



THÈSE

En vue de l'obtention du DOCTORAT DE L'UNIVERSITÉ DE TOULOUSE

Délivré par l'Université Toulouse 3 - Paul Sabatier

Présentée et soutenue par
Benjamin PORTAL

Le 26 novembre 2019

**Rôle des connexines 43 astrocytaires: une étude fonctionnelle
dans un modèle murin de dépression basé sur le stress chronique**

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

Spécialité : **NEUROSCIENCES**

Unité de recherche :

CRCA - Centre de Recherches sur la Cognition Animale

Thèse dirigée par
Bruno GUIARD

Jury

Mme Catherine HEURTEAUX, Rapporteur

Mme Laurence LANFUMEY, Rapporteur

M. Stéphane OLIET, Examineur

M. Denis SARROUILHE, Examineur

M. Bruno GUIARD, Directeur de thèse

*"Once you eliminate the impossible, whatever remains,
no matter how improbable, must be the truth"*

(Sir Arthur Conan Doyle)

Remerciements

Je souhaiterais dans un premier temps remercier les membres du jury. Merci à Mme Laurence Lanfumey et Mme Catherine Heurteaux d'avoir accepté d'être rapporteuses pour ce travail de thèse. Merci à M. Stéphane Oliet et M. Denis Sarrouilhe d'avoir également accepté de participer à ce jury.

Je souhaite également adresser mes remerciements à Mme Nathalie Rouach et à M. Mathieu Charvériat d'avoir accepté de faire partie de mon comité de suivi de thèse ainsi que de m'avoir apporté les éléments nécessaires pour avancer dans ma réflexion scientifique et ma rédaction.

Je suis arrivé au CRCA il y a maintenant cinq ans. Je souhaiterais remercier dans un premier temps Mme Claire Rampon pour m'avoir accepté au sein de son laboratoire et de m'avoir permis d'avancer au cours de mon cursus universitaire. Je souhaite également remercier M. Bernard Frances qui m'a permis de découvrir le CRCA et ce qui a été pour moi le point de départ de cette aventure scientifique.

Je souhaite particulièrement remercier mon directeur de thèse M. Bruno Guiard. Cinq ans que nous travaillons ensemble avec des hauts et des bas, particulièrement ces derniers temps où la rédaction met nos nerfs et nos sentiments à rude épreuve. Pourtant, travailler avec toi a été une expérience extraordinaire. Si c'était à refaire, je le referai. Au cours de ces trois années de thèse, j'ai eu la chance de participer à plusieurs projets scientifiques, à de nombreux congrès internationaux et de rencontrer de nombreuses personnes qui m'ont permis d'étendre mon champ de vision au-delà de mon projet de laboratoire, ce qui n'est pas forcément donné à tous les doctorants. Récemment tu m'as dit que tu faisais toujours passer les étudiants avant, et que tu ferais tout pour qu'ils réussissent. Tu travailles tard le soir et même pendant tes vacances pour faire en sorte que ce manuscrit avance, pour ça, j'aimerais t'adresser mon respect et mes sincères remerciements. J'espère un jour, pouvoir avoir la chance de retravailler avec toi !

Un grand merci aux chercheurs et doctorants avec qui j'ai eu la chance de collaborer au cours de cette thèse, Mme Nathalie Lorenzo (Marseille), Mme Nicole Déglon (Lausanne), Mme Nathalie Rouach (Paris), M. Nasser Haddjeri (Lyon), Mme Emmanuelle Corruble, Mme Céline Verstuyft, M. Romain Colle, M. Abdel Ait Tayeb de l'hôpital psychiatrique du Kremlin-Bicêtre mais aussi la team Theranexus Mme Marine Droquerre et M. Mathieu Charvériat.

Un grand merci à l'ensemble de l'équipe REMEMBeR : Claire, Laure, Cédric, Lionel M. et Lionel D. pour leur support scientifique et psychologique fort utile au cours de ces trois dernières années. Merci également à Stéphane pour son aide et son travail au sein de l'animalerie.

Un merci particulier pour Noélie (de la team Mito), Lionel D. et Cédric pour leur soutien au cours des deux années d'enseignement que j'ai eu la chance de réaliser à leurs côtés. Merci de m'avoir accepté au sein de votre équipe pédagogique et d'avoir été mes référents. Lorsqu'on se balade dans les couloirs du troisième étage, on peut apercevoir des ombres qui courent et qui passent. Parfois elles apparaissent et disparaissent aussitôt dans des salles sombres sans lumières. Je remercie toutes ces ombres qu'on appelle doctorants et stagiaires. À ceux qui sont partis : Khaoula, Vanessa, Paulin(e), Robin, Adam et tous les autres. À ceux qui sont toujours là Anna, Coutens, Petit Seb, Dr Fares et Chrichri pour les délires dans les salles de manip, les bureaux, ou à la cafet', pour les discussions scientifiques (qui restent scientifiques cinq minutes) et pour les moments de solitude et de soutien quand les manips ne fonctionnent pas. À ceux des autres équipes et plus particulièrement, Aurélie, Violette, Matthias, Hugo et Floflo pour ces discussions mémorables à l'Upsi et tous ces moments qu'on a pu passer ensemble. À toutes ces personnes, un IMMENSE merci. Bien plus que des collègues, vous êtes des amis, une famille que je n'oublierai jamais.

Une attention particulière pour Grand Seb, et Camille. Sébastien et Camille, je n'ai pas de mots pour décrire toute l'amitié et le respect que je vous porte. Vous avez été un soutien technique ÉNORME pendant cette thèse, que ça soit Sébastien au comportement ou Camille à la paillasse. Au-delà de ça, vous avez été un soutien émotionnel non négligeable. Nos pause-café ont été une soupape de sécurité que je n'oublierai jamais. Merci d'avoir été présent, merci d'être des amis.

Il n'y a pas de mots pour décrire toute l'amitié que je porte à Stella. Stella, elle boit beaucoup de café (comme moi) et elle râle beaucoup (comme moi). Mais Stella, c'est elle qui, avec Bruno, m'a tout appris. Comment fabriquer ses propres sondes, comment fonctionne une HPLC, comment on fait un Western Blot dans les règles de l'art. Stella, je te remercie d'avoir été présente tout au long (presque) de cette thèse et même si ta présence au bureau nous manque, merci d'être encore présente aujourd'hui.

Enfin merci à Aude. Tu n'es pas resté longtemps au laboratoire mais le peu de temps que nous avons passé ensemble a été très drôle et j'espère avoir la chance de revivre ça dans le futur.

À mes amis et ma famille, un grand merci pour votre soutien (surtout psychologique) durant ces trois dernières années.

Merci à mes parents pour les nombreuses relectures, les « tu ne veux pas faire une pause ? » et les « ça veut dire quoi astrocyte ? Connexine c'est féminin ou masculin ? »
Merci à Mathieu, mon frère pour son soutien psychologique. Loin des yeux mais toujours présent dans mon cœur et mon esprit.

Un merci particulier à ma grand-mère. Je n'ai jamais eu la chance de pouvoir te raconter comment se déroule ma thèse ou me plaindre que ça ne marche pas ou que je suis fatigué. Mais merci tout de même de m'avoir donné la force de passer mon concours, de décrocher une bourse et de suivre cette thèse avec les hauts et les bas qu'on lui connaît aujourd'hui. Un grand merci mes amis de l'impro Elona, Charlotte, Juliette, Lulu, Eva, bébé Alan, mon Fillot et tous ceux de la LUDI Toulouse qui m'ont aidé à évacuer mes frustrations et mes angoisses ces dernières années sur scène ou en backstage. Merci à Alison, Camille, Zélie, Poitier (Pierre), Provost (Pierre), Julien, Fab et Pablo des Black Stories Impro pour avoir été des modèles extraordinaires et de m'avoir fait oublier l'espace de quelques shootings photos mes peurs, mes craintes et mes faiblesses.

Merci Amandine ! Un jour tu m'as dit que tu « étais souvent en décor et que tu le serais jusqu'au bout ». Pourtant, tu as toujours été là. Tu as toujours été présente depuis le début. Et même si notre relation a connu des hauts et des bas, nous avons toujours fini par nous réconcilier et nous retrouver. Même si ton déménagement et ma rédaction ont mis une certaine distance, merci d'être toujours à mes côtés et de me soutenir quoi qu'il arrive.

Merci à Alexandra, Didi, Maleaume et Daminou. Vous êtes les ennemis du CBD et pourtant, pactiser avec vous a été un réel plaisir. Merci à vous d'avoir été là dans les bons et les mauvais moments, merci d'être des amis. Un grand merci à Julie Batut. Ton enthousiasme et ton énergie (parfois beaucoup trop débordante) ont été très revitalisants au cours de cette thèse.

Enfin, merci aux Biatch, Ophélie (la marrante du groupe), Nico (le Bordelais) et Raph (celui que je n'aime pas) pour leur soutien moral et les délires qui perdurent depuis le lycée. Vous pourrez dire que je vous ai soulé avec cette thèse et j'assume les conséquences. Malgré cela, vous avez toujours écouté, conseillé et essayé d'aider. On dit souvent que les amis sont la famille que l'on choisit. Aujourd'hui je suis fier de dire que vous êtes bien plus que mes amis, vous êtes ma famille.

Publications

Articles de recherche

Quesseveur G.* , Portal B.* , Basile J. A., Ezan P., Mathou A., Halley H., Leloup C., Fioramonti X., Deglon N., Giaume C., Rampon C. and B. P. Guiard (2015). Attenuated Levels of Hippocampal Connexin 43 and its Phosphorylation Correlate with Antidepressant- and Anxiolytic-Like Activities in Mice. Front Cell Neurosci 9: 490.

Portal B., Rovera R., Lejards C., Lorenzo N., Haddjeri N., Déglon N., Guiard B.P, Astroglial connexins-mediated cell-to-cell communication differentially influence the acute response of antidepressant and anxiolytic drugs. (En révision)

Ait Tayeb A.B.K.* , Portal B.* , Colle R.* , El-Asmar K., Mesdom P., Lejards C., Feve B., Becquemont L., Guiard B.P.‡, Verstuyft C. ‡, Corruble E.‡, Altered astroglial connexins are associated with low antidepressant response and high relapse rates in major depression: a translational approach. (Soumis)

Droguerre M., Tsurugizawa T., Duchêne A., Portal B., Guiard B.P., Deglon N., Rouach N., Hamon M., Mouthon F., Ciobanu L., Charvériat M., A new tool for *in vivo* study of astrocyte connexin 43 in brain. (En révision).

Droguerre M., Duchêne A., Picoli C., Portal B., Lejards C., Guiard B.P., Villard V., Déglon N., Hamon M., Mouthon F., Charvériat M., Remarkable efficacy of THN201, a new combination of donepezil plus mefloquine, to reverse neurocognitive deficits in rodent models of Alzheimer's disease. (En préparation)

Liste des communications

Communications affichées

Portal B., Manta S., Rovera R., Lorenzo N., Rampon C., Deglon N., Haddjeri N., Guiard B.P. ; Neuron-glia interaction in stress related behaviors : role of hippocampal glutamatergic tone. Société des Neurosciences, congrès Neurofrance, Marseille, France (2019).

Portal B., Manta S., Rovera R., Lorenzo N., Rampon C., Deglon N., Haddjeri N., Guiard B.P. ; Hippocampal Cx43 hemichannel inactivation protects from glutamatergic stress-related behavior. European College of Neuropsychopharmacology Workshop, Nice, France (2019).

Portal B., Manta S., Rovera R., Lorenzo N., Rampon C., Deglon N., Haddjeri N., Guiard B.P. ; Neurobiological relationships between astroglial Cx43 and stress-related responses. 31st European College of Neuropsychopharmacology Congress, Barcelona, Spain (2018).

Portal B., Manta S., Rovera R., Lorenzo N., Rampon C., Deglon N., Haddjeri N., Guiard B.P. ; Unraveling the role of astrocytic connexines 43 in anxio/depressive-like behaviors. Société des Neurosciences, congrès Neurofrance, Bordeaux, France (2017).

Communications orales

Portal B., Rovera R., Lejards C., Lorenzo N., Haddjeri N., Déglon N., Guiard B.P. ; Neurone-glia interactions : a pharmacological study. 32nd European College of Neuropsychopharmacology Congress, Copenhagen, Denmark (2019).

Portal B., Manta S., Rovera R., Lorenzo N., Rampon C., Deglon N., Haddjeri N., Guiard B.P. ; Hippocampal Cx43 hemichannel inactivation protects from glutamatergic stress-related behavior. European College of Neuropsychopharmacology Workshop, Nice, France (2019).

