x40 objective lens with an epifluorescence microscope (Imager.Z2, Zeiss) and AxioVision software (Zeiss). Activity of hypothalamic nuclei related to HPA axis was assessed by analysis of Fos-labeled neurons in the parvocellular nuclei of the PVN whose axons are known to release CRH. The nomenclature and nuclei boundaries used were those defined by Franklin and Paxinos's mouse brain atlas

(Franklin and Paxinos, 2008). Fos-positive cells within each nucleus was counted bilaterally in every fourth sections starting from bregma -0.22 to -1.22 mm. Hippocampal cell proliferation and neurogenesis were assessed by analysis of Ki67-labeled (cell proliferation), DCX-labeled (newborn immature neurons) and BrdU/NeuN-labeled (newborn mature neurons) cells in the granular cell layer (GCL) (defined as a two-cell soma-wide zone along the base of the GCL) every fourth sections, spanning the entire hippocampus. Cell proliferation and neurogenesis were examined separately in the dorsal (bregma -0.94 to -1.58 mm), intermediate (bregma -1.70 to -3.28 mm) and ventral parts (bregma -3.40 to -3.88 mm) of the hippocampus (Franklin and Paxinos, 2008). The GCL surfaces were determined with Axiovision software from pictures obtained at x10 objective lens at corresponding levels on cresyl violet or NeuN staining to express numbers of immunoreactive cells per square millimeter of respective areas and finally per cubic millimeter by multiplying by the thickness of sections (35 μ m). All quantifications were performed by an investigator blind to stress and treatment history.

Bibliography

Franklin KBJ, Paxinos G (2008) The mouse brain in stereotaxic coordinates. New York: Academic Press, Elsevier.

Kuhn HG, Cooper-Kuhn CM (2007). Bromodeoxyuridine and the detection of neurogenesis. *Curr Pharm Biotechnol*, 8:127-131.

Mineur YS, Prasol DJ, Belzung C, Crusio WE (2003). Agonistic behavior and unpredictable chronic mild stress in mice. *Behav Genet*, 33:513-519.

Nollet M, Gaillard P, Minier F, Tanti A, Belzung C, Leman S (2011). Activation of orexin neurons in dorsomedial/perifornical hypothalamus and antidepressant reversal in a rodent model of depression. *Neuropharmacology*, 61:336-346.

Steru L, Chermat R, Thierry B, Simon P (1985). The tail suspension test: a new method for screening antidepressants in mice. *Psychopharmacology (Berl)*, 85:367-370.

Surget A, Saxe M, Leman S, Ibarguen-Vargas Y, Chalon S, Griebel G, Hen R, Belzung C (2008). Drug-dependent requirement of hippocampal neurogenesis in a model of depression and of antidepressant reversal. *Biol Psychiatry*, 64:293-301.

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

Supplement 2

Table 1. Complete multiple comparisons for coat state analysis

Mann-Whitney <i>U</i> tests (with Holm-Bonferroni correction)				
Weeks	Effects	Comparisons		<i>p</i>
1	UCMS effects	Non-UCMS/VEH	vs. UCMS/VEH	<i>p</i> < 0.001***
		Non-UCMS/FLX	vs. UCMS/FLX	<i>p</i> < 0.001***
		Non-UCMS/ALM	vs. UCMS/ALM	<i>p</i> < 0.001***
	Treatments effects in UCMS mice	UCMS/VEH	vs. UCMS/FLX	ns
		UCMS/VEH	vs. UCMS/ALM	ns
		UCMS/FLX	vs. UCMS/ALM	ns
	Treatments effects in non-UCMS mice	Non-UCMS/VEH	vs. Non-UCMS/FLX	ns
		Non-UCMS/VEH	vs. Non-UCMS/ALM	ns
		Non-UCMS/FLX	vs. Non-UCMS/ALM	ns
2	UCMS effects	Non-UCMS/VEH	vs. UCMS/VEH	<i>p</i> < 0.001***
		Non-UCMS/FLX	vs. UCMS/FLX	<i>p</i> < 0.001***
		Non-UCMS/ALM	vs. UCMS/ALM	<i>p</i> < 0.001***
	Treatments effects in UCMS mice	UCMS/VEH	vs. UCMS/FLX	ns
		UCMS/VEH	vs. UCMS/ALM	ns
		UCMS/FLX	vs. UCMS/ALM	ns
	Treatments effects in non-UCMS mice	Non-UCMS/VEH	vs. Non-UCMS/FLX	ns
		Non-UCMS/VEH	vs. Non-UCMS/ALM	ns
		Non-UCMS/FLX	vs. Non-UCMS/ALM	ns
3	UCMS effects	Non-UCMS/VEH	vs. UCMS/VEH	<i>p</i> < 0.001***
		Non-UCMS/FLX	vs. UCMS/FLX	<i>p</i> < 0.001***
		Non-UCMS/ALM	vs. UCMS/ALM	<i>p</i> < 0.001***
	Treatments effects in UCMS mice	UCMS/VEH	vs. UCMS/FLX	ns
		UCMS/VEH	vs. UCMS/ALM	ns
		UCMS/FLX	vs. UCMS/ALM	ns
	Treatments effects in non-UCMS mice	Non-UCMS/VEH	vs. Non-UCMS/FLX	ns
		Non-UCMS/VEH	vs. Non-UCMS/ALM	ns
		Non-UCMS/FLX	vs. Non-UCMS/ALM	ns
4	UCMS effects	Non-UCMS/VEH	vs. UCMS/VEH	<i>p</i> < 0.001***
		Non-UCMS/FLX	vs. UCMS/FLX	<i>p</i> < 0.001***
		Non-UCMS/ALM	vs. UCMS/ALM	<i>p</i> < 0.001***
	Treatments effects in UCMS mice	UCMS/VEH	vs. UCMS/FLX	ns
		UCMS/VEH	vs. UCMS/ALM	ns
		UCMS/FLX	vs. UCMS/ALM	ns
	Treatments effects in non-UCMS mice	Non-UCMS/VEH	vs. Non-UCMS/FLX	ns
		Non-UCMS/VEH	vs. Non-UCMS/ALM	ns
		Non-UCMS/FLX	vs. Non-UCMS/ALM	ns
5	UCMS effects	Non-UCMS/VEH	vs. UCMS/VEH	<i>p</i> < 0.001***
		Non-UCMS/FLX	vs. UCMS/FLX	<i>p</i> < 0.001***
		Non-UCMS/ALM	vs. UCMS/ALM	<i>p</i> < 0.001***
	Treatments effects in UCMS mice	UCMS/VEH	vs. UCMS/FLX	<i>p</i> < 0.001***
		UCMS/VEH	vs. UCMS/ALM	<i>p</i> < 0.01**
		UCMS/FLX	vs. UCMS/ALM	ns
	Treatments effects in non-UCMS mice	Non-UCMS/VEH	vs. Non-UCMS/FLX	ns
		Non-UCMS/VEH	vs. Non-UCMS/ALM	ns
		Non-UCMS/FLX	vs. Non-UCMS/ALM	ns

ns: non-significant

Table 1. Cont.

6	UCMS effects	Non-UCMS/VEH	vs. UCMS/VEH	$p < 0.001^{***}$
		Non-UCMS/FLX	vs. UCMS/FLX	$p < 0.001^{***}$
		Non-UCMS/ALM	vs. UCMS/ALM	$p < 0.001^{***}$
	Treatments effects in UCMS mice	UCMS/VEH	vs. UCMS/FLX	$p < 0.001^{***}$
		UCMS/VEH	vs. UCMS/ALM	$p < 0.05^*$
		UCMS/FLX	vs. UCMS/ALM	ns
	Treatments effects in non-UCMS mice	Non-UCMS/VEH	vs. Non-UCMS/FLX	ns
		Non-UCMS/VEH	vs. Non-UCMS/ALM	ns
		Non-UCMS/FLX	vs. Non-UCMS/ALM	ns
7	UCMS effects	Non-UCMS/VEH	vs. UCMS/VEH	$p < 0.001^{***}$
		Non-UCMS/FLX	vs. UCMS/FLX	$p < 0.001^{***}$
		Non-UCMS/ALM	vs. UCMS/ALM	$p < 0.001^{***}$
	Treatments effects in UCMS mice	UCMS/VEH	vs. UCMS/FLX	$p < 0.001^{***}$
		UCMS/VEH	vs. UCMS/ALM	$p < 0.001^{***}$
		UCMS/FLX	vs. UCMS/ALM	ns
	Treatments effects in non-UCMS mice	Non-UCMS/VEH	vs. Non-UCMS/FLX	ns
		Non-UCMS/VEH	vs. Non-UCMS/ALM	ns
		Non-UCMS/FLX	vs. Non-UCMS/ALM	ns
8	UCMS effects	Non-UCMS/VEH	vs. UCMS/VEH	$p < 0.001^{***}$
		Non-UCMS/FLX	vs. UCMS/FLX	ns
		Non-UCMS/ALM	vs. UCMS/ALM	$p < 0.001^{***}$
	Treatments effects in UCMS mice	UCMS/VEH	vs. UCMS/FLX	$p < 0.001^{***}$
		UCMS/VEH	vs. UCMS/ALM	$p < 0.001^{***}$
		UCMS/FLX	vs. UCMS/ALM	$p < 0.05^*$
	Treatments effects in non-UCMS mice	Non-UCMS/VEH	vs. Non-UCMS/FLX	ns
		Non-UCMS/VEH	vs. Non-UCMS/ALM	ns
		Non-UCMS/FLX	vs. Non-UCMS/ALM	ns
9	UCMS effects	Non-UCMS/VEH	vs. UCMS/VEH	$p < 0.001^{***}$
		Non-UCMS/FLX	vs. UCMS/FLX	$p < 0.001^{***}$
		Non-UCMS/ALM	vs. UCMS/ALM	$p < 0.001^{***}$
	Treatments effects in UCMS mice	UCMS/VEH	vs. UCMS/FLX	$p < 0.001^{***}$
		UCMS/VEH	vs. UCMS/ALM	$p < 0.001^{***}$
		UCMS/FLX	vs. UCMS/ALM	ns
	Treatments effects in non-UCMS mice	Non-UCMS/VEH	vs. Non-UCMS/FLX	ns
		Non-UCMS/VEH	vs. Non-UCMS/ALM	ns
		Non-UCMS/FLX	vs. Non-UCMS/ALM	ns
ns : non-significant				

Supplement 3

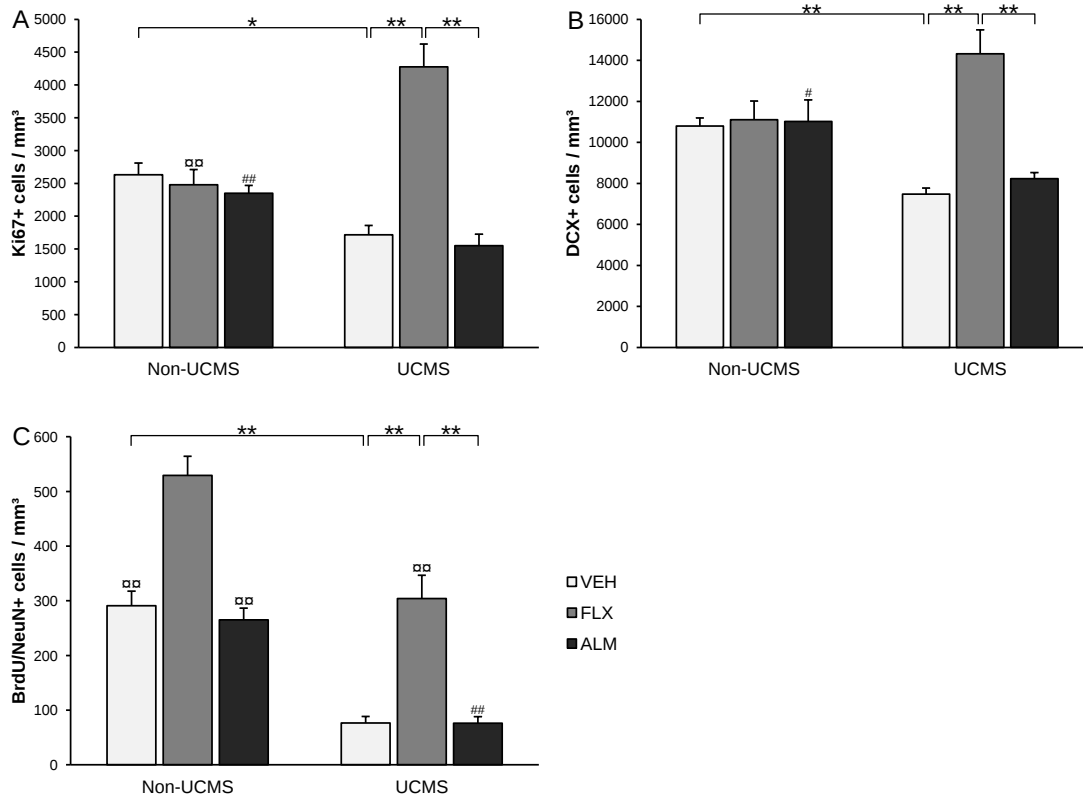


Figure 1. Effects of the unpredictable chronic mild stress (UCMS) and 7-weeks treatment with fluoxetine (FLX, 20 mg/kg/day, p.o.) or almorexant (ALM, 100 mg/kg/day, p.o.) on the cell proliferation, generation of immature and mature neurons in the intermediate part of the hippocampus assessed by the number of Ki67-, DCX- and BrdU/NeuN-positive cells per mm³ of the granule cell layer (GCL), respectively. (A) The UCMS induced a decrease of cell proliferation (non-UCMS/VEH group *versus* UCMS/VEH group, $p < 0.05$), while treatment with FLX counteract this reduction (UCMS/VEH group *versus* UCMS/FLX group, $p < 0.01$). No effect of ALM was noticed in UCMS mice (UCMS/FLX group *versus* UCMS/ALM group, $p < 0.01$). Furthermore, significant differences were observed between non-UCMS/FLX *versus* UCMS/FLX groups (□□ $p < 0.01$) and between non-UCMS/ALM *versus* UCMS/ALM groups (## $p < 0.01$). (B) The UCMS induced a decrease of immature neurons genesis (non-UCMS/VEH group *versus* UCMS/VEH group, $p < 0.01$), while treatment with FLX counteract this reduction (UCMS/VEH group *versus* UCMS/FLX group, $p < 0.01$) without effect of ALM in UCMS mice (UCMS/FLX group *versus* UCMS/ALM group, $p < 0.01$). A significant difference was also seen between non-UCMS/ALM group *versus* UCMS/ALM group (# $p < 0.05$). (C) The UCMS decreased the amount of mature neurons (non-UCMS/VEH group *versus* UCMS/VEH group, $p < 0.01$), whereas FLX treatment reversed this alteration (UCMS/VEH group *versus* UCMS/FLX group, $p < 0.01$). No effect of ALM was observed (UCMS/FLX group *versus* UCMS/ALM group, $p < 0.01$). FLX increased the proportion of mature neurons in non-UCMS mice (non-UCMS/FLX group *versus* □□ non-UCMS/VEH or □□ non-UCMS/ALM or □□ UCMS/FLX groups, $p < 0.01$). A significant difference was also seen between non-UCMS/ALM group *versus* UCMS/ALM group (## $p < 0.01$). Data represent mean $\pm$ SEM; one symbol $p < 0.05$, two symbols $p < 0.01$, three symbols $p < 0.001$; $n = 14-19$ mice/group.

DISCUSSION

L'objectif de ce travail était de contribuer à la compréhension de la physiopathologie de la dépression majeure en étudiant l'implication fonctionnelle du système orexinergique à travers l'utilisation d'un modèle animal de dépression, le stress chronique imprédictible modéré. Jusqu'à présent, les travaux cliniques ou précliniques ayant essayé d'éclaircir ce rôle s'étaient heurtés à des résultats souvent contradictoires, tantôt démontrant une augmentation de l'activité du système orexinergique dans les états dépressifs, tantôt le contraire (*cf.* Introduction § 3).

Ces données divergentes peuvent s'expliquer de diverses manières. Concernant les recherches cliniques, le principal outil de mesure utilisé est le prélèvement du liquide céphalo-rachidien (LCR) au niveau lombaire afin de doser l'OX-A. En plus du relatif éloignement de la zone de prélèvement par rapport au site de libération, la présence d'OX-A au sein du LCR n'est qu'une mesure indirecte de l'activité orexinergique et n'est pas nécessairement le reflet exact de l'activité centrale des neurones à orexines. De par la grande hétérogénéité clinique qui caractérise la dépression majeure, il est également souvent difficile, avec un nombre restreint de patients, de tirer des conclusions totalement fiables quant aux corrélats biologiques susceptibles de sous-tendre une partie des symptômes, d'autant plus que la présence de troubles du sommeil chez les patients dépressifs testés est rarement documentée. Quant aux données précliniques, la difficulté d'obtenir des résultats cohérents concernant la dépression majeure tient souvent au choix du modèle animal. Lorsque l'on veut étudier un phénomène pouvant participer à l'étiopathogenèse du trouble dépressif, beaucoup de paradigmes expérimentaux n'offrent pas les bases étiologiques nécessaires à l'obtention de résultats fiables. C'est pour cette raison que nous avons choisi d'utiliser le stress chronique imprédictible modéré, sans doute le meilleur modèle pour étudier les caractéristiques physiopathogéniques de la dépression majeure. Enfin, les différences observées dans les profils d'activation du système orexinergique des données cliniques et précliniques peuvent être mises en parallèle avec divers types de syndromes dépressifs que l'on peut observer et les différences parfois spectaculaires qui les caractérisent, comme par exemple le dysfonctionnement de l'axe HPA dans la dépression mélancolique et atypique.

1. Caractérisation de l'activation du système orexinergique lors d'un état dépressif-*like* chez la souris

La première étude de cette thèse s'est attachée à mettre en évidence les potentielles altérations du système orexinergique, dans notre modèle animal de dépression, en analysant l'activation des neurones à orexines et l'expression des récepteurs à orexines dans plusieurs structures cibles lors d'un état dépressif-*like* induit par l'UCMS. Nous avons également analysé l'effet sur le système orexinergique d'un traitement chronique avec un antidépresseur inhibiteur de recapture sélectif de sérotonine (IRSS), la fluoxétine. Nous avons enfin réalisé un test pharmacologique à l'aide d'un bio-essai d'un antagoniste des deux récepteurs orexinergiques, l'almorexant.

Ce premier travail nous a permis de mettre en évidence que l'état dépressif-*like* induit par l'UCMS, et confirmé par les tests comportementaux, était associé à une augmentation de l'activité des neurones à orexines, mesurée grâce à l'expression de la protéine Fos, dans la zone dorsomédiale et périfornicale de l'hypothalamus (DMH-PFA). Ce résultat, en plus d'apporter un premier éclaircissement quant aux précédentes données de la littérature alternant entre hypoactivité et hyperactivité du système orexinergique dans les états dépressifs, s'avère être en cohérence avec plusieurs autres études portant sur les spécificités de l'hypothalamus dorsomédial (DMH). En effet, cette région hypothalamique est particulièrement impliquée dans la coordination des réponses neuroendocrines, autonomes et comportementales de la composante émotionnelle du stress, en activant l'axe HPA au travers de ses projection excitatrices vers le PVN, et en régulant le système cardiovasculaire par l'intermédiaire de l'innervation sympathique du tronc cérébral, participant ainsi à l'augmentation de l'état de vigilance de l'animal (DiMicco *et al.*, 2002 ; Fontes *et al.*, 2011). De fait, lorsqu'un animal ou un individu se trouve dans une situation jugée dangereuse, le DMH joue un rôle clef dans l'établissement d'une réaction de défense, principalement caractérisée par une augmentation du rythme cardiaque, de la fréquence respiratoire et de l'anxiété (Shekhar *et al.*, 2002 ; Nascimento *et al.*, 2010 ; Fontes *et al.*, 2011). En accord avec ces dernières données, il a récemment été montré que les neurones à orexines dans le DMH-PFA étaient particulièrement sollicités lors d'une attaque de panique (Johnson *et al.*, 2010) et participe, d'une part, à la régulation de l'axe

HPA (*cf.* Introduction § 2.3.2), et d'autre part joue un rôle dans le contrôle du système cardiovasculaire (Samson *et al.*, 2005) et de la respiration (Kuwaki, 2010). Comme nous avons pu le décrire précédemment, la dépression majeure est en général caractérisée par un stress excessif, des comportements de type anxieux et des troubles cardiovasculaires. Les résultats de notre étude, qui démontrent une forte activation des neurones à orexines situés dans les parties dorsomédiale et périfornicale (DMH-PFA) de l'hypothalamus, renforcent donc l'idée du lien probable entre l'activation du système orexinergique et les altérations physiologiques et comportementales observées dans la dépression majeure.

De plus, la dépression est souvent dominée par des troubles anhédoniques, sous-tendus par la perturbation de différents systèmes de neurotransmission au sein de structures clefs comme l'aire tegmentale ventrale, le noyau accumbens ou le putamen (*cf.* Introduction § 1.4.3). Nos résultats concernant l'activité orexinergique lors d'un état dépressif-*like* dans le DMH-PFA, mais également l'absence d'activation dans la partie latérale de l'hypothalamus (LH), soutiennent cette assertion. En effet, les neurones orexinergiques du LH sont connus pour être fortement impliqués dans la régulation du système de récompense (Harris et Aston-Jones, 2006 ; Aston-Jones *et al.*, 2010), contrairement aux neurones orexinergiques localisés dans le DMH-PFA. Nos résultats ont montré que les neurones du LH ne présentaient que très peu d'activation suite au protocole d'UCMS. Or de précédentes recherches ont montré qu'après une phase d'extinction d'un comportement actif de recherche de substance hédonique, le DMH permettait d'inhiber et de prévenir la réapparition d'un comportement lié à l'addiction (Marchant *et al.*, 2010), alors que le LH était nécessaire pour la récupération de ce comportement (Marchant *et al.*, 2009). Il semblerait donc que l'activation du DMH soit davantage liée à des réponses anhédoniques, alors que l'activation du LH sous-tendrait la composante hédonique (Aston-Jones *et al.*, 2010). Ces données sont en adéquation avec ce que nous avons pu observer dans cette première étude, puisqu'une suractivation des neurones à orexines du DMH-PFA participerait à la fois aux réponses physiologiques et comportementales du stress et à l'inhibition de la réponse hédonique, alors que l'absence d'activation des neurones du LH sous-tendrait la présence d'anhédonie dans les états dépressifs-*like*. A l'instar de l'activation des neurones orexinergiques du DMH-PFA, l'absence d'activité de ceux du LH pourrait donc aussi être une caractéristique de la physiopathogénie de la dépression, et participer à expliquer le symptôme d'anhédonie. Il sera néanmoins nécessaire d'étayer cette hypothèse par des études ciblant cette population de neurones.

Nous avons également pu mettre en évidence que le traitement chronique avec un antidépresseur IRSS classique, la fluoxétine, permettait de contrecarrer les effets néfastes du stress chronique sur le comportement et sur le système orexinergique, en diminuant l'activation des neurones orexinergiques, la ramenant à des niveaux proches des animaux contrôles. Comme nous l'avons décrit dans l'introduction de cette thèse, la sérotonine est capable d'inhiber les neurones à orexines au travers des récepteurs 5-HT_{1A} (Muraki *et al.*, 2004 ; Kumar *et al.*, 2007), et le traitement chronique à la fluoxétine pourrait ainsi contribuer à la diminution de l'activation orexinergique. Cependant, on peut penser que cette réduction d'activation n'est pas uniquement due à l'augmentation de la neurotransmission sérotoninergique, puisque cette réduction ne s'observe que chez les individus ayant été soumis au protocole d'UCMS. En revanche, en l'état, il est difficile de savoir si la normalisation de l'activité des neurones orexinergiques engendrée par le traitement antidépresseur précède ou suit l'amélioration de l'état général de l'animal. Des études complémentaires sont ici nécessaires pour mieux discerner l'interaction des neurotransmissions sérotoninergique et orexinergique dans la dépression.

Une analyse de l'expression des récepteurs à orexines a également permis de mettre en évidence que le stress chronique induit une diminution de l'expression des récepteurs OX2 dans l'hippocampe ventral, le thalamus et l'hypothalamus. Dans ces deux dernières structures, le traitement chronique à la fluoxétine a rétabli l'expression normale des récepteurs OX2. Bien que l'implication différentielle des récepteurs à orexines dans la dépression majeure soit encore très mal connue, il semblerait cependant que le blocage spécifique des récepteurs OX1 et des récepteurs OX2 induise respectivement un effet antidépresseur-*like* et dépressif-*like* comme cela a été montré à l'aide de modèles génétiques chez la souris (Scott *et al.*, 2011). Donc si le blocage de la neurotransmission orexinergique au travers des récepteurs OX2 induit un état dépressif, nos résultats permettent de renforcer davantage le rôle clef de ces récepteurs dans les mécanismes physiopathogéniques de la dépression. Cette dernière idée est de plus corroborée par la mise en évidence d'une diminution de l'expression des récepteurs OX2 dans l'hippocampe ventral, qui est particulièrement impliqué dans la régulation des émotions (Fanselow et Dong, 2010). Enfin, le fait que le blocage des récepteurs OX1 soit associé à un effet antidépresseur-*like* pourrait expliquer l'absence de modification de l'expression de ceux-ci que nous avons observée lors d'un état dépressif-*like*.

Nous avons également mis en évidence que les souris soumises à l'UCMS et traitées avec la fluoxétine présentaient une augmentation de l'expression des récepteurs OX2 au niveau du cortex préfrontal. Même si d'autres investigations seront nécessaires pour comprendre ce phénomène, plusieurs études ont montré que l'OX-A, la sérotonine mais également la fluoxétine étaient capable de réguler les neurones pyramidaux et les interneurons GABAergiques et glutamatergiques du cortex préfrontal (Xia *et al.*, 2005 ; Song *et al.*, 2006 ; Liu et Aghajanian, 2008 ; Li *et al.*, 2010 ; Andrade, 2011 ; Zhong et Yan, 2011) dont l'implication dans les états dépressifs est maintenant clairement documentée (Drevets *et al.*, 2008).

En revanche, les données que nous avons recueillies concernant le système MCH-ergique ne nous ont pas permis de mettre en évidence son implication dans un état dépressif-like, ce que semble corroborer d'autres études soulignant que la MCH serait davantage impliquée dans les mécanismes sous-tendant les comportements anxieux plutôt que dans les comportements dépressifs-like (David *et al.*, 2007 ; Mikrouli *et al.*, 2011).

Nous avons enfin démontré, dans le test de suspension par la queue, que seule l'injection chronique d'un antagoniste des deux récepteurs à orexines, l'almorexant, avait un effet antidépresseur-like. Ce paradigme comportemental est couramment utilisé pour tester les effets potentiellement antidépresseurs de substances pharmacologiques. L'absence de résultat suite à l'injection aiguë de l'almorexant souligne un mécanisme d'action différent de celui des antidépresseurs monoaminergiques, et qui pourrait s'expliquer par les spécificités des systèmes neuropeptidergiques comme nous le verrons plus loin dans cette discussion générale. Malgré les limites inhérentes à ce type de bio-essai (*cf.* Introduction § 1.6.2.2), et bien que testé sur des souris non soumises à l'UCMS, ce résultat pilote a conforté le lien entre le système orexinergique et la dépression, ouvrant la voie à de futurs travaux sur les liens entre orexines et dépression.

2. Etude de l'effet de la privation partielle de sommeil sur le système orexinergique lors d'un état dépressif-like chez la souris

Dans notre deuxième étude, nous avons partiellement privé de sommeil une partie des souris soumises ou non à un protocole d'UCMS, et traitées ou non de manière chronique avec la fluoxétine, afin d'étudier l'activation orexinergique dans ces différentes conditions expérimentales. Cette étude avait pour objectif de mieux caractériser les effets de la perturbation du sommeil sur le système orexinergique dans un état dépressif-like.

Dans un premier temps, nous avons confirmé que l'état dépressif-like était associé à une augmentation de l'activation du système orexinergique dans le DMH-PFA, qui était contrecarré par un traitement chronique à la fluoxétine. Cependant, cette activation s'est avérée beaucoup moins importante que lors de notre première étude, ce qui pourrait s'expliquer par la différence de période du cycle nycthémeral au cours de laquelle nous avons réalisé nos analyses. En effet, dans notre première expérimentation, nous nous étions intéressés à l'activation des neurones orexinergiques correspondant au début de la période de veille, or les données obtenues ici coïncident à la fin de la phase inactive des animaux, pendant laquelle ils se reposent principalement, et durant laquelle l'activation du système orexinergique est à son plus bas niveau (Estabrooke *et al.*, 2001 ; Modirrousta *et al.*, 2005).

Les données obtenues suite aux privations partielles de sommeil nous ont permis de confirmer la dichotomie fonctionnelle existante entre les neurones orexinergiques du LH et du DMH-PFA, ainsi que d'émettre de nouvelles hypothèses de travail. En tout premier lieu, nos travaux ont confirmé que, chez les souris non stressées, seul le DMH-PFA était sollicité lors de la privation partielle de sommeil, corroborant l'implication de cette zone dans la régulation du sommeil et de l'état de veille (Harris et Aston-Jones, 2006). En revanche, chez les souris stressées, l'augmentation de l'activité orexinergique suite aux privations partielles de sommeil a concerné à la fois le DMH-PFA et le LH et semble être potentialisée par les effets du stress chronique. Cela suggère que le stress chronique a pu induire une sensibilisation du système orexinergique, qui de fait a réagi de manière plus importante aux privations partielles de sommeil. De plus, l'effet de cette privation sur le LH, spécifiquement observé chez les animaux soumis à l'UCMS,

pourrait être considéré comme bénéfique puisqu'elle participerait à activer plus fortement le système de récompense chez des animaux dépressifs-*like*. Cette hypothèse est soutenue par le fait que des privations totales de sommeil paradoxal engendrent une augmentation de la motivation à consommer du sucre chez le rat (Andersen *et al.*, 2009). En extrapolant, ce phénomène pourrait donc s'insérer dans le mécanisme thérapeutique de la privation de sommeil observé chez les individus dépressifs, bien que d'autres analyses soient indispensables pour consolider cette hypothèse.

Il est également intéressant de noter que, au sein du DMH-PFA, l'activation des neurones orexinergiques des animaux soumis à l'UCMS non privés de sommeil correspondait à celle observée chez les animaux contrôles mais privés partiellement de sommeil, ce qui peut suggérer que, même modestement, cette augmentation de l'activité orexinergique pourrait participer aux troubles du sommeil observés dans la dépression majeure. Mais les limites méthodologiques liées à l'utilisation de l'expression de la protéine Fos comme marqueur de l'activation neuronale, ainsi que l'absence de données électrophysiologiques sur la présence ou non de troubles du sommeil dans le modèle animal de dépression utilisé dans notre étude, ne permettent pas de tirer de conclusions claires et objectives quant aux liens entre activation du système orexinergique et troubles du sommeil associés à la dépression.

De manière générale, le traitement chronique préalable avec la fluoxétine a bloqué l'effet de l'UCMS et des privations partielles de sommeil sur l'activation du système orexinergique. Si cet effet pourrait être attribué à augmentation de la neurotransmission sérotoninergique qui inhiberait les neurones à orexines, il pourrait aussi être dû chez les souris soumises à l'UCMS à une amélioration générale de l'état dépressif-*like*, comme nous l'avons suggéré dans notre première étude.

En conclusion, une des principales limites de cette étude est qu'actuellement, bien qu'il soit possible de dire que notre dispositif de privation de sommeil ait été en mesure de perturber durablement le repos des animaux en fragmentant leur sommeil, on ne peut pas qualitativement démontrer cet effet. Pour y remédier, il faudra envisager des études complémentaires, en particulier en y associant des mesures électroencéphalographiques pour caractériser précisément ces privations partielles de sommeil. Des études d'enregistrements d'indices électrophysiologiques par radiotélémétrie sont actuellement en développement au laboratoire.

3. Implication fonctionnelle du système orexinergique dans un état dépressif-*like* chez la souris

Dans notre dernière étude, nous avons tenté de mieux comprendre comment les orexines pouvaient participer aux dysfonctionnements physiologiques et comportementaux associés à la dépression. Pour cela, nous avons analysé les effets de l'inhibition chronique de la neurotransmission orexinergique, à l'aide d'un antagoniste des deux récepteurs à orexines (l'almorexant), dans l'UCMS. L'almorexant, développé par Actelion Pharmaceuticals pour lutter contre l'insomnie, antagonise de manière compétitive et transitoire le récepteur OX1, et de manière non compétitive et durable le récepteur OX2 (Malherbe *et al.*, 2009).

Nos résultats ont clairement confirmé que le blocage chronique du système orexinergique avait un effet antidépresseur-*like* et anxiolytique dans plusieurs tests comportementaux, au même titre que la fluoxétine. Ces données permettent d'asseoir l'importance de la neurotransmission orexinergique dans la physiopathogénie de la dépression majeure, puisque celle-ci s'avère capable de réguler l'ensemble des perturbations engendrées par le protocole d'UCMS qui ont été mesurées dans notre étude (à l'exception du test d'hyponéophagie induite par la nouveauté). Nos résultats comportementaux ont permis également de confirmer que l'augmentation de l'activation des neurones à orexines, observée dans nos études précédentes en réponse à l'UCMS, constitue un trait pathogénique de l'état dépressif-*like*.

Au-delà de l'aspect comportemental, les résultats obtenus grâce à cette expérimentation permettent d'entrevoir la manière dont l'antagonisme du système orexinergique induit ses effets antidépresseurs-*like*. En effet, le blocage chronique du système orexinergique a permis de contrecarrer le dysfonctionnement de l'axe HPA induit par le stress chronique. Le mécanisme d'action de l'antagoniste orexinergique sur l'axe HPA peut s'interpréter comme suit. Comme nous l'avons vu précédemment, les orexines activent l'axe HPA en induisant la libération de CRH (*cf.* Introduction § 2.3.2). Ainsi, l'action thérapeutique de l'antagoniste orexinergique pourrait donc passer par l'inhibition chronique de l'axe du stress, et en particulier par une moindre activation des neurones du PVN libérant la CRH. Dans ce cas, lors d'un état dépressif, l'hyperactivité orexinergique participerait directement à entretenir les symptômes de la dépression en activant l'axe HPA de

manière excessive. Les effets des orexines sur l'axe du stress pourraient être modulés par les récepteurs OX2, que l'on sait très présents au niveau du PVN (Trivedi *et al.*, 1998 ; Marcus *et al.*, 2001), et qui sont fortement et durablement antagonisés par l'almorexant (Malherbe *et al.*, 2009). Cependant, cette hypothèse ne rend pas totalement compte du fait que la diminution des récepteurs OX2 induise un état dépressif-like (Scott *et al.*, 2011). Des études complémentaires sont donc nécessaires pour comprendre de quelle manière le système orexinergique régule précisément l'axe du stress, en prenant en compte particulièrement la présence des récepteurs OX1 dans le PVN (Hervieu *et al.*, 2001).