Résumé : Astrocytes are involved in the regulation of neurotransmission which in turn, impact high brain functions such as emotionality. Accordingly, clinical studies revealed decreases in brain density of GFAP-positive cells in patients with neuropsychiatric disorders. Astrocytes express proteins called connexins 43 (Cx43) that can assemble into either hemichannels (HC) to promote the release of neuroactive molecules, called gliotransmitters ; or into gap-junction (GJ) which contribute to astrocyte-astrocyte communication. Studies support a distinct role of GJ vs HC in the regulation of stress and mood. Indeed, although a decreased activity of GJ was unveiled in animal models of stress opposite results were yielded with HC.

In light of these non-conclusive results, we sought to determine the effects of constitutive or tissue specific Cx43 downregulation on stress-related responses and neurochemical changes. Student t-tests were applied to compare mice with a genetic inactivation of Cx43 to their appropriate controls.

We demonstrated that the constitutive deletion of Cx43 in Cx43 knock-down mice (KD), resulted in antidepressant-like behavior in the Forced Swim Test (FST) (KD : 57 ± 10 vs. WT : 109 ± 22 sec of immobility ; $p=0,014$). In addition, we noticed an increase in hippocampal extracellular glutamate concentrations during the FST while this neurochemical response was attenuated in KD mice compared to their wild-type counterparts (KD : $36 \pm 3\%$ vs. WT : $96 \pm 22\%$ of baseline ; $p=0,043$). No difference were observed in serotonin extracellular concentrations suggesting a specific involvement of the glutamatergic system.

To better understand such relationship, we then inactivated Cx43 in WT mice by micro-injecting into the hippocampus a lentiviral vector containing a short hairpin-RNA (shRNA) targeting this protein. Our results indicated that tissue specific silencing of Cx43 did not produce significant antidepressant-like behaviors in the Tail Suspension Test (TST) (shCx43 : 135 ± 12 vs. shGFP : 135 ± 11 sec. of immobility ; $p=0,977$) or in the Novelty Suppressed Feeding Test (NSFT) (shCx43 : 172 ± 28 vs. shGFP : 124 ± 9 sec of latency

to feed ; $p=0,07$). However, part of the neurobehavioral abnormalities detected in a mouse model of depression, were reversed by the inactivation of hippocampal Cx43 notably in the TST (shCx43 : 60 ± 3 vs. shGFP : 98 ± 12 sec of immobility, $p=0,02$) and the NSFT (shCx43 : 222 ± 31 vs. shGFP : 333 ± 16 sec of latency to feed, $p=0,010$).

Further investigations are warranted to decipher the mechanisms by which Cx43 regulate stress-related responses. Our recent data argue in favor of a role of HC since we showed that the intra-hippocampal injection of Gap26 mimetic peptide, a specific Cx43 HC blocker, reduced immobility time in the Forced

Swim Test (GAP 26 : 99 ± 13 vs. scramble peptide : 193 ± 46 sec. of immobility ; $p=0,105$) in relation with its ability to prevent acute stress-induced increase in local extracellular glutamate levels (GAP 26 : $65 \pm 15\%$ vs. scramble peptide : $101 \pm 11\%$ of baseline ; $p=0,260$).

Collectively, our data suggest that blocking specifically Cx43 hemichannel in the hippocampus could be a new therapeutic strategy to attenuate stress-responses and promote antidepressant-like effects through a non-neuronal mechanism.

Portal B., Manta S., Rovera R., Rampon C., Deglon N., Haddjeri N., Guiard B.P. ; Protective effect on stress related behaviors of astrocytic Connexins 43 inactivation. Journées de l'école doctorale Biologie-Santé-Biotechnologie (BSB), Toulouse, France (2018).

Portal B., Manta S., Rovera R., Lorenzo N., Rampon C., Deglon N., Haddjeri N., Guiard B.P. ; Unraveling the role of astrocytic connexines 43 in anxio/depressive-like behaviors. Société des Neurosciences, GDR mémoire, Bordeaux, France (2017).

Portal B., Manta S., Rovera R., Rampon C., Deglon N., Haddjeri N., Guiard B.P. ; Protective effect on stress related behaviors of astrocytic Connexins 43 inactivation. Journées du Toulouse Mind and Brain Institute (TMBI), Toulouse, France (2017).

Portal B., Manta S., Rovera R., Rampon C., Deglon N., Haddjeri N., Guiard B.P. ; Protective effect on stress related behaviors of astrocytic Connexins 43 inactivation. Journées des doctorants du CRCA, Toulouse, France (2017).

Portal B., Manta S., Rovera R., Rampon C., Deglon N., Haddjeri N., Guiard B.P. ; Unraveling the role of astrocytic connexines 43 in anxio/depressive-like behaviors. International Astrocyte School, Bertinoro, Italy (2017).

Résumé : Initially identified as supportive cells for neurons, evidence suggests that astrocytes are also involved in the regulation of neurotransmission and high brain functions. For example, recent clinical and preclinical studies reveal decreases in brain density/activity of GFAP-positive cells in patients with psychiatric disorders. However, the molecular mechanisms underlying such association remain poorly documented. Astrocytes express transmembrane proteins called connexins 30 and 43 (Cx30/Cx43) that assemble to form gap junctions between neighboring cells. Cx30 and 43 can also form hemichannels to promote the release of gliotransmitters in the extracellular space and thereby regulate neuronal activities. Interestingly, studies yielded valuable insights into the role of these proteins in the regulation of mood. Indeed, an attenuation of Cx43 expression was unveiled in the frontal cortex of depressed patients but also in relevant animal models of depression. This work was designed to evaluate the impact of the constitutive or the conditional inactivation of Cx43 on behaviors related to depressed states. To this end, we employed Cx43 knock-down (KD) mice or wild-type animals injected with lentiviral vectors containing shRNA-Cx43 in the hippocampus. In an attempt to correlate putative behavioral changes with modifications of hippocampal serotonergic neurotransmission, we also conducted *in vivo* microdialysis experiments in these mice carrying Cx43 inactivation. Our results indicate that Cx43 KD mice display a phenotype reminiscent of antidepressant-like activities notably in paradigms producing a high level of stress such as the tail suspension test and novelty suppressed feeding. In striking contrast, Cx43 KD mice had normal behaviors in the sucrose preference and social interaction tests. Interestingly, chronic exposure to CORT induced anhedonia and dampened social interactions. However, the latter behavioral impairments were prevented in Cx43 KD mice or in mice injected with the shRNA-Cx43. Despite these findings, microdialysis experiments did not reveal significant changes in hippocampal extracellular 5-HT levels. Enhancing serotonergic transmission is therefore dispensable for the beneficial effect of the inactivation of Cx43 on stress responses. Further investigations are warranted to explain the mechanisms by which Cx regulate mood-related behaviors, and to determine whether pharmacological Cx blockers represent innovative antidepressant drugs.

Portal B., Manta S., Rovera R., Rampon C., Deglon N., Haddjeri N., Guiard B.P. ;
Unraveling the role of astrocytic connexins in depression. Journées du Centre
de Biologie Intégrative (CBI), 2016.

Sommaire

REMERCIEMENTS	I
PUBLICATIONS	V
LISTE DES COMMUNICATIONS	VII
SOMMAIRE	XI
LISTE DES ABREVIATIONS	XVII
LISTE DES FIGURES	XIX
LISTE DES TABLEAUX	XXIII
RESUME	XXV
INTRODUCTION	1
PARTIE 1 : LES TROUBLES ANXIO/DEPRESSIFS	11
1. CARACTERISTIQUES CLINIQUES ET ANATOMIQUES	11
1.1. LES TROUBLES ANXIEUX	11
1.2. LA DEPRESSION MAJEURE	13
1.2.1. <i>Modifications anatomiques</i>	13
1.2.2. <i>Modifications fonctionnelles</i>	15
2. STRESS ET DEPRESSION	18
2.1. STRESS AIGU	18
2.1.1. <i>Rôle des MR</i>	20
2.1.2. <i>Rôle des GR</i> :	21
2.2. STRESS CHRONIQUE	22
3. MODELES ANIMAUX DE LA DEPRESSION	23
3.1. MODELISER LA DEPRESSION	23
3.2. LE MODELE CORT	25
4. PHARMACOLOGIE	28
4.1. CAS DES ANTIDEPRESSEURS MONOAMINERGIQUES	30
4.1.1. <i>Screening des antidépresseurs suite à une administration unique</i>	30
4.1.2. <i>Screening des antidépresseurs dans des modèles de dépression suite à une administration chronique</i>	30
4.1.3. <i>Limites thérapeutiques des antidépresseurs sérotoninergiques</i>	31
4.1.3.1. Long délai d'action	31
4.1.3.2. Faible taux de réponse	32

4.1.3.3.	Résistance aux traitements	33
4.1.3.4.	Taux de rechute	33
4.2.	CAS DES INHIBITEURS MIXTES DE RECAPTURE DE LA SEROTONINE ET DE NORADRENALINE ...	34
PARTIE 2 :	LES ASTROCYTES, FONCTIONS ET IMPLICATION DANS LA	
DEPRESSION	37	
1.	GENERALITES SUR LES ASTROCYTES.....	37
2.	GRANDES FONCTIONS DES ASTROCYTES.....	40
2.1.	ASTROCYTES : MODULATEURS DE L'ENERGIE	40
2.1.1.	<i>Transport du glucose</i>	40
2.1.2.	<i>Transport du lactate</i>	41
2.2.	ASTROCYTES : MODULATEURS DE L'OSMOLARITE.....	42
2.3.	ASTROCYTES : MODULATEURS DE LA MYELINISATION.....	43
2.4.	ASTROCYTES ET PLASTICITE SYNAPTIQUE	44
2.5.	ASTROCYTES ET SYNAPSE TRIPARTITE	45
2.5.1.	<i>Modulateurs de la neurotransmission</i>	45
2.5.2.	<i>Modulateurs de la gliotransmission</i>	48
3.	ASTROCYTE ET PHYSIOPATHOLOGIE.....	53
3.1.	ASTROCYTES ET PHYSIOPATHOLOGIE DE LA DEPRESSION.....	54
3.1.1.	<i>Modifications numériques & anatomiques</i>	54
3.1.2.	<i>Modifications énergétiques</i>	55
3.1.3.	<i>Modifications de l'osmolarité</i>	56
3.1.4.	<i>Modification de la myélinisation</i>	56
3.1.5.	<i>Modification de la réaction inflammatoire</i>	57
3.1.6.	<i>Modifications de la plasticité synaptique</i>	58
3.1.7.	<i>Modification de la gliotransmission</i>	60
PARTIE 3 :	PHYSIOPATHOLOGIE DES CONNEXINES	67
1.	GENERALITES SUR LES PANNEXINES ET CONNEXINES.....	67
1.1.	LES PANNEXINES	67
1.2.	LES CONNEXINES	69
1.3.	OUTILS D'ETUDE DES CONNEXINES.....	72
1.3.1.	<i>Outils génétiques</i>	73
1.3.2.	<i>Outils pharmacologiques</i>	73
1.3.2.1.	<i>Inhibiteurs pharmacologiques</i>	76
1.3.2.2.	<i>Inhibiteurs mimétiques structuraux</i>	77
1.3.2.3.	<i>Anticorps spécifiques des HC</i>	78

1.3.3.	Étude des JC : outils d'étude fonctionnelle	78
1.3.3.1.	Transfert <i>in vitro</i> de sondes colorées /fluorescentes.....	78
1.3.3.2.	Étude des vagues calciques <i>ex vivo</i>	80
1.3.3.3.	Étude des courants par double patch clamp.....	80
1.3.4.	Étude des HC : « dye uptake »	80
2.	ROLE DES CONNEXINES ASTROCYTAIRES.	81
2.1.	LES JONCTIONS COMMUNICANTES (JC)	81
2.1.1.	JC et transport de glucose	81
2.1.2.	JC et transport de calcium	82
2.1.3.	JC et transport des autres ions	82
2.2.	LES HEMICANAU (HC)	83
2.2.1.	HC et transport du glucose	83
2.2.2.	HC et homéostasie potassique.....	83
2.2.3.	HC et gliotransmission	84
3.	CONNEXINES ASTROCYTAIRES ET PATHOLOGIES	85
3.1.	CXS ASTROCYTAIRES ET DOULEUR NEUROPATHIQUE	86
3.2.	CXS ASTROCYTAIRES ET EPILEPSIE	87
3.3.	CXS ASTROCYTAIRES ET MALADIES D'ALZHEIMER	89
3.4.	CXS ASTROCYTAIRES ET MALADIE PSYCHIATRIQUE	90
3.4.1.	Exemple des troubles anxio/dépressifs	90
3.4.2.	Effets des antidépresseurs sur les connexines astrocytaires.....	94
3.4.2.1.	Antidépresseurs et JC	96
3.4.2.2.	Antidépresseurs et HC	97
	OBJECTIFS	99
	MATÉRIEL & MÉTHODES.....	103
1.	AUTORISATION D'EXPERIMENTER	105
2.	ANIMAUX	105
2.1.	SOURIS CONNEXINE 43 « KNOCK-DOWN » (Cx43 KD)	105
2.2.	SOURIS C57BL6/J	106
2.3.	SOURIS BALBC/J ET SWISS	106
3.	PHARMACOLOGIE	106
3.1.	OUTILS LENTIVIRAUX	106
3.2.	PREPARATION	107
3.3.	STEREOTAXIE ET INJECTION.....	107

4.	OUTILS PHARMACOLOGIQUES.....	107
4.1.	SOLUTIONS PHARMACOLOGIQUES POUR LES ADMINISTRATIONS AIGÛES.....	107
4.2.	SOLUTIONS PHARMACOLOGIQUES POUR LES ADMINISTRATIONS CHRONIQUES	108
4.3.	SOLUTIONS PEPTIDIQUES	108
4.3.1.	<i>Préparation</i>	109
4.3.2.	<i>Stéréotaxie et injection</i>	109
5.	TESTS COMPORTEMENTAUX	109
5.1.	TESTS D'ANXIÉTÉ.....	109
5.1.1.	<i>Hyperthermie induite par le stress aigu</i>	109
5.1.2.	<i>Champ ouvert (Open Field, OF)</i>	109
5.1.3.	<i>Labyrinthe en croix surélevé (Elevated plus Maze, EPM)</i>	110
5.1.4.	<i>Alimentation supprimée par la nouveauté (Novelty Suppressed Feeding, NSF)</i>	111
5.2.	TEST DE DÉPRESSION	112
5.2.1.	<i>Suspension caudale (Tail Suspension Test, TST)</i>	112
5.2.2.	<i>Nage forcée (Forced Swim Test, FST)</i>	113
5.2.3.	<i>Test d'éclaboussures (Splash Test, ST)</i>	114
5.2.4.	<i>État du pelage (Fur Coat State)</i>	114
5.3.	TEST DE MÉMOIRE : RECONNAISSANCE D'OBJET (OBJECT RECOGNITION, OR)	115
6.	ÉTUDES FONCTIONNELLES	116
6.1.	MICRODIALYSE INTRACÉRÉBRALE.....	116
6.1.1.	<i>Principe et fonctionnement</i>	116
6.1.2.	<i>Chirurgie</i>	117
6.1.3.	<i>Recueil et dosage des neurotransmetteurs</i>	117
6.1.3.1.	<i>Principe et fonctionnement</i>	117
6.1.3.2.	<i>Dosage de la 5-HT</i>	119
6.1.3.3.	<i>Dosage du Glutamate</i>	120
6.2.	ÉLECTROPHYSIOLOGIE IN VIVO	120
7.	AUTRE DOSAGE : CORTICOSTÉRONÉMIE	121
8.	ANALYSE DE L'EXPRESSION	121
8.1.	WESTERN BLOT.....	121
8.2.	IMMUNOHISTOCHEMIE.....	122
8.2.1.	<i>Perfusion</i>	122
8.2.2.	<i>Coupes histologiques</i>	123
8.2.3.	<i>Immunohistochimie</i>	123
8.2.4.	<i>Analyse</i>	124

9. ANALYSES STATISTIQUES	124
RÉSULTATS	127
CHAPITRE 1 : ÉTUDE DES EFFETS COMPORTEMENTAUX ET NEUROCHIMIQUES DE L'INACTIVATION DES CX43 EN CONDITIONS PHYSIOLOGIQUES 129	
1. MODELE D'INACTIVATION CONSTITUTIVE DES CX43 : SOURIS CX43 KD	130
1.1. CARACTERISATION HISTOLOGIQUE ET COMPORTEMENTALE	130
ARTICLE 1	135
1.2. CARACTERISATION NEUROCHIMIQUE	149
2. MODELE D'INACTIVATION TISSU-SPECIFIQUE DES CX43 : SOURIS WT AVEC SHRNA-CX43 INTRA-HIPPOCAMPIQUE	151
2.1. VALIDATION HISTOLOGIQUE	151
2.2. CARACTERISATION COMPORTEMENTALE	153
2.2.1. <i>Tests d'anxiété</i>	153
2.2.2. <i>Tests de résignation et d'incurie</i>	154
2.2.3. <i>Test de mémoire</i>	155
2.3. CARACTERISATION NEUROCHIMIQUE	157
3. MODELE D'INACTIVATION TISSU-SPECIFIQUE DES CX43 : SOURIS WT AVEC UN PEPTIDE MIMETIQUE DES CX43 INTRA-HIPPOCAMPIQUE PAR LE GAP26 .	158
CHAPITRE 2 : ÉTUDE DES EFFETS COMPORTEMENTAUX ET NEUROCHIMIQUES DE L'INACTIVATION DES CX43 EN CONDITIONS PHYSIOLOGIQUES SUIVE A L'INJECTION AIGÛE D'UN ANTI DEPRESSEUR : LA FLUOXETINE 161	
1. MODELE D'INACTIVATION CONSTITUTIVE DES CX43 : SOURIS CX43 KD	162
1.1. CARACTERISATION COMPORTEMENTALE	162
1.2. CARACTERISATION ELECTROPHYSIOLOGIQUE ET NEUROCHIMIQUE	163
1.2.1. <i>Activité électrique des neurones 5-HT dans le noyau du raphé dorsal (NRD)</i>	163
1.2.2. <i>Activité neurochimique des neurones 5-HT projetant dans l'hippocampe</i>	164
2. MODELE D'INACTIVATION TISSU SPECIFIQUE SHRNA-CX43	165
2.1. VALIDATION DE L'INACTIVATION DANS L'HIPPOCAMPE.	165
2.2. INACTIVATION HIPPOCAMPIQUE	165
2.2.1. <i>Conséquences comportementales</i>	165
2.2.2. <i>Conséquences neurochimiques</i>	166

3. MODELE D'INACTIVATION PHARMACOLOGIQUE DES CXS PAR LA CBX	167
ARTICLE 2.....	169
CHAPITRE 3 : ÉTUDE DES EFFETS COMPORTEMENTAUX ET	
NEUROCHIMIQUES DE L'INACTIVATION DES CX43 HIPPOCAMPIQUE EN	
CONDITION DE STRESS CHRONIQUE	
1. INHIBITION DES CX43 HIPPOCAMPIQUES.....	171
2. EFFETS DE L'INACTIVATION DES CX43 HIPPOCAMPIQUES DANS LE MODELE	
CORT SUR LA REPOSE DE L'AXE HPA.....	172
2.1. MESURE DES TAUX PLASMATIQUES DE CORTICOSTERONE EN REPOSE A UN STRESS AIGÛE.	172
2.2. MESURE DE L'HYPERTHERMIE INDUITE PAR LE STRESS AIGU	172
3. EFFETS COMPORTEMENTAUX DE L'INACTIVATION DES CX43	
HIPOCAMPIQUES DANS LE MODELE CORT.....	173
3.1. TESTS D'ANXIETE.....	173
3.2. TESTS DE RESIGNATION	175
3.3. TEST DE MEMOIRE.....	176
4. EFFET DE L'INACTIVATION DES CX43 HIPPOCAMPIQUES SUR L'ACTIVITE	
DES NEURONES 5-HT ET GLUT.....	177
CHAPITRE 4 : ÉTUDE DES EFFETS COMPORTEMENTAUX DE	
L'INACTIVATION DES CX43 EN CONDITIONS PATHOLOGIQUES SUITE A	
L'INJECTION CHRONIQUE D'UN ANTI DEPRESSEUR : LA VENLAFAXINE	
1. INDUCTION DU PHENOTYPE ANXIO/DEPRESSIF	182
2. ÉTUDE DE LA REPOSE CHRONIQUE A LA VENLA	183
3. ÉTUDE DE LA RECHUTE	187
ARTICLE 3.....	193
DISCUSSION	195
RÉFÉRENCES	211

Liste des abréviations

[5-HT] _{ext} : Concentrations extracellulaires de sérotonine	DAT : Transporteur de la dopamine
[Glut] _{ext} : Concentrations extracellulaires de glutamate	DCX : Doublecortine
5-HT : Sérotonine	DG : Gyrus Denté
AAV : Associated Adeno-virus	DM : Dépression majeure
ACTH : Adrénocorticotrophine (<u>A</u> dreno- <u>C</u> ortico <u>T</u> rophic <u>H</u> ormone)	EPM : Labyrinthe en croix surélevé (<u>E</u> levated <u>P</u> lus <u>M</u> aze)
ALDH1L1 : Gène de la 10-formyltetrahydrofolate déhydrogénase	FLX : Fluoxétine
AMPA : Récepteurs inotropiques au glutamate	FST : Test de nage forcée (<u>F</u> orced <u>S</u> wim <u>T</u> est)
AQP4 : Aquaporines de type 4	GABA : Acide γ -Amino Butyrique
ARNi : ARN interférant	GDNF : Facteur neurotrophique dérivé de la glie (<u>G</u> lial <u>D</u> erived <u>N</u> eurotrophic <u>F</u> actor)
ARNm : ARN messager	GFAP : Protéine gliale fibrillaire acide (<u>G</u> lial <u>F</u> ibrillary <u>A</u> cidic <u>P</u> rotein)
ATP : Adénosine tri-phosphate	Glut : Glutamate
BHE : Barrière hémato-encéphalique	GR : Récepteurs aux glucocorticoïdes
BDNF : Facteur neurotrophique dérivé du cerveau (<u>B</u> rain <u>D</u> erived <u>N</u> eurotrophic <u>F</u> actor)	HC : Hémicanal/Hémicanaux
BNST : Noyau de la strie terminale (<u>B</u> ed <u>N</u> ucleus <u>S</u> tria <u>T</u> erminalis)	HPA : Axe hypothalamo-hypophysaire surrénalien (<u>H</u> ypothalamo- <u>P</u> ituitary <u>A</u> drenal axis)
BZD : Benzodiazépine	i.p. : Intra-péritonéale
CA : Corne d'Ammon	IL-6 : Interleukine 6
CBX : Carbenoxolone	IL-1 β : Interleukine 1 β
CREB : Facteur de transcription activé par l'AMP cyclique (<u>C</u> AMP <u>R</u> esponse <u>E</u> lement <u>B</u> inding protein)	IMAO : Inhibiteur de la monoamine-oxydase
CRF : Cortico-libérine (<u>C</u> ortico <u>R</u> elease <u>F</u> actor)	IP ₃ : Inositol triphosphate
CRP : Protéine du complément (<u>C</u> omplement <u>R</u> eactive <u>P</u> rotein)	IRN : Inhibiteurs de recapture de la noradrénaline
Cx30 : Connexine 30	IRSN : Inhibiteurs mixtes de recapture de la sérotonine et de la noradrénaline
Cx43 : Connexine 43	ISRS : Inhibiteurs sélectifs de recapture de la sérotonine
Cxs : Connexines	JC : Jonction(s) communicante(s)
DA : Dopamine	KD : Knock-down
	KO : Knock-out

LCRa : Liquide céphalo-rachidien artificiel
LTD : Dépression à long terme
LTP : Potentialisation à long terme
LY : Lucifer yellow
MCT : Transporteurs au monocarboxylates
mGluR : Récepteurs métabotropiques au glutamate
MR : Récepteurs aux minéralocorticoïdes
NA : Noradrénaline
NET : Transporteurs de la noradrénaline
NMDA : Récepteurs ionotropiques au glutamate
NRD : Noyau du Raphé Dorsal
NSF : Test d'alimentation supprimée par la nouveauté (Novelty Suppressed Feeding)
OF : Test du champ ouvert (Open Field)
OR : Test de reconnaissance d'objet (Object Recognition)

p.o. : Voie orale (per os)
Panxs : Pannexines
PVN : Noyau para-ventriculaire (Para-Ventricular Nucleus)
SERT : Transporteurs de la sérotonine
shRNA : ARN en épingle à cheveux (Short-Hairpin RNA)
SNC : Système Nerveux Central
ST : Test d'éclaboussure (Splash Test)
TCA : Antidépresseurs tricycliques
TNF α : Tumor Necrosis Factor α
TPH-2 : Tryptophane Hydroxylase de type 2
TST : Test de suspension caudale (Tail Ssuspension Test)
UCMS : Stress chronique imprévisible (Unpredictable Chronic Mild Stress)
VENLA : Venlafaxine
vSUB : Subiculum ventral
WT : Phénotype sauvage (Wild-Type)