Puisque la neurogenèse hippocampique est une composante déterminante de l'effet thérapeutique des antidépresseurs monoaminergiques classiques (Santarelli *et al.*, 2003 ; Surget *et al.*, 2008 ; Surget *et al.*, 2011), nous avons cherché à savoir si l'effet bénéfique du blocage de la neurotransmission orexinergique par l'almorexant avait un lien direct avec une action sur la neurogenèse hippocampique. Nous avons pu constater que, non seulement l'antagoniste orexinergique n'induisait pas d'augmentation de la prolifération cellulaire et de la neurogenèse dans l'hippocampe que le stress chronique avait été capable de supprimer, mais aussi que le blocage du système orexinergique seul provoquait une diminution du nombre de nouvelles cellules et de nouveaux neurones dans la partie ventrale de l'hippocampe, zone qui est particulièrement liée au traitement de l'information à caractère émotionnel (Fanselow et Dong, 2010). Ces données nous ont permis de mettre en évidence que, contrairement à la fluoxétine (Surget *et al.*, 2011), la neurogenèse hippocampique n'était pas nécessaire au rétablissement du fonctionnement de l'axe de stress induit par l'injection chronique de l'almorexant. Ces résultats semblent faire écho aux effets antidépresseurs-like des antagonistes CRH1 et V1B qui ne nécessitent pas non plus de rétablissement de la neurogenèse pour exercer leur action thérapeutique (Surget *et al.*, 2008). On connaît encore très peu les liens directs ou indirects qui peuvent exister entre le système orexinergique et l'hippocampe, et l'effet de l'almorexant sur la diminution de la neurogenèse de l'hippocampe ventral est à préciser par d'autres études. Néanmoins, de par la spécificité neuroanatomique et fonctionnelle de l'hippocampe ventral (Fanselow et Dong, 2010), cela renforce une fois encore le lien entre système orexinergique et régulation des émotions.

4. Intérêts des systèmes neuropeptidergiques

Pour mieux comprendre l'importance des orexines dans le contexte des troubles dépressifs, il est nécessaire de se pencher sur les spécificités des systèmes de neurotransmission peptidergique. L'équipe de Gareth Leng, de l'Université d'Edimbourg, a beaucoup travaillé sur la manière dont les neurones peptidergiques pouvaient communiquer, et par conséquent sur la différence fondamentale entre les neurotransmetteurs « classiques » et les neuropeptides (Ludwig et Leng, 2006). Ces derniers sont en effet plus d'une centaine, avec des propriétés physiologiques et comportementales très diverses, et sont exprimés par des sous-ensembles de neurones dans l'ensemble du cerveau (Hokfelt *et al.*, 2000), en particulier dans l'hypothalamus où de nombreuses petites populations de neurones peptidergiques possèdent des phénotypes fonctionnels et biochimiques bien distincts.

Les neurotransmetteurs (comme le GABA ou le glutamate) sont stockés dans les neurones au niveau présynaptique dans de nombreuses petites vésicules, et libérés très localement dans la synapse. Avec une demi-vie d'environ 5 ms, ils vont être rapidement dégradés ou recapturés dans l'élément présynaptique, ce qui en minimise la dispersion. Ce mécanisme d'action confère aux neurotransmetteurs « classiques » une spécificité temporelle et spatiale restreinte au sein de la synapse.

Les neuropeptides, quant à eux, sont stockés dans des vésicules plus larges et moins nombreuses. Leur demi-vie est plus longue que celle des neurotransmetteurs. Par exemple, la demi-vie de l'ocytocine et de la vasopressine est de l'ordre de 20 minutes dans le cerveau et de 2 minutes dans le sang (Mens *et al.*, 1983). Concernant les orexines, l'injection intracérébroventriculaire d'OX-A entraîne l'augmentation du niveau d'OX-A dans le liquide céphalo-rachidien pendant 4 heures (Yoshida *et al.*, 2003), suggérant une libération très soutenue capable à la fois d'exercer des effets centraux sur une longue durée, et d'atteindre des cibles périphériques distantes par l'intermédiaire du système circulatoire.

De plus, des travaux ont montré que la libération des neuropeptides n'était pas restreinte à la terminaison axonale, et que les dendrites pouvaient aussi sécréter des peptides (Ludwig et Pittman, 2003). La libération dendritique de peptides ou de co-neurotransmetteurs permettrait de réguler le fonctionnement de la cellule d'origine (Ludwig et Leng, 1997 ; Gouzenes *et al.*, 1998). Les neurones à orexines co-expriment les dynorphines et le glutamate (Chou *et al.*, 2001 ; Crocker *et al.*, 2005), et si l'on ne connaît pas encore les possibles mécanismes de libération dendritique des neurones à orexines, différents travaux

suggèrent l'existence de tels phénomènes de sécrétion dendritique. Dans ce contexte, il a récemment été montré que les orexines pouvaient directement activer les neurones orexinergiques au travers des récepteurs 2 (Yamanaka *et al.*, 2010), ou indirectement grâce à la libération présynaptique de glutamate (Li *et al.*, 2002). Cette potentielle libération dendritique des orexines pourrait donc être essentielle pour la régulation de nombreux effets physiologiques et comportementaux.

En plus de leur rôle dans la communication neuronale et cellulaire, les neuropeptides sont en mesure d'influer sur leur propre libération pour la potentialiser. En effet, les neuropeptides sont capables de préparer les vésicules synaptiques pour une libération activité-dépendante par un phénomène d'amorçage (Ludwig et Leng, 2006). De plus, certains neuropeptides sont capables de réorganiser fonctionnellement le réseau neuronal ciblé en fournissant le substrat pour l'établissement de contacts prolongés en régulant la synaptogenèse et les cellules gliales (Ludwig et Leng, 2006).

Il apparaît donc que les peptides, contrairement aux neurotransmetteurs classiques, permettent la communication entre des populations de cellules qui peuvent être éloignées avec peu de précision temporelle et spatiale. Les neuropeptides peuvent donc agir à grande échelle, à la fois au sein du système nerveux central, mais également en périphérie, en ayant toutefois des effets physiologiques et comportementaux très subtils et soutenus au cours du temps. Pour preuve, l'injection périphérique ou centrale d'OX-A, sans spécificité spatiale ou temporelle, peut avoir des conséquences fonctionnelles et comportementales cohérentes et durables, comme l'augmentation de la vigilance, de la prise alimentaire ou de l'anxiété (Suzuki *et al.*, 2005 ; Sakurai, 2007 ; Avolio *et al.*, 2011). De fait, dans le cadre de la dépression majeure, la possibilité de pouvoir réguler simplement et de manière précise certains systèmes neuronaux, par l'intermédiaire de neuromodulateurs orexinergiques, pourrait offrir de nombreux avantages par rapports aux antidépresseurs classiques qui augmentent de manière générale, dans tout le système nerveux, la neurotransmission monoaminergique. Ce dernier point pose d'ailleurs certains problèmes, puisque les antidépresseurs actuellement utilisés sont pourvus de nombreux effets secondaires tels que des maux de tête, des nausées, une nervosité, des insomnies, des difficultés sexuelles, une prise de poids ou un risque plus élevé de diabète.

5. Conclusion

L'« hypothèse orexinergique » de la dépression développée dans cette thèse s'inscrit donc parfaitement dans ce que l'on connaît à présent de l'étiologie des troubles dépressifs (Belmaker et Agam, 2008). Dans ce cadre général, la neurogenèse hippocampique serait davantage un facteur de vulnérabilité, puisque son absence *per se* n'induit pas de symptômes dépressifs. En particulier, la neurogénèse hippocampique participe, sous l'action des antidépresseurs classiques, au rétablissement fonctionnel du rétrocontrôle de l'axe HPA (Surget *et al.*, 2011). Par ailleurs, de nombreuses recherches se focalisent actuellement sur le rôle exact des néoneurones de l'hippocampe et du bulbe olfactif, et propose que cette neurogenèse serait essentielle pour « le pattern de séparation », c'est-à-dire la capacité à discriminer les différences fines entre deux stimuli quasiment identiques (Sahay *et al.*, 2011a). Concrètement, l'absence de neurogenèse hippocampique peut altérer le pattern de séparation, et pourrait induire, dans un contexte dépressif, des difficultés d'interprétation des stimuli environnementaux ambigus ainsi que des tendances à surgénéraliser ses souvenirs (c'est-à-dire se rappeler préférentiellement des souvenirs portant sur des événements répétés ou étendus), deux aspects qui sont très liés à la dépression majeure (Sahay *et al.*, 2011b). Concernant la théorie monoaminergique de la dépression, la diminution de la neurotransmission sérotoninergique et noradrénergique ne ferait que soutenir la suractivation des neurones à orexines, puisque ces monoamines inhibent le système orexinergique (Yamanaka *et al.*, 2003b ; Muraki *et al.*, 2004 ; Sakurai *et al.*, 2005 ; Yamanaka *et al.*, 2006), sans que l'augmentation de la libération d'orexines ne soit suffisante pour induire un accroissement de la sécrétion monoaminergique. Enfin, l'activation soutenue du système orexinergique pourrait sous-tendre l'hyperactivité de l'axe HPA, en premier lieu par l'activation directe du PVN et de la libération de CRH, mais également par la libération de l'OX-A dans le système circulatoire qui pourrait engendrer la libération excessive d'ACTH et de glucocorticoïdes (*cf.* § 2.3.2).

Avec une telle implication dans les mécanismes qui sous-tendent l'apparition des troubles dépressifs, il est plus aisé de comprendre de quelle manière le blocage de la neurotransmission orexinergique est capable de rétablir l'équilibre homéostatique perturbé dans les états dépressifs. De plus, nos données permettent de mettre en lumière les possibles liens entre la suractivation spécifique du système orexinergique dans le DMH-PFA et certains troubles associés aux états

dépressifs comme les perturbations du sommeil ou les troubles anhédoniques.

L'ensemble de ces résultats nous permettent donc d'affirmer qu'une hyperactivité du système orexinergique fait entièrement partie de la physiopathogénie de la dépression. Cependant, la libération des orexines varie au cours du cycle circadien, et même si une étude a montré que le pattern de variation circadienne des niveaux d'OX-A était le même chez les dépressifs et les individus sains (Salomon *et al.*, 2003), il se peut que la libération des orexines lors d'un état dépressif ne soit plus en phase avec ce qui est normalement attendu pour un peptide promoteur d'éveil (Estabrooke *et al.*, 2001 ; Yoshida *et al.*, 2001). Trop d'activation durant la période de sommeil et trop peu d'activation durant la période de veille pourrait peut-être expliquer la fatigue observée chez les dépressifs, leur hypovigilance durant la journée, et leur difficulté d'endormissement. Nous n'avons mesuré l'activation orexinergique qu'à la fin de la période de sommeil ou au début de la période d'éveil, et d'autres données seraient nécessaires pour mieux cerner le profil de libération circadienne des orexines dans les états dépressifs.

6. Perspectives

Le travail de thèse ici présenté avait pour objectif principal d'étudier l'implication fonctionnelle du système orexinergique dans la physiopathogénie de la dépression majeure, à l'aide d'un modèle animal de dépression, le stress chronique imprédictible modéré. Nos travaux ont été initiés suite aux premières études mettant en lien orexines et dépression, au moment où d'autres équipes entamaient également des recherches sur ce sujet. Durant les quatre dernières années, le nombre de publications concernant le rôle des orexines dans la dépression n'a fait que croître de manière presque exponentielle, suggérant l'intérêt grandissant des chercheurs pour l'étude des systèmes peptidergiques dans les troubles psychiatriques (Belzung *et al.*, 2006), un peu au détriment des cibles classiques que sont les monoamines.

De nombreuses questions restent cependant en suspens, auxquelles de futurs travaux devront tenter d'apporter des réponses. D'une part, il sera nécessaire de déterminer si l'élévation seule de la neurotransmission orexinergique dans le cadre de la dépression peut favoriser l'apparition d'anomalies de l'axe HPA, de la neurotransmission monoaminergique ou du sommeil. D'autre part, il

faudra poursuivre les investigations quant aux effets antidépresseurs-*like* du blocage de la neurotransmission orexinergique.

Pour y parvenir, compte-tenu des récentes avancées sur la différence fonctionnelle des récepteurs orexinergiques, l'étude du rôle exact de ces derniers est un élément clef qui nous permettra de mieux comprendre la réelle implication de la neurotransmission orexinergique dans les états dépressifs. Pour ce faire, l'utilisation d'antagonistes spécifiques des récepteurs OX1 et OX2, ainsi que l'utilisation de souris *knock-out* pour l'un des deux récepteurs, pourrait s'avérer très utile.

La vérification du réel impact d'un dysfonctionnement orexinergique sur l'axe HPA dans les états dépressifs pourrait être par exemple réalisée par l'intermédiaire d'injections ciblées d'antagonistes spécifiques des récepteurs à orexines directement dans le PVN, ou par l'étude de la réactivité de l'axe HPA suite à l'injection de dexaméthasone chez des souris *knock-out* pour l'un ou l'autre des récepteurs orexinergiques.

De par les liens qui existent entre le système orexinergique et les centres de libération des monoamines, il serait opportun de mieux caractériser ces interactions dans le cadre de la dépression, et de vérifier si l'effet antidépresseur-*like* du blocage de la neurotransmission orexinergique est dépendant du rétablissement de la libération de monoamines. Pour cela, il serait possible de déterminer si l'inhibition génétique ou pharmacologique d'un type de récepteur induit des changements électrophysiologiques au niveau des neurones sérotoninergiques du noyau du raphé dorsal, des neurones noradrénergiques du locus coeruleus, ou des neurones dopaminergiques de l'aire tegmentale ventrale. Puisque les monoamines sont impliquées à la fois dans la régulation de l'humeur et du sommeil, cette étude pourrait fournir les bases physiologiques permettant de mieux comprendre comment les orexines interagissent avec ces deux entités dans les états dépressifs.

Il serait également intéressant d'approfondir l'examen des effets dépressifs-*like* ou antidépresseurs-*like* du blocage pharmacologique ou génétique de l'un ou l'autre des récepteurs orexinergiques chez des souris soumises à un protocole d'UCMS. L'analyse du phénotype comportemental et des enregistrements électroencéphalographiques de ces animaux pourrait permettre de caractériser l'importance d'un type de récepteur pour contrecarrer les effets délétères du stress chronique sur le comportement et le sommeil.

Ces quelques exemples de travaux futurs mettent en exergue la nécessité de mieux comprendre le fonctionnement du système

orexinergique, et en particulier du rôle des deux récepteurs, au sein des états dépressifs. Cela pourrait à la fois permettre de substantielles avancées quant aux multiples mécanismes de régulation exercés par les orexines sur l'ensemble du système nerveux, de mieux appréhender la physiopathogénie de la dépression, et de servir d'assise au développement de nouvelles molécules thérapeutiques plus efficaces, plus spécifiques et donc moins génératrices d'effets secondaires.

RÉFÉRENCES

BIBLIOGRAPHIQUES

Références bibliographiques

- Able SL, Ivarsson M, Fish RL, Clarke TL, McCourt C, Duckworth JM, Napier C, Katugampola SD** (2009). Localisation of melanin-concentrating hormone receptor 1 in rat brain and evidence that sleep parameters are not altered despite high central receptor occupancy. *Eur J Pharmacol*, 616:101-106.
- Adamantidis AR, Salvert D, Goutagny R, Lakaye B, Gervasoni D, Grisar T, Luppi PH, Fort P** (2008). Sleep architecture of the melanin-concentrating hormone receptor 1-knockout mice. *Eur J Neurosci*, 27:1793-1800.
- Adamantidis AR, Zhang F, Aravanis AM, Deisseroth K, de Lecea L** (2007). Neural substrates of awakening probed with optogenetic control of hypocretin neurons. *Nature*, 450:420-424.
- Adrien J** (2002). Neurobiological bases for the relation between sleep and depression. *Sleep Med Rev*, 6:341-351.
- Adrien J, Dugovic C, Martin P** (1991). Sleep-wakefulness patterns in the helpless rat. *Physiol Behav*, 49:257-262.
- Agid O, Kohn Y, Lerer B** (2000). Environmental stress and psychiatric illness. *Biomed Pharmacother*, 54:135-141.
- Agid O, Shapira B, Zislin J, Ritsner M, Hanin B, Murad H, Troudart T, Bloch M, Heresco-Levy U, Lerer B** (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*, 4:163-172.
- Aguilera G** (1998). Corticotropin releasing hormone, receptor regulation and the stress response. *Trends Endocrinol Metab*, 9:329-336.
- Ahnaou A, Drinkenburg WH, Bouwknecht JA, Alcazar J, Steckler T, Dautzenberg FM** (2008). Blocking melanin-concentrating hormone MCH1 receptor affects rat sleep-wake architecture. *Eur J Pharmacol*, 579:177-188.
- Airan RD, Meltzer LA, Roy M, Gong Y, Chen H, Deisseroth K** (2007). High-speed imaging reveals neurophysiological links to behavior in an animal model of depression. *Science*, 317:819-823.
- Al-Barazanji KA, Wilson S, Baker J, Jessop DS, Harbuz MS** (2001). Central orexin-A activates hypothalamic-pituitary-adrenal axis and stimulates hypothalamic corticotropin releasing factor and arginine vasopressin neurones in conscious rats. *J Neuroendocrinol*, 13:421-424.
- Allard JS, Tizabi Y, Shaffery JP, Manaye K** (2007). Effects of rapid eye movement sleep deprivation on hypocretin neurons in the hypothalamus of a rat model of depression. *Neuropeptides*, 41:329-337.
- Allard JS, Tizabi Y, Shaffery JP, Trouth CO, Manaye K** (2004). Stereological analysis of the hypothalamic hypocretin/orexin neurons in an animal model of depression. *Neuropeptides*, 38:311-315.
- Alloy LB, Abramson LY, Metalsky GI, Hartlage S** (1988). The hopelessness theory of depression: attributional aspects. *Br J Clin Psychol*, 27 (Pt 1):5-21.
- Alonso G** (2000). Prolonged corticosterone treatment of adult rats inhibits the proliferation of oligodendrocyte progenitors present throughout white and gray matter regions of the brain. *Glia*, 31:219-231.
- Alonso R, Griebel G, Pavone G, Stemmelin J, Le FG, Soubrie P** (2004). Blockade of CRF(1) or V(1b) receptors reverses stress-induced suppression of neurogenesis in a mouse model of depression. *Mol Psychiatry*, 9:278-86, 224.
- Alonso SJ, Arevalo R, Afonso D, Rodriguez M** (1991). Effects of maternal stress during pregnancy on forced swimming test behavior of the offspring. *Physiol Behav*, 50:511-517.
- Altman J** (1962). Are new neurons formed in the brains of adult mammals? *Science*, 135:1127-1128.

Références bibliographiques

- Altman J** (1963). Autoradiographic investigation of cell proliferation in the brains of rats and cats. *Anat Rec*, 145:573-591.
- Altman J** (1969a). Autoradiographic and histological studies of postnatal neurogenesis. 3. Dating the time of production and onset of differentiation of cerebellar microneurons in rats. *J Comp Neurol*, 136:269-293.
- Altman J** (1969b). Autoradiographic and histological studies of postnatal neurogenesis. IV. Cell proliferation and migration in the anterior forebrain, with special reference to persisting neurogenesis in the olfactory bulb. *J Comp Neurol*, 137:433-457.
- Altman J, Das GD** (1966). Autoradiographic and histological studies of postnatal neurogenesis. I. A longitudinal investigation of the kinetics, migration and transformation of cells incorporating tritiated thymidine in neonate rats, with special reference to postnatal neurogenesis in some brain regions. *J Comp Neurol*, 126:337-389.
- Anacker C, Zunszain PA, Carvalho LA, Pariante CM** (2011). The glucocorticoid receptor: pivot of depression and of antidepressant treatment? *Psychoneuroendocrinology*, 36:415-425.
- Anaclet C, Parmentier R, Ouk K, Guidon G, Buda C, Sastre JP, Akaoka H, Sergeeva OA, Yanagisawa M, Ohtsu H, Franco P, Haas HL, Lin JS** (2009). Orexin/hypocretin and histamine: distinct roles in the control of wakefulness demonstrated using knock-out mouse models. *J Neurosci*, 29:14423-14438.
- Andersen ML, Hoshino K, Tufik S** (2009). Increased susceptibility to development of anhedonia in rats with chronic peripheral nerve injury: involvement of sleep deprivation? *Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry*, 33:960-966.
- Andrade R** (2011). Serotonergic regulation of neuronal excitability in the prefrontal cortex. *Neuropharmacology*, 61:382-386.
- Angelucci F, Brene S, Mathe AA** (2005). BDNF in schizophrenia, depression and corresponding animal models. *Mol Psychiatry*, 10:345-352.
- Angst J, Amrein R, Stabl M** (1995). Moclobemide and tricyclic antidepressants in severe depression: meta-analysis and prospective studies. *J Clin Psychopharmacol*, 15:16S-23S.
- Anisman H, Ravindran AV, Griffiths J, Merali Z** (1999). Endocrine and cytokine correlates of major depression and dysthymia with typical or atypical features. *Mol Psychiatry*, 4:182-188.
- Ansorge MS, Zhou M, Lira A, Hen R, Gingrich JA** (2004). Early-life blockade of the 5-HT transporter alters emotional behavior in adult mice. *Science*, 306:879-881.
- Antonijevic IA** (2006). Depressive disorders -- is it time to endorse different pathophysiologies? *Psychoneuroendocrinology*, 31:1-15.
- Arihara Z, Takahashi K, Murakami O, Totsune K, Sone M, Satoh F, Ito S, Hayashi Y, Sasano H, Mouri T** (2000). Orexin-A in the human brain and tumor tissues of ganglioneuroblastoma and neuroblastoma. *Peptides*, 21:565-570.
- Arihara Z, Takahashi K, Murakami O, Totsune K, Sone M, Satoh F, Ito S, Mouri T** (2001). Immunoreactive orexin-A in human plasma. *Peptides*, 22:139-142.
- Armitage R** (2007). Sleep and circadian rhythms in mood disorders. *Acta Psychiatr Scand Suppl*, 104-115.
- Arrigoni E, Mochizuki T, Scammell TE** (2010). Activation of the basal forebrain by the orexin/hypocretin neurones. *Acta Physiol (Oxf)*, 198:223-235.
- Artigas F, Nutt DJ, Shelton R** (2002). Mechanism of action of antidepressants. *Psychopharmacol Bull*, 36 Suppl 2:123-132.
- Aston-Jones G, Bloom FE** (1981). Activity of norepinephrine-containing locus coeruleus neurons in behaving rats anticipates fluctuations in the sleep-waking cycle. *J Neurosci*, 1:876-886.

Références bibliographiques

- Aston-Jones G, Smith RJ, Sartor GC, Moorman DE, Massi L, Tahsili-Fahadan P, Richardson KA** (2010). Lateral hypothalamic orexin/hypocretin neurons: A role in reward-seeking and addiction. *Brain Res*, 1314:74-90.
- Atanasova B, El-Hage W, Chabanet C, Gaillard P, Belzung C, Camus V** (2010). Olfactory anhedonia and negative olfactory alliesthesia in depressed patients. *Psychiatry Res*, 176:190-196.
- Avolio E, Alo R, Carelli A, Canonaco M** (2011). Amygdalar orexinergic-GABAergic interactions regulate anxiety behaviors of the Syrian golden hamster. *Behav Brain Res*, 218:288-295.
- Ayd FJ, Jr.** (1957). A preliminary report on marsilid. *Am J Psychiatry*, 114:459.
- Bachner D, Kreienkamp H, Weise C, Buck F, Richter D** (1999). Identification of melanin concentrating hormone (MCH) as the natural ligand for the orphan somatostatin-like receptor 1 (SLC-1). *FEBS Lett*, 457:522-524.
- Baghai TC, Blier P, Baldwin DS, Bauer M, Goodwin GM, Fountoulakis KN, Kasper S, Leonard BE, Malt UF, Stein D, Versiani M, Moller HJ** (2011). General and comparative efficacy and effectiveness of antidepressants in the acute treatment of depressive disorders: a report by the WPA section of pharmacopsychiatry. *Eur Arch Psychiatry Clin Neurosci*.
- Bai F, Li X, Clay M, Lindstrom T, Skolnick P** (2001). Intra- and interstrain differences in models of "behavioral despair". *Pharmacol Biochem Behav*, 70:187-192.
- Ball JR, Kiloh LG** (1959). A controlled trial of imipramine in treatment of depressive states. *Br Med J*, 2:1052-1055.
- Ban TA** (2001). Pharmacotherapy of depression: a historical analysis. *J Neural Transm*, 108:707-716.
- Banasr M, Duman RS** (2007). Regulation of neurogenesis and gliogenesis by stress and antidepressant treatment. *CNS Neurol Disord Drug Targets*, 6:311-320.
- Banasr M, Hery M, Printemps R, Daszuta A** (2004). Serotonin-induced increases in adult cell proliferation and neurogenesis are mediated through different and common 5-HT receptor subtypes in the dentate gyrus and the subventricular zone. *Neuropsychopharmacology*, 29:450-460.
- Banasr M, Valentine GW, Li XY, Gourley SL, Taylor JR, Duman RS** (2007). Chronic unpredictable stress decreases cell proliferation in the cerebral cortex of the adult rat. *Biol Psychiatry*, 62:496-504.
- Bao AM, Meynen G, Swaab DF** (2008). The stress system in depression and neurodegeneration: focus on the human hypothalamus. *Brain Res Rev*, 57:531-553.
- Bao AM, Swaab DF** (2010). Corticotropin-releasing hormone and arginine vasopressin in depression focus on the human postmortem hypothalamus. *Vitam Horm*, 82:339-365.
- Barden N** (1996). Modulation of glucocorticoid receptor gene expression by antidepressant drugs. *Pharmacopsychiatry*, 29:12-22.
- Barefoot JC, Schroll M** (1996). Symptoms of depression, acute myocardial infarction, and total mortality in a community sample. *Circulation*, 93:1976-1980.
- Baumann CR, Clark EL, Pedersen NP, Hecht JL, Scammell TE** (2008). Do enteric neurons make hypocretin? *Regul Pept*, 147:1-3.
- Bayer L, Eggermann E, Serafin M, Saint-Mieux B, Machard D, Jones B, Muhlethaler M** (2001). Orexins (hypocretins) directly excite tuberomammillary neurons. *Eur J Neurosci*, 14:1571-1575.
- Bayer SA** (1982). Changes in the total number of dentate granule cells in juvenile and adult rats: a correlated volumetric and 3H-thymidine autoradiographic study. *Exp Brain Res*, 46:315-323.

Références bibliographiques

- Bayer SA, Yackel JW, Puri PS** (1982). Neurons in the rat dentate gyrus granular layer substantially increase during juvenile and adult life. *Science*, 216:890-892.
- Beardslee WR, Versage EM, Gladstone TR** (1998). Children of affectively ill parents: a review of the past 10 years. *J Am Acad Child Adolesc Psychiatry*, 37:1134-1141.
- Belanoff JK, Rothschild AJ, Cassidy F, DeBattista C, Baulieu EE, Schold C, Schatzberg AF** (2002). An open label trial of C-1073 (mifepristone) for psychotic major depression. *Biol Psychiatry*, 52:386-392.
- Belmaker RH, Agam G** (2008). Major depressive disorder. *N Engl J Med*, 358:55-68.
- Belzung C, Yalcin I, Griebel G, Surget A, Leman S** (2006). Neuropeptides in psychiatric diseases: an overview with a particular focus on depression and anxiety disorders. *CNS Neurol Disord Drug Targets*, 5:135-145.
- Benazzi F** (2003). The symptoms of atypical depression. *Can J Psychiatry*, 48:350-351.
- Benca RM, Obermeyer WH, Thisted RA, Gillin JC** (1992). Sleep and psychiatric disorders. A meta-analysis. *Arch Gen Psychiatry*, 49:651-668.
- Benedetti F, Barbini B, Campori E, Colombo C, Smeraldi E** (1996). Dopamine agonist amineptine prevents the antidepressant effect of sleep deprivation. *Psychiatry Res*, 65:179-184.
- Benedetti F, Barbini B, Lucca A, Campori E, Colombo C, Smeraldi E** (1997). Sleep deprivation hastens the antidepressant action of fluoxetine. *Eur Arch Psychiatry Clin Neurosci*, 247:100-103.
- Berger M, Doerr P, Lund R, Bronisch T, von ZD** (1982). Neuroendocrinological and neurophysiological studies in major depressive disorders: are there biological markers for the endogenous subtype? *Biol Psychiatry*, 17:1217-1242.
- Berridge KC, Kringelbach ML** (2008). Affective neuroscience of pleasure: reward in humans and animals. *Psychopharmacology (Berl)*, 199:457-480.
- Berridge KC, Robinson TE** (1998). What is the role of dopamine in reward: hedonic impact, reward learning, or incentive salience? *Brain Res Brain Res Rev*, 28:309-369.
- Berridge KC, Robinson TE** (2003). Parsing reward. *Trends Neurosci*, 26:507-513.
- Berton O, McClung CA, DiLeone RJ, Krishnan V, Renthal W, Russo SJ, Graham D, Tsankova NM, Bolanos CA, Rios M, Monteggia LM, Self DW, Nestler EJ** (2006). Essential role of BDNF in the mesolimbic dopamine pathway in social defeat stress. *Science*, 311:864-868.
- Binneman B, Feltner D, Kolluri S, Shi Y, Qiu R, Stiger T** (2008). A 6-week randomized, placebo-controlled trial of CP-316,311 (a selective CRH1 antagonist) in the treatment of major depression. *Am J Psychiatry*, 165:617-620.
- Bisagno V, Ferrini M, Rios H, Zieher LM, Wikinski SI** (2000). Chronic corticosterone impairs inhibitory avoidance in rats: possible link with atrophy of hippocampal CA3 neurons. *Pharmacol Biochem Behav*, 66:235-240.
- Bjorkqvist K** (2001). Social defeat as a stressor in humans. *Physiol Behav*, 73:435-442.
- Blanco M, García-Caballero T, Fraga M, Gallego R, Cuevas J, Forteza J, Beiras A, Diéguez C** (2002). Cellular localization of orexin receptors in human adrenal gland, adrenocortical adenomas and pheochromocytomas. *Regul Pept*, 104:161-165.
- Blanco M, López M, García-Caballero T, Gallego R, Vazquez-Boquete A, Morel G, Senaris R, Casanueva F, Diéguez C, Beiras A** (2001). Cellular localization of orexin receptors in human pituitary. *J Clin Endocrinol Metab*, 86:1616-1619.
- Bodnoff SR, Suranyi-Cadotte B, Aitken DH, Quirion R, Meaney MJ** (1988). The effects of chronic antidepressant treatment in an animal model of anxiety. *Psychopharmacology (Berl)*, 95:298-302.

Références bibliographiques

- Bodnoff SR, Suranyi-Cadotte B, Quirion R, Meaney MJ** (1989). A comparison of the effects of diazepam versus several typical and atypical anti-depressant drugs in an animal model of anxiety. *Psychopharmacology (Berl)*, 97:277-279.
- Bohus B, Koolhaas JM, Heijnen CJ, de Boer O** (1993). Immunological responses to social stress: dependence on social environment and coping abilities. *Neuropsychobiology*, 28:95-99.
- Borgland SL, Chang SJ, Bowers MS, Thompson JL, Vittoz N, Floresco SB, Chou J, Chen BT, Bonci A** (2009). Orexin A/hypocretin-1 selectively promotes motivation for positive reinforcers. *J Neurosci*, 29:11215-11225.
- Borowsky B, Durkin MM, Ogozalek K, Marzabadi MR, DeLeon J, Lagu B, Heurich R, Lichtblau H, Shaposhnik Z, Daniewska I, Blackburn TP, Branchek TA, Gerald C, Vaysse PJ, Forray C** (2002). Antidepressant, anxiolytic and anorectic effects of a melanin-concentrating hormone-1 receptor antagonist. *Nat Med*, 8:825-830.
- Borsini F, Meli A** (1988). Is the forced swimming test a suitable model for revealing antidepressant activity? *Psychopharmacology (Berl)*, 94:147-160.
- Borta A, Hoglinger GU** (2007). Dopamine and adult neurogenesis. *J Neurochem*, 100:587-595.
- Bouchard TJ, Jr.** (1994). Genes, environment, and personality. *Science*, 264:1700-1701.
- Bourgin P, Huitron-Resendiz S, Spier AD, Fabre V, Morte B, Criado JR, Sutcliffe JG, Henriksen SJ, de Lecea L** (2000). Hypocretin-1 modulates rapid eye movement sleep through activation of locus coeruleus neurons. *J Neurosci*, 20:7760-7765.
- Boutrel B, Kenny PJ, Specio SE, Martin-Fardon R, Markou A, Koob GF, de Lecea L** (2005). Role for hypocretin in mediating stress-induced reinstatement of cocaine-seeking behavior. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 102:19168-19173.
- Boyle MP, Brewer JA, Funatsu M, Wozniak DF, Tsien JZ, Izumi Y, Muglia LJ** (2005). Acquired deficit of forebrain glucocorticoid receptor produces depression-like changes in adrenal axis regulation and behavior. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 102:473-478.
- Bradley BP, Mogg K, Williams R** (1995). Implicit and explicit memory for emotion-congruent information in clinical depression and anxiety. *Behav Res Ther*, 33:755-770.
- Bragulat V, Paillere-Martinot ML, Artiges E, Frouin V, Poline JB, Martinot JL** (2007). Dopaminergic function in depressed patients with affective flattening or with impulsivity: [18F]fluoro-L-dopa positron emission tomography study with voxel-based analysis. *Psychiatry Res*, 154:115-124.
- Bremner JD, Narayan M, Anderson ER, Staib LH, Miller HL, Charney DS** (2000). Hippocampal volume reduction in major depression. *Am J Psychiatry*, 157:115-118.
- Bremner JD, Vythilingam M, Ng CK, Vermetten E, Nazeer A, Oren DA, Berman RM, Charney DS** (2003). Regional brain metabolic correlates of alpha-methylparatyrosine-induced depressive symptoms: implications for the neural circuitry of depression. *JAMA*, 289:3125-3134.
- Brobeck JR, Larsson S, Reyes E** (1956). A study of the electrical activity of the hypothalamic feeding mechanism. *J Physiol*, 132:358-364.
- Broberger C, de Lecea L, Sutcliffe JG, Hokfelt T** (1998). Hypocretin/orexin- and melanin-concentrating hormone-expressing cells form distinct populations in the rodent lateral hypothalamus: relationship to the neuropeptide Y and agouti gene-related protein systems. *J Comp Neurol*, 402:460-474.
- Broomfield NM, Davies R, MacMahon K, Ali F, Cross SM** (2007). Further evidence of attention bias for negative information in late life depression. *Int J Geriatr Psychiatry*, 22:175-180.
- Brown RE, Sergeeva O, Eriksson KS, Haas HL** (2001). Orexin A excites serotonergic neurons in the dorsal raphe nucleus of the rat. *Neuropharmacology*, 40:457-459.