Liste des figures

FIGURE 1 : REPRESENTATION SCHEMATIQUE ET SIMPLIFIEE DU CIRCUIT DE L'ANXIETE CHEZ LA SOURIS.	12
FIGURE 2 : REPRESENTATION SCHEMATIQUE DE L'AXE HPA.	19
FIGURE 3 : REPRESENTATION SCHEMATIQUE DU MODE D'ACTION DES RECEPTEURS GR ET MR. 20	
FIGURE 4 : IMPLICATION DE LA 5-HT, DE LA NA ET DE LA DA DANS LA SYMPTOMATOLOGIE DE LA DEPRESSION MAJEURE.	28
FIGURE 5 : REPRESENTATION SCHEMATIQUE DES EFFETS D'UN ISRS SUR LA NEUROTRANSMISSION 5-HT EN FONCTION DE LA DUREE DE TRAITEMENT.	32
FIGURE 6 : DIFFERENCES MORPHOLOGIQUES ENTRE ASTROCYTES PROTOPLASMIQUES ET FIBRILLAIRES.	38
FIGURE 7 : REPRESENTATION SCHEMATIQUE DU METABOLISME GLUCIDIQUE DANS LA COMMUNICATION ASTROCYTES/NEURONES.	42
FIGURE 8 : REGULATION DE L'ACTIVITE ASTROCYTAIRE PAR LA 5-HT, LA NA ET LEURS RECEPTEURS RESPECTIFS AU SEIN DE LA SYNAPSE TRIPARTITE MONOAMINERGIQUE	48
FIGURE 9 : REPRESENTATION SCHEMATIQUE D'UNE SYNAPSE TRIPARTITE.	52
FIGURE 10 : REPRESENTATIONS SCHEMATIQUES DES GRANDES FONCTIONS ASTROCYTAIRES... 53	
FIGURE 11 : REPRESENTATION SCHEMATIQUE D'UNE PANNEXINE.	68
FIGURE 12 : REGULATION DE L'OUVERTURE DES CANAUX PANNEXINES.	69
FIGURE 13 : HC ET JC FORMES PAR LES CXS.....	71
FIGURE 14 : REPRESENTATION SCHEMATIQUE ET SIMPLIFIEE DU CYCLE DE VIE DES CXS.	72
FIGURE 15 : ALTERATIONS DES CXS ASTROCYTAIRES DANS DIFFERENTES PATHOLOGIES DU SYSTEME NERVEUX CENTRAL.	86
FIGURE 16 : CONSTRUCTION GENETIQUE SIMPLIFIEE DU GENE DE LA Cx43 CHEZ LES SOURIS Cx43 KD.	105
FIGURE 17 : SCHEMA DE LA CONSTRUCTION DU SHRNA	106
FIGURE 18 : DISPOSITIF EXPERIMENTAL DU TEST D'OF	110
FIGURE 19 : DISPOSITIF EXPERIMENTAL DU TEST D'EPM	111
FIGURE 20 : DISPOSITIF EXPERIMENTAL DU TEST DE NSF.	112
FIGURE 21 : DISPOSITIF EXPERIMENTAL DU TST.	113
FIGURE 22 : DISPOSITIF EXPERIMENTAL DU FST.....	114
FIGURE 23 : DEGRADATION DE L'ETAT DU PELAGE CHEZ DES SOURIS EXPOSEES A LA CORT.. 115	
FIGURE 24 : DISPOSITIF EXPERIMENTAL DU TEST D'OR.	116
FIGURE 25 : DISPOSITIF EXPERIMENTAL DE LA MICRODIALYSE INTRACEREBRALE.	117
FIGURE 26 : SCHEMA SIMPLIFIE DE LA TECHNIQUE D'IMMUNOHISTOCHEMIE.	124

FIGURE 27 : EXPRESSION DES Cx43 ET Cx30 DANS L'HIPPOCAMPE, LE CORTEX PREFRONTAL ET L'HYPOTHALAMUS MESUREE PAR WESTERN-BLOT CHEZ DES SOURIS Cx43 FLOXEEES DITES Cx43 KD.	131
FIGURE 28 : EXPRESSION DE LA Cx43, Cx30 ET DE LA GFAP DANS L'HIPPOCAMPE DORSAL DE SOURIS Cx43 FLOXEEES DITES Cx43 KD, PAR IMMUNOHISTOCHEMIE.	132
FIGURE 29 : EXPRESSION DE LA PROTEINE ALDHL1 DANS L'HIPPOCAMPE MESUREE PAR WESTERN-BLOT.	132
FIGURE 30 : EFFET DE L'INACTIVATION CONSTITUTIVE DES Cx43 SUR LES [5-HT] _{EXT} HIPPOCAMPIQUES.	149
FIGURE 31 : EFFET DE L'INACTIVATION CONSTITUTIVE DES Cx43 LE COMPORTEMENT DE RESIGNATION APRES UN TRAITEMENT A LA PCPA.	150
FIGURE 32 : EFFET DE L'INACTIVATION CONSTITUTIVE DES Cx43 SUR LES [GLUT] _{EXT} HIPPOCAMPIQUES.	151
FIGURE 33 : ANALYSE DE L'EXPRESSION DES Cx43 PAR WESTERN BLOT DANS L'HIPPOCAMPE DE SOURIS INJECTEES LOCALEMENT AVEC UN SHRNA-Cx43.	152
FIGURE 34 : EXPRESSION DES Cx43, Cx30 ET DE LA GFAP DANS L'HIPPOCAMPE DE SOURIS INJECTEES LOCALEMENT AVEC UN SHRNA-Cx43.	153
FIGURE 35 : EFFET DE L'INACTIVATION INTRA-HIPPOCAMPIQUE DES Cx43 SUR LE COMPORTEMENT ANXIEUX.	154
FIGURE 36 : EFFET DE L'INACTIVATION INTRA-HIPPOCAMPIQUE DES Cx43 SUR LE COMPORTEMENT DE RESIGNATION ET D'INCURIE.	155
FIGURE 37 : EFFET DE L'INACTIVATION INTRA-HIPPOCAMPIQUE DES Cx43 SUR LA MEMOIRE.	156
FIGURE 38 : EFFET DE L'INACTIVATION INTRA-HIPPOCAMPIQUE DES Cx43 SUR LES [5-HT] _{EXT} HIPPOCAMPIQUES.	157
FIGURE 39 : EFFET DE L'INACTIVATION INTRA-HIPPOCAMPIQUE DU GAP26 SUR LE COMPORTEMENT DE RESIGNATION ET LES [GLUT] _{EXT} HIPPOCAMPIQUES.	159
FIGURE 40 : EFFET DE L'INACTIVATION INTRA-HIPPOCAMPIQUE DU GAP26 SUR LE COMPORTEMENT DE RESIGNATION EN PRESENCE OU NON D'UN ANTAGONISTE DES RECEPTEURS GLUTAMATERGIQUES NMDA (KETAMINE) OU AMPA (NBQX).	160
FIGURE 41 : EFFET DE L'INACTIVATION CONSTITUTIVE DES Cx43 SUR LA REPONSE A UNE ADMINISTRATION UNIQUE DE FLUOXETINE DANS LE TST.	162
FIGURE 42 : EFFET DE L'INACTIVATION CONSTITUTIVE DES Cx43 SUR LA FREQUENCE DE DECHARGE DES NEURONES 5-HT DU NRD EN REPONSE A L'ADMINISTRATION UNIQUE DE FLUOXETINE.	163
FIGURE 43 : EFFET DE L'INACTIVATION CONSTITUTIVE DES Cx43 SUR LA REPONSE A UNE ADMINISTRATION UNIQUE DE FLUOXETINE SUR LES [5-HT] _{EXT} HIPPOCAMPIQUES.	164

FIGURE 44 : EXPRESSION DES Cx43 ET DE LA GFAP DANS L'HIPPOCAMPE DE SOURIS INJECTEES AVEC UN SHRNA-Cx43.	165
FIGURE 45 : EFFET DE L'INACTIVATION HIPPOCAMPIQUE DES Cx43 SUR LA REPONSE A UNE ADMINISTRATION UNIQUE DE FLUOXETINE DANS LE TST.....	166
FIGURE 46 : EFFET DE L'INACTIVATION INTRA-HIPPOCAMPIQUE DES Cx43 SUR LA REPONSE A UNE ADMINISTRATION UNIQUE DE FLUOXETINE SUR LES [5-HT] _{EXT} HIPPOCAMPIQUES... ..	167
FIGURE 47 : EFFET DE L'INACTIVATION PHARMACOLOGIQUE DES CXS PAR LA CARBENOXOLONE SUR LA REPONSE A UNE ADMINISTRATION UNIQUE DE FLUOXETINE DANS LE TST.	168
FIGURE 48 : EXPRESSION DES Cx43, Cx30 ET DE LA GFAP DANS L'HIPPOCAMPE DE SOURIS INJECTEES AVEC UN SHRNA-GFP OU SHRNA-Cx43 DANS UN MODELE DE SOURIS DEPRIMEES.	171
FIGURE 49 : EFFET DE L'INACTIVATION DES Cx43 SUR LES CONCENTRATIONS PLASMATIQUES DE CORTICOSTERONE (CORT) DANS UN MODELE DE SOURIS DEPRIMEES.	172
FIGURE 50 : EFFET DE L'INACTIVATION INTRA-HIPPOCAMPIQUE DES Cx43 SUR L'HYPERTHERMIE DANS UN MODELE DE SOURIS DEPRIMEES.	173
FIGURE 51 : EFFET DE L'INACTIVATION INTRA-HIPPOCAMPIQUE DES Cx43 SUR L'ETAT DU PELAGE AU COURS DE L'EXPOSITION A LA CORT.	174
FIGURE 52 : EFFET DE L'INACTIVATION INTRA-HIPPOCAMPIQUE DES Cx43 SUR HIPPOCAMPIQUES SUR L'ANXIETE DANS UN MODELE DE SOURIS DEPRIMEES.	175
FIGURE 53 : EFFET DE L'INACTIVATION INTRA-HIPPOCAMPIQUE DES Cx43 SUR LE COMPORTEMENT DE RESIGNATION DANS UN MODELE DE SOURIS DEPRIMEES.	175
FIGURE 54 : EFFET DE L'INACTIVATION INTRA-HIPPOCAMPIQUE DES Cx43 SUR LA MEMOIRE DANS UN MODELE DE SOURIS DEPRIMEES.....	176
FIGURE 55 : EFFET DE L'INACTIVATION INTRA-HIPPOCAMPIQUE DES Cx43 SUR LES CONCENTRATIONS EXTRACELLULAIRES DE 5-HT ET DE GLUTAMATE DANS L'HIPPOCAMPE DANS UN MODELE DE SOURIS DEPRIMEES.....	178
FIGURE 56 : PROTOCOLE EXPERIMENTAL.	182
FIGURE 57 : ÉTUDE DE L'ÉVOLUTION DE L'ÉTAT DU PELAGE CHEZ LA SOURIS APRES UNE EXPOSITION DE DIX SEMAINES A LA CORT.	183
FIGURE 58 : ANXIETE ET ACTIVITE LOCOMOTRICE MESUREES DANS LE TEST D'OPEN FIELD, DANS UN MODELE DE SOURIS DEPRIMEES TRAITÉES A LA VENLAFAXINE ET/OU LA CBX.....	184
FIGURE 59 : ANXIETE MESUREE DANS LE TEST D'ALIMENTATION SUPPRIMEE PAR LA NOUVEAUTE DANS UN MODELE DE SOURIS DEPRIMEES TRAITÉES A LA VENLAFAXINE ET/OU LA CBX. .	185
FIGURE 60 : COMPORTEMENT DE RESIGNATION MESURE DANS LE TEST DE SUSPENSION CAUDALE DANS UN MODELE DE SOURIS DEPRIMEES TRAITÉES A LA VENLAFAXINE ET/OU LA CBX. .	185
FIGURE 61 : Z-SCORES EMOTIONNELS DANS UN MODELE DE SOURIS DEPRIMEES TRAITÉES A LA VENLAFAXINE ET/OU LA CBX.	186

FIGURE 62 : ANXIETE ET ACTIVITE LOCOMOTRICE MESUREES DANS LE TEST D'OPEN FIELD, DANS UN MODELE DE SOURIS DEPRIMEES APRES ARRET DES TRAITEMENTS A LA VENLAFAXINE ET/OU LA CBX.	187
FIGURE 63 : ANXIETE MESUREE DANS LE TEST D'ALIMENTATION SUPPRIMEE PAR LA NOUVEAUTE DANS UN MODELE DE SOURIS DEPRIMEES APRES ARRET DES TRAITEMENTS A LA VENLAFAXINE ET/OU LA CBX.	188
FIGURE 64 : COMPORTEMENT DE RESIGNATION MESURE DANS LE TEST DE SUSPENSION CAUDALE DANS UN MODELE DE SOURIS DEPRIMEES APRES ARRET DES TRAITEMENTS A LA VENLAFAXINE ET/OU LA CBX.	188
FIGURE 65 : Z-SCORES EMOTIONNELS DANS UN MODELE DE SOURIS DEPRIMEES APRES ARRET DES TRAITEMENTS A LA VENLAFAXINE ET/OU LA CBX.....	189
FIGURE 66 : TAUX DE RECHUTE DANS UN MODELE DE SOURIS DEPRIMEES APRES ARRET DES TRAITEMENTS A LA VENLAFAXINE ET/OU LA CBX.	190
FIGURE 67 : HYPOTHESE MECANISTIQUE EXPLIQUANT L'EFFET D'UNE SUR-ACTIVATION DES GR SUR L'EXPRESSION ET LA FONCTION DES Cx43 ASTROCYTAIRES	204
FIGURE 68 : HYPOTHESE MECANISTIQUE EXPLIQUANT LA DEREGULATION DE L'AXE HPA ET DU RETROCONTROLE DANS LA DM.	206

Liste des tableaux

TABLEAU 1 : PRINCIPAUX MODELES ANIMAUX DE DEPRESSION BASES SUR LE STRESS CHRONIQUE.	24
TABLEAU 2 : EFFETS DES DIFFERENTES CLASSES D'ANTI DEPRESSEURS SUR LES SYSTEMES MONOAMINERGIQUES, MESURES A L'AI DE DE LA TECHNIQUE DE MICRODIALYSE INTRACEREBRALE IN VIVO.	29
TABLEAU 3 : EXEMPLES D'EFFETS DE TROIS GLIOTRANSMETTEURS (GLUTAMATE, ATP ET D- SERINE) SUR L'ACTIVITE NEURONALE	49
TABLEAU 4 : DISTRIBUTION CELLULAIRE DES DIFFERENTES ISOFORMES DE CXS EXPRIMEES DANS LE SYSTEME NERVEUX CENTRAL.	70
TABLEAU 5 : TABLEAU RECAPITULATIF DES PRINCIPAUX BLOQUEURS PHARMACOLOGIQUES DES CXS UTILISES.	74
TABLEAU 6 : CARACTERISTIQUES PHARMACOLOGIQUES DE LA CARBENOXOLONE CBX.	76
TABLEAU 7 : NIVEAUX D'EXPRESSION ET STATUT FONCTIONNEL DES CONNEXINES CHEZ DES PATIENTS DEPRIMES ET DANS PLUSIEURS MODELES MURINS DE DEPRESSION BASES SUR DIFFERENTES PROCEDURES DE STRESS CHRONIQUE	92
TABLEAU 8 : EFFETS DE DIFFERENTS ANTI DEPRESSEURS SUR L'ANATOMIE ET LA FONCTION DES ASTROCYTES ET DES CXS ASTROCYTAIRES.....	95
TABLEAU 9 : COMPOSITION IONIQUE DU LIQUIDE CEPHALO-RACHIDIEN ARTIFICIEL (LCRA).	118
TABLEAU 10 : COMPOSITION DE LA PHASE SPECIFIQUE A LA SEROTONINE.	119
TABLEAU 11 : COMPOSITION DU TAMPON DE TRANSFERT.	122
TABLEAU 12 : COMPOSITION DU LIQUIDE DE CONSERVATION CRYOPROTECTANT.	123

Résumé

Les cellules gliales dont les astrocytes – au moins aussi nombreux que les neurones dans le cerveau – joueraient un rôle important dans l’anxiété, la dépression et probablement dans la réponse aux antidépresseurs. Plusieurs études menées chez l’Homme et l’animal vont dans ce sens puisqu’elles mettent en évidence une association entre des changements d’expression de différents marqueurs astrocytaires et la sévérité de ces troubles psychiatriques. C’est notamment le cas de la connexine 43 (Cx43), une protéine transmembranaire impliquée dans la formation de deux unités fonctionnelles distinctes : les jonctions communicantes (JC) qui assurent la communication entre deux astrocytes voisins et les hémicanaux (HC) dont le rôle est de libérer des molécules neuro-actives (gliotransmetteurs i.e. glutamate, ATP, D-sérine) dans la fente synaptique. En effet, une diminution de l’expression des Cx43 a été rapportée dans différentes régions cérébrales de patients dépressifs et dans des modèles murins de dépression. En revanche, d’un point de vue fonctionnel, l’induction d’un phénotype anxio/dépressif serait associée à une diminution de l’activité des JC et à une augmentation de l’activité des HC.

Face à ces effets opposés, l’objectif de cette thèse était de caractériser plus finement le rôle des Cx43 dans les comportements anxio/dépressifs et la réponse aux psychotropes en utilisant des approches d’inactivation génétiques et pharmacologiques de ces protéines.

Nos résultats montrent que l’inactivation génétique des Cx43 dans l’hippocampe n’entraîne aucun effet neuro-comportemental. En revanche, dans un modèle de dépression basé sur l’exposition chronique des souris à la corticostérone (modèle CORT), l’inactivation génétique des Cx43 exerce des effets de type anxiolytiques/antidépresseurs. D’un point de vue mécanistique, ces effets seraient liés à une diminution de la libération hippocampique de glutamate par les HC et à une atténuation de la réactivité de l’axe hypothalamo-hypophysaire-surénalien (HPA).

Concernant l’inactivation pharmacologique des Cx43, nos travaux apportent des évidences expérimentales sur le fait que l’administration systémique de carbenoxolone, un bloqueur des connexines, potentialise la réponse aiguë d’un inhibiteur de recapture de la sérotonine en conditions basales, mais s’oppose à ses effets bénéfiques chroniques dans un modèle de dépression. Le microenvironnement cellulaire semble donc essentiel dans la manière dont les Cx43 influencent la réponse aux antidépresseurs.

L’ensemble de ces résultats de thèse laissent entrevoir un rôle des Cx43 astrocytaires dans la régulation de l’humeur via la modulation de circuits neuronaux convergeant vers l’axe

HPA. Ils soulignent également l'intérêt de moduler les Cx43 pour renforcer l'activité thérapeutique des antidépresseurs actuellement disponibles. Les futures recherches devront préciser les modalités de ces nouvelles stratégies combinant des agents pharmacologiques à tropisme astrocytaire et neuronal.

Mots-clés

Astrocytes, Connexine 43, Hippocampe, Hémicanaux, Stress chronique, Antidépresseur

Abstract

Glial cells including astrocytes – as much abundant as neurons in the brain – may play an important role in anxiety, depression and possibly antidepressant drugs response. Previous studies in Humans and animals are consistent with this hypothesis since they report an association between changes in astroglial markers expression and the severity of psychiatric disorders. Among those markers, the connexins 43 (Cx43) are particularly interesting. Those transmembrane proteins are involved in the formation of two functional units of communication : the gap-junctions (GJ) which facilitate the communication between two neighboring astrocytes, and the hemichannels (HC) which are able to release neuroactive molecules (gliotransmitters i.e. glutamate, ATP, D-serine) in the synaptic cleft. Decreased levels of Cx43 were unveiled in different brain regions of depressed patients but also in relevant mouse models of depression. Functionally, the induction of an anxio/depressive-like phenotype has been associated with a decreased activity of GJ and an increased activity of HC.

In light of these data, the aim of this thesis was to better characterize the role of Cx43 in anxio/depressive-like behaviors and antidepressant drugs response using genetic and pharmacological approaches.

Our results show that hippocampal genetic inactivation of Cx43 has no effect on behaviors. However, in a mouse model of depression based on chronic corticosterone exposure (CORT model), the genetic inactivation of Cx43 induces anxiolytic-/antidepressant-like effects. Mechanistically, these behavioral responses would be linked to an attenuation of hippocampal glutamate release through HC and a lower hypothalamic pituitary adrenal (HPA) axis reactivity.

Regarding the pharmacological approach, our work provides experimental evidence that systemic administration of the connexins blocker carbenoxolone, enhances the acute effects of a serotonin reuptake inhibitor in basal conditions while hindering its chronic beneficial effects in a mouse model of depression. Together, those results suggest the importance of the cellular microenvironment in the way Cx43 may influence treatment response.

This work points out the importance of astroglial Cx43 in mood through the modulation of neuronal network associated with HPA axis. It also emphasizes the importance to develop Cx43 modulators to strengthen the therapeutic activity of antidepressant drugs. Further studies are warranted to define the modalities of such innovative strategies combining pharmacological agents with astroglial and neuronal tropisms.

Key-words

Astrocytes, Connexins 43, Hippocampus, Hemichannels, Chronic stress, Antidepressant

INTRODUCTION

En 2018, l'organisation mondiale de la santé estimait à plus de trois cent cinquante millions le nombre de personnes souffrant d'épisodes dépressifs dans le monde (OMS, 2018). Répertoriée dans le Manuel de Diagnostic et Statistiques des troubles Mentaux (DSM-V) comme une maladie psychiatrique, la dépression représente aujourd'hui un problème majeur de santé publique. En effet, elle est considérée en France comme la troisième cause d'invalidité (Disease et al 2017).

Qu'elle soit unipolaire ou incluse dans un trouble bipolaire, la combinaison des symptômes émotionnels, cognitifs et moteurs fait de ce trouble psychiatrique un syndrome dont les principales caractéristiques sont :

- Une humeur triste,
- Une perte d'intérêt et de plaisir (anhédonie),
- Une perte ou un gain de poids,
- Des troubles du sommeil,
- Des troubles de l'attention,
- Un sentiment de culpabilité et une dévalorisation de soi,
- Des troubles cognitifs, perte de mémoire,
- Des pensées de mort récurrentes

La dépression majeure (DM) constitue une forme grave de dépression unipolaire. Selon le DSM-V, au moins cinq de ces symptômes doivent être présents afin de poser un diagnostic de DM incluant obligatoirement « l'humeur triste » ou « la perte d'intérêt et de plaisir » (APA 2013). En fonction des symptômes prédominants et de leur sévérité, la nature de la DM varie selon les patients.

Des études épidémiologiques ont montré que cette pathologie touche deux fois plus de femmes que d'hommes (Sramek et al 2016, Weissman et al 1993, Weissman & Klerman 1977). Alors qu'une psychothérapie s'avère suffisante dans le traitement d'une dépression « légère », les antidépresseurs sont nécessaires dans le traitement des formes les plus sévères.

À ce jour, plusieurs hypothèses ont été proposées afin d'expliquer l'origine de la pathologie :

- Une diminution de la neurotransmission monoaminergique centrale en rapport avec un déficit des concentrations extracellulaires de sérotonine (5-HT), noradrénaline (NA) et/ou de dopamine (DA),
- Une diminution du processus de neurogenèse adulte et de la gliogenèse dans l'hippocampe, associée à une diminution du volume de cette structure du système limbique,
- Une sur-activation de l'axe hypothalamo-hypophysaire-surrénalien (HPA) caractérisée par une élévation des concentrations plasmatiques en cortisol.

Ces mécanismes ne sont pas exclusifs et différents travaux montrent qu'ils peuvent être intimement liés (Gold 2015). Une meilleure connaissance de ces processus à l'échelle moléculaire et cellulaire est indispensable pour développer de nouvelles stratégies thérapeutiques.

Les traitements antidépresseurs actuellement disponibles visent à contrecarrer les altérations neurochimiques retrouvées dans la DM. Plus particulièrement, les études chez l'animal ont permis de montrer que les traitements antidépresseurs utilisés en première intention augmentent la neurotransmission monoaminergique en agissant sur différentes cibles pharmacologiques (Guiard et al 2006) :

- Les inhibiteurs de la monoamine-oxydase, l'enzyme de dégradation des catécholamines (IMAO), ont été les premiers utilisés. On compte à ce jour trois catégories d'IMAO : les inhibiteurs sélectifs de la MAO de type A comme le moclobémide (Aurorix®), les inhibiteurs sélectifs de la MAO de type B comme la rasagiline (Azilect®) et les inhibiteurs non-sélectifs inhibant les deux sous-types comme la sélégiline (Eldepryl®). Leur mauvaise tolérance fait qu'ils ne sont aujourd'hui presque plus utilisés dans le traitement de la DM, Les antidépresseurs tricycliques (TCA) comme l'amitriptyline (Laroxyl®) augmentent les concentrations extracellulaires de 5-HT et de NA en inhibant la recapture de ces monoamines respectivement par les transporteurs SERT et NET. En revanche, leur faible sélectivité vis-à-vis de ces cibles et leur capacité à augmenter la NA au niveau cardiaque sont responsables d'effets cardiotoxiques,
- Plus récemment, les inhibiteurs sélectifs de recapture de la sérotonine (ISRS) comme la fluoxétine (Prozac®), la paroxétine (Déroxat®) ou encore le escitalopram (Seroplex®), ont été développés pour agir de manière plus sélective sur le SERT. En dépit d'un meilleur profil de tolérance, leur efficacité thérapeutique semble moins bonne que les TCA. Les inhibiteurs mixtes de recapture comme la venlafaxine (Effexor®) qui, à l'instar des TCA, agissent à la fois sur les systèmes 5-HT et NA. Ceux-ci sont de plus en plus utilisés, alors que le développement d'inhibiteurs triples de recapture de la 5-HT, NA et DA est déjà discuté (Guiard et al 2009).