Références bibliographiques

- Brundin L, Bjorkqvist M, Petersen A, Traskman-Bendz L** (2007a). Reduced orexin levels in the cerebrospinal fluid of suicidal patients with major depressive disorder. *Eur Neuropsychopharmacol*, 17:573-579.
- Brundin L, Bjorkqvist M, Traskman-Bendz L, Petersen A** (2009). Increased orexin levels in the cerebrospinal fluid the first year after a suicide attempt. *J Affect Disord*, 113:179-182.
- Brundin L, Petersen A, Bjorkqvist M, Traskman-Bendz L** (2007b). Orexin and psychiatric symptoms in suicide attempters. *J Affect Disord*, 100:259-263.
- Brunton PJ, Russell JA** (2003). Hypothalamic-pituitary-adrenal responses to centrally administered orexin-A are suppressed in pregnant rats. *J Neuroendocrinol*, 15:633-637.
- Burdakov D, Gerasimenko O, Verkhatsky A** (2005). Physiological changes in glucose differentially modulate the excitability of hypothalamic melanin-concentrating hormone and orexin neurons *in situ*. *J Neurosci*, 25:2429-2433.
- Burke HM, Davis MC, Otte C, Mohr DC** (2005). Depression and cortisol responses to psychological stress: a meta-analysis. *Psychoneuroendocrinology*, 30:846-856.
- Burlet S, Tyler CJ, Leonard CS** (2002). Direct and indirect excitation of laterodorsal tegmental neurons by Hypocretin/Orexin peptides: implications for wakefulness and narcolepsy. *J Neurosci*, 22:2862-2872.
- Buwalda B, De Boer SF, Schmidt ED, Felszeghy K, Nyakas C, Sgoifo A, Van der Vegt BJ, Tilders FJ, Bohus B, Koolhaas JM** (1999). Long-lasting deficient dexamethasone suppression of hypothalamic-pituitary-adrenocortical activation following peripheral CRF challenge in socially defeated rats. *J Neuroendocrinol*, 11:513-520.
- Buyse DJ, Frank E, Lowe KK, Cherry CR, Kupfer DJ** (1997). Electroencephalographic sleep correlates of episode and vulnerability to recurrence in depression. *Biol Psychiatry*, 41:406-418.
- Cameron HA, Gould E** (1994). Adult neurogenesis is regulated by adrenal steroids in the dentate gyrus. *Neuroscience*, 61:203-209.
- Carlson PJ, Singh JB, Zarate CA, Jr., Drevets WC, Manji HK** (2006). Neural circuitry and neuroplasticity in mood disorders: insights for novel therapeutic targets. *NeuroRx*, 3:22-41.
- Carrasco JL, Sandner C** (2005). Clinical effects of pharmacological variations in selective serotonin reuptake inhibitors: an overview. *Int J Clin Pract*, 59:1428-1434.
- Carroll BJ, Cassidy F, Naftolowitz D, Tatham NE, Wilson WH, Iranmanesh A, Liu PY, Veldhuis JD** (2007). Pathophysiology of hypercortisolism in depression. *Acta Psychiatr Scand Suppl*, 90-103.
- Caspi A, Sugden K, Moffitt TE, Taylor A, Craig IW, Harrington H, McClay J, Mill J, Martin J, Braithwaite A, Poulton R** (2003). Influence of life stress on depression: moderation by a polymorphism in the 5-HTT gene. *Science*, 301:386-389.
- Cassano P, Lattanzi L, Fava M, Navari S, Battistini G, Abelli M, Cassano GB** (2005). Ropinirole in treatment-resistant depression: a 16-week pilot study. *Can J Psychiatry*, 50:357-360.
- Catlin DH, Gorelick DA, Gerner RH** (1982). Clinical pharmacology of beta-endorphin in depression and schizophrenia. *Ann N Y Acad Sci*, 398:434-447.
- Cerqueira JJ, Mailliet F, Almeida OF, Jay TM, Sousa N** (2007). The prefrontal cortex as a key target of the maladaptive response to stress. *J Neurosci*, 27:2781-2787.
- Cervilla JA, Molina E, Rivera M, Torres-Gonzalez F, Bellon JA, Moreno B, Luna JD, Lorente JA, Mayoral F, King M, Nazareth I, Gutierrez B** (2007). The risk for depression conferred by stressful life events is modified by variation at the serotonin transporter 5HTTLPR genotype: evidence from the Spanish PREDICT-Gene cohort. *Mol Psychiatry*, 12:748-755.
- Chaki S, Funakoshi T, Hirota-Okuno S, Nishiguchi M, Shimazaki T, Iijima M, Grottick AJ, Kanuma K, Omodera K, Sekiguchi Y, Okuyama S, Tran TA, Semple G, Thomsen W** (2005).

Références bibliographiques

Anxiolytic- and antidepressant-like profile of ATC0065 and ATC0175: nonpeptidic and orally active melanin-concentrating hormone receptor 1 antagonists. *J Pharmacol Exp Ther*, 313:831-839.

Challet E, Pevet P, Malan A (1997). Effect of prolonged fasting and subsequent refeeding on free-running rhythms of temperature and locomotor activity in rats. *Behav Brain Res*, 84:275-284.

Chambers J, Ames RS, Bergsma D, Muir A, Fitzgerald LR, Hervieu G, Dytko GM, Foley JJ, Martin J, Liu WS, Park J, Ellis C, Ganguly S, Konchar S, Cluderay J, Leslie R, Wilson S, Sarau HM (1999). Melanin-concentrating hormone is the cognate ligand for the orphan G-protein-coupled receptor SLC-1. *Nature*, 400:261-265.

Channon S, Baker JE, Robertson MM (1993). Working memory in clinical depression: an experimental study. *Psychol Med*, 23:87-91.

Chaput Y, de Montigny C, Blier P (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*, 5:219-229.

Charney DS, Manji HK (2004). Life stress, genes, and depression: multiple pathways lead to increased risk and new opportunities for intervention. *Sci STKE*, 2004:re5.

Chau DT, Rada PV, Kim K, Kosloff RA, Hoebel BG (2011). Fluoxetine alleviates behavioral depression while decreasing acetylcholine release in the nucleus accumbens shell. *Neuropsychopharmacology*, 36:1729-1737.

Cheeta S, Ruigt G, van Proosdij J, Willner P (1997). Changes in sleep architecture following chronic mild stress. *Biol Psychiatry*, 41:419-427.

Chemelli RM, Willie JT, Sinton CM, Elmquist JK, Scammell T, Lee C, Richardson JA, Williams SC, Xiong Y, Kisanuki Y, Fitch TE, Nakazato M, Hammer RE, Saper CB, Yanagisawa M (1999). Narcolepsy in orexin knockout mice: molecular genetics of sleep regulation. *Cell*, 98:437-451.

Chen B, Dowlatshahi D, MacQueen GM, Wang JF, Young LT (2001). Increased hippocampal BDNF immunoreactivity in subjects treated with antidepressant medication. *Biol Psychiatry*, 50:260-265.

Chiaroni P, Azorin JM, Dassa D, Henry JM, Giudicelli S, Malthiery Y, Planells R (2000). Possible involvement of the dopamine D3 receptor locus in subtypes of bipolar affective disorder. *Psychiatr Genet*, 10:43-49.

Chiro GD, Hammock MK, Bleyer WA (1976). Spinal descent of cerebrospinal fluid in man. *Neurology*, 26:1-8.

Chou TC, Lee CE, Lu J, Elmquist JK, Hara J, Willie JT, Beuckmann CT, Chemelli RM, Sakurai T, Yanagisawa M, Saper CB, Scammell TE (2001). Orexin (hypocretin) neurons contain dynorphin. *J Neurosci*, 21:RC168.

Chou TC, Scammell TE, Gooley JJ, Gaus SE, Saper CB, Lu J (2003). Critical role of dorsomedial hypothalamic nucleus in a wide range of behavioral circadian rhythms. *J Neurosci*, 23:10691-10702.

Chrousos GP, Gold PW (1992). The concepts of stress and stress system disorders. Overview of physical and behavioral homeostasis. *JAMA*, 267:1244-1252.

Chung S, Hopf FW, Nagasaki H, Li CY, Belluzzi JD, Bonci A, Civelli O (2009). The melanin-concentrating hormone system modulates cocaine reward. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 106:6772-6777.

Cicchetti D, Rogosch FA, Sturge-Apple ML (2007). Interactions of child maltreatment and serotonin transporter and monoamine oxidase A polymorphisms: depressive symptomatology among adolescents from low socioeconomic status backgrounds. *Dev Psychopathol*, 19:1161-1180.

Références bibliographiques

- Claes S** (2009). Glucocorticoid receptor polymorphisms in major depression. *Ann N Y Acad Sci*, 1179:216-228.
- Cluderay JE, Harrison DC, Hervieu GJ** (2002). Protein distribution of the orexin-2 receptor in the rat central nervous system. *Regul Pept*, 104:131-144.
- Coe CL, Kramer M, Czeh B, Gould E, Reeves AJ, Kirschbaum C, Fuchs E** (2003). Prenatal stress diminishes neurogenesis in the dentate gyrus of juvenile rhesus monkeys. *Biol Psychiatry*, 54:1025-1034.
- Cook SC, Wellman CL** (2004). Chronic stress alters dendritic morphology in rat medial prefrontal cortex. *J Neurobiol*, 60:236-248.
- Cooper-Kuhn CM, Winkler J, Kuhn HG** (2004). Decreased neurogenesis after cholinergic forebrain lesion in the adult rat. *J Neurosci Res*, 77:155-165.
- Crane GE** (1957). Iproniazid (marsilid) phosphate, a therapeutic agent for mental disorders and debilitating diseases. *Psychiatr Res Rep Am Psychiatr Assoc*, 8:142-152.
- Crocker A, Espana RA, Papadopoulou M, Saper CB, Faraco J, Sakurai T, Honda M, Mignot E, Scammell TE** (2005). Concomitant loss of dynorphin, NARP, and orexin in narcolepsy. *Neurology*, 65:1184-1188.
- Cryan JF, Holmes A** (2005). The ascent of mouse: advances in modelling human depression and anxiety. *Nat Rev Drug Discov*, 4:775-790.
- Cryan JF, Mombereau C, Vassout A** (2005). The tail suspension test as a model for assessing antidepressant activity: review of pharmacological and genetic studies in mice. *Neurosci Biobehav Rev*, 29:571-625.
- Cuijpers P, Geraedts AS, van Oppen P, Andersson G, Markowitz JC, van Straten A** (2011). Interpersonal psychotherapy for depression: a meta-analysis. *Am J Psychiatry*, 168:581-592.
- Czeh B, Michaelis T, Watanabe T, Frahm J, de Biurrun G, van Kampen M, Bartolomucci A, Fuchs E** (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*, 98:12796-12801.
- D'Aquila PS, Newton J, Willner P** (1997). Diurnal variation in the effect of chronic mild stress on sucrose intake and preference. *Physiol Behav*, 62:421-426.
- Date Y, Mondal MS, Matsukura S, Ueta Y, Yamashita H, Kaiya H, Kangawa K, Nakazato M** (2000). Distribution of orexin/hypocretin in the rat median eminence and pituitary. *Brain Res Mol Brain Res*, 76:1-6.
- Date Y, Ueta Y, Yamashita H, Yamaguchi H, Matsukura S, Kangawa K, Sakurai T, Yanagisawa M, Nakazato M** (1999). Orexins, orexigenic hypothalamic peptides, interact with autonomic, neuroendocrine and neuroregulatory systems. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 96:748-753.
- Dauvilliers Y, Arnulf I, Mignot E** (2007). Narcolepsy with cataplexy. *Lancet*, 369:499-511.
- David DJ, Klemenhagen KC, Holick KA, Saxe MD, Mendez I, Santarelli L, Craig DA, Zhong H, Swanson CJ, Hegde LG, Ping XI, Dong D, Marzabadi MR, Gerald CP, Hen R** (2007). Efficacy of the MCHR1 antagonist N-[3-(1-([4-(3,4-difluorophenoxy)phenyl]methyl)(4-piperidyl))-4-methylphenyl]-2-methylpropanamide (SNAP 94847) in mouse models of anxiety and depression following acute and chronic administration is independent of hippocampal neurogenesis. *J Pharmacol Exp Ther*, 321:237-248.
- De Berardis D, Di IG, Acciavatti T, Conti C, Serroni N, Olivieri L, Cavuto M, Martinotti G, Janiri L, Moschetta FS, Conti P, Di GM** (2011). The emerging role of melatonin agonists in the treatment of major depression: focus on agomelatine. *CNS Neurol Disord Drug Targets*, 10:119-132.
- de Lecea L, Kilduff TS, Peyron C, Gao X, Foye PE, Danielson PE, Fukuhara C, Battenberg EL, Gautvik VT, Bartlett FS, Frankel WN, van den Pol AN, Bloom FE, Gautvik KM, Sutcliffe JG**

Références bibliographiques

(1998). The hypocretins: hypothalamus-specific peptides with neuroexcitatory activity. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 95:322-327.

de Winter RF, van Hemert AM, DeRijk RH, Zwinderman KH, Frankhuijzen-Sierevogel AC, Wiegant VM, Goekoop JG (2003). Anxious-retarded depression: relation with plasma vasopressin and cortisol. *Neuropsychopharmacology*, 28:140-147.

Deadwyler SA, Porrino L, Siegel JM, Hampson RE (2007). Systemic and nasal delivery of orexin-A (Hypocretin-1) reduces the effects of sleep deprivation on cognitive performance in nonhuman primates. *J Neurosci*, 27:14239-14247.

Delay J, Lainé B, Buisson JF (1952). Note concernant l'action de l'isonicotinyl-hydrazide utilisé dans le traitement des états dépressifs. *Ann Med Psychol (Paris)*, 110:689-692.

Delgado JM, Anand BK (1953). Increase of food intake induced by electrical stimulation of the lateral hypothalamus. *Am J Physiol*, 172:162-168.

Demyttenaere K, De Fruyt J (2003). Getting what you ask for: on the selectivity of depression rating scales. *Psychother Psychosom*, 72:61-70.

Detanico BC, Piato AL, Freitas JJ, Lhullier FL, Hidalgo MP, Caumo W, Elisabetsky E (2009). Antidepressant-like effects of melatonin in the mouse chronic mild stress model. *Eur J Pharmacol*, 607:121-125.

Detke MJ, Rickels M, Lucki I (1995). Active behaviors in the rat forced swimming test differentially produced by serotonergic and noradrenergic antidepressants. *Psychopharmacology (Berl)*, 121:66-72.

Dikeos DG, Papadimitriou GN, Avramopoulos D, Karadima G, Daskalopoulou EG, Souery D, Mendlewicz J, Vassilopoulos D, Stefanis CN (1999). Association between the dopamine D3 receptor gene locus (DRD3) and unipolar affective disorder. *Psychiatr Genet*, 9:189-195.

DiMicco JA, Samuels BC, Zaretskaia MV, Zaretsky DV (2002). The dorsomedial hypothalamus and the response to stress: part renaissance, part revolution. *Pharmacol Biochem Behav*, 71:469-480.

Dranovsky A, Hen R (2006). Hippocampal neurogenesis: regulation by stress and antidepressants. *Biol Psychiatry*, 59:1136-1143.

Drevets WC (2001). Neuroimaging and neuropathological studies of depression: implications for the cognitive-emotional features of mood disorders. *Curr Opin Neurobiol*, 11:240-249.

Drevets WC (2003). Neuroimaging abnormalities in the amygdala in mood disorders. *Ann N Y Acad Sci*, 985:420-444.

Drevets WC, Bogers W, Raichle ME (2002). Functional anatomical correlates of antidepressant drug treatment assessed using PET measures of regional glucose metabolism. *Eur Neuropsychopharmacol*, 12:527-544.

Drevets WC, Price JL, Furey ML (2008). Brain structural and functional abnormalities in mood disorders: implications for neurocircuitry models of depression. *Brain Struct Funct*, 213:93-118.

Drevets WC, Thase ME, Moses-Kolko EL, Price J, Frank E, Kupfer DJ, Mathis C (2007). Serotonin-1A receptor imaging in recurrent depression: replication and literature review. *Nucl Med Biol*, 34:865-877.

Dugovic C, Maccari S, Weibel L, Turek FW, Van Reeth O (1999). High corticosterone levels in prenatally stressed rats predict persistent paradoxical sleep alterations. *J Neurosci*, 19:8656-8664.

Dulawa SC, Hen R (2005). Recent advances in animal models of chronic antidepressant effects: the novelty-induced hypophagia test. *Neurosci Biobehav Rev*, 29:771-783.

Dulawa SC, Holick KA, Gundersen B, Hen R (2004). Effects of chronic fluoxetine in animal models of anxiety and depression. *Neuropsychopharmacology*, 29:1321-1330.

Références bibliographiques

- Dunlop BW, Nemeroff CB** (2007). The role of dopamine in the pathophysiology of depression. *Arch Gen Psychiatry*, 64:327-337.
- Dupin N, Mailliet F, Rocher C, Kessal K, Spedding M, Jay TM** (2006). Common efficacy of psychotropic drugs in restoring stress-induced impairment of prefrontal plasticity. *Neurotox Res*, 10:193-198.
- Edwards CM, Abusnana S, Sunter D, Murphy KG, Ghatei MA, Bloom SR** (1999). The effect of the orexins on food intake: comparison with neuropeptide Y, melanin-concentrating hormone and galanin. *J Endocrinol*, 160:R7-12.
- Eggermann E, Serafin M, Bayer L, Machard D, Saint-Mleux B, Jones BE, Muhlethaler M** (2001). Orexins/hypocretins excite basal forebrain cholinergic neurones. *Neuroscience*, 108:177-181.
- Elias CF, Saper CB, Maratos-Flier E, Tritos NA, Lee C, Kelly J, Tatro JB, Hoffman GE, Ollmann MM, Barsh GS, Sakurai T, Yanagisawa M, Elmquist JK** (1998). Chemically defined projections linking the mediobasal hypothalamus and the lateral hypothalamic area. *J Comp Neurol*, 402:442-459.
- Elliott R, Rubinstein JS, Sahakian BJ, Dolan RJ** (2000). Selective attention to emotional stimuli in a verbal go/no-go task: an fMRI study. *Neuroreport*, 11:1739-1744.
- Erickson K, Drevets WC, Clark L, Cannon DM, Bain EE, Zarate CA, Jr., Charney DS, Sahakian BJ** (2005). Mood-congruent bias in affective go/no-go performance of unmedicated patients with major depressive disorder. *Am J Psychiatry*, 162:2171-2173.
- Eriksson KS, Sergeeva O, Brown RE, Haas HL** (2001). Orexin/hypocretin excites the histaminergic neurons of the tuberomammillary nucleus. *J Neurosci*, 21:9273-9279.
- Eriksson KS, Sergeeva OA, Selbach O, Haas HL** (2004). Orexin (hypocretin)/dynorphin neurons control GABAergic inputs to tuberomammillary neurons. *Eur J Neurosci*, 19:1278-1284.
- Eriksson PS, Perfilieva E, Bjork-Eriksson T, Alborn AM, Nordborg C, Peterson DA, Gage FH** (1998). Neurogenesis in the adult human hippocampus. *Nat Med*, 4:1313-1317.
- Espana RA, Baldo BA, Kelley AE, Berridge CW** (2001). Wake-promoting and sleep-suppressing actions of hypocretin (orexin): basal forebrain sites of action. *Neuroscience*, 106:699-715.
- Espana RA, Oleson EB, Locke JL, Brookshire BR, Roberts DC, Jones SR** (2010). The hypocretin-orexin system regulates cocaine self-administration via actions on the mesolimbic dopamine system. *Eur J Neurosci*, 31:336-348.
- Estabrooke IV, McCarthy MT, Ko E, Chou TC, Chemelli RM, Yanagisawa M, Saper CB, Scammell TE** (2001). Fos expression in orexin neurons varies with behavioral state. *J Neurosci*, 21:1656-1662.
- Fadel J, Deutch AY** (2002). Anatomical substrates of orexin-dopamine interactions: lateral hypothalamic projections to the ventral tegmental area. *Neuroscience*, 111:379-387.
- Fales CL, Barch DM, Rundle MM, Mintun MA, Mathews J, Snyder AZ, Sheline YI** (2009). Antidepressant treatment normalizes hypoactivity in dorsolateral prefrontal cortex during emotional interference processing in major depression. *J Affect Disord*, 112:206-211.
- Fangmann P, Assion HJ, Juckel G, Gonzalez CA, López-Muñoz F** (2008). Half a century of antidepressant drugs: on the clinical introduction of monoamine oxidase inhibitors, tricyclics, and tetracyclics. Part II: tricyclics and tetracyclics. *J Clin Psychopharmacol*, 28:1-4.
- Fanselow MS, Dong HW** (2010). Are the dorsal and ventral hippocampus functionally distinct structures? *Neuron*, 65:7-19.
- Fava M, Kendler KS** (2000). Major depressive disorder. *Neuron*, 28:335-341.
- Feng P, Hu Y, Li D, Vurbic D, Fan H, Wang S, Strohl KP** (2009). The effect of clomipramine on wake/sleep and orexinergic expression in rats. *J Psychopharmacol*, 23:559-566.

Références bibliographiques

- Feng P, Vurbic D, Wu Z, Hu Y, Strohl KP** (2008). Changes in brain orexin levels in a rat model of depression induced by neonatal administration of clomipramine. *J Psychopharmacol*, 22:784-791.
- Feng P, Vurbic D, Wu Z, Strohl KP** (2007). Brain orexins and wake regulation in rats exposed to maternal deprivation. *Brain Res*, 1154:163-172.
- Flores BH, Kenna H, Keller J, Solvason HB, Schatzberg AF** (2006). Clinical and biological effects of mifepristone treatment for psychotic depression. *Neuropsychopharmacology*, 31:628-636.
- Fontes MA, Xavier CH, de Menezes RC, DiMicco JA** (2011). The dorsomedial hypothalamus and the central pathways involved in the cardiovascular response to emotional stress. *Neuroscience*, 184:64-74.
- Forbes EE** (2009). Where's the fun in that? Broadening the focus on reward function in depression. *Biol Psychiatry*, 66:199-200.
- Foster JA, MacQueen G** (2008). Neurobiological factors linking personality traits and major depression. *Can J Psychiatry*, 53:6-13.
- Fountoulakis KN, Moller HJ** (2011). Efficacy of antidepressants: a re-analysis and re-interpretation of the Kirsch data. *Int J Neuropsychopharmacol*, 14:405-412.
- Frank E, Thase ME** (1999). Natural history and preventative treatment of recurrent mood disorders. *Annu Rev Med*, 50:453-468.
- Freemantle N, Anderson IM, Young P** (2000). Predictive value of pharmacological activity for the relative efficacy of antidepressant drugs. Meta-regression analysis. *Br J Psychiatry*, 177:292-302.
- Freyhan FA** (1960). The modern treatment of depressive disorders. *Am J Psychiatry*, 116:1057-1064.
- Frodl T, Schule C, Schmitt G, Born C, Baghai T, Zill P, Bottlender R, Rupprecht R, Bondy B, Reiser M, Moller HJ, Meisenzahl EM** (2007). Association of the brain-derived neurotrophic factor Val66Met polymorphism with reduced hippocampal volumes in major depression. *Arch Gen Psychiatry*, 64:410-416.
- Fronczek R, Lammers GJ, Balesar R, Unmehopa UA, Swaab DF** (2005). The number of hypothalamic hypocretin (orexin) neurons is not affected in Prader-Willi syndrome. *J Clin Endocrinol Metab*, 90:5466-5470.
- Fu CH, Williams SC, Cleare AJ, Brammer MJ, Walsh ND, Kim J, Andrew CM, Pich EM, Williams PM, Reed LJ, Mitterschiffthaler MT, Suckling J, Bullmore ET** (2004). Attenuation of the neural response to sad faces in major depression by antidepressant treatment: a prospective, event-related functional magnetic resonance imaging study. *Arch Gen Psychiatry*, 61:877-889.
- Fuchs E, Czeh B, Michaelis T, de Biurrun G, Watanabe T, Frahm J** (2002). Synaptic plasticity and tianeptine: structural regulation. *Eur Psychiatry*, 17 Suppl 3:311-317.
- Furlong TM, Vianna DM, Liu L, Carrive P** (2009). Hypocretin/orexin contributes to the expression of some but not all forms of stress and arousal. *Eur J Neurosci*, 30:1603-1614.
- Gage FH, Ray J, Fisher LJ** (1995). Isolation, characterization, and use of stem cells from the CNS. *Annu Rev Neurosci*, 18:159-192.
- Gautvik KM, de Lecea L, Gautvik VT, Danielson PE, Tranque P, Dopazo A, Bloom FE, Sutcliffe JG** (1996). Overview of the most prevalent hypothalamus-specific mRNAs, as identified by directional tag PCR subtraction. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 93:8733-8738.
- Geddes JR, Carney SM, Davies C, Furukawa TA, Kupfer DJ, Frank E, Goodwin GM** (2003). Relapse prevention with antidepressant drug treatment in depressive disorders: a systematic review. *Lancet*, 361:653-661.

Références bibliographiques

- Gehlert DR, Rasmussen K, Shaw J, Li X, Ardayfio P, Craft L, Coskun T, Zhang HY, Chen Y, Witkin JM** (2009). Preclinical evaluation of melanin-concentrating hormone receptor 1 antagonism for the treatment of obesity and depression. *J Pharmacol Exp Ther*, 329:429-438.
- Geraciotti TD, Jr., Loosen PT, Orth DN** (1997). Low cerebrospinal fluid corticotropin-releasing hormone concentrations in eucortisolemic depression. *Biol Psychiatry*, 42:165-174.
- Gershon AA, Vishne T, Grunhaus L** (2007). Dopamine D2-like receptors and the antidepressant response. *Biol Psychiatry*, 61:145-153.
- Gigantesco A, Morosini P** (2008). Development, reliability and factor analysis of a self-administered questionnaire which originates from the World Health Organization's Composite International Diagnostic Interview - Short Form (CIDI-SF) for assessing mental disorders. *Clin Pract Epidemiol Ment Health*, 4:8.
- Gilbertson MW, Shenton ME, Ciszewski A, Kasai K, Lasko NB, Orr SP, Pitman RK** (2002). Smaller hippocampal volume predicts pathologic vulnerability to psychological trauma. *Nat Neurosci*, 5:1242-1247.
- Gillin JC, Duncan W, Pettigrew KD, Frankel BL, Snyder F** (1979). Successful separation of depressed, normal, and insomniac subjects by EEG sleep data. *Arch Gen Psychiatry*, 36:85-90.
- Gobbi G, Blier P** (2005). Effect of neurokinin-1 receptor antagonists on serotonergic, noradrenergic and hippocampal neurons: comparison with antidepressant drugs. *Peptides*, 26:1383-1393.
- Goddard AW, Ball SG, Martinez J, Robinson MJ, Yang CR, Russell JM, Shekhar A** (2010). Current perspectives of the roles of the central norepinephrine system in anxiety and depression. *Depress Anxiety*, 27:339-350.
- Gold PW, Chrousos GP** (1999). The endocrinology of melancholic and atypical depression: relation to neurocircuitry and somatic consequences. *Proc Assoc Am Physicians*, 111:22-34.
- Gold PW, Chrousos GP** (2002). Organization of the stress system and its dysregulation in melancholic and atypical depression: high vs low CRH/NE states. *Mol Psychiatry*, 7:254-275.
- Gold PW, Gabry KE, Yasuda MR, Chrousos GP** (2002). Divergent endocrine abnormalities in melancholic and atypical depression: clinical and pathophysiologic implications. *Endocrinol Metab Clin North Am*, 31:37-62, vi.
- Gold PW, Goodwin FK, Chrousos GP** (1988a). Clinical and biochemical manifestations of depression. Relation to the neurobiology of stress (1). *N Engl J Med*, 319:348-353.
- Gold PW, Goodwin FK, Chrousos GP** (1988b). Clinical and biochemical manifestations of depression. Relation to the neurobiology of stress (2). *N Engl J Med*, 319:413-420.
- Goldman SA, Nottebohm F** (1983). Neuronal production, migration, and differentiation in a vocal control nucleus of the adult female canary brain. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 80:2390-2394.
- Gotlib IH, Kasch KL, Traill S, Joormann J, Arnow BA, Johnson SL** (2004a). Coherence and specificity of information-processing biases in depression and social phobia. *J Abnorm Psychol*, 113:386-398.
- Gotlib IH, Krasnoperova E, Yue DN, Joormann J** (2004b). Attentional biases for negative interpersonal stimuli in clinical depression. *J Abnorm Psychol*, 113:121-135.
- Gottesmann C, Gottesman I** (2007). The neurobiological characteristics of rapid eye movement (REM) sleep are candidate endophenotypes of depression, schizophrenia, mental retardation and dementia. *Prog Neurobiol*, 81:237-250.
- Gould E** (2007). How widespread is adult neurogenesis in mammals? *Nat Rev Neurosci*, 8:481-488.
- Gould E, Beylin A, Tanapat P, Reeves A, Shors TJ** (1999a). Learning enhances adult neurogenesis in the hippocampal formation. *Nat Neurosci*, 2:260-265.

Références bibliographiques

- Gould E, Reeves AJ, Fallah M, Tanapat P, Gross CG, Fuchs E** (1999b). Hippocampal neurogenesis in adult Old World primates. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 96:5263-5267.
- Gouzenes L, Desarmenien MG, Hussy N, Richard P, Moos FC** (1998). Vasopressin regularizes the phasic firing pattern of rat hypothalamic magnocellular vasopressin neurons. *J Neurosci*, 18:1879-1885.
- Grady SP, Nishino S, Czeisler CA, Hepner D, Scammell TE** (2006). Diurnal variation in CSF orexin-A in healthy male subjects. *Sleep*, 29:295-297.
- Grant MM, Thase ME, Sweeney JA** (2001). Cognitive disturbance in outpatient depressed younger adults: evidence of modest impairment. *Biol Psychiatry*, 50:35-43.
- Greenberg BD, Li Q, Lucas FR, Hu S, Sirota LA, Benjamin J, Lesch KP, Hamer D, Murphy DL** (2000). Association between the serotonin transporter promoter polymorphism and personality traits in a primarily female population sample. *Am J Med Genet*, 96:202-216.
- Griebel G, Simiand J, Serradeil-Le GC, Wagnon J, Pascal M, Scatton B, Maffrand JP, Soubrie P** (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*, 99:6370-6375.
- Grønli J, Murison R, Bjorvatn B, Sørensen E, Portas CM, Ursin R** (2004). Chronic mild stress affects sucrose intake and sleep in rats. *Behav Brain Res*, 150:139-147.
- Gutierrez MA, Stimmel GL, Aiso JY** (2003). Venlafaxine: a 2003 update. *Clin Ther*, 25:2138-2154.
- Haddjeri N, Blier P, de Montigny C** (1998). Long-term antidepressant treatments result in a tonic activation of forebrain 5-HT_{1A} receptors. *J Neurosci*, 18:10150-10156.
- Hagan JJ, Leslie RA, Patel S, Evans ML, Wattam TA, Holmes S, Benham CD, Taylor SG, Routledge C, Hemmati P, Munton RP, Ashmeade TE, Shah AS, Hatcher JP, Hatcher PD, Jones DN, Smith MI, Piper DC, Hunter AJ, Porter RA, Upton N** (1999). Orexin A activates locus coeruleus cell firing and increases arousal in the rat. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 96:10911-10916.
- Hajós M, Fleishaker JC, Filipiak-Reisner JK, Brown MT, Wong EH** (2004). The selective norepinephrine reuptake inhibitor antidepressant reboxetine: pharmacological and clinical profile. *CNS Drug Rev*, 10:23-44.
- Hamilton VL, Hoffman WS, Broman CL, Rauma D** (1993). Unemployment, distress, and coping: a panel study of autoworkers. *J Pers Soc Psychol*, 65:234-247.
- Hara J, Beuckmann CT, Nambu T, Willie JT, Chemelli RM, Sinton CM, Sugiyama F, Yagami K, Goto K, Yanagisawa M, Sakurai T** (2001). Genetic ablation of orexin neurons in mice results in narcolepsy, hypophagia, and obesity. *Neuron*, 30:345-354.
- Harald B, Gordon P** (2011). Meta-review of depressive subtyping models. *J Affect Disord*, in press.
- Harris GC, Aston-Jones G** (2006). Arousal and reward: a dichotomy in orexin function. *Trends Neurosci*, 29:571-577.
- Harris GC, Wimmer M, Aston-Jones G** (2005). A role for lateral hypothalamic orexin neurons in reward seeking. *Nature*, 437:556-559.
- Harris GC, Wimmer M, Randall-Thompson JF, Aston-Jones G** (2007). Lateral hypothalamic orexin neurons are critically involved in learning to associate an environment with morphine reward. *Behav Brain Res*, 183:43-51.
- Harvey AG** (2001). Insomnia: symptom or diagnosis? *Clin Psychol Rev*, 21:1037-1059.
- Hashimoto K** (2011). The role of glutamate on the action of antidepressants. *Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry*, 35:1558-1568.

Références bibliographiques

- Hasin DS, Goodwin RD, Stinson FS, Grant BF** (2005). Epidemiology of major depressive disorder: results from the National Epidemiologic Survey on Alcoholism and Related Conditions. *Arch Gen Psychiatry*, 62:1097-1106.
- Hasler G, Fromm S, Carlson PJ, Luckenbaugh DA, Waldeck T, Geraci M, Roiser JP, Neumeister A, Meyers N, Charney DS, Drevets WC** (2008). Neural response to catecholamine depletion in unmedicated subjects with major depressive disorder in remission and healthy subjects. *Arch Gen Psychiatry*, 65:521-531.
- Hassani OK, Lee MG, Jones BE** (2009). Melanin-concentrating hormone neurons discharge in a reciprocal manner to orexin neurons across the sleep-wake cycle. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 106:2418-2422.
- Hawes BE, Kil E, Green B, O'Neill K, Fried S, Graziano MP** (2000). The melanin-concentrating hormone receptor couples to multiple G proteins to activate diverse intracellular signaling pathways. *Endocrinology*, 141:4524-4532.
- Haynes AC, Jackson B, Chapman H, Tadayyon M, Johns A, Porter RA, Arch JR** (2000). A selective orexin-1 receptor antagonist reduces food consumption in male and female rats. *Regul Pept*, 96:45-51.
- Haynes AC, Jackson B, Overend P, Buckingham RE, Wilson S, Tadayyon M, Arch JR** (1999). Effects of single and chronic intracerebroventricular administration of the orexins on feeding in the rat. *Peptides*, 20:1099-1105.
- Hegadoren KM, O'Donnell T, Lanius R, Coupland NJ, Lacaze-Masmonteil N** (2009). The role of beta-endorphin in the pathophysiology of major depression. *Neuropeptides*, 43:341-353.
- Heim C, Nemeroff CB** (2001). The role of childhood trauma in the neurobiology of mood and anxiety disorders: preclinical and clinical studies. *Biol Psychiatry*, 49:1023-1039.
- Heim C, Plotsky PM, Nemeroff CB** (2004). Importance of studying the contributions of early adverse experience to neurobiological findings in depression. *Neuropsychopharmacology*, 29:641-648.
- Heldt SA, Stanek L, Chhatwal JP, Ressler KJ** (2007). Hippocampus-specific deletion of BDNF in adult mice impairs spatial memory and extinction of aversive memories. *Mol Psychiatry*, 12:656-670.
- Henn FA, Vollmayr B** (2004). Neurogenesis and depression: etiology or epiphenomenon? *Biol Psychiatry*, 56:146-150.
- Hervieu GJ, Cluderay JE, Harrison DC, Roberts JC, Leslie RA** (2001). Gene expression and protein distribution of the orexin-1 receptor in the rat brain and spinal cord. *Neuroscience*, 103:777-797.
- Heuser IJ, Schweiger U, Gotthardt U, Schmider J, Lammers CH, Dettling M, Yassouridis A, Holsboer F** (1996). Pituitary-adrenal-system regulation and psychopathology during amitriptyline treatment in elderly depressed patients and normal comparison subjects. *Am J Psychiatry*, 153:93-99.
- Hill J, Duckworth M, Murdock P, Rennie G, Sabido-David C, Ames RS, Szekeres P, Wilson S, Bergsma DJ, Gloger IS, Levy DS, Chambers JK, Muir AI** (2001). Molecular cloning and functional characterization of MCH2, a novel human MCH receptor. *J Biol Chem*, 276:20125-20129.
- Hindmarch I** (2002). Beyond the monoamine hypothesis: mechanisms, molecules and methods. *Eur Psychiatry*, 17 Suppl 3:294-299.
- Hobson JA, McCarley RW, Wyzinski PW** (1975). Sleep cycle oscillation: reciprocal discharge by two brainstem neuronal groups. *Science*, 189:55-58.
- Hoes MJ** (1982). Monoamines in Psychiatry: the role of serotonin in depression, anxiety and stress. *Acta Psychiatr Belg*, 82:287-309.