Plus récemment deux nouvelles molécules ont vu le jour. Il s'agit de l'agomélatine (Valdoxan®) et de l'agent multi-cible vortioxétine (Brintelix®) dont les mécanismes d'action reposent, entre autres, sur la modulation de certains sous-types de récepteurs sérotoninergiques. Toutefois, ces derniers apportent peu ou pas d'avantages par rapport aux antidépresseurs actuellement commercialisés si ce n'est sur les aspects cognitifs (Katona et al 2012, Martin et al 2017, McIntyre et al 2017, McIntyre et al 2014). En dépit

de l'efficacité incontestable de ces antidépresseurs, un tiers des patients ne répondent pas à ces différentes options pharmacologiques (Little 2009). Par ailleurs, parmi les répondeurs, un long délai d'action (trois à quatre semaines) est nécessaire avant d'observer les premiers signes thérapeutiques. Enfin, un taux de rechute important est également recensé comme une limite thérapeutique préoccupante des antidépresseurs (Leon et al 2000, Stewart et al 2014).

Afin de mettre en évidence de nouvelles cibles pharmacologiques et de tester l'efficacité de nouvelles molécules, de nombreux modèles murins, majoritairement basés sur le stress chronique, ont été développés. Parmi eux, on trouve le modèle de stress chroniques imprévisibles (Unpredictable Chronic Mild Stress, UCMS) (Mineur et al 2006), le modèle de défaite sociale (Berton et al 2006) et le modèle d'exposition chronique à la corticostérone (David et al 2009). Ce dernier initialement décrit chez le rat (Hill et al 2003, Murray et al 2008), consiste à délivrer un analogue murin du cortisol, la corticostérone (CORT), dans l'eau de boisson pendant environ huit semaines. L'exposition chronique à la CORT permet une activation des récepteurs minéralocorticoïdes (MR) et glucocorticoïdes (GR) centraux. La sur-activation de ces derniers induit de nombreuses perturbations dans le système nerveux central (SNC) dont une diminution du processus de neurogenèse hippocampique chez l'adulte (David et al 2009), une diminution du volume de cette structure limbique (Zhang et al 2015b) mais aussi des perturbations de l'activité du système 5-HT. Par exemple, en conditions de stress aigu, la synthèse et la libération de 5-HT sont fortement activées au niveau de plusieurs aires cérébrales (Amat et al 2005, Maswood et al 1998) probablement en rapport avec la stimulation de l'activité de l'enzyme de synthèse TPH-2 en réponse à la sécrétion de corticostérone (Azmitia & McEwen 1969, Park et al 1989). Lorsque le stress se prolonge, les taux extracellulaires de 5-HT augmentent également et différentes études suggèrent que cet effet résulte de la désensibilisation des autorécepteurs inhibiteurs 5-HT_{1A} situés dans la région des corps cellulaires des neurones sérotoninergiques (Laaris et al 1995, Lanfumey et al 1999, Rainer et al 2011). Au contraire, dans les zones de projection de ces neurones sérotoninergiques, l'exposition à un stress prolongé provoque une augmentation de l'expression des ARNm d'autres récepteurs (5-HT_{2A} /5-HT_{2C}) (Harada et al 2008) qui pourrait, du moins en partie, rendre compte des effets comportementaux délétères du stress.

Il est cependant intéressant de noter que les anomalies liées à une exposition chronique à la CORT (et donc à une sur-activation des GR) ont été retrouvées chez l'Homme (pour revue Boku et al 2017). Ce modèle semble donc adapté pour étudier les mécanismes neurobiologiques de la DM mais aussi l'efficacité des antidépresseurs puisque les anomalies observées suite à l'administration chronique de CORT chez le rongeur peuvent être

corrigées par un traitement chronique à la fluoxétine ou à la venlafaxine (David et al 2009, Mendez-David et al 2017b, Quesseveur, Portal et al 2015, Rainer et al 2011).

Depuis quelques années, différentes preuves expérimentales révèlent l'implication des astrocytes dans la physiopathologie de la DM et notamment une diminution de la densité de ces cellules dans le cerveau de patients déprimés (Rajkowska & Miguel-Hidalgo 2007, Rajkowska & Stockmeier 2013). De même, chez le rat soumis à un stress chronique, une perte de ces cellules gliales a été observée dans le cortex préfrontal (Banasr & Duman 2008). Alors que ces travaux portent sur l'étude du niveau d'expression de marqueurs astrocytaires tel que la protéine GFAP (Glial Fibrillary Acidic Protein) (Nagy et al 2015), une étude récente montre que l'organisation en réseau de ces cellules (aussi appelé syncytium glial) est également perturbée dans la pathologie (Medina et al 2016). Les astrocytes apparaissent donc comme une nouvelle cible thérapeutique dans le traitement de la DM. Constituants majeurs de la barrière hémato-encéphalique, les astrocytes servent de support aux neurones en leur apportant énergie et nutriments nécessaires à leur bon fonctionnement, ainsi qu'au développement du réseau neuronal (Allen & Barres 2009, Elsayed & Magistretti 2015). Mais le rôle de ces cellules gliales ne se limite pas à une fonction de soutien métabolique puisque leur rôle dans la modulation de la neurotransmission monoaminergique au sein de la synapse tripartite est fortement soupçonné (pour revue Quesseveur et al 2013b). En effet, plusieurs études *in vitro* (Bal et al 1997, Inazu et al 2001, Kimelberg & Katz 1986) révèlent sur des cultures primaires d'astrocytes la présence d'ARN messagers (ARNm) codant pour les transporteurs de monoamines notamment le SERT et le NET (Katz & Kimelberg 1985). Même si l'étude de ces transporteurs monoaminergiques astrocytaires a conduit à des résultats hétérogènes (Hansson et al 1985, Höslì & Höslì 1995, Paterson & Hertz 1989), plusieurs inhibiteurs comme la désipramine (Norpramin®) ou le milnacipran (Ixel®) sont capables de bloquer la recapture des monoamines sur des cultures primaires d'astrocytes de rats (Inazu et al 2003). La présence du transporteur de dopamine (DAT) dans les astrocytes reste peu documentée et controversée. Bien qu'une étude *in vitro* révèle que les astrocytes expriment le DAT (Karakaya et al 2007), il a été proposé que la présence de DA dans les astrocytes résulterait d'un processus hétérologue par le NET ou par un autre système de transporteur dont le Transporteur de Cations Organiques de type 3 (OCT-3) (Takeda et al 2002). Dans la même idée, nombreux sont les récepteurs monoaminergiques exprimés par les astrocytes. Même si leurs rôles restent peu documentés, ils pourraient participer, au sein de la synapse tripartite, à la mise en place des mécanismes de régulation de la libération des neurotransmetteurs par les neurones et les astrocytes eux-mêmes, et ainsi contrôler finement leurs concentrations extracellulaires. Enfin, il a été proposé que les astrocytes pourraient transmettre différents signaux aux neurones pour réguler leur survie, leur prolifération et la formation de nouvelles synapses. Cette dernière fonction de l'unité

neuro-gliale serait rendue possible via la libération de facteurs neurotrophiques tels que les facteurs de croissance des fibroblastes de type 1 et 2 (essentiels pour la formation des connexions synaptiques dans le cortex, la maturation et la survie des neurones NA et la neurogenèse adulte), le facteur de croissance glial (GDNF) lui aussi associé à la prolifération, la survie et la maturation des nouveaux neurones produit au niveau des niches neurogéniques (Airaksinen & Saarma 2002, Henderson et al 1994) ou encore le facteur neurotrophique dérivé du cerveau (BDNF) (Quesseveur et al 2013a).

Parmi les nombreuses cibles astrocytaires qui pourraient jouer un rôle dans le DM et la réponse aux antidépresseurs, les connexines 30 et 43 (Cx30/43) font aujourd'hui l'objet d'une attention particulière. Exprimées principalement par les astrocytes, ces protéines participent à la formation des jonctions communicantes (JC). Ces domaines membranaires spécialisés permettent l'amarrage de deux cellules adjacentes facilitant ainsi leur communication par la formation d'un pore perméable à de petites molécules dont le poids moléculaire est inférieur à 1kDa telles que le Ca^{2+} , l'ATP, l' IP_3 ou d'autres métabolites. À l'inverse, un canal non apparié (aussi appelé connexon ou hémicanal, HC) favorise la communication entre les astrocytes et les autres types cellulaires dont les neurones (Charvériat et al 2017). On sait aujourd'hui que la libération de molécules neuroactives par les HC est une étape cruciale pour l'activité et la plasticité neuronale (Kimelberg 2007). Au début des années 2010, deux études ont montré une diminution de l'expression des Cx43 dans le cortex préfrontal de patients déprimés et suicidés (Ernst et al 2011, Miguel-Hidalgo et al 2014). Chez l'animal, un dysfonctionnement de ces protéines a été associé à des comportements de type anxio/dépressifs (Sun et al 2012). Ce résultat a récemment été remis en question dans notre laboratoire. En effet, une inactivation génétique constitutive des Cx43 conduit à un ensemble de comportements de type antidépresseurs chez la souris (Quesseveur Portal et al 2015). Bien que des processus adaptatifs puissent rendre compte de ce résultat, il est nécessaire de mettre en place un programme de recherche visant à mieux comprendre le rôle de ces protéines dans la dépression mais aussi dans la réponse aux antidépresseurs. N'étant la cible directe d'aucun antidépresseur, les Cx43 semblent néanmoins impliquées dans le mécanisme d'action de plusieurs d'entre eux. On retiendra principalement que toutes les classes d'antidépresseurs augmentent l'expression des Cx43. À titre d'exemple, des études *in vitro* montrent que la fluoxétine (Mostafavi et al 2014) ou l'amitriptyline (Morioka et al 2014) augmentent l'expression des Cx43 sur des cultures primaires d'astrocytes. En revanche, les antidépresseurs auraient des effets différents sur l'activité des Cx43 selon leur engagement dans la fonction JC ou HC (Jeanson et al 2017). De manière intéressante, il a été rapporté dans cette étude que les ISRS, les inhibiteurs de la recapture de la noradrénaline (IRN) ou les TCA, inhibent tous l'activité des HC. En revanche, leur action sur l'activité JC semble discutable puisqu'au sein d'une même classe pharmacologique, des effets différents sont retrouvés. C'est

notamment le cas des TCA pour lesquels l'amitriptyline inhibe les JC alors que l'imipramine (Tofranil®) ne semble pas avoir d'effets. De manière similaire, la fluoxétine inhibe l'activité JC alors que la paroxétine (Seroxat®) l'active.

Dans le but de mieux comprendre l'implication des connexines astrocytaires dans les troubles anxio/dépressifs, ce travail de thèse a porté sur les effets cellulaires, moléculaires et comportementaux de l'inactivation des Cx43 à l'aide de stratégies complémentaires génétiques (souris Cx43 KD ou sauvages injectées avec un shRNA-Cx43) et pharmacologiques (inhibiteurs des connexines).

Alors que l'implication des connexines dans la DM a été exclusivement décrite dans le cortex préfrontal, le premier chapitre de ce travail de thèse s'intéresse au rôle des Cx43 de l'hippocampe dans la régulation des comportements émotionnels en conditions physiologiques. Nous verrons que l'inhibition des Cx43 spécifiquement dans cette structure limbique peut avoir des conséquences importantes sur le comportement anxio/dépressif en rapport avec des modifications de la neurotransmission glutamatergique. Cette observation nous a conduits à émettre l'hypothèse selon laquelle la fonction HC des Cx43, connue pour participer à la libération de gliotransmetteurs (D-Serine, ATP, GABA, Glutamate...) dans la fente synaptique (Orellana et al 2011b, Otte et al 2013, Sultan et al 2015), pourrait jouer un rôle clé dans la régulation des émotions.

Posant la question de l'importance des Cx43 dans la réponse aigüe aux antidépresseurs, le deuxième chapitre de ces travaux de thèse a été consacré à l'étude de la réponse aigüe à un ISRS chez des souris génétiquement ou pharmacologiquement inactivées pour les Cx43. En particulier, nous verrons qu'une telle inactivation influence fortement la réponse à la fluoxétine.

Dans un troisième chapitre, nous verrons l'importance de ces protéines en conditions pathologiques, notamment dans un modèle de souris soumises à un stress chronique (modèle CORT).

Enfin dans un quatrième chapitre, nous avons profité d'une collaboration avec l'équipe du Pr. Emmanuelle Corruble et du Dr Romain Colle (Hôpital Psychiatrique du Kremlin-Bicêtre, Paris), pour déterminer le rôle des Cx43 dans la réponse à un traitement chronique aux antidépresseurs, et dans le phénomène de rechute à la fois chez la souris modèle de dépression et le patient déprimé.

D'un point de vue expérimental, ce travail de thèse a été réalisé *in vivo* avec (i) l'étude des différences comportementales entre des souris contrôles et des souris présentant une inactivation (génétique ou pharmacologique) des Cx43 ; (ii) l'étude des effets d'une telle

inactivation à la fois sur l'activité des neurones sérotoninergiques et glutamatergique à l'aide de la technique de microdialyse intracérébrale.

Ce travail préclinique a été possible grâce à la mise en place de collaborations avec différents laboratoires et chercheurs français et étrangers :

- Laboratoire de Thérapie Cellulaire et Moléculaire, Pr Nicole Déglon (Lausanne, Suisse) : préparation des lentivirus contenant les shRNA-Cx43,
- Fédération de recherche 3C, Dr Nathalie Lorenzo (Université Aix-Marseille) : dosage du glutamate, GABA,
- Institut Cellules-Souches et Cerveau, INSERM U1208 (Lyon), Dr Nasser Haddjeri : étude comportementale dans un modèle de dépression, le « 5-day Forced-Swim Stress »,
- Centre de Recherche Interdisciplinaire en Biologie (CIRB), Collège de France (Paris), Pr Nathalie Rouach : étude des propriétés électrophysiologiques des astrocytes
- Unité INSERM U769, Pr Emanuelle Corruble (Hôpital du Kremlin-Bicetre) : étude clinique

Enfin, ces travaux de thèse s'inscrivent dans le cadre d'un projet financé par la Fondation pour la Recherche Médicale (FRM) intitulé « Étude de l'implication des Cx43 sur les comportements anxio/dépressifs chez la souris » (2015-2019).

Partie 1 : Les troubles anxio/dépressifs

1. Caractéristiques cliniques et anatomiques

1.1. Les troubles anxieux

Selon le DSM-V, l'anxiété est définie comme une « anticipation des futures menaces et se distingue de la peur, décrite comme une véritable réponse émotionnelle face à un danger ». Hippocrate (460 av. JC – 377 av. JC) décrit pour la première fois les troubles anxieux. Aujourd'hui, l'anxiété est considérée comme la sixième cause d'invalidité en France (9^e au niveau mondial) (Disease et al 2017).

On considère les troubles anxieux comme un ensemble de pathologies allant des attaques paniques jusqu'aux phobies les plus spécifiques (Kessler et al 2005). Bon nombre d'épisodes anxieux apparaissent dès l'enfance ou l'adolescence. Par ailleurs, les patients touchés par ces troubles psychiatriques sont traités en ambulatoire nécessitant moins d'attention qu'un patient touché par une pathologie psychiatrique plus importante telle que la schizophrénie par exemple. Toutefois, l'anxiété génère un véritable problème de santé publique qui, en l'absence de traitements adaptés, peut engendrer des conséquences importantes sur la vie du patient.

Touchant deux fois plus de femmes que d'hommes (Sramek et al 2016, Weissman et al 1993, Weissman & Klerman 1977), les 35-55 ans présentent 20% de risques supplémentaires de développer des troubles anxieux au cours de leur vie (pour revue Kessler et al 2015).

Bien que les mécanismes de l'anxiété restent aujourd'hui méconnus, certaines régions cérébrales sont décrites comme ayant un rôle important dans le développement de la pathologie. C'est notamment le cas de l'amygdale, le centre de régulation de la peur (Babaev et al 2018). De tels symptômes ne peuvent s'expliquer par l'activité d'une seule structure. En outre, on sait que l'amygdale entretient des liens anatomiques et fonctionnels bidirectionnels avec l'hippocampe, le cortex frontal, le septum, le thalamus et l'hypothalamus, à l'origine d'une régulation complexe de l'anxiété (Figure 1).

L'hippocampe est une autre région importante dans la régulation de l'anxiété. Anatomiquement et fonctionnellement (Kheirbek & Hen 2011), il peut être divisé en deux parties :

- L'hippocampe dorsal est majoritairement impliqué dans la mémoire et la formation de nouveaux souvenirs (Moser & Moser 1998),
- L'hippocampe ventral participerait plutôt au contrôle des émotions (pour revue Belzung et al 2014).

De plus, les parties dorsales et ventrales de l'hippocampe peuvent être subdivisées en plusieurs sous-régions. Parmi elles on retrouve les cornes d'Ammon (CA1/2/3), riches en neurones glutamatergiques sous-tendant les principales fonctions de l'hippocampe, et le

gyrus denté (DG, aussi appelé CA4) siège de la neurogenèse hippocampique chez l'adulte (Aimone et al 2018).

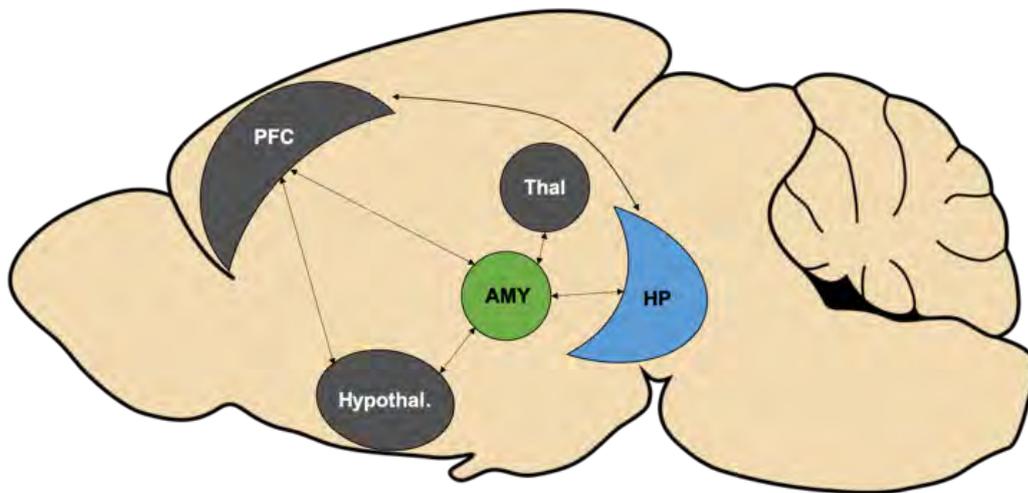


Figure 1 : Représentation schématique et simplifiée du circuit de l'anxiété chez la souris.

L'amygdale (AMY) projette vers de nombreuses régions cérébrales telles que l'hippocampe (HP), le cortex préfrontal (PFC) et l'hypothalamus (Hypothal.). Elle reçoit également plusieurs afférences provenant de ces régions. Figure adaptée d'après Calhoun & Tye 2015.

Plusieurs études ont montré l'importance de l'hippocampe dans le développement de troubles anxieux. Par exemple, une étude montre qu'une lésion de cette structure provoquée par une sur-activation des récepteurs glutamatergiques NMDA induit une diminution des comportements stéréotypés et une réduction des comportements anxieux (Deacon & Rawlins 2005). Dans cette étude, les auteurs montrent également une réduction de la latence à aller se nourrir mesurée dans trois tests différents dont celui d'hyponéophagie et une diminution de la latence à passer dans le compartiment sombre dans le test de « light-dark ». En revanche cette étude propose une lésion hippocampique totale ne permettant pas de préciser la sous-région impliquée dans ces comportements. Plus récemment, des données révèlent l'importance du DG de l'hippocampe ventral dans les comportements anxieux (Weeden et al 2015). Suite à l'injection de colchicine (un puissant neurotoxique) directement dans le DG de l'hippocampe ventral, une augmentation du temps passé dans les bras ouverts du labyrinthe en croix surélevé et du temps passé dans le centre d'une nouvelle arène a été observée. En accord avec ces résultats, l'utilisation d'outils ontogénétiques a permis de valider l'implication des neurones hippocampiques, et notamment ceux du CA1 ventral dans l'apparition des comportements anxieux. Dans une première étude, l'activation lumineuse des neurones exprimant un canal inhibiteur sensible à la lumière (ArchT) au moment où l'animal entre dans un bras ouvert d'un labyrinthe en croix surélevé, induit une augmentation du temps passé dans ce compartiment anxiogène (Jimenez et al 2018). Kheirbek et ses collaborateurs quant à eux mettent en avant l'importance du DG dans les comportements anxio/dépressifs (Kheirbek

et al 2013). En effet, en réponse à l'activation des neurones du DG ventral, les auteurs rapportent une diminution de l'anxiété mesurée dans le test de labyrinthe en croix surélevée et de champ ouvert. Enfin, l'utilisation d'un autre système inhibiteur impliquant des récepteurs sensibles à la Clozapine-N-Oxyde (CNO) (Drug Receptor Exclusively Activated by Designer Drug, DREADD), a permis de valider ces observations. En effet l'injection intra-péritonéale (i.p.) de CNO permet l'inactivation des nouveaux neurones de la zone sous-granulaire du DG dans l'hippocampe ventral et diminue l'anxiété (Anacker et al 2018).

Ces données sont importantes dans le contexte de ce travail de thèse car une anxiété prolongée peut être responsable du déclenchement d'une DM surtout en l'absence d'un traitement approprié (Malhi & Mann 2018). L'anxiété représente également un symptôme important de la DM utilisé comme un critère de diagnostic.

1.2. La dépression majeure

Troisième cause d'invalidité en France (5^e au niveau mondial et européen), la DM partage de nombreux points communs avec les troubles anxieux. D'une part, la prévalence de la DM est proche de celle des troubles anxieux puisqu'un quart de la population est touché par ce trouble psychiatrique sans nécessairement présenter d'antécédents (Milanovic et al 2015). Par ailleurs, il existe une forte comorbidité entre les troubles anxieux et la DM. En effet, une étude rapporte qu'environ 30% des patients atteints de troubles anxieux, quelles que soient leurs natures, souffrent également de DM (Rush et al 2005). D'autre part les structures cérébrales impliquées semblent être les mêmes. On retiendra principalement l'implication du cortex préfrontal (Liu et al 2017), de l'hippocampe ventral (Colla et al 2007, Liu et al 2017) ou encore de l'amygdale (Yao et al 2018). Les avancées technologiques récentes ont permis de mettre en évidence plusieurs altérations anatomiques et fonctionnelles au niveau de ces structures (Kupfer et al 2012).

1.2.1. Modifications anatomiques

Plusieurs études en neuro-imagerie décrivent les altérations anatomiques qui sont associées à la DM, majoritairement au niveau du cortex préfrontal, de l'hippocampe ou de l'amygdale.

Le cortex préfrontal peut être divisé en trois grandes sous-régions comme (i) le cortex préfrontal dorso-latéral, (ii) le cortex para-limbique et (iii) le cortex cingulaire antérieur. Ces régions corticales sont connectées aux autres structures impliquées dans la DM comme l'hippocampe ou l'amygdale. Une méta-analyse utilisant l'imagerie à résonance magnétique (IRM) a mis en évidence une diminution du volume du cortex préfrontal, associée à une diminution du volume de l'hippocampe chez des patients souffrant de DM (Koolschijn et al 2009). Ces résultats ont été récemment corroborés par une étude de

voxel (analyse volumétrique par IRM) montrant une diminution du volume de matière grise dans le cortex préfrontal médian et le cortex orbitofrontal supérieur droit (Nakano et al 2014). Une autre méta-analyse (McKinnon et al 2009) rapporte une diminution volumétrique globale au niveau de l'hippocampe chez des patients atteints de DM en comparaison à des patients sains. En revanche, cette diminution apparaît spécifiquement chez des patients souffrant d'épisodes dépressifs dont la durée est supérieure à deux ans.

Des données plus récentes montrent une diminution du volume du DG, notamment au niveau de l'hippocampe ventral chez les patients dépressifs (Travis et al 2015). En revanche, il semblerait que la DM ne puisse s'expliquer uniquement par la diminution du volume hippocampique au niveau ventral puisqu'une analyse IRM montre une diminution globale du volume de cette structure limbique (Lindqvist et al 2014). Cette atrophie hippocampique serait due à une augmentation de la mort cellulaire (Lucassen et al 2006). En effet, dans une étude menée chez le rat, des données révèlent qu'un stress aigu (durant lequel les animaux sont placés 1h à 4°C) ou chronique (durant lequel les animaux sont soumis à plusieurs stress imprévisibles durant vingt-et-un jours), réduit le nombre de neurones dans l'hippocampe via une augmentation du processus d'apoptose alors que ce phénomène est aboli trois semaines après l'arrêt des stress (Heine et al 2004). La même équipe a également montré chez des rongeurs soumis à un stress social, qu'un traitement de 28 jours à la tianeptine, une molécule sédatrice utilisée pour ses effets antidépresseurs, réduit la perte de nouveaux neurones causée par le stress social (Lucassen et al 2004).