Références bibliographiques

- Hokfelt T, Broberger C, Xu ZQ, Sergeev V, Ubink R, Diez M** (2000). Neuropeptides--an overview. *Neuropharmacology*, 39:1337-1356.
- Holick KA, Lee DC, Hen R, Dulawa SC** (2008). Behavioral effects of chronic fluoxetine in BALB/cJ mice do not require adult hippocampal neurogenesis or the serotonin 1A receptor. *Neuropsychopharmacology*, 33:406-417.
- Hollander JA, Lu Q, Cameron MD, Kamenecka TM, Kenny PJ** (2008). Insular hypocretin transmission regulates nicotine reward. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 105:19480-19485.
- Holmans P, Weissman MM, Zubenkov GS, Scheftner WA, Crowe RR, Depaulo JR, Jr., Knowles JA, Zubenkov WN, Murphy-Eberenz K, Marta DH, Boutelle S, McInnis MG, Adams P, Gladis M, Steele J, Miller EB, Potash JB, Mackinnon DF, Levinson DF** (2007). Genetics of recurrent early-onset major depression (GenRED): final genome scan report. *Am J Psychiatry*, 164:248-258.
- Holmes A, Heilig M, Rupniak NM, Steckler T, Griebel G** (2003). Neuropeptide systems as novel therapeutic targets for depression and anxiety disorders. *Trends Pharmacol Sci*, 24:580-588.
- Holmes A, le Guisquet AM, Vogel E, Millstein RA, Leman S, Belzung C** (2005). Early life genetic, epigenetic and environmental factors shaping emotionality in rodents. *Neurosci Biobehav Rev*, 29:1335-1346.
- Holmqvist T, Akerman KE, Kukkonen JP** (2001). High specificity of human orexin receptors for orexins over neuropeptide Y and other neuropeptides. *Neurosci Lett*, 305:177-180.
- Holsboer F** (2000). The corticosteroid receptor hypothesis of depression. *Neuropsychopharmacology*, 23:477-501.
- Holsboer F** (2001). Stress, hypercortisolism and corticosteroid receptors in depression: implications for therapy. *J Affect Disord*, 62:77-91.
- Holsboer F, Barden N** (1996). Antidepressants and hypothalamic-pituitary-adrenocortical regulation. *Endocr Rev*, 17:187-205.
- Horvath TL, Diano S, van den Pol AN** (1999a). Synaptic interaction between hypocretin (orexin) and neuropeptide Y cells in the rodent and primate hypothalamus: a novel circuit implicated in metabolic and endocrine regulations. *J Neurosci*, 19:1072-1087.
- Horvath TL, Gao XB** (2005). Input organization and plasticity of hypocretin neurons: possible clues to obesity's association with insomnia. *Cell Metab*, 1:279-286.
- Horvath TL, Peyron C, Diano S, Ivanov A, Aston-Jones G, Kilduff TS, van den Pol AN** (1999b). Hypocretin (orexin) activation and synaptic innervation of the locus coeruleus noradrenergic system. *J Comp Neurol*, 415:145-159.
- Howell OW, Doyle K, Goodman JH, Scharfman HE, Herzog H, Pringle A, Beck-Sickinger AG, Gray WP** (2005). Neuropeptide Y stimulates neuronal precursor proliferation in the post-natal and adult dentate gyrus. *J Neurochem*, 93:560-570.
- Huang GJ, Bannerman D, Flint J** (2008). Chronic fluoxetine treatment alters behavior, but not adult hippocampal neurogenesis, in BALB/cJ mice. *Mol Psychiatry*, 13:119-121.
- Huang ZL, Qu WM, Li WD, Mochizuki T, Eguchi N, Watanabe T, Urade Y, Hayaishi O** (2001). Arousal effect of orexin A depends on activation of the histaminergic system. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 98:9965-9970.
- Huhman KL** (2006). Social conflict models: can they inform us about human psychopathology? *Horm Behav*, 50:640-646.
- Ibarguen-Vargas Y, Surget A, Touma C, Palme R, Belzung C** (2008). Multifaceted strain-specific effects in a mouse model of depression and of antidepressant reversal. *Psychoneuroendocrinology*, 33:1357-1368.

Références bibliographiques

- Ibarguen-Vargas Y, Surget A, Vourc'h P, Leman S, Andres CR, Gardier AM, Belzung C** (2009). Deficit in BDNF does not increase vulnerability to stress but dampens antidepressant-like effects in the unpredictable chronic mild stress. *Behav Brain Res*, 202:245-251.
- Ida T, Nakahara K, Katayama T, Murakami N, Nakazato M** (1999). Effect of lateral cerebroventricular injection of the appetite-stimulating neuropeptide, orexin and neuropeptide Y, on the various behavioral activities of rats. *Brain Res*, 821:526-529.
- Ida T, Nakahara K, Kuroiwa T, Fukui K, Nakazato M, Murakami T, Murakami N** (2000a). Both corticotropin releasing factor and neuropeptide Y are involved in the effect of orexin (hypocretin) on the food intake in rats. *Neurosci Lett*, 293:119-122.
- Ida T, Nakahara K, Murakami T, Hanada R, Nakazato M, Murakami N** (2000b). Possible involvement of orexin in the stress reaction in rats. *Biochem Biophys Res Commun*, 270:318-323.
- Ito N, Yabe T, Gamo Y, Nagai T, Oikawa T, Yamada H, Hanawa T** (2008). I.c.v. administration of orexin-A induces an antidepressive-like effect through hippocampal cell proliferation. *Neuroscience*, 157:720-732.
- Ito N, Yabe T, Nagai T, Oikawa T, Yamada H, Hanawa T** (2009). A possible mechanism underlying an antidepressive-like effect of Kososan, a Kampo medicine, via the hypothalamic orexinergic system in the stress-induced depression-like model mice. *Biol Pharm Bull*, 32:1716-1722.
- Jacobs BL, van Praag H, Gage FH** (2000). Adult brain neurogenesis and psychiatry: a novel theory of depression. *Mol Psychiatry*, 5:262-269.
- Jacobsen E** (1986). The early history of psychotherapeutic drugs. *Psychopharmacology (Berl)*, 89:138-144.
- Jahn H, Schick M, Kiefer F, Kellner M, Yassouridis A, Wiedemann K** (2004). Metyrapone as additive treatment in major depression: a double-blind and placebo-controlled trial. *Arch Gen Psychiatry*, 61:1235-1244.
- Jaszberenyi M, Bujdoso E, Pataki I, Telegdy G** (2000). Effects of orexins on the hypothalamic-pituitary-adrenal system. *J Neuroendocrinol*, 12:1174-1178.
- Jaszberenyi M, Bujdoso E, Telegdy G** (2001). The role of neuropeptide Y in orexin-induced hypothalamic-pituitary-adrenal activation. *J Neuroendocrinol*, 13:438-441.
- Jay TM, Rocher C, Hotte M, Naudon L, Gurden H, Spedding M** (2004). Plasticity at hippocampal to prefrontal cortex synapses is impaired by loss of dopamine and stress: importance for psychiatric diseases. *Neurotox Res*, 6:233-244.
- Jayaram-Lindstrom N, Wennberg P, Hurd YL, Franck J** (2004). Effects of naltrexone on the subjective response to amphetamine in healthy volunteers. *J Clin Psychopharmacol*, 24:665-669.
- Jiang W, Zhang Y, Xiao L, Van Cleemput J, Ji SP, Bai G, Zhang X** (2005). Cannabinoids promote embryonic and adult hippocampus neurogenesis and produce anxiolytic- and antidepressant-like effects. *J Clin Invest*, 115:3104-3116.
- Johansson A** (2011). Recent progress in the discovery of melanin-concentrating hormone 1-receptor antagonists. *Expert Opin Ther Pat*, 21:905-925.
- Johnson PL, Truitt W, Fitz SD, Minick PE, Dietrich A, Sanghani S, Traskman-Bendz L, Goddard AW, Brundin L, Shekhar A** (2010). A key role for orexin in panic anxiety. *Nat Med*, 16:111-115.
- Johnston JP** (1968). Some observations upon a new inhibitor of monoamine oxidase in brain tissue. *Biochem Pharmacol*, 17:1285-1297.
- Johren O, Bruggemann N, Dendorfer A, Dominiak P** (2003). Gonadal steroids differentially regulate the messenger ribonucleic acid expression of pituitary orexin type 1 receptors and adrenal orexin type 2 receptors. *Endocrinology*, 144:1219-1225.

Références bibliographiques

- Johren O, Neidert SJ, Kummer M, Dendorfer A, Dominiak P** (2001). Prepro-orexin and orexin receptor mRNAs are differentially expressed in peripheral tissues of male and female rats. *Endocrinology*, 142:3324-3331.
- Joiner TE, Jr., Steer RA, Abramson LY, Alloy LB, Metalsky GI, Schmidt NB** (2001). Hopelessness depression as a distinct dimension of depressive symptoms among clinical and non-clinical samples. *Behav Res Ther*, 39:523-536.
- Jolas T, Haj-Dahmane S, Kidd EJ, Langlois X, Lanfumey L, Fattaccini CM, Vantalon V, Laporte AM, Adrien J, Gozlan H, .** (1994). Central pre- and postsynaptic 5-HT1A receptors in rats treated chronically with a novel antidepressant, cericlamine. *J Pharmacol Exp Ther*, 268:1432-1443.
- Joyce PR, Mulder RT, McKenzie JM, Luty SE, Cloninger CR** (2004). Atypical depression, atypical temperament and a differential antidepressant response to fluoxetine and nortriptyline. *Depress Anxiety*, 19:180-186.
- Judd LL, Akiskal HS, Maser JD, Zeller PJ, Endicott J, Coryell W, Paulus MP, Kunovac JL, Leon AC, Mueller TI, Rice JA, Keller MB** (1998). A prospective 12-year study of subsyndromal and syndromal depressive symptoms in unipolar major depressive disorders. *Arch Gen Psychiatry*, 55:694-700.
- Kadotani H, Faraco J, Mignot E** (1998). Genetic studies in the sleep disorder narcolepsy. *Genome Res*, 8:427-434.
- Kametani H, Kawamura H** (1990). Alterations in acetylcholine release in the rat hippocampus during sleep-wakefulness detected by intracerebral dialysis. *Life Sci*, 47:421-426.
- Kaplan MS, Hinds JW** (1977). Neurogenesis in the adult rat: electron microscopic analysis of light radioautographs. *Science*, 197:1092-1094.
- Karege F, Vaudan G, Schwald M, Perroud N, La HR** (2005). Neurotrophin levels in postmortem brains of suicide victims and the effects of antemortem diagnosis and psychotropic drugs. *Brain Res Mol Brain Res*, 136:29-37.
- Karteris E, Machado RJ, Chen J, Zervou S, Hillhouse EW, Randeva HS** (2005). Food deprivation differentially modulates orexin receptor expression and signaling in rat hypothalamus and adrenal cortex. *Am J Physiol Endocrinol Metab*, 288:E1089-E1100.
- Karteris E, Randeva HS, Grammatopoulos DK, Jaffe RB, Hillhouse EW** (2001). Expression and coupling characteristics of the CRH and orexin type 2 receptors in human fetal adrenals. *J Clin Endocrinol Metab*, 86:4512-4519.
- Kastin AJ, Akerstrom V** (1999). Orexin A but not orexin B rapidly enters brain from blood by simple diffusion. *J Pharmacol Exp Ther*, 289:219-223.
- Katz RJ, Roth KA, Carroll BJ** (1981a). Acute and chronic stress effects on open field activity in the rat: implications for a model of depression. *Neurosci Biobehav Rev*, 5:247-251.
- Katz RJ, Roth KA, Schmaltz K** (1981b). Amphetamine and tranlycypromine in an animal model of depression: pharmacological specificity of the reversal effect. *Neurosci Biobehav Rev*, 5:259-264.
- Kawauchi H, Kawazoe I, Tsubokawa M, Kishida M, Baker BI** (1983). Characterization of melanin-concentrating hormone in chum salmon pituitaries. *Nature*, 305:321-323.
- Kendler KS** (2001). Twin studies of psychiatric illness: an update. *Arch Gen Psychiatry*, 58:1005-1014.
- Kendler KS, Eaves LJ, Walters EE, Neale MC, Heath AC, Kessler RC** (1996). The identification and validation of distinct depressive syndromes in a population-based sample of female twins. *Arch Gen Psychiatry*, 53:391-399.
- Kendler KS, Gardner CO, Prescott CA** (2002). Toward a comprehensive developmental model for major depression in women. *Am J Psychiatry*, 159:1133-1145.

Références bibliographiques

- Kendler KS, Gatz M, Gardner CO, Pedersen NL** (2006). A Swedish national twin study of lifetime major depression. *Am J Psychiatry*, 163:109-114.
- Kendler KS, Karkowski LM, Prescott CA** (1999). Causal relationship between stressful life events and the onset of major depression. *Am J Psychiatry*, 156:837-841.
- Kendler KS, Kessler RC, Neale MC, Heath AC, Eaves LJ** (1993a). The prediction of major depression in women: toward an integrated etiologic model. *Am J Psychiatry*, 150:1139-1148.
- Kendler KS, Kessler RC, Walters EE, MacLean C, Neale MC, Heath AC, Eaves LJ** (1995). Stressful life events, genetic liability, and onset of an episode of major depression in women. *Am J Psychiatry*, 152:833-842.
- Kendler KS, Kuhn JW, Vittum J, Prescott CA, Riley B** (2005). The interaction of stressful life events and a serotonin transporter polymorphism in the prediction of episodes of major depression: a replication. *Arch Gen Psychiatry*, 62:529-535.
- Kendler KS, Neale M, Kessler R, Heath A, Eaves L** (1993b). A twin study of recent life events and difficulties. *Arch Gen Psychiatry*, 50:789-796.
- Kendler KS, Neale MC, Kessler RC, Heath AC, Eaves LJ** (1992). Childhood parental loss and adult psychopathology in women. A twin study perspective. *Arch Gen Psychiatry*, 49:109-116.
- Kessler RC, Berglund P, Demler O, Jin R, Koretz D, Merikangas KR, Rush AJ, Walters EE, Wang PS** (2003). The epidemiology of major depressive disorder: results from the National Comorbidity Survey Replication (NCS-R). *JAMA*, 289:3095-3105.
- Kessler RC, Ustun TB** (2004). The World Mental Health (WMH) Survey Initiative Version of the World Health Organization (WHO) Composite International Diagnostic Interview (CIDI). *Int J Methods Psychiatr Res*, 13:93-121.
- Kilpatrick DG, Koenen KC, Ruggiero KJ, Acierno R, Galea S, Resnick HS, Roitzsch J, Boyle J, Gelernter J** (2007). The serotonin transporter genotype and social support and moderation of posttraumatic stress disorder and depression in hurricane-exposed adults. *Am J Psychiatry*, 164:1693-1699.
- Kim JJ, Diamond DM** (2002). The stressed hippocampus, synaptic plasticity and lost memories. *Nat Rev Neurosci*, 3:453-462.
- Kim MJ, Hamilton JP, Gotlib IH** (2008). Reduced caudate gray matter volume in women with major depressive disorder. *Psychiatry Res*, 164:114-122.
- Kirchgessner AL, Liu M** (1999). Orexin synthesis and response in the gut. *Neuron*, 24:941-951.
- Kirsch I, Deacon BJ, Huedo-Medina TB, Scoboria A, Moore TJ, Johnson BT** (2008). Initial severity and antidepressant benefits: a meta-analysis of data submitted to the Food and Drug Administration. *PLoS Med*, 5:e45.
- Klerman GL, Cole JO** (1965). Clinical pharmacology of imipramine and related antidepressant compounds. *Pharmacol Rev*, 17:101-141.
- Kodama M, Fujioka T, Duman RS** (2004). Chronic olanzapine or fluoxetine administration increases cell proliferation in hippocampus and prefrontal cortex of adult rat. *Biol Psychiatry*, 56:570-580.
- Koerts J, Leenders KL, Koning M, Portman AT, van Beilen M** (2007). Striatal dopaminergic activity (FDOPA-PET) associated with cognitive items of a depression scale (MADRS) in Parkinson's disease. *Eur J Neurosci*, 25:3132-3136.
- Kok SW, Roelfsema F, Overeem S, Lammers GJ, Strijers RL, Frolich M, Meinders AE, Pijl H** (2002). Dynamics of the pituitary-adrenal ensemble in hypocretin-deficient narcoleptic humans: blunted basal adrenocorticotropin release and evidence for normal time-keeping by the master pacemaker. *J Clin Endocrinol Metab*, 87:5085-5091.
- Koob GF** (2008). A role for brain stress systems in addiction. *Neuron*, 59:11-34.

Références bibliographiques

- Koolhaas JM, De Boer SF, De Rutter AJ, Meerlo P, Sgoifo A** (1997). Social stress in rats and mice. *Acta Physiol Scand Suppl*, 640:69-72.
- Korotkova TM, Sergeeva OA, Eriksson KS, Haas HL, Brown RE** (2003). Excitation of ventral tegmental area dopaminergic and nondopaminergic neurons by orexins/hypocretins. *J Neurosci*, 23:7-11.
- Kotz CM** (2006). Integration of feeding and spontaneous physical activity: role for orexin. *Physiol Behav*, 88:294-301.
- Kozlovsky N, Matar MA, Kaplan Z, Kotler M, Zohar J, Cohen H** (2007). Long-term down-regulation of BDNF mRNA in rat hippocampal CA1 subregion correlates with PTSD-like behavioural stress response. *Int J Neuropsychopharmacol*, 10:741-758.
- Kranz GS, Kasper S, Lanzenberger R** (2010). Reward and the serotonergic system. *Neuroscience*, 166:1023-1035.
- Krishnan V, Han MH, Graham DL, Berton O, Renthal W, Russo SJ, Laplant Q, Graham A, Lutter M, Lagace DC, Ghose S, Reister R, Tannous P, Green TA, Neve RL, Chakravarty S, Kumar A, Eisch AJ, Self DW, Lee FS, Tamminga CA, Cooper DC, Gershenfeld HK, Nestler EJ** (2007). Molecular adaptations underlying susceptibility and resistance to social defeat in brain reward regions. *Cell*, 131:391-404.
- Kuhn HG, Dickinson-Anson H, Gage FH** (1996). Neurogenesis in the dentate gyrus of the adult rat: age-related decrease of neuronal progenitor proliferation. *J Neurosci*, 16:2027-2033.
- Kuhn R** (1958). The treatment of depressive states with G 22355 (imipramine hydrochloride). *Am J Psychiatry*, 115:459-464.
- Kulkarni VA, Jha S, Vaidya VA** (2002). Depletion of norepinephrine decreases the proliferation, but does not influence the survival and differentiation, of granule cell progenitors in the adult rat hippocampus. *Eur J Neurosci*, 16:2008-2012.
- Kumar S, Szymusiak R, Bashir T, Rai S, McGinty D, Alam MN** (2007). Effects of serotonin on perifornical-lateral hypothalamic area neurons in rat. *Eur J Neurosci*, 25:201-212.
- Kupfer DJ** (1976). REM latency: a psychobiologic marker for primary depressive disease. *Biol Psychiatry*, 11:159-174.
- Kupfer DJ, Ulrich RF, Coble PA, Jarrett DB, Grochocinski VJ, Doman J, Matthews G, Borbely AA** (1985). Electroencephalographic sleep of younger depressives. Comparison with normals. *Arch Gen Psychiatry*, 42:806-810.
- Kuru M, Ueta Y, Serino R, Nakazato M, Yamamoto Y, Shibuya I, Yamashita H** (2000). Centrally administered orexin/hypocretin activates HPA axis in rats. *Neuroreport*, 11:1977-1980.
- Kuwaki T** (2010). Hypothalamic modulation of breathing. *Adv Exp Med Biol*, 669:243-247.
- Kuwaki T** (2011). Orexin links emotional stress to autonomic functions. *Auton Neurosci*, 161:20-27.
- Ladd CO, Huot RL, Thirivikraman KV, Nemeroff CB, Meaney MJ, Plotsky PM** (2000). Long-term behavioral and neuroendocrine adaptations to adverse early experience. *Prog Brain Res*, 122:81-103.
- Lagos P, Torterolo P, Jantos H, Chase MH, Monti JM** (2009). Effects on sleep of melanin-concentrating hormone (MCH) microinjections into the dorsal raphe nucleus. *Brain Res*, 1265:103-110.
- Lagos P, Urbanavicius J, Scorza MC, Miraballes R, Torterolo P** (2011). Depressive-like profile induced by MCH microinjections into the dorsal raphe nucleus evaluated in the forced swim test. *Behav Brain Res*, 218:259-266.

Références bibliographiques

- Lambe EK, Aghajanian GK** (2003). Hypocretin (orexin) induces calcium transients in single spines postsynaptic to identified thalamocortical boutons in prefrontal slice. *Neuron*, 40:139-150.
- Lambe EK, Olausson P, Horst NK, Taylor JR, Aghajanian GK** (2005). Hypocretin and nicotine excite the same thalamocortical synapses in prefrontal cortex: correlation with improved attention in rat. *J Neurosci*, 25:5225-5229.
- Lambert G, Johansson M, Agren H, Friberg P** (2000). Reduced brain norepinephrine and dopamine release in treatment-refractory depressive illness: evidence in support of the catecholamine hypothesis of mood disorders. *Arch Gen Psychiatry*, 57:787-793.
- Lammers GJ, Pijl H, Iestra J, Langius JA, Buunk G, Meinders AE** (1996). Spontaneous food choice in narcolepsy. *Sleep*, 19:75-76.
- Landrø NI, Stiles TC, Sletvold H** (2001). Neuropsychological function in nonpsychotic unipolar major depression. *Neuropsychiatry Neuropsychol Behav Neurol*, 14:233-240.
- Lauriello J, Kenny WM, Sutton L, Golshan S, Ruiz C, Kelsoe J, Rapaport M, Gillin JC** (1993). The cholinergic REM sleep induction test with pilocarpine in mildly depressed patients and normal controls. *Biol Psychiatry*, 33:33-39.
- Lavergne F, Jay TM** (2010). A new strategy for antidepressant prescription. *Front Neurosci*, 4:192.
- Law AJ, Pei Q, Walker M, Gordon-Andrews H, Weickert CS, Feldon J, Pryce CR, Harrison PJ** (2009). Early parental deprivation in the marmoset monkey produces long-term changes in hippocampal expression of genes involved in synaptic plasticity and implicated in mood disorder. *Neuropsychopharmacology*, 34:1381-1394.
- Lawrence AJ, Cowen MS, Yang HJ, Chen F, Oldfield B** (2006). The orexin system regulates alcohol-seeking in rats. *Br J Pharmacol*, 148:752-759.
- Lecrubier Y, Guelfi JD** (1990). Efficacy of reversible inhibitors of monoamine oxidase-A in various forms of depression. *Acta Psychiatr Scand Suppl*, 360:18-23.
- Lee E, Son H** (2009). Adult hippocampal neurogenesis and related neurotrophic factors. *BMB Rep*, 42:239-244.
- Lee JH, Bang E, Chae KJ, Kim JY, Lee DW, Lee W** (1999). Solution structure of a new hypothalamic neuropeptide, human hypocretin-2/orexin-B. *Eur J Biochem*, 266:831-839.
- Lee MG, Hassani OK, Jones BE** (2005a). Discharge of identified orexin/hypocretin neurons across the sleep-waking cycle. *J Neurosci*, 25:6716-6720.
- Lee R, Geraciotti TD, Jr., Kasckow JW, Coccaro EF** (2005b). Childhood trauma and personality disorder: positive correlation with adult CSF corticotropin-releasing factor concentrations. *Am J Psychiatry*, 162:995-997.
- Lehmann HE, Cahn CH, De Verteuil RL** (1958). The treatment of depressive conditions with imipramine (G 22355). *Can Psychiatr Assoc J*, 3:155-164.
- Leibenluft E, Wehr TA** (1992). Is sleep deprivation useful in the treatment of depression? *Am J Psychiatry*, 149:159-168.
- Lembo PM, Grazzini E, Cao J, Hubatsch DA, Pelletier M, Hoffert C, St-Onge S, Pou C, Labrecque J, Groblewski T, O'Donnell D, Payza K, Ahmad S, Walker P** (1999). The receptor for the orexigenic peptide melanin-concentrating hormone is a G-protein-coupled receptor. *Nat Cell Biol*, 1:267-271.
- Leonard BE** (2001). Stress, norepinephrine and depression. *J Psychiatry Neurosci*, 26 Suppl:S11-S16.
- Lesch KP, Bengel D, Heils A, Sabol SZ, Greenberg BD, Petri S, Benjamin J, Muller CR, Hamer DH, Murphy DL** (1996). Association of anxiety-related traits with a polymorphism in the serotonin transporter gene regulatory region. *Science*, 274:1527-1531.

Références bibliographiques

- Lesch KP, Mossner R** (2006). Inactivation of 5HT transport in mice: modeling altered 5HT homeostasis implicated in emotional dysfunction, affective disorders, and somatic syndromes. *Handb Exp Pharmacol*, 417-456.
- Leventopoulos M, Russig H, Feldon J, Pryce CR, Opacka-Juffry J** (2009). Early deprivation leads to long-term reductions in motivation for reward and 5-HT1A binding and both effects are reversed by fluoxetine. *Neuropharmacology*, 56:692-701.
- Levinson DF** (2006). The genetics of depression: a review. *Biol Psychiatry*, 60:84-92.
- Levinson DF, Evgrafov OV, Knowles JA, Potash JB, Weissman MM, Scheftner WA, Depaulo JR, Jr., Crowe RR, Murphy-Eberenz K, Marta DH, McInnis MG, Adams P, Gladis M, Miller EB, Thomas J, Holmans P** (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*, 164:259-264.
- Levitan RD, Vaccarino FJ, Brown GM, Kennedy SH** (2002). Low-dose dexamethasone challenge in women with atypical major depression: pilot study. *J Psychiatry Neurosci*, 27:47-51.
- Levitt DR, Teitelbaum P** (1975). Somnolence, akinesia, and sensory activation of motivated behavior in the lateral hypothalamic syndrome. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 72:2819-2823.
- Li B, Chen F, Ye J, Chen X, Yan J, Li Y, Xiong Y, Zhou Z, Xia J, Hu Z** (2010). The modulation of orexin A on HCN currents of pyramidal neurons in mouse prelimbic cortex. *Cereb Cortex*, 20:1756-1767.
- Li Y, Gao XB, Sakurai T, van den Pol AN** (2002). Hypocretin/Orexin excites hypocretin neurons via a local glutamate neuron-A potential mechanism for orchestrating the hypothalamic arousal system. *Neuron*, 36:1169-1181.
- Li Y, van den Pol AN** (2005). Direct and indirect inhibition by catecholamines of hypocretin/orexin neurons. *J Neurosci*, 25:173-183.
- Liberzon I, Zubieta JK, Fig LM, Phan KL, Koeppe RA, Taylor SF** (2002). mu-Opioid receptors and limbic responses to aversive emotional stimuli. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 99:7084-7089.
- Lin L, Faraco J, Li R, Kadotani H, Rogers W, Lin X, Qiu X, de Jong PJ, Nishino S, Mignot E** (1999). The sleep disorder canine narcolepsy is caused by a mutation in the hypocretin (orexin) receptor 2 gene. *Cell*, 98:365-376.
- Lin L, Hungs M, Mignot E** (2001). Narcolepsy and the HLA region. *J Neuroimmunol*, 117:9-20.
- Liu RJ, Aghajanian GK** (2008). Stress blunts serotonin- and hypocretin-evoked EPSCs in prefrontal cortex: role of corticosterone-mediated apical dendritic atrophy. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 105:359-364.
- Liu RJ, van den Pol AN, Aghajanian GK** (2002). Hypocretins (orexins) regulate serotonin neurons in the dorsal raphe nucleus by excitatory direct and inhibitory indirect actions. *J Neurosci*, 22:9453-9464.
- Liu Z, Zhu F, Wang G, Xiao Z, Wang H, Tang J, Wang X, Qiu D, Liu W, Cao Z, Li W** (2006). Association of corticotropin-releasing hormone receptor1 gene SNP and haplotype with major depression. *Neurosci Lett*, 404:358-362.
- Liu ZW, Gao XB** (2007). Adenosine inhibits activity of hypocretin/orexin neurons by the A1 receptor in the lateral hypothalamus: a possible sleep-promoting effect. *J Neurophysiol*, 97:837-848.
- Loomer HP, Saunders JC, Kline NS** (1957). A clinical and pharmacodynamic evaluation of iproniazid as a psychic energizer. *Psychiatr Res Rep Am Psychiatr Assoc*, 8:129-141.
- López León S, Croes EA, Sayed-Tabatabaei FA, Claes S, van Broeckhoven C, van Duijn CM** (2005). The dopamine D4 receptor gene 48-base-pair-repeat polymorphism and mood disorders: a meta-analysis. *Biol Psychiatry*, 57:999-1003.

Références bibliographiques

- López M, Senaris R, Gallego R, García-Caballero T, Lago F, Seoane L, Casanueva F, Diéguez C** (1999). Orexin receptors are expressed in the adrenal medulla of the rat. *Endocrinology*, 140:5991-5994.
- López M, Seoane L, Senaris RM, Diéguez C** (2001). Prepro-orexin mRNA levels in the rat hypothalamus, and orexin receptors mRNA levels in the rat hypothalamus and adrenal gland are not influenced by the thyroid status. *Neurosci Lett*, 300:171-175.
- López M, Tena-Sempere M, Diéguez C** (2010). Cross-talk between orexins (hypocretins) and the neuroendocrine axes (hypothalamic-pituitary axes). *Front Neuroendocrinol*, 31:113-127.
- López-Muñoz F, Alamo C, Cuenca E, Shen WW, Clervoy P, Rubio G** (2005). History of the discovery and clinical introduction of chlorpromazine. *Ann Clin Psychiatry*, 17:113-135.
- López-Muñoz F, Alamo C, Juckel G, Assion HJ** (2007). Half a century of antidepressant drugs: on the clinical introduction of monoamine oxidase inhibitors, tricyclics, and tetracyclics. Part I: monoamine oxidase inhibitors. *J Clin Psychopharmacol*, 27:555-559.
- López-Rubalcava C, Lucki I** (2000). Strain differences in the behavioral effects of antidepressant drugs in the rat forced swimming test. *Neuropsychopharmacology*, 22:191-199.
- Louis C, Cohen C, Depoortere R, Griebel G** (2006). Antidepressant-like effects of the corticotropin-releasing factor 1 receptor antagonist, SSR125543, and the vasopressin 1b receptor antagonist, SSR149415, in a DRL-72 s schedule in the rat. *Neuropsychopharmacology*, 31:2180-2187.
- Lu XY, Bagnol D, Burke S, Akil H, Watson SJ** (2000). Differential distribution and regulation of OX1 and OX2 orexin/hypocretin receptor messenger RNA in the brain upon fasting. *Horm Behav*, 37:335-344.
- Lubkin M, Stricker-Krongrad A** (1998). Independent feeding and metabolic actions of orexins in mice. *Biochem Biophys Res Commun*, 253:241-245.
- Lucas G, Rymar VV, Du J, Mnie-Filali O, Bisgaard C, Manta S, Lambas-Senas L, Wiborg O, Haddjeri N, Pineyro G, Sadikot AF, Debonnel G** (2007). Serotonin(4) (5-HT(4)) receptor agonists are putative antidepressants with a rapid onset of action. *Neuron*, 55:712-725.
- Lucki I** (1997). The forced swimming test as a model for core and component behavioral effects of antidepressant drugs. *Behav Pharmacol*, 8:523-532.
- Ludwig M, Leng G** (1997). Autoinhibition of supraoptic nucleus vasopressin neurons in vivo: a combined retrodialysis/electrophysiological study in rats. *Eur J Neurosci*, 9:2532-2540.
- Ludwig M, Leng G** (2006). Dendritic peptide release and peptide-dependent behaviours. *Nat Rev Neurosci*, 7:126-136.
- Ludwig M, Pittman QJ** (2003). Talking back: dendritic neurotransmitter release. *Trends Neurosci*, 26:255-261.
- Luthin DR** (2007). Anti-obesity effects of small molecule melanin-concentrating hormone receptor 1 (MCHR1) antagonists. *Life Sci*, 81:423-440.
- Lutter M, Krishnan V, Russo SJ, Jung S, McClung CA, Nestler EJ** (2008). Orexin signaling mediates the antidepressant-like effect of calorie restriction. *J Neurosci*, 28:3071-3075.
- Lyons WE, Mamounas LA, Ricaurte GA, Coppola V, Reid SW, Bora SH, Wihler C, Koliatsos VE, Tessarollo L** (1999). Brain-derived neurotrophic factor-deficient mice develop aggressiveness and hyperphagia in conjunction with brain serotonergic abnormalities. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 96:15239-15244.
- Maass AR, Nimmo MJ** (1959). A new inhibitor of serotonin metabolism. *Nature*, 184(Suppl 8):547-548.
- Maccari S, Darnaudery M, Morley-Fletcher S, Zuena AR, Cinque C, Van Reeth O** (2003). Prenatal stress and long-term consequences: implications of glucocorticoid hormones. *Neurosci Biobehav Rev*, 27:119-127.

Références bibliographiques

- MacQueen GM, Campbell S, McEwen BS, Macdonald K, Amano S, Joffe RT, Nahmias C, Young LT** (2003). Course of illness, hippocampal function, and hippocampal volume in major depression. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 100:1387-1392.
- MacQueen GM, Galway TM, Hay J, Young LT, Joffe RT** (2002). Recollection memory deficits in patients with major depressive disorder predicted by past depressions but not current mood state or treatment status. *Psychol Med*, 32:251-258.
- Madaan V, Wilson DR** (2009). Neuropeptides: relevance in treatment of depression and anxiety disorders. *Drug News Perspect*, 22:319-324.
- Magarinos AM, McEwen BS** (1995a). Stress-induced atrophy of apical dendrites of hippocampal CA3c neurons: comparison of stressors. *Neuroscience*, 69:83-88.
- Magarinos AM, McEwen BS** (1995b). Stress-induced atrophy of apical dendrites of hippocampal CA3c neurons: involvement of glucocorticoid secretion and excitatory amino acid receptors. *Neuroscience*, 69:89-98.
- Maier SF** (1984). Learned helplessness and animal models of depression. *Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry*, 8:435-446.
- Mailliet F, Qi H, Rocher C, Spedding M, Svenningsson P, Jay TM** (2008). Protection of stress-induced impairment of hippocampal/prefrontal LTP through blockade of glucocorticoid receptors: implication of MEK signaling. *Exp Neurol*, 211:593-596.
- Malberg JE, Duman RS** (2003). Cell proliferation in adult hippocampus is decreased by inescapable stress: reversal by fluoxetine treatment. *Neuropsychopharmacology*, 28:1562-1571.
- Malberg JE, Eisch AJ, Nestler EJ, Duman RS** (2000). Chronic antidepressant treatment increases neurogenesis in adult rat hippocampus. *J Neurosci*, 20:9104-9110.
- Malendowicz LK, Hochol A, Ziolkowska A, Nowak M, Gottardo L, Nussdorfer GG** (2001). Prolonged orexin administration stimulates steroid-hormone secretion, acting directly on the rat adrenal gland. *Int J Mol Med*, 7:401-404.
- Malendowicz LK, Tortorella C, Nussdorfer GG** (1999). Orexins stimulate corticosterone secretion of rat adrenocortical cells, through the activation of the adenylate cyclase-dependent signaling cascade. *J Steroid Biochem Mol Biol*, 70:185-188.
- Malherbe P, Borroni E, Pinard E, Wettstein JG, Knoflach F** (2009). Biochemical and electrophysiological characterization of almorexant, a dual orexin 1 receptor (OX1)/orexin 2 receptor (OX2) antagonist: comparison with selective OX1 and OX2 antagonists. *Mol Pharmacol*, 76:618-631.
- Malkesman O, Weller A** (2009). Two different putative genetic animal models of childhood depression--a review. *Prog Neurobiol*, 88:153-169.
- Manji HK, Moore GJ, Chen G** (2000). Clinical and preclinical evidence for the neurotrophic effects of mood stabilizers: implications for the pathophysiology and treatment of manic-depressive illness. *Biol Psychiatry*, 48:740-754.
- Mann JJ** (2003). Neurobiology of suicidal behaviour. *Nat Rev Neurosci*, 4:819-828.
- Mann JJ** (2005). The medical management of depression. *N Engl J Med*, 353:1819-1834.
- Marchant NJ, Furlong TM, McNally GP** (2010). Medial dorsal hypothalamus mediates the inhibition of reward seeking after extinction. *J Neurosci*, 30:14102-14115.
- Marchant NJ, Hamlin AS, McNally GP** (2009). Lateral hypothalamus is required for context-induced reinstatement of extinguished reward seeking. *J Neurosci*, 29:1331-1342.
- Marcus JN, Aschkenasi CJ, Lee CE, Chemelli RM, Saper CB, Yanagisawa M, Elmquist JK** (2001). Differential expression of orexin receptors 1 and 2 in the rat brain. *J Comp Neurol*, 435:6-25.

Références bibliographiques

- Marrosu F, Portas C, Mascia MS, Casu MA, Fa M, Giagheddu M, Imperato A, Gessa GL** (1995). Microdialysis measurement of cortical and hippocampal acetylcholine release during sleep-wake cycle in freely moving cats. *Brain Res*, 671:329-332.
- Marsh DJ, Weingarth DT, Novi DE, Chen HY, Trumbauer ME, Chen AS, Guan XM, Jiang MM, Feng Y, Camacho RE, Shen Z, Frazier EG, Yu H, Metzger JM, Kuca SJ, Shearman LP, Gopal-Truter S, MacNeil DJ, Strack AM, MacIntyre DE, Van der Ploeg LH, Qian S** (2002). Melanin-concentrating hormone 1 receptor-deficient mice are lean, hyperactive, and hyperphagic and have altered metabolism. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 99:3240-3245.
- Martin P, Soubrie P, Puech AJ** (1990). Reversal of helpless behavior by serotonin uptake blockers in rats. *Psychopharmacology (Berl)*, 101:403-407.
- Martinot M, Bragulat V, Artiges E, Dolle F, Hinnen F, Jouvent R, Martinot J** (2001). Decreased presynaptic dopamine function in the left caudate of depressed patients with affective flattening and psychomotor retardation. *Am J Psychiatry*, 158:314-316.
- Matsuki T, Nomiyama M, Takahira H, Hirashima N, Kunita S, Takahashi S, Yagami K, Kilduff TS, Bettler B, Yanagisawa M, Sakurai T** (2009). Selective loss of GABA(B) receptors in orexin-producing neurons results in disrupted sleep/wakefulness architecture. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 106:4459-4464.
- Matsumoto T, Azekawa T, Uchikado H, Ozaki S, Hasegawa N, Takekawa Y, Matsushita S** (2011). Comparative study of suicide risk in depressive disorder patients with and without problem drinking. *Psychiatry Clin Neurosci*, 65:529-532.
- Matsuo K, Rosenberg DR, Easter PC, MacMaster FP, Chen HH, Nicoletti M, Caetano SC, Hatch JP, Soares JC** (2008). Striatal volume abnormalities in treatment-naïve patients diagnosed with pediatric major depressive disorder. *J Child Adolesc Psychopharmacol*, 18:121-131.
- Maudhuit C, Hamon M, Adrien J** (1996a). Effects of chronic treatment with zimelidine and REM sleep deprivation on the regulation of raphe neuronal activity in a rat model of depression. *Psychopharmacology (Berl)*, 124:267-274.
- Maudhuit C, Jolas T, Chastanet M, Hamon M, Adrien J** (1996b). Reduced inhibitory potency of serotonin reuptake blockers on central serotonergic neurons in rats selectively deprived of rapid eye movement sleep. *Biol Psychiatry*, 40:1000-1007.
- Mayberg HS, Lozano AM, Voon V, McNeely HE, Seminowicz D, Hamani C, Schwab JM, Kennedy SH** (2005). Deep brain stimulation for treatment-resistant depression. *Neuron*, 45:651-660.
- Mazzocchi G, Malendowicz LK, Gottardo L, Aragona F, Nussdorfer GG** (2001). Orexin A stimulates cortisol secretion from human adrenocortical cells through activation of the adenylate cyclase-dependent signaling cascade. *J Clin Endocrinol Metab*, 86:778-782.
- McBriar MD** (2006). Recent advances in the discovery of melanin-concentrating hormone receptor antagonists. *Curr Opin Drug Discov Devel*, 9:496-508.
- McCabe C, Cowen PJ, Harmer CJ** (2009). Neural representation of reward in recovered depressed patients. *Psychopharmacology (Berl)*, 205:667-677.
- McCabe C, Mishor Z, Cowen PJ, Harmer CJ** (2010). Diminished neural processing of aversive and rewarding stimuli during selective serotonin reuptake inhibitor treatment. *Biol Psychiatry*, 67:439-445.
- McCauley J, Kern DE, Kolodner K, Dill L, Schroeder AF, DeChant HK, Ryden J, Derogatis LR, Bass EB** (1997). Clinical characteristics of women with a history of childhood abuse: unhealed wounds. *JAMA*, 277:1362-1368.
- McCormick CM, Smythe JW, Sharma S, Meaney MJ** (1995). Sex-specific effects of prenatal stress on hypothalamic-pituitary-adrenal responses to stress and brain glucocorticoid receptor density in adult rats. *Brain Res Dev Brain Res*, 84:55-61.

Références bibliographiques

- McEwen BS** (1998a). Protective and damaging effects of stress mediators. *N Engl J Med*, 338:171-179.
- McEwen BS** (1998b). Stress, adaptation, and disease. Allostasis and allostatic load. *Ann N Y Acad Sci*, 840:33-44.
- McEwen BS** (2001). Plasticity of the hippocampus: adaptation to chronic stress and allostatic load. *Ann N Y Acad Sci*, 933:265-277.
- McEwen BS, Olie JP** (2005). Neurobiology of mood, anxiety, and emotions as revealed by studies of a unique antidepressant: tianeptine. *Mol Psychiatry*, 10:525-537.
- McKinney WT** (2001). Overview of the past contributions of animal models and their changing place in psychiatry. *Semin Clin Neuropsychiatry*, 6:68-78.
- McLaughlin RJ, Gobbi G** (2011). Cannabinoids and emotionality: a neuroanatomical perspective. *Neuroscience*, 204:134-144.
- Meerlo P, Overkamp GJ, Daan S, Van Den Hoofdakker RH, Koolhaas JM** (1996). Changes in Behaviour and Body Weight Following a Single or Double Social Defeat in Rats. *Stress*, 1:21-32.
- Meerlo P, Sgoifo A, Turek FW** (2002). The effects of social defeat and other stressors on the expression of circadian rhythms. *Stress*, 5:15-22.
- Mens WB, Witter A, van Wimersma Greidanus TB** (1983). Penetration of neurohypophyseal hormones from plasma into cerebrospinal fluid (CSF): half-times of disappearance of these neuropeptides from CSF. *Brain Res*, 262:143-149.
- Merali Z, Du L, Hrdina P, Palkovits M, Faludi G, Poulter MO, Anisman H** (2004). Dysregulation in the suicide brain: mRNA expression of corticotropin-releasing hormone receptors and GABA(A) receptor subunits in frontal cortical brain region. *J Neurosci*, 24:1478-1485.
- Merali Z, Kent P, Du L, Hrdina P, Palkovits M, Faludi G, Poulter MO, Bedard T, Anisman H** (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*, 59:594-602.
- Meshi D, Drew MR, Saxe M, Ansorge MS, David D, Santarelli L, Malapani C, Moore H, Hen R** (2006). Hippocampal neurogenesis is not required for behavioral effects of environmental enrichment. *Nat Neurosci*, 9:729-731.
- Metalsky GI, Joiner TE, Jr., Hardin TS, Abramson LY** (1993). Depressive reactions to failure in a naturalistic setting: a test of the hopelessness and self-esteem theories of depression. *J Abnorm Psychol*, 102:101-109.
- Methippara MM, Alam MN, Szymusiak R, McGinty D** (2000). Effects of lateral preoptic area application of orexin-A on sleep-wakefulness. *Neuroreport*, 11:3423-3426.
- Meynen G, Unmehopa UA, van Heerikhuizen JJ, Hofman MA, Swaab DF, Hoogendijk WJ** (2006). Increased arginine vasopressin mRNA expression in the human hypothalamus in depression: A preliminary report. *Biol Psychiatry*, 60:892-895.
- Michelson D, Stratakis C, Hill L, Reynolds J, Galliven E, Chrousos G, Gold P** (1996). Bone mineral density in women with depression. *N Engl J Med*, 335:1176-1181.
- Mieda M, Hasegawa E, Kisanuki YY, Sinton CM, Yanagisawa M, Sakurai T** (2011). Differential roles of orexin receptor-1 and -2 in the regulation of non-REM and REM sleep. *J Neurosci*, 31:6518-6526.
- Mignot E** (1998). Genetic and familial aspects of narcolepsy. *Neurology*, 50:S16-S22.
- Mignot E, Lammers GJ, Ripley B, Okun M, Nevsimanova S, Overeem S, Vankova J, Black J, Harsh J, Bassetti C, Schrader H, Nishino S** (2002). The role of cerebrospinal fluid hypocretin measurement in the diagnosis of narcolepsy and other hypersomnias. *Arch Neurol*, 59:1553-1562.

Références bibliographiques

- Mihara K, Nakamura A, Kuba T, Yakushi T, Hotta H, Kojima M, Kondo T** (2010). Ropinirole augmentation therapy in a case with treatment-resistant unipolar depression. *Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry*, 34:703-704.
- Mikrouli E, Wortwein G, Soylu R, Mathe AA, Petersen S** (2011). Increased numbers of orexin/hypocretin neurons in a genetic rat depression model. *Neuropeptides*, 45:401-406.
- Millan MJ, Gobert A, Panayi F, Rivet JM, Dekeyne A, Brocco M, Ortuno JC, Di CB** (2008). The melanin-concentrating hormone1 receptor antagonists, SNAP-7941 and GW3430, enhance social recognition and dialysate levels of acetylcholine in the frontal cortex of rats. *Int J Neuropsychopharmacol*, 11:1105-1122.
- Miller BH, Schultz LE, Gulati A, Cameron MD, Pletcher MT** (2008). Genetic regulation of behavioral and neuronal responses to fluoxetine. *Neuropsychopharmacology*, 33:1312-1322.
- Ming GL, Song H** (2005). Adult neurogenesis in the mammalian central nervous system. *Annu Rev Neurosci*, 28:223-250.
- Mintz M, Ruedi-Bettschen D, Feldon J, Pryce CR** (2005). Early social and physical deprivation leads to reduced social motivation in adulthood in Wistar rats. *Behav Brain Res*, 156:311-320.
- Modell S, Yassouridis A, Huber J, Holsboer F** (1997). Corticosteroid receptor function is decreased in depressed patients. *Neuroendocrinology*, 65:216-222.
- Modirrousta M, Mainville L, Jones BE** (2005). Orexin and MCH neurons express c-Fos differently after sleep deprivation vs. recovery and bear different adrenergic receptors. *Eur J Neurosci*, 21:2807-2816.
- Mogg K, Bradbury KE, Bradley BP** (2006). Interpretation of ambiguous information in clinical depression. *Behav Res Ther*, 44:1411-1419.
- Monleon S, D'Aquila P, Parra A, Simon VM, Brain PF, Willner P** (1995). Attenuation of sucrose consumption in mice by chronic mild stress and its restoration by imipramine. *Psychopharmacology (Berl)*, 117:453-457.
- Monzon ME, De Barioglio SR** (1999). Response to novelty after i.c.v. injection of melanin-concentrating hormone (MCH) in rats. *Physiol Behav*, 67:813-817.
- Monzon ME, Varas MM, De Barioglio SR** (2001). Anxiogenesis induced by nitric oxide synthase inhibition and anxiolytic effect of melanin-concentrating hormone (MCH) in rat brain. *Peptides*, 22:1043-1047.
- Moreau JL, Jenck F, Martin JR, Mortas P, Haefely WE** (1992). Antidepressant treatment prevents chronic unpredictable mild stress-induced anhedonia as assessed by ventral tegmentum self-stimulation behavior in rats. *Eur Neuropsychopharmacol*, 2:43-49.
- Moreno G, Perello M, Gaillard RC, Spinedi E** (2005). Orexin stimulates hypothalamic-pituitary-adrenal (HPA) axis function, but not food intake, in the absence of full hypothalamic NPY-ergic activity. *Endocrine*, 26:99-106.
- Moriguchi T, Sakurai T, Nambu T, Yanagisawa M, Goto K** (1999). Neurons containing orexin in the lateral hypothalamic area of the adult rat brain are activated by insulin-induced acute hypoglycemia. *Neurosci Lett*, 264:101-104.
- Morilak DA, Frazer A** (2004). Antidepressants and brain monoaminergic systems: a dimensional approach to understanding their behavioural effects in depression and anxiety disorders. *Int J Neuropsychopharmacol*, 7:193-218.
- Morley-Fletcher S, Darnaudery M, Mocaer E, Froger N, Lanfumey L, Laviola G, Casolini P, Zuena AR, Marzano L, Hamon M, Maccari S** (2004). Chronic treatment with imipramine reverses immobility behaviour, hippocampal corticosteroid receptors and cortical 5-HT(1A) receptor mRNA in prenatally stressed rats. *Neuropharmacology*, 47:841-847.

Références bibliographiques

- Morley-Fletcher S, Rea M, Maccari S, Laviola G** (2003). Environmental enrichment during adolescence reverses the effects of prenatal stress on play behaviour and HPA axis reactivity in rats. *Eur J Neurosci*, 18:3367-3374.
- Mu P, Neumann PA, Panksepp J, Schluter OM, Dong Y** (2011). Exposure to cocaine alters dynorphin-mediated regulation of excitatory synaptic transmission in nucleus accumbens neurons. *Biol Psychiatry*, 69:228-235.
- Mueller TI, Leon AC, Keller MB, Solomon DA, Endicott J, Coryell W, Warshaw M, Maser JD** (1999). Recurrence after recovery from major depressive disorder during 15 years of observational follow-up. *Am J Psychiatry*, 156:1000-1006.
- Muller MB, Holsboer F** (2006). Mice with mutations in the HPA-system as models for symptoms of depression. *Biol Psychiatry*, 59:1104-1115.
- Munafo MR, Brown SM, Hariri AR** (2008). Serotonin transporter (5-HTTLPR) genotype and amygdala activation: a meta-analysis. *Biol Psychiatry*, 63:852-857.
- Muñoz M, Coveñas R** (2011). NK-1 receptor antagonists: a new paradigm in pharmacological therapy. *Curr Med Chem*, 18:1820-1831.
- Muraki Y, Yamanaka A, Tsujino N, Kilduff TS, Goto K, Sakurai T** (2004). Serotonergic regulation of the orexin/hypocretin neurons through the 5-HT1A receptor. *J Neurosci*, 24:7159-7166.
- Muroya S, Funahashi H, Yamanaka A, Kohno D, Uramura K, Nambu T, Shibahara M, Kuramochi M, Takigawa M, Yanagisawa M, Sakurai T, Shioda S, Yada T** (2004). Orexins (hypocretins) directly interact with neuropeptide Y, POMC and glucose-responsive neurons to regulate Ca²⁺ signaling in a reciprocal manner to leptin: orexigenic neuronal pathways in the mediobasal hypothalamus. *Eur J Neurosci*, 19:1524-1534.
- Murphy FC, Sahakian BJ, Rubinsztein JS, Michael A, Rogers RD, Robbins TW, Paykel ES** (1999). Emotional bias and inhibitory control processes in mania and depression. *Psychol Med*, 29:1307-1321.
- Murray CJ, Lopez AD** (1996). Evidence-based health policy--lessons from the Global Burden of Disease Study. *Science*, 274:740-743.
- Murray CJ, Lopez AD** (1997a). Alternative projections of mortality and disability by cause 1990-2020: Global Burden of Disease Study. *Lancet*, 349:1498-1504.
- Murray CJ, Lopez AD** (1997b). Global mortality, disability, and the contribution of risk factors: Global Burden of Disease Study. *Lancet*, 349:1436-1442.
- Murray LA, Whitehouse WG, Alloy LB** (1999). Mood congruence and depressive deficits in memory: a forced-recall analysis. *Memory*, 7:175-196.
- Muscat R, Willner P** (1992). Suppression of sucrose drinking by chronic mild unpredictable stress: a methodological analysis. *Neurosci Biobehav Rev*, 16:507-517.
- Muschamp JW, Dominguez JM, Sato SM, Shen RY, Hull EM** (2007). A role for hypocretin (orexin) in male sexual behavior. *J Neurosci*, 27:2837-2845.
- Nair SG, Adams-Deutsch T, Pickens CL, Smith DG, Shaham Y** (2009). Effects of the MCH1 receptor antagonist SNAP 94847 on high-fat food-reinforced operant responding and reinstatement of food seeking in rats. *Psychopharmacology (Berl)*, 205:129-140.
- Nair SG, Golden SA, Shaham Y** (2008). Differential effects of the hypocretin 1 receptor antagonist SB 334867 on high-fat food self-administration and reinstatement of food seeking in rats. *Br J Pharmacol*, 154:406-416.
- Nakabayashi M, Suzuki T, Takahashi K, Totsune K, Muramatsu Y, Kaneko C, Date F, Takeyama J, Darnel AD, Moriya T, Sasano H** (2003). Orexin-A expression in human peripheral tissues. *Mol Cell Endocrinol*, 205:43-50.

Références bibliographiques

- Nakamura T, Uramura K, Nambu T, Yada T, Goto K, Yanagisawa M, Sakurai T** (2000). Orexin-induced hyperlocomotion and stereotypy are mediated by the dopaminergic system. *Brain Res*, 873:181-187.
- Nambu T, Sakurai T, Mizukami K, Hosoya Y, Yanagisawa M, Goto K** (1999). Distribution of orexin neurons in the adult rat brain. *Brain Res*, 827:243-260.
- Nanmoku T, Isobe K, Sakurai T, Yamanaka A, Takekoshi K, Kawakami Y, Ishii K, Goto K, Nakai T** (2000). Orexins suppress catecholamine synthesis and secretion in cultured PC12 cells. *Biochem Biophys Res Commun*, 274:310-315.
- Narita M, Nagumo Y, Hashimoto S, Khotib J, Miyatake M, Sakurai T, Yanagisawa M, Nakamachi T, Shioda S, Suzuki T** (2006). Direct involvement of orexinergic systems in the activation of the mesolimbic dopamine pathway and related behaviors induced by morphine. *J Neurosci*, 26:398-405.
- Narita M, Nagumo Y, Miyatake M, Ikegami D, Kurahashi K, Suzuki T** (2007). Implication of protein kinase C in the orexin-induced elevation of extracellular dopamine levels and its rewarding effect. *Eur J Neurosci*, 25:1537-1545.
- Nascimento JO, Zangrossi H, Jr., Viana MB** (2010). Effects of reversible inactivation of the dorsomedial hypothalamus on panic- and anxiety-related responses in rats. *Braz J Med Biol Res*, 43:869-873.
- Needles DJ, Abramson LY** (1990). Positive life events, attributional style, and hopefulness: testing a model of recovery from depression. *J Abnorm Psychol*, 99:156-165.
- Nemeroff CB** (1996). The corticotropin-releasing factor (CRF) hypothesis of depression: new findings and new directions. *Mol Psychiatry*, 1:336-342.
- Nestler EJ, Gould E, Manji H, Buncan M, Duman RS, Greshenfeld HK, Hen R, Koester S, Lederhendler I, Meaney M, Robbins T, Winsky L, Zalcman S** (2002). Preclinical models: status of basic research in depression. *Biol Psychiatry*, 52:503-528.
- Neumeister A, Drevets WC, Belfer I, Luckenbaugh DA, Henry S, Bonne O, Herscovitch P, Goldman D, Charney DS** (2006a). Effects of a alpha 2C-adrenoreceptor gene polymorphism on neural responses to facial expressions in depression. *Neuropsychopharmacology*, 31:1750-1756.
- Neumeister A, Hu XZ, Luckenbaugh DA, Schwarz M, Nugent AC, Bonne O, Herscovitch P, Goldman D, Drevets WC, Charney DS** (2006b). Differential effects of 5-HTTLPR genotypes on the behavioral and neural responses to tryptophan depletion in patients with major depression and controls. *Arch Gen Psychiatry*, 63:978-986.
- Neumeister A, Konstantinidis A, Stastny J, Schwarz MJ, Vitouch O, Willeit M, Praschak-Rieder N, Zach J, de Zwaan M, Bondy B, Ackenheil M, Kasper S** (2002). Association between serotonin transporter gene promoter polymorphism (5HTTLPR) and behavioral responses to tryptophan depletion in healthy women with and without family history of depression. *Arch Gen Psychiatry*, 59:613-620.
- Neumeister A, Wood S, Bonne O, Nugent AC, Luckenbaugh DA, Young T, Bain EE, Charney DS, Drevets WC** (2005). Reduced hippocampal volume in unmedicated, remitted patients with major depression versus control subjects. *Biol Psychiatry*, 57:935-937.
- Newport DJ, Stowe ZN, Nemeroff CB** (2002). Parental depression: animal models of an adverse life event. *Am J Psychiatry*, 159:1265-1283.
- Nielsen CK, Arnt J, Sanchez C** (2000). Intracranial self-stimulation and sucrose intake differ as hedonic measures following chronic mild stress: interstrain and interindividual differences. *Behav Brain Res*, 107:21-33.
- Nishino S, Ripley B, Overeem S, Lammers GJ, Mignot E** (2000). Hypocretin (orexin) deficiency in human narcolepsy. *Lancet*, 355:39-40.
- Nixon K, Crews FT** (2004). Temporally specific burst in cell proliferation increases hippocampal neurogenesis in protracted abstinence from alcohol. *J Neurosci*, 24:9714-9722.

Références bibliographiques

- Nofzinger EA** (2005). Functional neuroimaging of sleep. *Semin Neurol*, 25:9-18.
- Nofzinger EA, Schwartz RM, Reynolds CF, III, Thase ME, Jennings JR, Frank E,asiczka AL, Garamoni GL, Kupfer DJ** (1994). Affect intensity and phasic REM sleep in depressed men before and after treatment with cognitive-behavioral therapy. *J Consult Clin Psychol*, 62:83-91.
- Nolen-Hoeksema S, Morrow J** (1991). A prospective study of depression and posttraumatic stress symptoms after a natural disaster: the 1989 Loma Prieta Earthquake. *J Pers Soc Psychol*, 61:115-121.
- Nunn JD, Mathews A, Trower P** (1997). Selective processing of concern-related information in depression. *Br J Clin Psychol*, 36 (Pt 4):489-503.
- Nutt DJ** (2002). The neuropharmacology of serotonin and noradrenaline in depression. *Int Clin Psychopharmacol*, 17 Suppl 1:S1-12.
- O'Neil MF, Moore NA** (2003). Animal models of depression: are there any? *Hum Psychopharmacol*, 18:239-254.
- Ohayon MM** (2007). Insomnia: a ticking clock for depression? *J Psychiatr Res*, 41:893-894.
- Ordway GA, Schenk J, Stockmeier CA, May W, Klimek V** (2003). Elevated agonist binding to alpha2-adrenoceptors in the locus coeruleus in major depression. *Biol Psychiatry*, 53:315-323.
- Palhagen S, Qi H, Martensson B, Walinder J, Granerus AK, Svenningsson P** (2010). Monoamines, BDNF, IL-6 and corticosterone in CSF in patients with Parkinson's disease and major depression. *J Neurol*, 257:524-532.
- Papp M, Moryl E, Willner P** (1996). Pharmacological validation of the chronic mild stress model of depression. *Eur J Pharmacol*, 296:129-136.
- Papp M, Willner P, Muscat R** (1991). An animal model of anhedonia: attenuation of sucrose consumption and place preference conditioning by chronic unpredictable mild stress. *Psychopharmacology (Berl)*, 104:255-259.
- Pariante CM** (2003). Depression, stress and the adrenal axis. *J Neuroendocrinol*, 15:811-812.
- Pariante CM, Lightman SL** (2008). The HPA axis in major depression: classical theories and new developments. *Trends Neurosci*, 31:464-468.
- Pariante CM, Miller AH** (2001). Glucocorticoid receptors in major depression: relevance to pathophysiology and treatment. *Biol Psychiatry*, 49:391-404.
- Pecina S, Berridge KC** (2005). Hedonic hot spot in nucleus accumbens shell: where do mu-opioids cause increased hedonic impact of sweetness? *J Neurosci*, 25:11777-11786.
- Pecina S, Smith KS, Berridge KC** (2006). Hedonic hot spots in the brain. *Neuroscientist*, 12:500-511.
- Pelizza L, Ferrari A** (2009). Anhedonia in schizophrenia and major depression: state or trait? *Ann Gen Psychiatry*, 8:22.
- Penninx BW, Geerlings SW, Deeg DJ, van Eijk JT, van Tilburg W, Beekman AT** (1999). Minor and major depression and the risk of death in older persons. *Arch Gen Psychiatry*, 56:889-895.
- Perera TD, Coplan JD, Lisanby SH, Lipira CM, Arif M, Carpio C, Spitzer G, Santarelli L, Scharf B, Hen R, Rosoklija G, Sackeim HA, Dwork AJ** (2007). Antidepressant-induced neurogenesis in the hippocampus of adult nonhuman primates. *J Neurosci*, 27:4894-4901.
- Perlis ML, Smith LJ, Lyness JM, Matteson SR, Pigeon WR, Jungquist CR, Tu X** (2006). Insomnia as a risk factor for onset of depression in the elderly. *Behav Sleep Med*, 4:104-113.
- Perrault G, Morel E, Zivkovic B, Sanger DJ** (1992). Activity of litoxetine and other serotonin uptake inhibitors in the tail suspension test in mice. *Pharmacol Biochem Behav*, 42:45-47.

Références bibliographiques

- Peyron C, Faraco J, Rogers W, Ripley B, Overeem S, Charnay Y, Nevsimalova S, Aldrich M, Reynolds D, Albin R, Li R, Hungs M, Pedrazzoli M, Padigaru M, Kucherlapati M, Fan J, Maki R, Lammers GJ, Bouras C, Kucherlapati R, Nishino S, Mignot E** (2000). A mutation in a case of early onset narcolepsy and a generalized absence of hypocretin peptides in human narcoleptic brains. *Nat Med*, 6:991-997.
- Peyron C, Tighe DK, van den Pol AN, de Lecea L, Heller HC, Sutcliffe JG, Kilduff TS** (1998). Neurons containing hypocretin (orexin) project to multiple neuronal systems. *J Neurosci*, 18:9996-10015.
- Pezawas L, Meyer-Lindenberg A, Drabant EM, Verchinski BA, Munoz KE, Kolachana BS, Egan MF, Mattay VS, Hariri AR, Weinberger DR** (2005). 5-HTTLPR polymorphism impacts human cingulate-amygdala interactions: a genetic susceptibility mechanism for depression. *Nat Neurosci*, 8:828-834.
- Pflug B, Tolle R** (1971). Disturbance of the 24-hour rhythm in endogenous depression and the treatment of endogenous depression by sleep deprivation. *Int Pharmacopsychiatry*, 6:187-196.
- Pickar D, Davis GC, Schulz SC, Extein I, Wagner R, Naber D, Gold PW, van Kammen DP, Goodwin FK, Wyatt RJ, Li CH, Bunney WE, Jr.** (1981). Behavioral and biological effects of acute beta-endorphin injection in schizophrenic and depressed patients. *Am J Psychiatry*, 138:160-166.
- Pigott HE, Leventhal AM, Alter GS, Boren JJ** (2010). Efficacy and effectiveness of antidepressants: current status of research. *Psychother Psychosom*, 79:267-279.
- Pissios P** (2009). Animals models of MCH function and what they can tell us about its role in energy balance. *Peptides*, 30:2040-2044.
- Pitchot W, Hansenne M, Pinto E, Reggers J, Fuchs S, Ansseau M** (2005). 5-Hydroxytryptamine 1A receptors, major depression, and suicidal behavior. *Biol Psychiatry*, 58:854-858.
- Pittenger C, Duman RS** (2008). Stress, depression, and neuroplasticity: a convergence of mechanisms. *Neuropsychopharmacology*, 33:88-109.
- Pizzagalli DA, Holmes AJ, Dillon DG, Goetz EL, Birk JL, Bogdan R, Dougherty DD, Iosifescu DV, Rauch SL, Fava M** (2009). Reduced caudate and nucleus accumbens response to rewards in unmedicated individuals with major depressive disorder. *Am J Psychiatry*, 166:702-710.
- Plotsky PM, Meaney MJ** (1993). Early, postnatal experience alters hypothalamic corticotropin-releasing factor (CRF) mRNA, median eminence CRF content and stress-induced release in adult rats. *Brain Res Mol Brain Res*, 18:195-200.
- Poltyrev T, Weinstock M** (2004). Gender difference in the prevention of hyperanxiety in adult prenatally stressed rats by chronic treatment with amitriptyline. *Psychopharmacology (Berl)*, 171:270-276.
- Porsolt RD, Bertin A, Jalfre M** (1977a). Behavioral despair in mice: a primary screening test for antidepressants. *Arch Int Pharmacodyn Ther*, 229:327-336.
- Porsolt RD, Bertin A, Jalfre M** (1978). "Behavioural despair" in rats and mice: strain differences and the effects of imipramine. *Eur J Pharmacol*, 51:291-294.
- Porsolt RD, Le PM, Jalfre M** (1977b). Depression: a new animal model sensitive to antidepressant treatments. *Nature*, 266:730-732.
- Posternak MA, Zimmerman M** (2002). Partial validation of the atypical features subtype of major depressive disorder. *Arch Gen Psychiatry*, 59:70-76.
- Pothion S, Bizot JC, Trovero F, Belzung C** (2004). Strain differences in sucrose preference and in the consequences of unpredictable chronic mild stress. *Behav Brain Res*, 155:135-146.

Références bibliographiques

- Pratt LA, Ford DE, Crum RM, Armenian HK, Gallo JJ, Eaton WW** (1996). Depression, psychotropic medication, and risk of myocardial infarction. Prospective data from the Baltimore ECA follow-up. *Circulation*, 94:3123-3129.
- Prévot E, Maudhuit C, Le PE, Hamon M, Adrien J** (1996). Sleep deprivation reduces the citalopram-induced inhibition of serotonergic neuronal firing in the nucleus raphe dorsalis of the rat. *J Sleep Res*, 5:238-245.
- Pryce CR, Bettschen D, Bahr NI, Feldon J** (2001). Comparison of the effects of infant handling, isolation, and nonhandling on acoustic startle, prepulse inhibition, locomotion, and HPA activity in the adult rat. *Behav Neurosci*, 115:71-83.
- Pryce CR, Ruedi-Bettschen D, Dettling AC, Weston A, Russig H, Ferger B, Feldon J** (2005). Long-term effects of early-life environmental manipulations in rodents and primates: Potential animal models in depression research. *Neurosci Biobehav Rev*, 29:649-674.
- Purba JS, Hoogendijk WJ, Hofman MA, Swaab DF** (1996). Increased number of vasopressin- and oxytocin-expressing neurons in the paraventricular nucleus of the hypothalamus in depression. *Arch Gen Psychiatry*, 53:137-143.
- Purcell R, Maruff P, Kyrios M, Pantelis C** (1997). Neuropsychological function in young patients with unipolar major depression. *Psychol Med*, 27:1277-1285.
- Qu D, Ludwig DS, Gammeltoft S, Piper M, Pelleymounter MA, Cullen MJ, Mathes WF, Przypek R, Kanarek R, Maratos-Flier E** (1996). A role for melanin-concentrating hormone in the central regulation of feeding behaviour. *Nature*, 380:243-247.
- Quidé Y, Witteveen AB, El-Hage W, Veltman DJ, Olff M** (2011). Differences between effects of psychological versus pharmacological treatments on functional and morphological brain alterations in anxiety disorders and major depressive disorder: A systematic review. *Neurosci Biobehav Rev*, 36:626-644.
- Quirarte GL, Roozendaal B, McGaugh JL** (1997). Glucocorticoid enhancement of memory storage involves noradrenergic activation in the basolateral amygdala. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 94:14048-14053.
- Raadsheer FC, Hoogendijk WJ, Stam FC, Tilders FJ, Swaab DF** (1994). Increased numbers of corticotropin-releasing hormone expressing neurons in the hypothalamic paraventricular nucleus of depressed patients. *Neuroendocrinology*, 60:436-444.
- Raadsheer FC, van Heerikhuize JJ, Lucassen PJ, Hoogendijk WJ, Tilders FJ, Swaab DF** (1995). Corticotropin-releasing hormone mRNA levels in the paraventricular nucleus of patients with Alzheimer's disease and depression. *Am J Psychiatry*, 152:1372-1376.
- Radley JJ, Sisti HM, Hao J, Rocher AB, McCall T, Hof PR, McEwen BS, Morrison JH** (2004). Chronic behavioral stress induces apical dendritic reorganization in pyramidal neurons of the medial prefrontal cortex. *Neuroscience*, 125:1-6.
- Rainer Q, Xia L, Guilloux JP, Gabriel C, Mocaer E, Hen R, Enhamre E, Gardier AM, David DJ** (2011). Beneficial behavioural and neurogenic effects of agomelatine in a model of depression/anxiety. *Int J Neuropsychopharmacol*, 1-15.
- Rainero I, Ostacoli L, Rubino E, Gallone S, Picci LR, Fenoglio P, Negro E, Rosso C, De MP, De MM, Furlan PM, Pinessi L** (2011). Association between major mood disorders and the hypocretin receptor 1 gene. *J Affect Disord*, 130:487-491.
- Randeva HS, Karteris E, Grammatopoulos D, Hillhouse EW** (2001). Expression of orexin-A and functional orexin type 2 receptors in the human adult adrenals: implications for adrenal function and energy homeostasis. *J Clin Endocrinol Metab*, 86:4808-4813.
- Reus VI, Wolkowitz OM, Frederick S** (1997). Antigluocorticoid treatments in psychiatry. *Psychoneuroendocrinology*, 22 Suppl 1:S121-S124.
- Reynolds BA, Weiss S** (1992). Generation of neurons and astrocytes from isolated cells of the adult mammalian central nervous system. *Science*, 255:1707-1710.

Références bibliographiques

- Rezvani AH, Overstreet DH, Cleves M, Parsian A** (2007). Further genetic characterization of the fawn-hooded (FH/Wjd) rat, an animal model of comorbid depression and alcoholism. *Psychiatr Genet*, 17:77-83.
- Ripley B, Overeem S, Fujiki N, Nevsimalova S, Uchino M, Yesavage J, Di MD, Dohi K, Melberg A, Lammers GJ, Nishida Y, Roelandse FW, Hungs M, Mignot E, Nishino S** (2001). CSF hypocretin/orexin levels in narcolepsy and other neurological conditions. *Neurology*, 57:2253-2258.
- Ripoll N, David DJ, Dailly E, Hascoet M, Bourin M** (2003). Antidepressant-like effects in various mice strains in the tail suspension test. *Behav Brain Res*, 143:193-200.
- Rizk P, Salazar J, Raisman-Vozari R, Marien M, Ruberg M, Colpaert F, Debeir T** (2006). The alpha2-adrenoceptor antagonist dexefaroxan enhances hippocampal neurogenesis by increasing the survival and differentiation of new granule cells. *Neuropsychopharmacology*, 31:1146-1157.
- Robinson DS, Nies A, Ravaris CL, Lamborn KR** (1973). The monoamine oxidase inhibitor, phenelzine, in the treatment of depressive -anxiety states. A controlled clinical trial. *Arch Gen Psychiatry*, 29:407-413.
- Rocher C, Spedding M, Munoz C, Jay TM** (2004). Acute stress-induced changes in hippocampal/prefrontal circuits in rats: effects of antidepressants. *Cereb Cortex*, 14:224-229.
- Rose EJ, Ebmeier KP** (2006). Pattern of impaired working memory during major depression. *J Affect Disord*, 90:149-161.
- Rotter A, Asemann R, Decker A, Kornhuber J, Biermann T** (2011). Orexin expression and promoter-methylation in peripheral blood of patients suffering from major depressive disorder. *J Affect Disord*, 131:186-192.
- Roy M, David N, Cueva M, Giorgetti M** (2007). A study of the involvement of melanin-concentrating hormone receptor 1 (MCHR1) in murine models of depression. *Biol Psychiatry*, 61:174-180.
- Ruedi-Bettschen D, Pedersen EM, Feldon J, Pryce CR** (2005). Early deprivation under specific conditions leads to reduced interest in reward in adulthood in Wistar rats. *Behav Brain Res*, 156:297-310.
- Ruedi-Bettschen D, Zhang W, Russig H, Ferger B, Weston A, Pedersen EM, Feldon J, Pryce CR** (2006). Early deprivation leads to altered behavioural, autonomic and endocrine responses to environmental challenge in adult Fischer rats. *Eur J Neurosci*, 24:2879-2893.
- Ruhé HG, Mason NS, Schene AH** (2007). Mood is indirectly related to serotonin, norepinephrine and dopamine levels in humans: a meta-analysis of monoamine depletion studies. *Mol Psychiatry*, 12:331-359.
- Rushworth MF, Behrens TE** (2008). Choice, uncertainty and value in prefrontal and cingulate cortex. *Nat Neurosci*, 11:389-397.
- Russell SH, Small CJ, Dakin CL, Abbott CR, Morgan DG, Ghatei MA, Bloom SR** (2001). The central effects of orexin-A in the hypothalamic-pituitary-adrenal axis in vivo and in vitro in male rats. *J Neuroendocrinol*, 13:561-566.
- Rygula R, Abumaria N, Flugge G, Fuchs E, Ruther E, Havemann-Reinecke U** (2005). Anhedonia and motivational deficits in rats: impact of chronic social stress. *Behav Brain Res*, 162:127-134.
- Sahay A, Scobie KN, Hill AS, O'Carroll CM, Kheirbek MA, Burghardt NS, Fenton AA, Dranovsky A, Hen R** (2011a). Increasing adult hippocampal neurogenesis is sufficient to improve pattern separation. *Nature*, 472:466-470.
- Sahay A, Wilson DA, Hen R** (2011b). Pattern separation: a common function for new neurons in hippocampus and olfactory bulb. *Neuron*, 70:582-588.

Références bibliographiques

- Saito Y, Cheng M, Leslie FM, Civelli O** (2001). Expression of the melanin-concentrating hormone (MCH) receptor mRNA in the rat brain. *J Comp Neurol*, 435:26-40.
- Saito Y, Nothacker HP, Wang Z, Lin SH, Leslie F, Civelli O** (1999). Molecular characterization of the melanin-concentrating-hormone receptor. *Nature*, 400:265-269.
- Saitoh A, Yamada M, Yamada M, Takahashi K, Yamaguchi K, Murasawa H, Nakatani A, Tatsumi Y, Hirose N, Kamei J** (2008). Antidepressant-like effects of the delta-opioid receptor agonist SNC80 [(+)-4-[(alphaR)-alpha-[(2S,5R)-2,5-dimethyl-4-(2-propenyl)-1-piperazinyl]-(3-methoxyphenyl)methyl]-N,N-diethylbenzamide) in an olfactory bulbectomized rat model. *Brain Res*, 1208:160-169.
- Sakamoto F, Yamada S, Ueta Y** (2004). Centrally administered orexin-A activates corticotropin-releasing factor-containing neurons in the hypothalamic paraventricular nucleus and central amygdaloid nucleus of rats: possible involvement of central orexins on stress-activated central CRF neurons. *Regul Pept*, 118:183-191.
- Sakurai T** (2007). The neural circuit of orexin (hypocretin): maintaining sleep and wakefulness. *Nat Rev Neurosci*, 8:171-181.
- Sakurai T, Amemiya A, Ishii M, Matsuzaki I, Chemelli RM, Tanaka H, Williams SC, Richardson JA, Kozlowski GP, Wilson S, Arch JR, Buckingham RE, Haynes AC, Carr SA, Annan RS, McNulty DE, Liu WS, Terrett JA, Elshourbagy NA, Bergsma DJ, Yanagisawa M** (1998). Orexins and orexin receptors: a family of hypothalamic neuropeptides and G protein-coupled receptors that regulate feeding behavior. *Cell*, 92:573-585.
- Sakurai T, Nagata R, Yamanaka A, Kawamura H, Tsujino N, Muraki Y, Kageyama H, Kunita S, Takahashi S, Goto K, Koyama Y, Shioda S, Yanagisawa M** (2005). Input of orexin/hypocretin neurons revealed by a genetically encoded tracer in mice. *Neuron*, 46:297-308.
- Salamone JD, Correa M, Farrar A, Mingote SM** (2007). Effort-related functions of nucleus accumbens dopamine and associated forebrain circuits. *Psychopharmacology (Berl)*, 191:461-482.
- Salomon RM, Ripley B, Kennedy JS, Johnson B, Schmidt D, Zeitzer JM, Nishino S, Mignot E** (2003). Diurnal variation of cerebrospinal fluid hypocretin-1 (Orexin-A) levels in control and depressed subjects. *Biol Psychiatry*, 54:96-104.
- Salzer HM, Lurie ML** (1953). Anxiety and depressive states treated with isonicotiny hydrazide (isoniazid). *AMA Arch Neurol Psychiatry*, 70:317-324.
- Samson WK, Taylor MM** (2001). Hypocretin/orexin suppresses corticotroph responsiveness in vitro. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol*, 281:R1140-R1145.
- Samson WK, Taylor MM, Ferguson AV** (2005). Non-sleep effects of hypocretin/orexin. *Sleep Med Rev*, 9:243-252.
- Samson WK, Taylor MM, Follwell M, Ferguson AV** (2002). Orexin actions in hypothalamic paraventricular nucleus: physiological consequences and cellular correlates. *Regul Pept*, 104:97-103.
- Santarelli L, Saxe M, Gross C, Surget A, Battaglia F, Dulawa S, Weisstaub N, Lee J, Duman R, Arancio O, Belzung C, Hen R** (2003). Requirement of hippocampal neurogenesis for the behavioral effects of antidepressants. *Science*, 301:805-809.
- Saper CB, Chou TC, Scammell TE** (2001). The sleep switch: hypothalamic control of sleep and wakefulness. *Trends Neurosci*, 24:726-731.
- Sapolsky RM** (1996). Why stress is bad for your brain. *Science*, 273:749-750.
- Sapolsky RM** (2000). Glucocorticoids and hippocampal atrophy in neuropsychiatric disorders. *Arch Gen Psychiatry*, 57:925-935.
- Sapolsky RM** (2003). Stress and plasticity in the limbic system. *Neurochem Res*, 28:1735-1742.

Références bibliographiques

- Sarchiapone M, Carli V, Camardese G, Cuomo C, Di GD, Calcagni ML, Focacci C, De RS** (2006). Dopamine transporter binding in depressed patients with anhedonia. *Psychiatry Res*, 147:243-248.
- Schildkraut JJ** (1965). The catecholamine hypothesis of affective disorders: a review of supporting evidence. *Am J Psychiatry*, 122:509-522.
- Schmidt FM, Brugel M, Kratzsch J, Strauss M, Sander C, Baum P, Thiery J, Hegerl U, Schonknecht P** (2010). Cerebrospinal fluid hypocretin-1 (orexin A) levels in mania compared to unipolar depression and healthy controls. *Neurosci Lett*, 483:20-22.
- Schmidt HD, Duman RS** (2007). The role of neurotrophic factors in adult hippocampal neurogenesis, antidepressant treatments and animal models of depressive-like behavior. *Behav Pharmacol*, 18:391-418.
- Schuld A, Hebebrand J, Geller F, Pollmacher T** (2000). Increased body-mass index in patients with narcolepsy. *Lancet*, 355:1274-1275.
- Scott LV, Dinan TG** (1998). Vasopressin and the regulation of hypothalamic-pituitary-adrenal axis function: implications for the pathophysiology of depression. *Life Sci*, 62:1985-1998.
- Scott MM, Marcus JN, Pettersen A, Birnbaum SG, Mochizuki T, Scammell TE, Nestler EJ, Elmquist JK, Lutter M** (2011). Hcrtr1 and 2 signaling differentially regulates depression-like behaviors. *Behav Brain Res*, 222:289-294.
- Secoli SR, Teixeira NA** (1998). Chronic prenatal stress affects development and behavioral depression in rats. *Stress*, 2:273-280.
- Segal Z, Vincent P, Levitt A** (2002). Efficacy of combined, sequential and crossover psychotherapy and pharmacotherapy in improving outcomes in depression. *J Psychiatry Neurosci*, 27:281-290.
- Segrin C, Abramson LY** (1994). Negative reactions to depressive behaviors: a communication theories analysis. *J Abnorm Psychol*, 103:655-668.
- Seifritz E, Gillin JC, Rapaport MH, Kelsoe JR, Bhatti T, Stahl SM** (1998). Sleep electroencephalographic response to muscarinic and serotonin1A receptor probes in patients with major depression and in normal controls. *Biol Psychiatry*, 44:21-33.
- Seligman ME, Beagley G** (1975). Learned helplessness in the rat. *J Comp Physiol Psychol*, 88:534-541.
- Seligman ME, Maier SF** (1967). Failure to escape traumatic shock. *J Exp Psychol*, 74:1-9.
- Sharf R, Guarnieri DJ, Taylor JR, DiLeone RJ** (2010a). Orexin mediates morphine place preference, but not morphine-induced hyperactivity or sensitization. *Brain Res*, 1317:24-32.
- Sharf R, Sarhan M, Brayton CE, Guarnieri DJ, Taylor JR, DiLeone RJ** (2010b). Orexin signaling via the orexin 1 receptor mediates operant responding for food reinforcement. *Biol Psychiatry*, 67:753-760.
- Shekhar A, Katner JS, Sajdyk TJ, Kohl RR** (2002). Role of norepinephrine in the dorsomedial hypothalamic panic response: an in vivo microdialysis study. *Pharmacol Biochem Behav*, 71:493-500.
- Sheline YI, Barch DM, Donnelly JM, Ollinger JM, Snyder AZ, Mintun MA** (2001). Increased amygdala response to masked emotional faces in depressed subjects resolves with antidepressant treatment: an fMRI study. *Biol Psychiatry*, 50:651-658.
- Sheline YI, Gado MH, Kraemer HC** (2003). Untreated depression and hippocampal volume loss. *Am J Psychiatry*, 160:1516-1518.
- Sheline YI, Wang PW, Gado MH, Csernansky JG, Vannier MW** (1996). Hippocampal atrophy in recurrent major depression. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 93:3908-3913.

Références bibliographiques

- Sherman AD, Sacquitne JL, Petty F** (1982). Specificity of the learned helplessness model of depression. *Pharmacol Biochem Behav*, 16:449-454.
- Shields M, Carroll MD, Ogden CL** (2011). Adult obesity prevalence in Canada and the United States. *NCHS Data Brief*, 1-8.
- Shima K, Nakahama H, Yamamoto M** (1986). Firing properties of two types of nucleus raphe dorsalis neurons during the sleep-waking cycle and their responses to sensory stimuli. *Brain Res*, 399:317-326.
- Shimada M, Tritos NA, Lowell BB, Flier JS, Maratos-Flier E** (1998). Mice lacking melanin-concentrating hormone are hypophagic and lean. *Nature*, 396:670-674.
- Shimazaki T, Yoshimizu T, Chaki S** (2006). Melanin-concentrating hormone MCH1 receptor antagonists: a potential new approach to the treatment of depression and anxiety disorders. *CNS Drugs*, 20:801-811.
- Shimomura Y, Mori M, Sugo T, Ishibashi Y, Abe M, Kurokawa T, Onda H, Nishimura O, Sumino Y, Fujino M** (1999). Isolation and identification of melanin-concentrating hormone as the endogenous ligand of the SLC-1 receptor. *Biochem Biophys Res Commun*, 261:622-626.
- Shirayama Y, Chen AC, Nakagawa S, Russell DS, Duman RS** (2002). Brain-derived neurotrophic factor produces antidepressant effects in behavioral models of depression. *J Neurosci*, 22:3251-3261.
- Smeraldi E, Benedetti F, Barbini B, Campori E, Colombo C** (1999). Sustained antidepressant effect of sleep deprivation combined with pindolol in bipolar depression. A placebo-controlled trial. *Neuropsychopharmacology*, 20:380-385.
- Smith D, Dempster C, Glanville J, Freemantle N, Anderson I** (2002). Efficacy and tolerability of venlafaxine compared with selective serotonin reuptake inhibitors and other antidepressants: a meta-analysis. *Br J Psychiatry*, 180:396-404.
- Smith DG, Davis RJ, Rorick-Kehn L, Morin M, Witkin JM, McKinzie DL, Nomikos GG, Gehlert DR** (2006). Melanin-concentrating hormone-1 receptor modulates neuroendocrine, behavioral, and cortic limbic neurochemical stress responses in mice. *Neuropsychopharmacology*, 31:1135-1145.
- Smith DG, Hegde LG, Wolinsky TD, Miller S, Papp M, Ping X, Edwards T, Gerald CP, Craig DA** (2009a). The effects of stressful stimuli and hypothalamic-pituitary-adrenal axis activation are reversed by the melanin-concentrating hormone 1 receptor antagonist SNAP 94847 in rodents. *Behav Brain Res*, 197:284-291.
- Smith JW, Seckl JR, Evans AT, Costall B, Smythe JW** (2004). Gestational stress induces post-partum depression-like behaviour and alters maternal care in rats. *Psychoneuroendocrinology*, 29:227-244.
- Smith KS, Tindell AJ, Aldridge JW, Berridge KC** (2009b). Ventral pallidum roles in reward and motivation. *Behav Brain Res*, 196:155-167.
- Smoski MJ, Felder J, Bizzell J, Green SR, Ernst M, Lynch TR, Dichter GS** (2009). fMRI of alterations in reward selection, anticipation, and feedback in major depressive disorder. *J Affect Disord*, 118:69-78.
- Snyder JS, Soumier A, Brewer M, Pickel J, Cameron HA** (2011). Adult hippocampal neurogenesis buffers stress responses and depressive behaviour. *Nature*, 476:458-461.
- Sobocki P, Ekman M, Agren H, Krakau I, Runeson B, Martensson B, Jonsson B** (2007). Resource use and costs associated with patients treated for depression in primary care. *Eur J Health Econ*, 8:67-76.
- Sobocki P, Jonsson B, Angst J, Rehnberg C** (2006). Cost of depression in Europe. *J Ment Health Policy Econ*, 9:87-98.

Références bibliographiques

- Song C, Leonard BE** (2005). The olfactory bulbectomised rat as a model of depression. *Neurosci Biobehav Rev*, 29:627-647.
- Song CH, Chen XW, Xia JX, Yu ZP, Hu ZA** (2006). Modulatory effects of hypocretin-1/orexin-A with glutamate and gamma-aminobutyric acid on freshly isolated pyramidal neurons from the rat prefrontal cortex. *Neurosci Lett*, 399:101-105.
- Southmayd SE, David MM, Cairns J, Delva NJ, Letemendia FJ, Waldron JJ** (1990). Sleep deprivation in depression: pattern of relapse and characteristics of preceding sleep. *Biol Psychiatry*, 28:979-988.
- Spiegelman BM, Flier JS** (2001). Obesity and the regulation of energy balance. *Cell*, 104:531-543.
- Spijker J, Bijl RV, de GR, Nolen WA** (2001). Determinants of poor 1-year outcome of DSM-III-R major depression in the general population: results of the Netherlands Mental Health Survey and Incidence Study (NEMESIS). *Acta Psychiatr Scand*, 103:122-130.
- Spinazzi R, Rucinski M, Neri G, Malendowicz LK, Nussdorfer GG** (2005a). Prepro-orexin and orexin receptors are expressed in cortisol-secreting adrenocortical adenomas, and orexins stimulate in vitro cortisol secretion and growth of tumor cells. *J Clin Endocrinol Metab*, 90:3544-3549.
- Spinazzi R, Ziolkowska A, Neri G, Nowak M, Rebuffat P, Nussdorfer GG, Andreis PG, Malendowicz LK** (2005b). Orexins modulate the growth of cultured rat adrenocortical cells, acting through type 1 and type 2 receptors coupled to the MAPK p42/p44- and p38-dependent cascades. *Int J Mol Med*, 15:847-852.
- Spitzer RL, Williams JB, Gibbon M, First MB** (1992). The Structured Clinical Interview for DSM-III-R (SCID). I: History, rationale, and description. *Arch Gen Psychiatry*, 49:624-629.
- Steffens DC, Byrum CE, McQuoid DR, Greenberg DL, Payne ME, Blitchington TF, MacFall JR, Krishnan KR** (2000). Hippocampal volume in geriatric depression. *Biol Psychiatry*, 48:301-309.
- Steru L, Chermat R, Thierry B, Simon P** (1985). The tail suspension test: a new method for screening antidepressants in mice. *Psychopharmacology (Berl)*, 85:367-370.
- Stockmeier CA** (2003). Involvement of serotonin in depression: evidence from postmortem and imaging studies of serotonin receptors and the serotonin transporter. *J Psychiatr Res*, 37:357-373.
- Stordal KI, Lundervold AJ, Egeland J, Mykletun A, Asbjørnsen A, Landrø NI, Roness A, Rund BR, Sundet K, Oedegaard KJ, Lund A** (2004). Impairment across executive functions in recurrent major depression. *Nord J Psychiatry*, 58:41-47.
- Sullivan PF, Neale MC, Kendler KS** (2000). Genetic epidemiology of major depression: review and meta-analysis. *Am J Psychiatry*, 157:1552-1562.
- Surget A, Belzung C** (2008) Unpredictable chronic mild stress in mice. In: *Experimental animal models in neurobehavioral research* (Kalueff AV, LaPorte JL, eds), pp 79-112. New York: Nova Science Publishers.
- Surget A, Saxe M, Leman S, Ibarguen-Vargas Y, Chalon S, Griebel G, Hen R, Belzung C** (2008). Drug-dependent requirement of hippocampal neurogenesis in a model of depression and of antidepressant reversal. *Biol Psychiatry*, 64:293-301.
- Surget A, Tanti A, Leonardo ED, Laugeray A, Rainer Q, Touma C, Palme R, Griebel G, Ibarguen-Vargas Y, Hen R, Belzung C** (2011). Antidepressants recruit new neurons to improve stress response regulation. *Mol Psychiatry*, in press.
- Surget A, Wang Y, Leman S, Ibarguen-Vargas Y, Edgar N, Griebel G, Belzung C, Sibille E** (2009). Corticolimbic transcriptome changes are state-dependent and region-specific in a rodent model of depression and of antidepressant reversal. *Neuropsychopharmacology*, 34:1363-1380.

Références bibliographiques

- Surguladze S, Brammer MJ, Keedwell P, Giampietro V, Young AW, Travis MJ, Williams SC, Phillips ML** (2005). A differential pattern of neural response toward sad versus happy facial expressions in major depressive disorder. *Biol Psychiatry*, 57:201-209.
- Suzuki M, Beuckmann CT, Shikata K, Ogura H, Sawai T** (2005). Orexin-A (hypocretin-1) is possibly involved in generation of anxiety-like behavior. *Brain Res*, 1044:116-121.
- Svenningsson P, Chergui K, Rachleff I, Flajolet M, Zhang X, El YM, Vaugeois JM, Nomikos GG, Greengard P** (2006). Alterations in 5-HT1B receptor function by p11 in depression-like states. *Science*, 311:77-80.
- Sweet DC, Levine AS, Kotz CM** (2004). Functional opioid pathways are necessary for hypocretin-1 (orexin-A)-induced feeding. *Peptides*, 25:307-314.
- Taheri S, Gardiner J, Hafizi S, Murphy K, Dakin C, Seal L, Small C, Ghatei M, Bloom S** (2001). Orexin A immunoreactivity and preproorexin mRNA in the brain of Zucker and WKY rats. *Neuroreport*, 12:459-464.
- Takahashi K, Lin JS, Sakai K** (2006). Neuronal activity of histaminergic tuberomammillary neurons during wake-sleep states in the mouse. *J Neurosci*, 26:10292-10298.
- Takahashi K, Lin JS, Sakai K** (2008). Neuronal activity of orexin and non-orexin waking-active neurons during wake-sleep states in the mouse. *Neuroscience*, 153:860-870.
- Tannenbaum B, Tannenbaum GS, Sudom K, Anisman H** (2002). Neurochemical and behavioral alterations elicited by a chronic intermittent stressor regimen: implications for allostatic load. *Brain Res*, 953:82-92.
- Tarullo AR, Gunnar MR** (2006). Child maltreatment and the developing HPA axis. *Horm Behav*, 50:632-639.
- Tashiro A, Makino H, Gage FH** (2007). Experience-specific functional modification of the dentate gyrus through adult neurogenesis: a critical period during an immature stage. *J Neurosci*, 27:3252-3259.
- Teske JA, Billington CJ, Kotz CM** (2010). Hypocretin/orexin and energy expenditure. *Acta Physiol (Oxf)*, 198:303-312.
- Tham A, Engelbrektson K, Mathe AA, Johnson L, Olsson E, Aberg-Wistedt A** (1997). Impaired neuropsychological performance in euthymic patients with recurring mood disorders. *J Clin Psychiatry*, 58:26-29.
- Thannickal TC, Moore RY, Nienhuis R, Ramanathan L, Gulyani S, Aldrich M, Cornford M, Siegel JM** (2000). Reduced number of hypocretin neurons in human narcolepsy. *Neuron*, 27:469-474.
- Thorpe AJ, Cleary JP, Levine AS, Kotz CM** (2005). Centrally administered orexin A increases motivation for sweet pellets in rats. *Psychopharmacology (Berl)*, 182:75-83.
- Thorpe AJ, Kotz CM** (2005). Orexin A in the nucleus accumbens stimulates feeding and locomotor activity. *Brain Res*, 1050:156-162.
- Treadway MT, Zald DH** (2011). Reconsidering anhedonia in depression: lessons from translational neuroscience. *Neurosci Biobehav Rev*, 35:537-555.
- Tremblay LK, Naranjo CA, Cardenas L, Herrmann N, Busto UE** (2002). Probing brain reward system function in major depressive disorder: altered response to dextroamphetamine. *Arch Gen Psychiatry*, 59:409-416.
- Trivedi P, Yu H, MacNeil DJ, Van der Ploeg LH, Guan XM** (1998). Distribution of orexin receptor mRNA in the rat brain. *FEBS Lett*, 438:71-75.
- Tronche F, Kellendonk C, Kretz O, Gass P, Anlag K, Orban PC, Bock R, Klein R, Schutz G** (1999). Disruption of the glucocorticoid receptor gene in the nervous system results in reduced anxiety. *Nat Genet*, 23:99-103.

Références bibliographiques

- Tsankova NM, Berton O, Renthal W, Kumar A, Neve RL, Nestler EJ** (2006). Sustained hippocampal chromatin regulation in a mouse model of depression and antidepressant action. *Nat Neurosci*, 9:519-525.
- Tsourtos G, Thompson JC, Stough C** (2002). Evidence of an early information processing speed deficit in unipolar major depression. *Psychol Med*, 32:259-265.
- Tsuno N, Besset A, Ritchie K** (2005). Sleep and depression. *J Clin Psychiatry*, 66:1254-1269.
- Urani A, Philbert J, Cohen C, Griebel G** (2011). The corticotropin-releasing factor 1 receptor antagonist, SSR125543, and the vasopressin 1b receptor antagonist, SSR149415, prevent stress-induced cognitive impairment in mice. *Pharmacol Biochem Behav*, 98:425-431.
- van den Pol AN** (1999). Hypothalamic hypocretin (orexin): robust innervation of the spinal cord. *J Neurosci*, 19:3171-3182.
- van den Pol AN, Gao XB, Obrietan K, Kilduff TS, Belousov AB** (1998). Presynaptic and postsynaptic actions and modulation of neuroendocrine neurons by a new hypothalamic peptide, hypocretin/orexin. *J Neurosci*, 18:7962-7971.
- van den Pol AN, Ghosh PK, Liu RJ, Li Y, Aghajanian GK, Gao XB** (2002). Hypocretin (orexin) enhances neuron activity and cell synchrony in developing mouse GFP-expressing locus coeruleus. *J Physiol*, 541:169-185.
- van Kampen M, Kramer M, Hiemke C, Flugge G, Fuchs E** (2002). The chronic psychosocial stress paradigm in male tree shrews: evaluation of a novel animal model for depressive disorders. *Stress*, 5:37-46.
- van Praag H, Kempermann G, Gage FH** (1999). Running increases cell proliferation and neurogenesis in the adult mouse dentate gyrus. *Nat Neurosci*, 2:266-270.
- van West D, Van Den Eede F, Del-Favero J, Souery D, Norrback KF, Van Duijn C, Sluijs S, Adolfsson R, Mendlewicz J, Deboutte D, van Broeckhoven C, Claes S** (2006). Glucocorticoid receptor gene-based SNP analysis in patients with recurrent major depression. *Neuropsychopharmacology*, 31:620-627.
- Venner A, Karnani M, Gonzales A, Jensen L, Fugger L, Burdakov D** (2011). Orexin neurons as conditional glucosensors: paradoxical regulation of sugar-sensing by intracellular fuels. *J Physiol*, 589:5701-5708.
- Verret L, Goutagny R, Fort P, Cagnon L, Salvert D, Leger L, Boissard R, Salin P, Peyron C, Luppi PH** (2003). A role of melanin-concentrating hormone producing neurons in the central regulation of paradoxical sleep. *BMC Neurosci*, 4:19.
- Vittoz NM, Schmeichel B, Berridge CW** (2008). Hypocretin /orexin preferentially activates caudomedial ventral tegmental area dopamine neurons. *Eur J Neurosci*, 28:1629-1640.
- Vogel GW, Buffenstein A, Minter K, Hennessey A** (1990a). Drug effects on REM sleep and on endogenous depression. *Neurosci Biobehav Rev*, 14:49-63.
- Vogel GW, Neill D, Hagler M, Kors D** (1990b). A new animal model of endogenous depression: a summary of present findings. *Neurosci Biobehav Rev*, 14:85-91.
- Vogel GW, Neill D, Kors D, Hagler M** (1990c). REM sleep abnormalities in a new animal model of endogenous depression. *Neurosci Biobehav Rev*, 14:77-83.
- Vogel GW, Vogel F, McAbee RS, Thurmond AJ** (1980). Improvement of depression by REM sleep deprivation. New findings and a theory. *Arch Gen Psychiatry*, 37:247-253.
- von der Goltz C, Koopmann A, Dinter C, Richter A, Grosshans M, Fink T, Wiedemann K, Kiefer F** (2011). Involvement of orexin in the regulation of stress, depression and reward in alcohol dependence. *Horm Behav*, 60:644-650.
- Von Frijtag JC, Van den Bos R, Spruijt BM** (2002). Imipramine restores the long-term impairment of appetitive behavior in socially stressed rats. *Psychopharmacology (Berl)*, 162:232-238.

Références bibliographiques

- Vyas A, Bernal S, Chattarji S** (2003). Effects of chronic stress on dendritic arborization in the central and extended amygdala. *Brain Res*, 965:290-294.
- Vyas A, Jadhav S, Chattarji S** (2006). Prolonged behavioral stress enhances synaptic connectivity in the basolateral amygdala. *Neuroscience*, 143:387-393.
- Vyas A, Mitra R, Shankaranarayana Rao BS, Chattarji S** (2002). Chronic stress induces contrasting patterns of dendritic remodeling in hippocampal and amygdaloid neurons. *J Neurosci*, 22:6810-6818.
- Wacker J, Dillon DG, Pizzagalli DA** (2009). The role of the nucleus accumbens and rostral anterior cingulate cortex in anhedonia: integration of resting EEG, fMRI, and volumetric techniques. *Neuroimage*, 46:327-337.
- Walker MP** (2009). The role of sleep in cognition and emotion. *Ann N Y Acad Sci*, 1156:168-197.
- Walker MP, van der Helm E** (2009). Overnight therapy? The role of sleep in emotional brain processing. *Psychol Bull*, 135:731-748.
- Waller DA, Hardy BW, Pole R, Giles D, Gullion CM, Rush AJ, Roffwarg HP** (1989). Sleep EEG in bulimic, depressed, and normal subjects. *Biol Psychiatry*, 25:661-664.
- Wang B, You ZB, Wise RA** (2009). Reinstatement of cocaine seeking by hypocretin (orexin) in the ventral tegmental area: independence from the local corticotropin-releasing factor network. *Biol Psychiatry*, 65:857-862.
- Weaver IC, Cervoni N, Champagne FA, D'Alessio AC, Sharma S, Seckl JR, Dymov S, Szyf M, Meaney MJ** (2004). Epigenetic programming by maternal behavior. *Nat Neurosci*, 7:847-854.
- Webster MJ, Knable MB, O'Grady J, Orthmann J, Weickert CS** (2002). Regional specificity of brain glucocorticoid receptor mRNA alterations in subjects with schizophrenia and mood disorders. *Mol Psychiatry*, 7:985-94, 924.
- Weinstock M** (1997). Does prenatal stress impair coping and regulation of hypothalamic-pituitary-adrenal axis? *Neurosci Biobehav Rev*, 21:1-10.
- Weinstock M, Matlina E, Maor GI, Rosen H, McEwen BS** (1992). Prenatal stress selectively alters the reactivity of the hypothalamic-pituitary adrenal system in the female rat. *Brain Res*, 595:195-200.
- Weiss JM** (1997). Does decreased sucrose intake indicate loss of preference in CMS model? *Psychopharmacology (Berl)*, 134:368-370.
- Williams JB, Gibbon M, First MB, Spitzer RL, Davies M, Borus J, Howes MJ, Kane J, Pope HG, Jr., Rounsaville B, .** (1992). The Structured Clinical Interview for DSM-III-R (SCID). II. Multisite test-retest reliability. *Arch Gen Psychiatry*, 49:630-636.
- Willie JT, Chemelli RM, Sinton CM, Tokita S, Williams SC, Kisanuki YY, Marcus JN, Lee C, Elmquist JK, Kohlmeier KA, Leonard CS, Richardson JA, Hammer RE, Yanagisawa M** (2003). Distinct narcolepsy syndromes in Orexin receptor-2 and Orexin null mice: molecular genetic dissection of Non-REM and REM sleep regulatory processes. *Neuron*, 38:715-730.
- Willie JT, Chemelli RM, Sinton CM, Yanagisawa M** (2001). To eat or to sleep? Orexin in the regulation of feeding and wakefulness. *Annu Rev Neurosci*, 24:429-458.
- Willie JT, Sinton CM, Maratos-Flier E, Yanagisawa M** (2008). Abnormal response of melanin-concentrating hormone deficient mice to fasting: hyperactivity and rapid eye movement sleep suppression. *Neuroscience*, 156:819-829.
- Willner P** (1983a). Dopamine and depression: a review of recent evidence. I. Empirical studies. *Brain Res*, 287:211-224.
- Willner P** (1983b). Dopamine and depression: a review of recent evidence. II. Theoretical approaches. *Brain Res*, 287:225-236.

Références bibliographiques

- Willner P** (1983c). Dopamine and depression: a review of recent evidence. III. The effects of antidepressant treatments. *Brain Res*, 287:237-246.
- Willner P** (1984). The validity of animal models of depression. *Psychopharmacology (Berl)*, 83:1-16.
- Willner P** (1997). Validity, reliability and utility of the chronic mild stress model of depression: a 10-year review and evaluation. *Psychopharmacology (Berl)*, 134:319-329.
- Willner P** (2005). Chronic mild stress (CMS) revisited: consistency and behavioural-neurobiological concordance in the effects of CMS. *Neuropsychobiology*, 52:90-110.
- Willner P, Moreau JL, Nielsen CK, Papp M, Sluzewska A** (1996). Decreased hedonic responsiveness following chronic mild stress is not secondary to loss of body weight. *Physiol Behav*, 60:129-134.
- Willner P, Muscat R, Papp M** (1992). Chronic mild stress-induced anhedonia: a realistic animal model of depression. *Neurosci Biobehav Rev*, 16:525-534.
- Willner P, Towell A, Sampson D, Sophokleous S, Muscat R** (1987). Reduction of sucrose preference by chronic unpredictable mild stress, and its restoration by a tricyclic antidepressant. *Psychopharmacology (Berl)*, 93:358-364.
- Wing JK, Babor T, Brugha T, Burke J, Cooper JE, Giel R, Jablenski A, Regier D, Sartorius N** (1990). SCAN. Schedules for Clinical Assessment in Neuropsychiatry. *Arch Gen Psychiatry*, 47:589-593.
- Winokur A, Gary KA, Rodner S, Rae-Red C, Fernando AT, Szuba MP** (2001). Depression, sleep physiology, and antidepressant drugs. *Depress Anxiety*, 14:19-28.
- Winsky-Sommerer R, Boutrel B, de Lecea L** (2003). The role of the hypocretinergic system in the integration of networks that dictate the states of arousal. *Drug News Perspect*, 16:504-512.
- Winsky-Sommerer R, Yamanaka A, Diano S, Borok E, Roberts AJ, Sakurai T, Kilduff TS, Horvath TL, de Lecea L** (2004). Interaction between the corticotropin-releasing factor system and hypocretins (orexins): a novel circuit mediating stress response. *J Neurosci*, 24:11439-11448.
- Wirz-Justice A, Van Den Hoofdakker RH** (1999). Sleep deprivation in depression: what do we know, where do we go? *Biol Psychiatry*, 46:445-453.
- Wolkowitz OM, Reus VI** (1999). Treatment of depression with antiglucocorticoid drugs. *Psychosom Med*, 61:698-711.
- Wong DT, Horng JS, Bymaster FP, Hauser KL, Molloy BB** (1974). A selective inhibitor of serotonin uptake: Lilly 110140, 3-(p-trifluoromethylphenoxy)-N-methyl-3-phenylpropylamine. *Life Sci*, 15:471-479.
- Wong ML, Licinio J** (2001). Research and treatment approaches to depression. *Nat Rev Neurosci*, 2:343-351.
- Wood JV, Saltzberg JA, Goldsamt LA** (1990a). Does affect induce self-focused attention? *J Pers Soc Psychol*, 58:899-908.
- Wood JV, Saltzberg JA, Neale JM, Stone AA, Rachmiel TB** (1990b). Self-focused attention, coping responses, and distressed mood in everyday life. *J Pers Soc Psychol*, 58:1027-1036.
- Wu JC, Bunney WE** (1990). The biological basis of an antidepressant response to sleep deprivation and relapse: review and hypothesis. *Am J Psychiatry*, 147:14-21.
- Wurtman RJ** (2005). Genes, stress, and depression. *Metabolism*, 54:16-19.
- Xi MC, Morales FR, Chase MH** (2001). Effects on sleep and wakefulness of the injection of hypocretin-1 (orexin-A) into the laterodorsal tegmental nucleus of the cat. *Brain Res*, 901:259-264.

Références bibliographiques

- Xia J, Chen X, Song C, Ye J, Yu Z, Hu Z** (2005). Postsynaptic excitation of prefrontal cortical pyramidal neurons by hypocretin-1/orexin A through the inhibition of potassium currents. *J Neurosci Res*, 82:729-736.
- Xie X, Crowder TL, Yamanaka A, Morairty SR, Lewinter RD, Sakurai T, Kilduff TS** (2006). GABA(B) receptor-mediated modulation of hypocretin/orexin neurones in mouse hypothalamus. *J Physiol*, 574:399-414.
- Yadid G, Friedman A** (2008). Dynamics of the dopaminergic system as a key component to the understanding of depression. *Prog Brain Res*, 172:265-286.
- Yalcin I, Belzung C, Surget A** (2008). Mouse strain differences in the unpredictable chronic mild stress: a four-antidepressant survey. *Behav Brain Res*, 193:140-143.
- Yamada H, Okumura T, Motomura W, Kobayashi Y, Kohgo Y** (2000). Inhibition of food intake by central injection of anti-orexin antibody in fasted rats. *Biochem Biophys Res Commun*, 267:527-531.
- Yamanaka A, Beuckmann CT, Willie JT, Hara J, Tsujino N, Mieda M, Tominaga M, Yagami K, Sugiyama F, Goto K, Yanagisawa M, Sakurai T** (2003a). Hypothalamic orexin neurons regulate arousal according to energy balance in mice. *Neuron*, 38:701-713.
- Yamanaka A, Kunii K, Nambu T, Tsujino N, Sakai A, Matsuzaki I, Miwa Y, Goto K, Sakurai T** (2000). Orexin-induced food intake involves neuropeptide Y pathway. *Brain Res*, 859:404-409.
- Yamanaka A, Muraki Y, Ichiki K, Tsujino N, Kilduff TS, Goto K, Sakurai T** (2006). Orexin neurons are directly and indirectly regulated by catecholamines in a complex manner. *J Neurophysiol*, 96:284-298.
- Yamanaka A, Muraki Y, Tsujino N, Goto K, Sakurai T** (2003b). Regulation of orexin neurons by the monoaminergic and cholinergic systems. *Biochem Biophys Res Commun*, 303:120-129.
- Yamanaka A, Sakurai T, Katsumoto T, Yanagisawa M, Goto K** (1999). Chronic intracerebroventricular administration of orexin-A to rats increases food intake in daytime, but has no effect on body weight. *Brain Res*, 849:248-252.
- Yamanaka A, Tabuchi S, Tsunematsu T, Fukazawa Y, Tominaga M** (2010). Orexin directly excites orexin neurons through orexin 2 receptor. *J Neurosci*, 30:12642-12652.
- Yamanaka A, Tsujino N, Funahashi H, Honda K, Guan JL, Wang QP, Tominaga M, Goto K, Shioda S, Sakurai T** (2002). Orexins activate histaminergic neurons via the orexin 2 receptor. *Biochem Biophys Res Commun*, 290:1237-1245.
- Yoshida K, McCormack S, Espana RA, Crocker A, Scammell TE** (2006). Afferents to the orexin neurons of the rat brain. *J Comp Neurol*, 494:845-861.
- Yoshida Y, Fujiki N, Maki RA, Schwarz D, Nishino S** (2003). Differential kinetics of hypocretins in the cerebrospinal fluid after intracerebroventricular administration in rats. *Neurosci Lett*, 346:182-186.
- Yoshida Y, Fujiki N, Nakajima T, Ripley B, Matsumura H, Yoneda H, Mignot E, Nishino S** (2001). Fluctuation of extracellular hypocretin-1 (orexin A) levels in the rat in relation to the light-dark cycle and sleep-wake activities. *Eur J Neurosci*, 14:1075-1081.
- Zalsman G, Huang YY, Oquendo MA, Burke AK, Hu XZ, Brent DA, Ellis SP, Goldman D, Mann JJ** (2006). Association of a triallelic serotonin transporter gene promoter region (5-HTTLPR) polymorphism with stressful life events and severity of depression. *Am J Psychiatry*, 163:1588-1593.
- Zangen A, Nakash R, Overstreet DH, Yadid G** (2001). Association between depressive behavior and absence of serotonin-dopamine interaction in the nucleus accumbens. *Psychopharmacology (Berl)*, 155:434-439.

Références bibliographiques

Zhang TY, Bagot R, Parent C, Nesbitt C, Bredy TW, Caldji C, Fish E, Anisman H, Szyf M, Meaney MJ (2006). Maternal programming of defensive responses through sustained effects on gene expression. *Biol Psychol*, 73:72-89.

Zhao C, Deng W, Gage FH (2008). Mechanisms and functional implications of adult neurogenesis. *Cell*, 132:645-660.

Zhong P, Yan Z (2011). Differential regulation of the excitability of prefrontal cortical fast-spiking interneurons and pyramidal neurons by serotonin and fluoxetine. *PLoS One*, 6:e16970.

Ziolkowska A, Spinazzi R, Albertin G, Nowak M, Malendowicz LK, Tortorella C, Nussdorfer GG (2005). Orexins stimulate glucocorticoid secretion from cultured rat and human adrenocortical cells, exclusively acting via the OX1 receptor. *J Steroid Biochem Mol Biol*, 96:423-429.

Zobel AW, Nickel T, Kunzel HE, Ackl N, Sonntag A, Ising M, Holsboer F (2000). Effects of the high-affinity corticotropin-releasing hormone receptor 1 antagonist R121919 in major depression: the first 20 patients treated. *J Psychiatr Res*, 34:171-181.

Zubieta JK, Bueller JA, Jackson LR, Scott DJ, Xu Y, Koeppe RA, Nichols TE, Stohler CS (2005). Placebo effects mediated by endogenous opioid activity on mu-opioid receptors. *J Neurosci*, 25:7754-7762.

Zubieta JK, Smith YR, Bueller JA, Xu Y, Kilbourn MR, Jewett DM, Meyer CR, Koeppe RA, Stohler CS (2001). Regional mu opioid receptor regulation of sensory and affective dimensions of pain. *Science*, 293:311-315.

ANNEXE

n-3 Polyunsaturated fatty acid supplementation reverses stress-induced modifications on brain monoamine levels in mice

S. Vancassel,* S. Leman,^{†,§} L. Hanonick,** S. Denis,* J. Roger,^{†,§} M. Nollet,^{†,§} S. Bodard,^{§,††} I. Kousignian,^{§,††} C. Belzung,^{†,§} and S. Chalon^{1,§,††}

Unité de Nutrition et Régulation Lipidique des Fonctions Cérébrales,* Institut National de la Recherche Agronomique, domaine de Vilvert, 78352 Jouy-en-Josas cedex, France; EA 3248 Psychobiologie des Emotions, Faculté des Sciences & Techniques,[†] Université François Rabelais, Tours, F-37000, France; Institut Fédératif de Recherche 135,[§] Tours, F-37000, France; Endocrinologie et Maladies Métaboliques,** CHU Henri Mondor, Créteil, F-94000, France; and Institut National de la Santé et de la Recherche Médicale, U619,^{††} Tours, F-37000, France

Abstract The aim of this study was to examine the effects of supplementation with n-3 polyunsaturated fatty acids (PUFAs) on stress responses in mice subjected to an unpredictable chronic mild stress (UCMS) procedure. Stress-induced modifications in coat and aggressiveness were evaluated, and phospholipid PUFA profiles and monoamine levels were analyzed in the frontal cortex, hippocampus, and striatum. The results showed that repeated exposure to mild stressors induced degradation in the physical state of the coat, lowered body weight gain, and increased aggressiveness, without any effect of n-3 PUFA supplementation. The UCMS induced a significant decrease in the levels of norepinephrine in the frontal cortex and striatum, and a nonsignificant decrease in the hippocampus. The tissue levels of serotonin (5-HT) were 40% to 65% decreased in the three brain regions studied. Interestingly, the n-3 PUFA supplementation reversed this stress-induced reduction in 5-HT levels. These findings showed that supplementation in n-3 long-chain PUFAs might reverse certain effects of UCMS in cerebral structures involved in stress-related behaviors.—Vancassel, S., S. Leman, L. Hanonick, S. Denis, J. Roger, M. Nollet, S. Bodard, I. Kousignian, C. Belzung, and S. Chalon. n-3 Polyunsaturated fatty acid supplementation reverses stress-induced modifications on brain monoamine levels in mice. *J. Lipid Res.* 2008. 49: 340–348.

Supplementary key words chronic mild stress • omega 3 • docosahexaenoic acid

The mammalian brain is particularly rich in docosahexaenoic acid (22:6n-3, DHA), the main n-3 polyunsaturated fatty acid (PUFA). DHA is provided directly by the diet from aquatic sources and, after endogenous synthesis in

the liver, from its vegetable dietary precursor α -linolenic acid (18:3n-3, ALA) by successive desaturation and elongation. ALA is present in the brain at very low concentrations, whereas DHA can represent half of the total PUFAs inserted into phospholipids that constitute the structure of neuronal membranes. Accumulation of DHA in brain membranes is particularly high during the perinatal period, coinciding with the formation of synapses (1). It has been shown that the accumulation of DHA in the human infant brain during the first 6 months of life is half that of the total amount in the body, around 5 mg per day (2).

A diet deficient in ALA results in changes in the composition of cells, organelles, and synaptic membranes in the central nervous system and leads to reduced learning ability. Several animal studies have therefore focused on the effects of dietary n-3 PUFA deficiency on behavioral functions, showing reduced performance in spatial memory and discrimination tasks (as reviewed in Ref. 3). Moreover, rodents subjected to diets deficient in DHA or its precursor show reduced attention and reduction in locomotor responses to novelty, habituation, and anxiety (4–6). n-3 PUFA-deficient animals also exhibit aggressive behavior and increased symptoms of depression in a forced swim test (7). However, most of these effects were reversed by dietary supplementation with long-chain n-3 PUFAs (8–10).

It has been shown that these behavioral impairments may be the result of changes in the release of neurotrans-

Abbreviations: ALA, α -linolenic acid; DA, dopamine; DHA, docosahexaenoic acid; DOPAC, dihydroxyphenyl acetic acid; EPA, eicosapentaenoic acid; 5-HIAA, 5-hydroxyindole acetic acid; 5-HT, serotonin; HVA, homovanillic acid; NE, norepinephrine; NSF, novelty suppression of feeding; PE, phosphatidylethanolamine; SFA, saturated fatty acid; TFA, total fatty acid; UCMS, unpredictable chronic mild stress.

¹To whom correspondence should be addressed.

e-mail: sylvie.chalon@univ-tours.fr

Manuscript received 19 July 2007 and in revised form 29 October 2007.

Published, JLR Papers in Press, November 8, 2007.

DOI 10.1194/jlr.M700328-JLR200

Copyright © 2008 by the American Society for Biochemistry and Molecular Biology, Inc.

mitters and in interactions with corresponding receptors (11, 12). In particular, we showed that the presynaptic dopamine (DA) vesicle compartment was reduced in the frontal cortex of deficient rats, resulting in reduced cortical inhibition in ventral areas, particularly in the nucleus accumbens (13–15). These neurochemical changes may be responsible for inattention and inefficient reward processing, contributing to learning impairment and to slowing of extinction (16, 17). Changes in serotonergic neurotransmission were also reported in rats fed a chronic ALA-deficient diet, and these changes were potentially reversible by an adequate diet, depending on when the intervention occurred (18). In particular, weaning seems to be a pivotal period, after which any recovery is impossible, highlighting the importance of adequate supply of n-3 PUFAs during the developmental window (19).

In light of these findings, it can be suggested that early deficiency in n-3 PUFAs, particularly DHA, may result in a cascade of suboptimal development of neurotransmitter systems, especially in limbic structures, leading to impaired emotional and cognitive responses to subsequent environmental challenges. In addition, it has been suggested that DHA may be involved in the regulation of stress responses in rats, inasmuch as DHA intake completely reversed anxiety-like behavior in the elevated plus-maze caused by an n-3 PUFA-deficient diet and attenuated freezing behavior in conditioned fear-stress responses (20). It has also been shown that n-3 fatty acid-deficient mice were more vulnerable to stress, inasmuch as they behaved similarly to mice fed an adequate diet under normal conditions in the elevated-plus maze but were significantly more anxious under stressful conditions (3). In humans, it has previously been reported that administration of fish oil rich in DHA improved resistance to the mental stress of exams in students (21). Moreover, prevention of stress-induced aggression and hostility by DHA supplementation has been demonstrated in clinical trials (22, 23). The authors concluded that DHA influences a possible adaptive mechanism during stress by lowering norepinephrine levels.

There is currently some evidence regarding the involvement of dietary n-3 PUFA in mood disorders, particularly depression. Cross-national epidemiological analyses have suggested that lower n-3 PUFA levels are related to higher prevalence rates of major and postpartum depression (24, 25) and that there is a significant negative correlation between fish consumption and the prevalence of depression (26). In addition, several clinical studies have described abnormally low levels of DHA in the plasma and/or erythrocytes of depressed patients (27, 28).

To understand further the potential relationships between n-3 PUFA and depression, we examined the effects of n-3 PUFA supplementation on various responses induced by chronic stress exposure in mice. Animals were subjected to a chronic mild stress procedure that represents a well-known animal model of depression (29, 30). The consequences of n-3 PUFA supplementation on behavioral parameters and on monoaminergic levels and fatty acid profiles in several brain areas (i.e., the frontal

cortex, hippocampus, and striatum) were compared in normal and stress conditions.

MATERIALS AND METHODS

Animals

Fifty-five male **BALB/cByJ@Rj** mice (Centre d'Élevage Janvier; Le Genest Saint Isle, France) were used in this study. The mice were aged 6 weeks on their arrival and were housed in groups of three to four. They were maintained in a temperature- (22°C) and humidity- (40%) controlled room on an inverted light-dark cycle (light from 20:00 to 8:00) with free access to food (regular chow, Ext M20, SDS; Essex, England) and water. Mice were first acclimatized to the laboratory for 1 week before the start of the experiment. Experiments were conducted in accordance with the European Communities Council Directive of November 24, 1986 (86/609/EEC).

Mice were initially distributed into four groups. Mice of two groups were subjected to an unpredictable chronic mild stress (UCMS) procedure for 8 weeks, until the end of the behavioral tests. At the start of the experiment, stressed mice were maintained under the same standard conditions, but they were isolated in individual home cages (8.5 × 22 cm) and had no physical contact with the other mice. Animals from the two nonstressed groups were housed in groups of three or four, with a shelter and some tubes placed in their home cages. Several variables were used to assess the stress-induced effects, i.e., condition of coat, body weight, behavior in the novelty suppression of feeding (NSF) test, and behavior in the resident-intruder test. Condition of the coat and body weight were recorded weekly for all mice. The behavioral tests commenced from the seventh week. Mice were euthanized at the end of the behavioral tests (i.e., 8 weeks after the beginning of the UCMS procedure).

UCMS procedure

The stress protocol used was based on the UCMS procedure described by Willner, Muscat, and Papp (30), and adapted to mice by our laboratory (31–34). This animal model of depression consists of chronic exposure to various mild social and environmental stressors, none of which is sufficient alone to induce long-lasting effects. The stressors used vary, and they were applied in a different sequence each week to avoid any habituation. We excluded nociceptive stressors and food/water deprivation for ethical reasons. The emphasis in this model is on the chronic and variable nature of the stressors.

The stressors used consisted of removal of bedding, wetting the bedding, several repeated changes of bedding, tilting cages by 45° for varying times, placing ~2 cm of water in the home cage (after removing the bedding), exposure to rat bedding for 15 min, social stress 1 (placing a mouse in a cage that had previously belonged to another mouse), social stress 2 (placing a mouse in another animal's cage and then returning it to its own cage, where it would find that the cage had been occupied by another mouse), restrained stress in small tubes for varying times, lights on during the dark phase, lights off during the light phase, a succession of light and dark periods for 30 min, and switching the light/dark cycle for varying durations.

Parameters measured

Two parameters were measured throughout the UCMS procedure, i.e., condition of the coat and body weight. The condition of the coat was evaluated each week by examining the

coat on different parts of the body (head, neck, dorsal area, ventral area, tail, front and hind paws, and genital area). For each area, a score of 0 was applied if the coat was in good condition, and a score of 1 if it was in very poor condition (disordered, piloerection). The total score was the sum of the score for each area; thus a high score indicated that the coat was in poor condition. This method has been validated in a number of recent studies (31, 32, 35). Body weight was also measured each week until the end of the UCMS procedure.

n-3 PUFA supplementation

n-3 PUFA (IérodNV, Laboratoire Iérod; France) or vehicle devoid of n-3 PUFA (Frial oil; Lesieur, France) was administered daily at 1:30 PM by force feeding at a volume of 0.15 ml throughout the UCMS procedure. IérodNV contained 70% n-3 PUFA (w/w). Mice in the supplemented groups were thus receiving a dose of approximately 80 mg/day n-3 PUFA [6.1 mg DHA and 9.2 mg eicosapentaenoic acid (EPA)], corresponding to the dose that has been previously shown to allow maximal DHA incorporation in brain membranes (36).

Four groups of mice were formed: a nonstressed group receiving the vehicle (NS-V, $n = 13$), a stressed group receiving the vehicle (S-V, $n = 14$), a nonstressed group receiving n-3 PUFA (NS-PUFA, $n = 14$), and a stressed group receiving n-3 PUFA (S-PUFA, $n = 14$).

Behavioral tests

NSF test. The NSF test is a modified version of that used by Santarelli et al. (32). The testing apparatus consisted of a wooden 30 cm $\times$ 30 cm $\times$ 20 cm box with an indirect red light. The floor was covered with 2 cm sawdust. Twelve hours before the test, food was removed from the cages. At the time of testing, a pellet of food (regular chow) was placed on a white paper platform positioned in the center of the box. An animal was placed in a corner of the maze. The latency to manifestly chew the pellet was recorded within a 3 min period. This test induced conflicting motivation between the drive to eat the food pellet and the fear of venturing into the center of the arena. This test was performed at 10 AM.

Resident-intruder test. The resident-intruder test consisted of the introduction of an unknown animal into the home cage of test mice to measure their aggressiveness. The intruder was a naïve male C57BL/6J@Rj mouse, known for its high passivity and lack of aggression. When done in nonstressed mice, the animals were isolated 24 h before the test to become familiar with their novel environment. The bedding of the isolated stressed mice was changed 24 h before the test to standardize conditions between nonstressed and stressed mice. The test started when the intruder was placed in the home cage of the resident animal and lasted for 5 min. Two parameters were measured: the latency of the first attack and the frequency of attacks on the intruder. This test was performed at 3 PM.

Fatty acid analysis of phospholipid classes

Mice ($n = 6$ for each group) were euthanized by decapitation at the end of the behavioral tests. Brains were quickly removed, and the frontal cortex, hippocampus, and striatum were dissected out on ice, weighed, and frozen in liquid nitrogen. Total lipids were extracted by a modification of the method of Folch, Lees, and Sloane Stanley (37). Phosphatidylethanolamine (PE) was separated from total lipids on an aminopropyl-bonded silica gel cartridge (BAKERBOND speTM Amino; Baker, USA) by the method of Alessandri and Goustard-Langelier (38). The fatty

acids were methylated with BF₃, and the fatty acid methyl esters were analyzed by gas liquid chromatography (Carlo Erba) (39) and identified by comparison with commercial standards of equivalent chain lengths. The results were expressed as mg fatty acids/100 mg total fatty acids (TFAs; wt %).

Monoamine analysis

Mice ($n = 6-8$ for each group) were euthanized by decapitation at the end of the behavioral tests. Brains were quickly removed, and the frontal cortex, hippocampus, and striatum were dissected out on ice and weighed. Each cerebral region was homogenized in 1 ml of a buffer containing 12 mM HClO₄, 0.1 mM EDTA, 0.5 mM Na₂S₂O₅, 3 mM octanesulfonic acid, and 3 mM heptanesulfonic acid with an Ultraturrax T25 at 4°C. After centrifugation at 30,000 g for 20 min at 4°C, 100 μ l of the supernatant was stored at -80°C until use. Contents of norepinephrine (NE), DA, dihydroxyphenyl acetic acid (DOPAC), homovanillic acid (HVA), serotonin (5-HT) and 5-hydroxyindole acetic acid (5-HIAA) were measured in each supernatant by HPLC, with electrochemical detection on a Concorde apparatus (Waters; St. Quentin-Yvelines, France). Samples were injected using a Rheodyne 7725i injector valve with a 20 μ l injection loop. The mobile phase, consisting of 7% acetonitrile, 3% methanol, 90% 20 mM citric acid, 10 mM monobasic phosphate sodium, 3.25 mM octanesulfonic acid, 3 mM heptanesulfonic acid, 0.1 mM EDTA, 2 mM KCl, 6 ml/l o-phosphoric acid, and 2 ml/l diethylamine, pH 3, was pumped at 0.3 ml/min using a Gold 118 system (Beckman; Fullerton, CA). Separation was performed with a 3 μ m C18, 3.2 $\times$ 100 mm reversed phase column (LC-22C, BAS; West Lafayette, IN). A glassy carbon working electrode set at 610 mV with reference to an in situ Ag/AgCl reference electrode was used to detect compounds. Signals were recorded and quantified with a Beckman Gold 118 integrator. Amounts of NE, DA, DOPAC, HVA, 5-HT, and 5-HIAA were calculated by comparing peak levels from the supernatant samples with those of external standards. Results are expressed as nmol/mg tissue.

Statistical analyses

All data are expressed as mean $\pm$ SEM. For monoamine assays and fatty acid analyses, means were compared by two-way ANOVA (PUFA supplementation $\times$ stress factors), followed by the posthoc Bonferroni test in case of significance. For behavioral studies and body weight follow-up, results were compared using nonparametric ANOVA from Kruskal-Wallis, followed by the posthoc Mann-Whitney U test in case of significance. Differences with $P < 0.05$ were considered significant. Statistical analyses were performed using Statistica 7.0 software (StatSoft®, Inc.; Tulsa, OK).

RESULTS

State of the coat and body weight

Coat state. Kruskal-Wallis test revealed significant differences in the state of the coat after 1 week of UCMS ($P < 0.001$) until the end of UCMS ($P < 0.001$) (Fig. 1A). The coat state of both stressed groups (groups S-V and S-PUFA) continued to deteriorate, and there was a significant difference compared with nonstressed mice after 1 week UCMS ($P < 0.001$) until the end of UCMS ($P < 0.001$). No effect of n-3 PUFA treatment was observed in stressed mice (groups S-V and S-PUFA), from week 1 until week 5. Deterioration was greater during weeks 5 and 7 in the

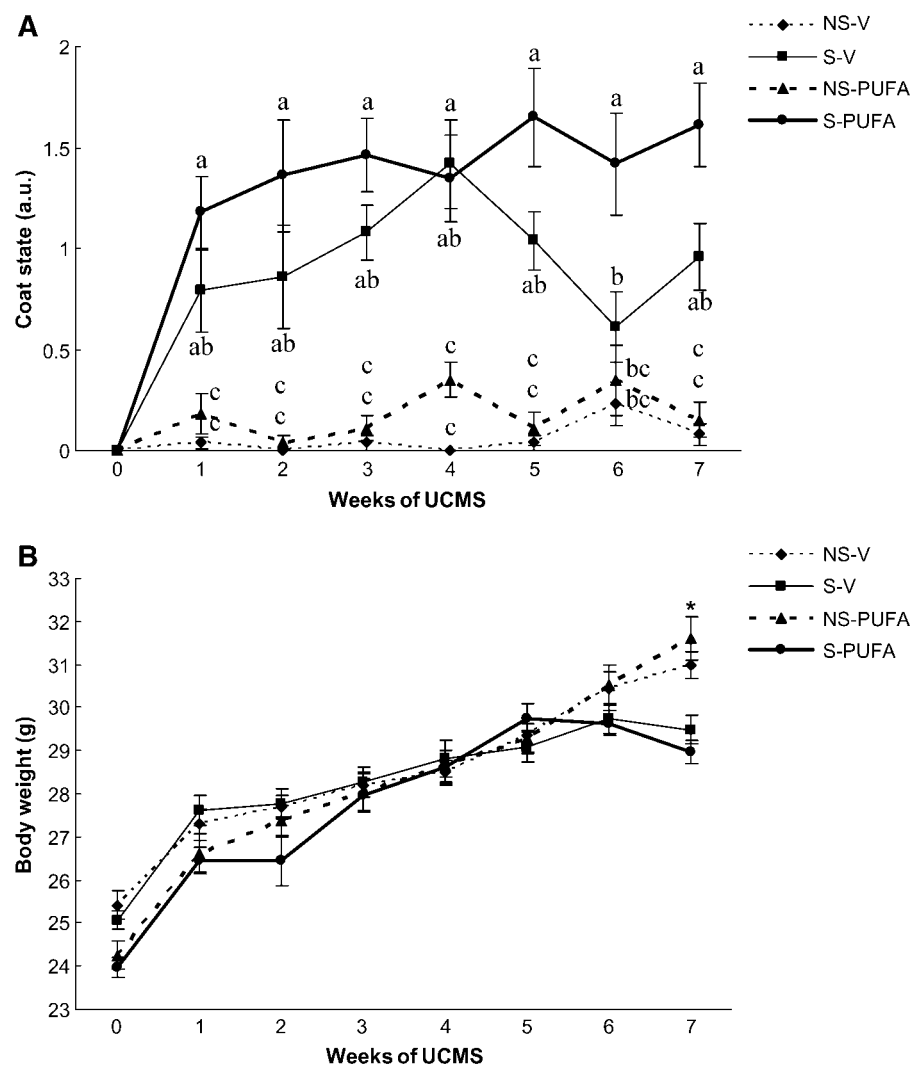


Fig. 1. Effects of unpredictable chronic mild stress (UCMS) on the state of the coat (A) and body weight (B). A: The condition of the coat was evaluated each week on eight different body areas and scored from 0 (good condition) to 1 (very poor condition). The total score represents the sum of each area. a–c, significantly different between groups ($P < 0.05$; ANOVA); B: *Significantly different between nonstressed groups and stressed groups ($P < 0.05$; ANOVA). Values are means $\pm$ SEM ($n = 12$ for each group). NS-V, nonstressed receiving vehicle; S-V, stressed receiving vehicle; NS-PUFA, nonstressed receiving n-3 PUFA; S-PUFA, stressed receiving n-3 PUFA.

stressed supplemented mice (group S-PUFA) than in the stressed unsupplemented mice (group S-V, $P = 0.0501$ and $P = 0.0568$, respectively), but the difference only reached statistical significance during week 6 ($P < 0.03$).

Body weight. No difference in body weight appeared among the four groups throughout the UCMS regimen (Fig. 1B), except during week 7, when the body weights of both nonstressed groups (NS-V and NS-PUFA) were significantly higher than those of the stressed groups (S-V and S-PUFA; $P < 0.03$ and $P < 0.001$, respectively).

Behavioral analyses

NSF test. The Kruskal-Wallis test showed significant differences between the four groups in latency to chew the pellet ($P < 0.001$) (Fig. 2A). n-3 PUFA supplementa-

tion resulted in increased latency to chew the pellet ($P < 0.02$ for S-V vs. S-PUFA and $P < 0.005$ for NS-V vs. NS-PUFA). UCMS had no effect in either test.

Resident-intruder test. The Kruskal-Wallis test showed significant differences between the groups in latency to attack the intruder ($P < 0.005$) (Fig. 2B). The UCMS procedure resulted in a significant effect, inasmuch as it reduced the latency of agonistic behaviors ($P < 0.05$ for NS-V vs. S-V). Similar effects were observed for frequency of attack (data not shown). n-3 PUFA supplementation had no effect in this test.

Fatty acid profile of brain membranes

The major fatty acids in the PE of frontal cortex, hippocampus, and striatum are shown in Tables 1, 2, and 3,

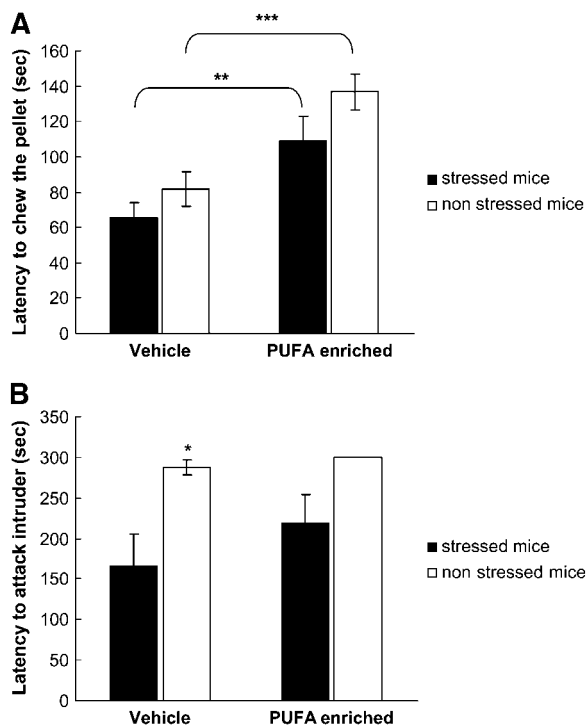


Fig. 2. Effects of UCMS and n-3 PUFA supplementation in the novelty suppression of feeding test (A) and in the resident-intruder test (B). A: ** $P < 0.02$; *** $P < 0.005$; B: * $P < 0.05$ (ANOVA). Values are means $\pm$ SEM ($n = 12$ for each group).

respectively. In the four groups of mice, saturated fatty acid (SFA) and PUFA accounted for the highest levels of fatty acids. The total SFA and total n-6 + n-3 PUFAs thus accounted for nearly 30% and 45% of the TFAs in each cerebral region, respectively.

Effect of UCMS in nonsupplemented mice

The UCMS procedure resulted in a slight but significant reduction in the 22:5n-6 content in the three cerebral areas studied (20% in the frontal cortex and hippocampus, 28% in the striatum), leading to a significantly reduced 22:5n-6/22:6n-3 ratio in the hippocampus and striatum ($P < 0.05$).

Effects of n-3 PUFA supplementation in nonstressed mice

Daily n-3 PUFA supplementation did not affect the SFA or the MUFA contents of brain membranes, but significantly increased the 22:6n-3 (DHA) levels in the frontal cortex (+9% in NS-PUFA compared with NS-V, $P < 0.05$) and hippocampus (+17%, $P < 0.05$). However, no incorporation of 20:5n-3 (EPA) was detected, despite the high content in the supplement. This resulted in significantly higher levels of total n-3 PUFA ($P < 0.05$). The n-3 PUFA supplementation induced a reduction of total n-6 PUFA levels in the three cerebral regions, i.e., 20% in the frontal cortex, 15% in the hippocampus, and 12% in the striatum, mainly owing to the decrease in 20:4n-6 and 22:5n-6 (decreased by almost 60% in the three regions, $P < 0.05$). These changes resulted in a significant reduction of the 22:5n-6/22:6n-3 ratio ($P < 0.05$), without affecting the total n-6 + n-3 PUFAs.

Interaction between stress and supplementation

In mice subjected to UCMS, n-3 PUFA supplementation resulted in only a 5–6% increase in 22:6n-3 (DHA) levels in the hippocampus and in frontal cortex ($P < 0.05$), whereas no change was observed in the striatum. Moreover, low levels of incorporation of 20:5n-3 (EPA) appeared in the three cerebral structures. The reduction in 22:5n-6 was much less in stressed than in nonstressed mice; levels were decreased by 50% in the frontal cortex, 35% in the hippocampus, and unchanged in the striatum. It should be noted that the reduction in levels of 20:4n-6 (arachidonic acid) was greater in the hippocampus and striatum of stressed mice (S-PUFA group) than in corresponding structures in nonstressed mice (NS-PUFA group).

Monoamine levels in brain tissues

Effects of UCMS. A number of reductions in tissue levels of monoamines were observed in stressed animals (group S-V) compared with controls (group NS-V) in the three brain regions studied. In the frontal cortex (Table 4), significantly reduced levels of NE were observed (51%, $P < 0.05$). In the hippocampus (Table 5), a 44%, although non-significantly reduced, level of NE was observed, whereas amounts of 5-HT and 5-HIAA were decreased 2-fold ($P <$

TABLE 1. Main fatty acid contents of PE in the frontal cortex

Group	Fatty Acid ^a		mg/100 mg fatty acids							
	SFA	MUFA	20:4n-6	22:5n-6	n-6 PUFA ^b	20:5n-3	22:6n-3	n-3 PUFA ^c	n-6+n-3 PUFA	22:5n-6/22:6n-3
NS-V	26.9 $\pm$ 0.6	10.2 $\pm$ 0.6	9.5 $\pm$ 0.3 ^a	0.7 $\pm$ 0.0 ^a	14.9 $\pm$ 0.4 ^a	nd	29.3 $\pm$ 0.8 ^a	29.6 $\pm$ 0.8 ^a	44.6 $\pm$ 1.0	0.02 $\pm$ 0.00 ^a
S-V	26.6 $\pm$ 0.7	11.0 $\pm$ 0.6	9.4 $\pm$ 0.3 ^a	0.5 $\pm$ 0.0 ^b	14.8 $\pm$ 0.4 ^a	nd	29.3 $\pm$ 0.6 ^a	29.5 $\pm$ 0.5 ^a	44.3 $\pm$ 0.5	0.02 $\pm$ 0.00 ^a
NS-PUFA	26.3 $\pm$ 0.7	11.2 $\pm$ 0.9	7.8 $\pm$ 0.2 ^b	0.3 $\pm$ 0.0 ^c	11.9 $\pm$ 0.4 ^b	nd	31.7 $\pm$ 0.6 ^b	32.4 $\pm$ 0.6 ^b	44.3 $\pm$ 0.8	0.01 $\pm$ 0.00 ^b
S-PUFA	26.5 $\pm$ 1.0	11.0 $\pm$ 0.3	7.7 $\pm$ 0.5 ^b	0.3 $\pm$ 0.0 ^c	12.0 $\pm$ 0.6 ^b	0.1 $\pm$ 0.1	30.8 $\pm$ 1.7 ^b	31.6 $\pm$ 1.7 ^b	43.5 $\pm$ 2.3	0.01 $\pm$ 0.00 ^b

MUFA, monounsaturated fatty acid; NS-PUFA, nonstressed mice receiving n-3 fatty acids; NS-V, nonstressed mice receiving vehicle; PE, phosphatidylethanolamine; PUFA, polyunsaturated fatty acid; SFA, saturated fatty acid; S-PUFA, stressed mice receiving n-3 fatty acids; S-V, stressed mice receiving vehicle; nd, not determined. Values are means $\pm$ SEM.

^aFor each fatty acid, values with different superscripts (^{a–c}) were significantly different between groups (two-way ANOVA; $P < 0.05$); $n = 6$ for all groups.

^bn-6 PUFA = sum of 18:2n-6, 18:3n-6, 20:3n-6, 22:4n-6, and 22:5n-6.

^cn-3 PUFA = sum of 18:3n-3, 18:4n-3, 20:4n-3, 20:5n-3, 22:5n-3, and 22:6n-3.

TABLE 2. Main fatty acid contents of PE in the hippocampus

Group	Fatty Acid ^a		mg/100 mg fatty acids							
	SFA	MUFA	20:4n-6	22:5n-6	n-6 PUFA ^b	20:5n-3	22:6n-3	n-3 PUFA ^c	n-6+n-3 PUFA	22:5n-6/22:6n-3
NS-V	25.6 ± 1.4 ^{a,b}	11.0 ± 1.0	12.2 ± 1.0 ^a	0.7 ± 0.1 ^a	19.1 ± 1.4 ^a	nd	24.1 ± 1.7 ^a	24.4 ± 1.7 ^a	43.5 ± 3.0	0.03 ± 0.00 ^a
S-V	25.1 ± 0.6 ^{a,b}	10.2 ± 0.4	12.4 ± 0.3 ^a	0.5 ± 0.0 ^b	19.5 ± 0.3 ^a	nd	25.0 ± 0.7 ^a	25.3 ± 0.7 ^a	44.8 ± 0.5	0.02 ± 0.00 ^b
NS-PUFA	26.3 ± 1.2 ^a	10.9 ± 0.9	10.8 ± 0.6 ^b	0.3 ± 0.0 ^c	16.2 ± 0.6 ^b	nd	28.3 ± 1.4 ^b	29.1 ± 1.4 ^b	45.3 ± 1.8	0.01 ± 0.00 ^c
S-PUFA	24.9 ± 0.6 ^b	10.7 ± 0.4	10.2 ± 0.2 ^b	0.3 ± 0.0 ^c	16.1 ± 0.9 ^b	0.1 ± 0.1	26.4 ± 0.8 ^c	27.3 ± 0.9 ^c	43.4 ± 1.5	0.01 ± 0.00 ^c

Values are means ± SEM.

^aFor each fatty acid, values with different superscripts (^{a-c}) were significantly different between groups (two-way ANOVA; $P < 0.05$); $n = 6$ for all groups.

^bn-6 PUFA = sum of 18:2n-6, 18:3n-6, 20:3n-6, 22:4n-6, and 22:5n-6.

^cn-3 PUFA = sum of 18:3n-3, 18:4n-3, 20:4n-3, 20:5n-3, 22:5n-3, and 22:6n-3.

0.05). A significant 60% decrease in NE and 45% decrease in HVA levels were measured in the striatum (Table 6).

Effects of n-3 PUFA supplementation. Supplementation with n-3 PUFA resulted in significant increases in the tissue levels of several monoamines in stressed mice, in both frontal cortex and hippocampus. Increased amounts of 5-HT were observed in S-PUFA compared with S-V groups in the frontal cortex (120%, $P < 0.05$, Table 4), and increased amounts of DOPAC were observed in nonstressed animals (97%, $P < 0.05$). In the hippocampus, n-3 PUFA supplementation also increased the levels of 5-HT and 5-HIAA in the stress condition (+93% and +60%, respectively, $P < 0.05$; Table 5). No effect of the supplementation was seen in the striatum (Table 6).

DISCUSSION

The purpose of the present study was to evaluate the effects of UCMS on several aspects of behavior and brain phospholipid fatty acid profiles and monoamine levels in mice receiving either a control diet or a diet supplemented with n-3 long-chain PUFAs throughout the stress procedure. The supplementation comprised daily administration of a mixture of DHA and EPA by force feeding, allowing precise control of the dose. It had been previously shown that n-3 PUFA, particularly DHA, can have an antistress effect in conditioned fear-induced freezing (20). Moreover, positive effects of EPA have been demonstrated on symptoms of depression in humans, whereas low n-3 PUFA plasma status has been reported to be asso-

ciated with an increased risk of depression (as reviewed in Ref. 40).

We have previously shown in animal models that chronic diet deficiency in ALA was able to act on the release of monoamines and acetylcholine in brain regions involved in stress-related behavior (mainly the hippocampus and frontal cortex) (15, 16, 18, 39). 5-HT and acetylcholine release was greater in the basal state in the hippocampus but was reduced under neuronal activation in deficient rats. In addition, it appeared that serotonergic and muscarinic receptor binding might also be affected by the n-3 PUFA content of the diet (11, 41, 42).

On the basis of these findings, we hypothesized that n-3 PUFA supplementation could improve resistance to stress through action on monoaminergic neurotransmission. We used a model of UCMS in the mouse that had been shown to induce a depression-like state, which becomes apparent through deterioration in coat state (31–35). As expected, repeated exposure to mild stressors in the present study resulted in deterioration in the state of the coat that could be explained by a decrease in the mouse's grooming behavior related to conservation of resources in favor of coping behaviors toward the stress situation (31). The UCMS effect was also observed in the decrease in body weight gain during the last week. A clear effect of the UCMS procedure was also observed in the resident-intruder test, in which the decrease in latency to attack the intruder confirmed the increased level of aggressiveness in stressed animals (33). We observed that n-3 PUFA supplementation did not reduce coat deterioration in this model, or the aggressiveness in the resident-intruder test in stressed mice. Further, the coat state of stressed-

TABLE 3. Main fatty acid contents of PE in the striatum

Group	Fatty Acid ^a		mg/100 mg fatty acids							
	SFA	MUFA	20:4n-6	22:5n-6	n-6 PUFA ^b	20:5n-3	22:6n-3	n-3 PUFA ^c	n-6+n-3 PUFA	22:5n-6/22:6n-3
NS-V	24.3 ± 1.0	13.1 ± 2.0 ^a	11.6 ± 0.8 ^a	0.6 ± 0.1 ^a	18.0 ± 1.0 ^a	nd	23.2 ± 1.6	23.6 ± 1.6	41.5 ± 2.5 ^a	0.03 ± 0.00 ^a
S-V	23.1 ± 1.2	14.0 ± 0.8 ^a	11.2 ± 0.3 ^a	0.4 ± 0.1 ^b	17.2 ± 0.7 ^a	nd	23.5 ± 1.0	23.8 ± 1.1	41.0 ± 0.7 ^{a,b}	0.02 ± 0.00 ^b
NS-PUFA	23.6 ± 1.3	15.7 ± 2.0 ^a	11.4 ± 1.1 ^a	0.3 ± 0.0 ^b	15.8 ± 1.4 ^b	nd	25.2 ± 1.9	25.9 ± 1.8	41.6 ± 2.6 ^a	0.01 ± 0.00 ^b
S-PUFA	24.1 ± 1.9	13.7 ± 1.2 ^b	9.1 ± 0.2 ^b	0.4 ± 0.1 ^b	14.3 ± 0.5 ^c	0.1 ± 0.1	23.1 ± 2.4	24.1 ± 2.7	38.4 ± 2.3 ^b	0.02 ± 0.01 ^c

Values are means ± SEM.

^aFor each fatty acid, values with different superscripts (^{a-c}) were significantly different between groups (two-way ANOVA; $P < 0.05$); $n = 6$ for all groups.

^bn-6 PUFA = sum of 18:2n-6, 18:3n-6, 20:3n-6, 22:4n-6, and 22:5n-6.

^cn-3 PUFA = sum of 18:3n-3, 18:4n-3, 20:4n-3, 20:5n-3, 22:5n-3, and 22:6n-3.

TABLE 4. Monoamine levels in the frontal cortex

Group	Monoamine ^a					
	nmol/mg tissue					
	NE	DA	DOPAC	HVA	5-HT	5-HIAA
NS-V ^b	1.95 ± 0.29 ^a	2.45 ± 0.79	0.68 ± 0.15 ^a	1.75 ± 0.76	1.05 ± 0.13 ^{a,b}	1.18 ± 0.45
S-V ^c	0.95 ± 0.21 ^b	1.71 ± 0.77	0.63 ± 0.22 ^a	0.89 ± 0.68	0.64 ± 0.27 ^a	0.88 ± 0.31
NS-PUFA ^b	2.18 ± 0.34 ^a	2.63 ± 0.67	1.34 ± 0.36 ^b	1.33 ± 0.50	1.28 ± 0.78 ^{a,b}	0.89 ± 0.12
S-PUFA ^c	1.28 ± 0.30 ^b	2.81 ± 1.39	0.88 ± 0.28 ^a	1.28 ± 0.4	1.41 ± 0.25 ^b	1.13 ± 0.28

Values are means ± SEM.

^a For each monoamine, values with different superscripts (^{a-c}) were significantly different between groups (two-way ANOVA; *P* < 0.05).

^b n = 6.

^c n = 7.

supplemented mice was sometimes worse than that of their matched controls (stressed-vehicle mice). The sole effect of supplementation was seen in the NSF test, which involves food motivation and fear in a novel environment: in this situation, n-3 PUFA supplementation resulted in greater latency to chew the pellet in the novel environment, and this effect was unexpectedly independent of the UCMS procedure. In fact, we observed that in both stressed and nonstressed groups, the mice subjected to n-3 PUFA supplementation were more reluctant to accept the force-feeding procedure than were mice receiving the vehicle. This may be a consequence of the odor and/or taste of the PUFA-enriched mixture (fish and sea food odors), to which the mice seemed to have an aversion, resulting in reduction in their motivation to take food in the NSF test.

We measured the tissue levels of monoamines in several brain areas in the four experimental groups. In mice that did not receive n-3 PUFA supplementation, the UCMS induced a significant 50% to 60% decrease in the levels of NE in the frontal cortex and striatum, and a 44% (nonsignificant) decrease in the hippocampus. The tissue levels of 5-HT were also 40% to 65% decreased in the three brain regions studied, although this reduction was only statistically significant in the hippocampus. The levels of the 5-HT metabolite 5-HIAA were also significantly reduced in the hippocampus of stressed animals. The levels of DA and its metabolites, DOPAC and HVA, had a tendency to be slightly reduced in the regions where it was detectable (i.e., the frontal cortex and striatum), but no statistically significant difference was detected, except for the levels of HVA in the striatum. It has previously been shown that exposure to stressful stimuli increases the extracellular release of 5-HT in the hippocampus (43) and frontal cortex (44). It has been suggested that this type of

consequence is a neuroadaptive process in response to stress, aimed at attenuating the adverse effects on behavior, and that a failure of this process may be involved in the occurrence of depression (45). In rat models of chronic mild stress, different results have been reported with regard to the function of monoaminergic systems, such as an increase in dopaminergic activity in the prefrontal cortex (46) or a decrease in the tissue levels of 5-HT (47). However, discrepant data have also been reported (48). In all conditions, these neurochemical modifications were improved by the administration of antidepressive drugs such as imipramine (46) or fluoxetine (47). With regard to the neurochemical findings, the reductions in tissue levels of 5-HT and NE detected at the end of the UCMS procedure may be related to signs of depression-like behavior observed in these animals.

The main finding of the present study was that supplementation with n-3 PUFA seemed to have a reversing effect on the reduced 5-HT levels that were induced by the UCMS. As previously noted, tissue levels of 5-HT were 40% to 65% decreased in the three brain regions studied of unsupplemented stressed animals, although this reduction was only statistically significant in the hippocampus. Under n-3 PUFA supplementation, these levels were rather similar (frontal cortex and striatum) or increased (hippocampus) between stressed and nonstressed mice. Although this "reversal" was proven for 5-HT levels, it was less clear for NE, which was also reduced in S-PUFA versus NS-PUFA mice in the frontal cortex, but very similar between both groups in the hippocampus. For DA and metabolites, it was also difficult to observe clear effects of the n-3 supplementation on the consequences of stress. Thus, in the frontal cortex, we obtained a nonsignificant 30–40% reduction in the levels of DA and HVA in stressed animals, and similar levels

TABLE 5. Monoamine levels in the hippocampus

Group	Monoamine ^a					
	nmol/mg tissue					
	NE	DA	DOPAC	HVA	5-HT	5-HIAA
NS-V ^b	2.32 ± 0.31	nd	nd	nd	2.05 ± 1.32 ^a	2.93 ± 0.83 ^{a,c}
S-V ^c	1.29 ± 1.08	nd	nd	nd	1.10 ± 0.40 ^b	1.40 ± 0.44 ^b
NS-PUFA ^b	1.93 ± 0.69	nd	nd	nd	1.39 ± 0.40 ^{a,b}	1.70 ± 0.29 ^{b,c}
S-PUFA ^c	1.90 ± 0.93	nd	nd	nd	2.12 ± 0.63 ^a	2.24 ± 0.61 ^c

Values are means ± SEM.

^a For each monoamine, values with different superscripts (^{a-c}) were significantly different between groups (two-way ANOVA; *P* < 0.05).

^b n = 6.

^c n = 7.

TABLE 6. Monoamine levels in the striatum

Group	Monoamine ^a					
	NE	DA	DOPAC	HVA	5-HT	5-HIAA
NS-V ^b	2.03 ± 1.00 ^a	35.82 ± 12.60	10.82 ± 4.70	9.92 ± 4.31 ^a	4.00 ± 2.81	2.73 ± 1.37
S-V ^c	0.83 ± 0.66 ^b	29.00 ± 6.90	6.43 ± 1.22	5.47 ± 0.95 ^b	1.41 ± 1.13	1.64 ± 0.46
NS-PUFA ^b	nd	35.55 ± 9.18	8.27 ± 1.81	10.61 ± 4.43 ^a	3.81 ± 0.86	1.70 ± 0.52
S-PUFA ^c	nd	35.43 ± 11.87	8.96 ± 1.93	5.86 ± 2.99 ^b	3.15 ± 2.00	1.95 ± 0.80

Values are means ± SEM.

^aFor each monoamine, values with different superscripts (^{a,b}) were significantly different between groups (two-way ANOVA; $P < 0.05$).

^bn = 6.

^cn = 7.

were observed between stressed and nonstressed animals under n-3 PUFA supplementation. In the striatum, the levels of HVA were significantly reduced in stressed compared with nonstressed animals, in unsupplemented as well as in supplemented groups. As mentioned above, these neurochemical effects of supplementation were not associated with effects on the physical or behavioral signs resulting from the stress procedure, indicating dissociation between the stress-induced modifications in monoaminergic parameters and the stressed-induced modifications in physical and behavioral parameters.

Supplementation with n-3 PUFA was also associated with several changes in the fatty acid composition of brain phospholipid membranes, inasmuch as it increased the incorporation of DHA in a range of variations specific to each cerebral region according to the stress condition. The increase in DHA in nonstressed mice was between 9% and 17%, the maximum observed in the hippocampus. In stressed conditions, there was no increase in DHA in the striatum, and it reached only 6% in the hippocampus and in the frontal cortex. However, n-3 PUFA supplementation resulted in low levels of incorporation of EPA in cerebral membranes in stressed mice but not in nonstressed animals. These findings suggest that the UCMS procedure might prevent the incorporation of DHA into phospholipid membranes. It has previously been shown that psychological stress increases lipid peroxidation activity in the mouse (49) and rat (50, 51) brain, in a cerebral region-specific manner. DHA has a highly oxidation-prone chemical structure, and this could contribute to the lower DHA levels incorporated into brain phospholipids of UCMS-subjected mice. However, the appearance of EPA also suggested higher retroconversion of DHA.

The UCMS imposed on nonsupplemented mice for 8 weeks resulted in a reduction in the 22:5n-6 levels in the PE of the frontal cortex, hippocampus, and striatum. Although this PUFA was present at very low concentrations in cerebral phospholipids, there may be stress-induced consequences on brain membrane properties. The differences in DHA content of cerebral structures observed in unsupplemented nonstressed mice were exacerbated by n-3 PUFA supplementation, illustrating the previously described differences in accretion (9, 39, 52). Incorporation of DHA in supplemented mice was higher in the frontal cortex than in the striatum and the hippocampus. As expected, n-3 PUFA supplementation induced a reduction in n-6 PUFA. In particular, we showed that 22:5n-6

levels, which were already low in brain membranes in unsupplemented animals, were substantially changed in supplemented nonstressed mice.

In conclusion, the present findings showed that UCMS resulted in depression-like behavior in mice associated with changes in brain phospholipid fatty acid composition and monoamine levels. Daily n-3 PUFA supplementation reversed the 5-HT stress-induced effects but without impact on the physical state or behavior of the animals. This suggests that n-3 long-chain PUFAs can improve resistance to stress through attenuation of the impact of the UCMS on specific aspects of cerebral function.

This study was supported by INRA, Institut National de la Santé et de la Recherche Médicale, and the Université François Rabelais (Tours, France), and by a grant from the Laboratoire Léro (Suresnes, France).

REFERENCES

- Clandinin, M. T. 1999. Brain development and assessing the supply of polyunsaturated fatty acid. *Lipids*. **34**: 131–137.
- Cunnane, S. C., V. Francescutti, J. T. Brenna, and M. Crawford. 2000. Breast-fed infants achieve a higher rate of brain and whole body docosahexaenoate accumulation than formula-fed infants not consuming dietary docosahexaenoate. *Lipids*. **35**: 105–111.
- Fedorova, I., and N. Salem, Jr. 2006. Omega-3 fatty acids and rodent behavior. *Prostaglandins Leukot. Essent. Fatty Acids*. **75**: 271–289.
- Francès, H., C. Monier, M. Clement, A. Lecorsier, M. Debray, and J. M. Bourre. 1996. Effect of dietary alpha-linolenic acid deficiency on habituation. *Life Sci*. **58**: 1805–1806.
- Levant, B., J. D. Radcliff, and S. E. Carlson. 2004. Decreased brain docosahexaenoic acid during development alters dopamine-related behaviors in adult rats that are differentially affected by dietary remediation. *Behav. Brain Res*. **152**: 49–57.
- Vancassel, S., C. Blondeau, M. S. Lallemand, M. Cador, A. Linard, M. Lavalie, and F. Dellu-Hagedorn. 2007. Hyperactivity in the rat is associated with spontaneous low level of n-3 polyunsaturated fatty acids in the frontal cortex. *Behav. Brain Res*. **180**: 119–126.
- DeMar, J. C., K. Ma, J. M. Bell, M. Igarashi, D. Greenstein, and S. I. Rapoport. 2006. One generation of n-3 polyunsaturated fatty acid deprivation increases depression and aggression test scores in rats. *J. Lipid Res*. **47**: 172–180.
- Lim, S. Y., and H. Suzuki. 2002. Dose-response effect of docosahexaenoic acid ethyl ester on maze behavior and brain fatty acid composition in adult mice. *Int. J. Vitam. Nutr. Res*. **72**: 77–84.
- Carrié, I., M. Clément, D. de Javel, H. Francès, and J. M. Bourre. 2000. Phospholipid supplementation reverses behavioral and biochemical alterations induced by n-3 polyunsaturated fatty acid deficiency in mice. *J. Lipid Res*. **41**: 473–480.
- Morigushi, T., and N. Salem. 2003. Recovery of brain docosahexaenoate leads to recovery of spatial task performance. *J. Neurochem*. **87**: 297–309.

11. Chalon, S. 2006. Omega-3 fatty acids and monoamine neurotransmission. *Prostaglandins Leukot. Essent. Fatty Acids*. **75**: 259–269.
12. Kuperstein, F., E. Yakubov, P. Dinerman, S. Gil, R. Elyam, N. Salem, Jr., and E. Yavin. 2005. Overexpression of dopamine receptor genes and their products in the postnatal rat brain following maternal n-3 fatty acid dietary deficiency. *J. Neurochem*. **95**: 1550–1562.
13. Zimmer, L., S. Hembert, G. Durand, P. Breton, D. Guilloteau, J. C. Besnard, and S. Chalon. 1998. Chronic n-3 polyunsaturated fatty acid diet-deficiency acts on dopamine metabolism in the rat frontal cortex: a microdialysis study. *Neurosci. Lett.* **1240**: 177–181.
14. Zimmer, L., S. Delion-Vancassel, G. Durand, D. Guilloteau, S. Bodard, J. C. Besnard, and S. Chalon. 2000. Modification of dopamine neurotransmission in the nucleus accumbens of rats deficient in n-3 polyunsaturated fatty acids. *J. Lipid Res.* **41**: 32–40.
15. Zimmer, L., S. Delion-Vancassel, S. Cantagel, P. Breton, S. Delamanche, D. Guilloteau, G. Durand, and S. Chalon. 2002. The dopamine mesocorticolimbic pathway is altered by a chronic deficiency in n-3 polyunsaturated fatty acids in the rat. *Am. J. Clin. Nutr.* **75**: 662–667.
16. Chalon, S., S. Vancassel, L. Zimmer, D. Guilloteau, and G. Durand. 2001. PUFA and cerebral function: focus on monoaminergic neurotransmitters. *Lipids*. **36**: 937–944.
17. Reisbick, S., and M. Neuringer. 1997. Omega-3 fatty acid deficiency and behavior: a critical review and directions for future research. In *Handbook of Essential Fatty Acid Biology: Biochemistry, Physiology, and Behavioral Neurobiology*. S. Yehuda and D. I. Mostofsky, editors. Humana Press Inc., Totowa. 397–426.
18. Kodas, E., L. Galineau, S. Bodard, S. Vancassel, D. Guilloteau, J. C. Besnard, and S. Chalon. 2004. Serotonergic neurotransmission is affected by n-3 polyunsaturated fatty acids in the rat. *J. Neurochem*. **89**: 695–702.
19. Kodas, E., S. Vancassel, B. Lejeune, D. Guilloteau, and S. Chalon. 2002. Reversibility of n-3 fatty acid deficiency-induced changes in dopaminergic neurotransmission in rats: critical role of developmental stage. *J. Lipid Res.* **43**: 1209–1219.
20. Takeuchi, T., M. Iwanaga, and E. Harada. 2003. Possible regulatory mechanism of DHA-induced anti-stress reaction in rats. *Brain Res.* **964**: 136–143.
21. Hamazaki, K., S. Sawazaki, T. Nagasawa, Y. Nagao, Y. Kanagawa, and K. Yazawa. 1999. Administration of docosahexaenoic acid influences behavior and plasma catecholamine levels at times of psychological stress. *Lipids*. **34**: S33–S37.
22. Hamazaki, K., M. Itomura, M. Huan, H. Nishizawa, S. Sawazaki, M. Tanouchi, S. Watanabe, T. Hamazaki, K. Terazawa, and K. Yazawa. 2005. Effect of omega-3 fatty acid-containing phospholipids on blood catecholamine concentrations in healthy volunteers: a randomized, placebo-controlled, double-blind trial. *Nutrition*. **21**: 705–710.
23. Hamazaki, T., M. Itomura, S. Sawazaki, and Y. Nagao. 2000. Anti-stress effects of DHA. *Biofactors*. **13**: 41–45.
24. Hibbeln, J. R. 2002. Seafood consumption, the DHA content of mothers' milk and prevalence rates of postpartum depression: a cross-national, ecological analysis. *J. Affect. Disord.* **69**: 15–29.
25. Otto, S. J., R. H. de Groot, and G. Hornstra. 2003. Increased risk of postpartum depressive symptoms is associated with slower normalization after pregnancy of the functional docosahexaenoic acid status. *Prostaglandins Leukot. Essent. Fatty Acids*. **69**: 237–243.
26. Hibbeln, J. R. 1998. Fish consumption and major depression. *Lancet*. **351**: 1213–1216.
27. Peet, M., B. Murphy, J. Shay, and D. F. Horrobin. 1998. Depletion of omega-3 fatty acid levels in red blood cell membranes of depressive patients. *Biol. Psychiatry*. **43**: 315–319.
28. Maes, M., A. Christophe, J. Delanghe, C. Altamura, H. Neels, and H. Y. Meltzer. 1999. Lowered omega 3 polyunsaturated fatty acids in serum phospholipids and cholesteryl esters of depressed patients. *Psychiatry Res.* **85**: 275–291.
29. Willner, P. 1997. Validity, reliability and utility of the chronic mild stress model of depression: a 10-year review and evaluation. *Psychopharmacology (Berl.)*. **134**: 319–329.
30. Willner, P., R. Muscat, and M. Papp. 1992. An animal model of anhedonia. *Clin. Neuropharmacol.* **15 (Suppl.)**: 550A–551A.
31. Ducottet, C., G. Griebel, and C. Belzung. 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**: 625–631.
32. Santarelli, L., M. Saxe, C. Gross, A. Surget, F. Battaglia, S. Dulawa, N. Weisstaub, J. Lee, R. Duman, O. Arancio, et al. 2003. Requirement of hippocampal neurogenesis for the behavioral effects of antidepressants. *Science*. **301**: 805–809.
33. Mineur, Y. S., D. J. Prasol, C. Belzung, and W. E. Crusio. 2003. Agonistic behavior and unpredictable chronic mild stress in mice. *Behav. Genet.* **33**: 513–519.
34. Ducottet, C., and C. Belzung. 2004. Behaviour in the elevated plus-maze predicts coping after subchronic mild stress in mice. *Physiol. Behav.* **81**: 417–426.
35. Griebel, G., J. Simiand, C. Serradeil-Le Gal, J. Wagnon, M. Pascal, B. Scatton, J. P. Maffrand, and P. Soubrie. 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. USA*. **99**: 6370–6375.
36. Alessandri, J. M., C. Poumès-Ballihaut, B. Langelier, M. H. Perruchot, G. Raguenez, M. Lavialle, and P. Guesnet. 2003. Incorporation of docosahexaenoic acid into nerve membrane phospholipids: bridging the gap between animals and cultured cells. *Am. J. Clin. Nutr.* **78**: 702–710.
37. Folch, J., M. Lees, and G. H. Sloane Stanley. 1957. A simple method for the isolation and purification of total lipids from animal tissue. *J. Biol. Chem.* **226**: 497–506.
38. Alessandri, J. M., and B. Goustard-Langelier. 2001. Alterations in fatty acid composition of tissue phospholipids in the developing retinal dystrophic rat. *Lipids*. **36**: 1141–1152.
39. Aid, S., S. Vancassel, C. Poumès-Ballihaut, S. Chalon, P. Guesnet, and M. Lavialle. 2003. Effect of a diet-induced (n-3) polyunsaturated fatty acid depletion on cholinergic parameters in the rat hippocampus. *J. Lipid Res.* **44**: 1545–1551.
40. Sinclair, A. J., D. Begg, M. Mathai, and R. S. Weisinger. 2007. Omega 3 fatty acids and brain: review of studies in depression. *Asia Pac. J. Clin. Nutr.* **16**: 391–397.
41. du Bois, T. M., W. Bell, C. Deng, and X. F. Huang. 2005. A high n-6 polyunsaturated fatty acid diet reduces muscarinic M2/M4 receptor binding in the rat brain. *J. Chem. Neuroanat.* **29**: 282–288.
42. du Bois, T. M., C. Deng, W. Bell, and X. F. Huang. 2006. Fatty acids differentially affect serotonin receptor and transporter binding in the rat brain. *Neuroscience*. **139**: 1397–1403.
43. Linthorst, A. C. E., R. G. Penalva, C. Flachskamm, F. Holsboer, and J. M. H. M. Reul. 2002. Forced swim stress activates rat hippocampal serotonergic neurotransmission involving a corticotrophin-releasing hormone receptor-dependent mechanism. *Eur. J. Neurosci.* **16**: 2441–2452.
44. Storey, J. D., D. A. F. Robertson, J. E. Beattie, I. C. Reid, S. N. Mitchell, and D. J. K. Balfour. 2006. Behavioural and neurochemical responses evoked by repeated exposure to an elevated open platform. *Behav. Brain Res.* **166**: 220–229.
45. Graeff, F. G., F. S. Guimaraes, T. G. C. S. De Andrade, and J. F. W. Deakin. 1996. Role of 5-HT in stress, anxiety, and depression. *Pharmacol. Biochem. Behav.* **54**: 129–141.
46. Bekris, S., K. Antoniou, S. Daskas, and Z. Papadopoulou-Daifoti. 2005. Behavioral and neurochemical effects induced by chronic mild stress applied to two different rat strains. *Behav. Brain Res.* **161**: 45–59.
47. Li, J.-M., L.-D. Kong, Y.-M. Wang, C. H. K. Cheng, W.-Y. Zhang, and W.-Z. Tan. 2003. Behavioral and biochemical studies on chronic mild stress models in rats treated with a Chinese traditional prescription Banxia-houpu decoction. *Life Sci.* **74**: 55–73.
48. Di Chiara, G., P. Loddo, and G. Tanda. 1999. Reciprocal changes in prefrontal and limbic dopamine responsiveness to aversive and rewarding stimuli after chronic mild stress: implications for the psychobiology of depression. *Biol. Psychiatry*. **46**: 1624–1633.
49. Matsumoto, K., K. Yobimoto, N. T. T. Huong, M. Abdel-Fattah, T. Van Hien, and H. Watanabe. 1999. Psychological stress-induced enhancement of brain lipid peroxidation via nitric oxide systems and its modulation by anxiolytic and anxiogenic drugs in mice. *Brain Res.* **839**: 74–84.
50. Liu, J., W. Xiaoyan, M. K. Shigenaga, H. C. Yeo, A. Mori, and B. N. Ames. 1996. Immobilization stress causes oxidative damage to lipid, protein, and DNA in the brain of rats. *FASEB J.* **10**: 1532–1538.
51. Sahin, E., and S. Gumuslu. 2004. Alterations in brain antioxidant status, proteins oxidation and lipid peroxidation in response to different stress models. *Behav. Brain Res.* **155**: 214–248.
52. Favrelière, S., L. Barrier, G. Durand, S. Chalon, and C. Tallineau. 1998. Chronic dietary n-3 polyunsaturated fatty acid deficiency affects the fatty acid composition of plasmalethanolamine and phosphatidylethanolamine differently in rat frontal cortex, striatum and cerebellum. *Lipids*. **33**: 401–407.

Etude de l'implication fonctionnelle du système orexinergique dans les mécanismes physiopathogéniques de la dépression majeure

La dépression majeure fait partie des troubles psychiatriques les plus répandus, et bien qu'elle soit l'une des principales causes d'invalidité et l'un des plus sérieux problèmes de santé dans le monde, les mécanismes neurobiologiques qui sous-tendent cette maladie psychiatrique restent encore méconnus. Cependant, au-delà des facteurs psychosociaux souvent à l'origine de l'apparition de la maladie, il est maintenant admis que la dépression majeure se caractérise par un déséquilibre de la neurotransmission monoaminergique, une perturbation de l'axe du stress (*hypothalamic-pituitary-adrenal*, HPA), et/ou une altération de la neuroplasticité. Cependant, ces processus étiopathogéniques ne suffisent pas à expliquer l'ensemble des troubles observés dans la dépression majeure, et différentes pistes ont été étudiées pour permettre de discerner d'autres facteurs physiopathogéniques. Dans le cadre de ces recherches, les systèmes neuropeptidergiques ont particulièrement attiré l'attention des scientifiques, de par leurs nombreux effets physiologiques et comportementaux. Parmi ces neuropeptides, les orexines pourraient participer de manière importante aux troubles associés à la dépression majeure, voire en être un facteur étiogénique. De fait, un nombre grandissant d'études s'intéresse particulièrement aux liens entre ces neuropeptides et les troubles dépressifs, avec cependant de nombreuses contradictions et questions qui restent en suspens quant à l'implication des orexines dans la physiopathogénie de la dépression majeure. Ce travail de thèse avait donc pour objectif d'étudier précisément le rôle du système orexinergique dans la dépression majeure.

Pour réaliser nos objectifs, nous avons utilisé le stress chronique imprédictible modéré (*unpredictable chronic mild stress*, UCMS) chez la souris, un modèle de dépression majeure chez l'animal qui permet de reproduire le rôle des stress socio-environnementaux dans l'apparition d'un épisode dépressif. Nous avons dans un premier temps examiné l'implication des orexines dans les états dépressifs en étudiant les effets de l'UCMS et d'un antidépresseur sur l'activation du système orexinergique. Etant donné que les troubles du sommeil font partie des symptômes les plus communément observés chez les individus dépressifs, et que des privations de sommeil engendrent des effets antidépresseurs, nous avons ensuite tenté de savoir si le système orexinergique pouvait sous-tendre ces processus, en analysant l'effet de privations partielles de sommeil sur l'activation des neurones à orexines chez des souris soumises à un protocole d'UCMS. Enfin, nous avons directement analysé l'importance de la neurotransmission orexinergique dans les mécanismes physiopathogéniques de la dépression majeure en étudiant, chez des souris exposées à l'UCMS, l'effet du blocage pharmacologique du système orexinergique sur le comportement, l'axe HPA et la neurogenèse hippocampique.

Nos résultats ont montré que l'état dépressif-like induit chez la souris par l'UCMS était associé à une augmentation de l'activation des neurones orexinergiques dans la partie dorsomédiale et périfornicale de l'hypothalamus (DMH-PFA), sans induire de changements dans la partie latérale de l'hypothalamus (LH). Nous avons également mis en évidence des changements de l'expression du récepteur OX2 dans plusieurs zones corticolimbiques. Le traitement chronique avec l'antidépresseur a été en mesure de contrecarrer l'hyperactivité des neurones à orexines et certaines des altérations d'expression des récepteurs OX2. Nous avons ensuite montré que les perturbations partielles de sommeil induisaient une augmentation de l'activation orexinergique spécifiquement dans le DMH-PFA, alors qu'associées au stress chronique, ces privations de sommeil sollicitent les neurones orexinergiques du DMH-PFA et du LH. Enfin, nous avons démontré que le blocage pharmacologique du système orexinergique chez des souris soumises à l'UCMS induit des effets comportementaux antidépresseurs-like qui semblent être sous-tendus par le rétablissement du rétrocontrôle négatif de l'axe HPA indépendamment d'une augmentation de la neurogenèse hippocampique.

L'ensemble de ces résultats montrent qu'une hyperactivité du système orexinergique, particulièrement dans le DMH-PFA, participerait directement à la physiopathogénèse des troubles dépressifs, et que son inhibition induit des effets antidépresseurs. Ces travaux ouvrent de nouvelles perspectives de recherche quant à la compréhension du lien entre système orexinergique et physiopathogénèse de la dépression majeure.