Une augmentation du débit sanguin a été mise en évidence dans l'amygdale chez des patients déprimés (Drevets et al 1992) suggérant l'implication de cette structure dans la physiopathologie de la DM. En accord avec ces données, une étude utilisant l'IRM montre une augmentation du volume de l'amygdale chez ces patients (Van Eijndhoven et al 2009). Les auteurs mettent en évidence une corrélation positive entre le volume de l'amygdale et la sévérité de la DM. Ces résultats sont néanmoins discutables puisque l'augmentation du volume de l'amygdale est également observée chez des patients souffrant de dépression passagère alors que le volume de l'amygdale de patients souffrant de DM récurrente et de patients sains est comparable (Frodl et al 2003). Faisant écho à ces observations, des données récentes apportent un argument supplémentaire en faveur d'un volume amygdalien inchangé dans la DM, tant au niveau de la structure entière qu'au niveau des différents noyaux qui la composent (Brown et al 2019).

D'un point de vue anatomo-fonctionnel, des connexions synaptiques aberrantes entre le cortex préfrontal, l'hippocampe et l'amygdale ont été décrites. En outre, l'utilisation de techniques d'imageries fonctionnelles (IRMf) montre une diminution des connexions entre

ces trois structures (He et al 2019). Dans la même étude, les auteurs décrivent une corrélation négative entre la présence de connectivités cortico-limbiques et la sévérité de la dépression : moins de connectivité serait associée à une plus forte sévérité de la DM. Toutefois, les modifications anatomiques ne peuvent à elles seules rendre compte de l'apparition, du développement et de la sévérité de la DM. Il est vraisemblable que ces modifications s'accompagnent de changements fonctionnels qui entrent également en jeu dans la pathologie.

1.2.2. Modifications fonctionnelles

En accord avec les données présentées précédemment, Rajkowska et ses collaborateurs montrent dans une étude *post-mortem* que la densité, le nombre et la taille des neurones du cortex préfrontal de patients souffrants de DM est réduit en comparaison à des patients sains (Rajkowska 2000). Par ailleurs, l'activité de cette structure corticale est différente entre l'hémisphère gauche et l'hémisphère droit (Bruder et al 2001). En utilisant l'électroencéphalogramme, ces auteurs apportent un argument en faveur d'une plus faible activation du cortex préfrontal gauche, favorisant l'activité du cortex préfrontal droit. De manière intéressante, après avoir suivi un traitement antidépresseur de douze semaines à la fluoxétine, les patients souffrant de DM présentent un schéma d'activation frontal inversé. Des résultats similaires ont été retrouvés avec un autre inhibiteur de recapture de 5-HT, l'escitalopram (Haghighi et al 2017). De nombreuses preuves expérimentales viennent étayer ces résultats. En particulier, les travaux de Davidson (Davidson 2003, Davidson et al 2000) décrivent le cortex préfrontal gauche comme fortement impliqué dans la régulation des émotions positives alors que le cortex préfrontal droit serait impliqué dans la régulation des émotions négatives.

Chez l'Homme, une analyse IRMf a permis de mettre en évidence des modifications métaboliques dans le système limbique de patients déprimés (Mayberg et al 2000). L'injection de fluorodéoxyglucose (FDG), capté mais non métabolisé par les neurones, rend compte de l'activité métabolique des régions ciblées. Plus le FDG s'accumule, plus l'activité de la région étudiée est importante et inversement. Les auteurs révèlent une hypoactivité métabolique du cortex préfrontal et une hyperactivité de l'hippocampe chez des patients déprimés. De manière intéressante, six semaines de traitement à la fluoxétine (20 mg/kg/jour sans modification de la concentration au cours du traitement) permettent de rééquilibrer la balance fonctionnelle en augmentant l'activité corticale et en diminuant l'activité limbique. Ces résultats ont été précisés récemment (Yan et al 2019) puisqu'en utilisant une autre technique IRM basée sur le flux d'oxygène sanguin, les auteurs observent une augmentation de l'activité hippocampique.

Dans des modèles animaux de dépression, il a été montré qu'un stress chronique pouvait modifier la plasticité synaptique et la connectivité au sein de l'hippocampe. Ainsi un fort niveau de stress augmente la dépression à long terme (LTD) et diminue la potentialisation à long terme (LTP) (Kim & Diamond 2002, Xu et al 1997). En accord avec ces données, une étude récente chez le rat révèle que l'induction d'une LTP par des stimulations hautes fréquences répétées dans le DG ventral est suffisante pour induire un comportement de type antidépresseur (Kanzari et al 2018). Bien que les mécanismes sous-jacents restent méconnus, il a été démontré chez le rongeur que les connexions synaptiques au sein de l'hippocampe sont réduites dans un contexte de DM (Son et al 2012). Dans cette étude, les auteurs analysent l'expression de la neuritine, une protéine exprimée lors de la formation de nouvelles synapses. Alors que l'application de stress chroniques imprévisibles pendant vingt-et-un jours est suffisante pour induire une diminution d'expression de la neuritine, témoignant d'une diminution de la connectivité synaptique au sein de l'hippocampe, un traitement de vingt-et-un jours à la fluoxétine corrige ces effets.

Le processus de neurogenèse (production de nouveaux neurones) représente une autre forme de plasticité observée dans l'hippocampe. Celui-ci est présent dès les stades embryonnaires d'un individu et se poursuit chez l'adulte (pour revue Pino et al 2017). L'hypothèse « neurogénique » de la DM stipule que la production de nouveaux neurones au niveau de l'hippocampe notamment médiée par la production de BDNF, est un processus primordial dans la régulation des émotions et l'efficacité des antidépresseurs (Yun et al 2017). En ce sens, une des causes de l'apparition des symptômes dépressifs pourrait être une diminution de la neurogenèse hippocampique chez l'adulte (Miller & Hen 2015). Dans des modèles animaux de dépression, il a été montré qu'un stress chronique diminue ce processus et ceci quelque-soit la nature du modèle : stress chroniques imprévisibles (Lee et al 2006), stress de défaite sociale (Van Bokhoven et al 2011) ou encore stress causé par l'administration chronique de CORT (Cameron & Gould 1994). Chez l'Homme, l'étude de la neurogenèse adulte est source de débat. L'utilisation de carbone radio-marqué a permis à Spalding et ses collaborateurs de montrer l'existence d'une production de nouveaux neurones chez l'adulte (Spalding et al 2013, Spalding et al 2005). Dans une étude récente, des auteurs rapportent que ce processus est présent chez l'Homme à la naissance mais qu'il décroît rapidement à en juger par l'absence de marquage doublecortine (DCX, marqueur de neurones immatures) dès l'âge de 19 ans et persistant jusqu'à au moins 77 ans (Sorrells et al 2018). Néanmoins, en utilisant le même marqueur de neurones immatures DCX, Boldrini et ses collaborateurs apportent un argument en faveur du maintien de la neurogenèse hippocampique au cours du vieillissement (Boldrini et al 2018). Il a été cependant montré chez des patients déprimés, une diminution de la neurogenèse hippocampique (Apple et al 2017). Par ailleurs, le déclin de ce processus

décrit par Sorrells et ses collaborateurs a été récemment corrélé à une susceptibilité plus importante à la DM (Micheli et al 2018) apportant un argument supplémentaire de l'importance de la neurogenèse dans la DM.

De la même manière que les antidépresseurs augmentent la LTP hippocampique, il est désormais admis qu'ils contribuent à stimuler le processus de neurogenèse dans cette région chez l'adulte. Malberg et ses collaborateurs montrent que différentes classes d'antidépresseurs comme les ISRS, IRN et IMAO, augmentent la neurogenèse adulte chez le rat (Malberg et al 2000) alors qu'une inhibition de la production de nouveaux neurones empêche les antidépresseurs d'exercer leurs effets comportementaux (Santarelli et al 2003). En irradiant la couche sous-granulaire (riche en cellules-souches) du DG de l'hippocampe pour bloquer la neurogenèse, le Dr Denis David et ses collaborateurs montrent que les effets antidépresseurs d'un traitement chronique à la fluoxétine sont nettement diminués alors que d'autres ne sont pas affectés (David et al 2009), suggérant l'existence de mécanismes neurogenèse-dépendants et -indépendants dans le mode d'action des antidépresseurs. Parmi ces mécanismes neurogenèse-indépendants, l'hypothèse de l'implication des facteurs neurotrophiques comme BDNF est largement admis (Nibuya et al 1995). En accord avec ces observations, l'administration systémique de cette neurotrophine (i) promeut des effets de type antidépresseurs et anxiolytiques, (ii) reverse les effets anhédoniques induits par des stress chroniques imprévisibles et (iii) favorise la survie des nouveaux neurones hippocampique mais aussi la prolifération des cellules-souches (Schmidt & Duman 2010). Il a été montré que les effets bénéfiques du BDNF sur le comportement et l'activation de la neurogenèse hippocampique (Li et al 2008) passent par l'activation du récepteur TrkB (Lee et al 2002). Des effets similaires ont été retrouvés suite à l'utilisation de stratégies antidépressives non-pharmacologiques comme l'application de courants électriques (« Deep Brain Stimulation ») dans l'hippocampe (Encinas et al 2011), ceci non seulement chez l'animal (Jia et al 2019) mais aussi chez des patients dépressifs (Mayberg et al 2005).

Enfin, plusieurs études révèlent l'implication des changements fonctionnels de l'amygdale dans la physiopathologie de la DM (pour revue Bellani et al 2011). Contrairement à l'hippocampe, la plasticité synaptique semble être augmentée dans l'amygdale de patients souffrant de DM en comparaison à des patients sains (Kuhn et al 2014). De la même manière, alors que plusieurs études révèlent la diminution de l'arborisation dendritique dans le cortex préfrontal et l'hippocampe, d'autres montrent qu'un stress chronique favorise l'apparition de nouvelles dendrites et de nouveaux boutons synaptiques dans l'amygdale. On retiendra principalement qu'un stress de contrainte augmente l'arborisation des neurones pyramidaux de l'amygdale basolatérale (Vyas et al 2002). En accord avec ces données, l'étude de marqueurs neuronaux spécifiques a permis de montrer chez la souris,

qu'un stress chronique de contention induit une diminution de l'arborisation des interneurons mais pas de la quantité des épines dendritiques présentes sur ces neurones de l'amygdale (Gilabert-Juan et al 2011) responsable d'une hyper-activation de cette structure cérébrale en conditions pathologiques. En effet, ces auteurs montrent une diminution de l'enzyme de dégradation de l'acide glutamique, principalement exprimée par les interneurons, ainsi qu'une diminution d'expression des protéines d'adhésion spécifiquement dans cette population de neurones. Ces résultats ont été récemment remis en question par une étude montrant qu'un stress chronique de défaite sociale n'influence pas la dendritogenèse des neurones pyramidaux de l'amygdale (Colyn et al 2019). En revanche, l'apparition de nouvelles dendrites est observable dans les neurones dit en étoile (stellate neurons), principalement GABAergiques.

L'ensemble de ces données mettent en avant des perturbations anatomiques et fonctionnelles de trois régions cérébrales : le cortex préfrontal, l'hippocampe et l'amygdale dans des modèles murin d'anxiété et de dépression mais aussi chez des patients souffrant de DM. Ces anomalies à l'échelle tissulaire reposent sur des mécanismes moléculaires et cellulaires précis qui sont sensibles à différentes classes d'antidépresseurs. Aujourd'hui, le stress chronique est le modèle privilégié chez le rongeur pour étudier la DM et ainsi identifier de nouvelles cibles/pistes thérapeutiques. La plasticité cérébrale (LTP, neurogenèse, dendritogenèse) fait partie des processus les plus étudiés dans le domaine de la neuro-psychopharmacologie.

2. Stress et dépression

2.1. Stress aigu

Le stress est un facteur environnemental qui contribue fortement au développement de plusieurs pathologies psychiatriques. En effet, une hyperactivité de l'axe HPA a été rapportée chez certains patients atteints de DM (Holsboer 2001). Dans ce système, la corticolibérine (ou Corticotropin-Releasing Factor CRF) est libérée par le noyau paraventriculaire de l'hypothalamus et provoque l'activation de l'axe HPA via la libération d'adrénocorticotrophine (Adreno-Cortico-Trophic Hormone, ACTH) par l'hypophyse antérieure (Figure 2). La libération d'ACTH provoque la stimulation des glandes surrénales qui, à leur tour, vont produire et sécréter dans la circulation sanguine du cortisol chez l'Homme ou de la corticostérone chez les rongeurs (Feldman & Weidenfeld 1995, Herman & Cullinan 1997). Il est important de noter qu'un stimulus stressant, un changement d'environnement ou encore de rythme de l'horloge circadienne peut provoquer des perturbations de l'activité de l'axe HPA.

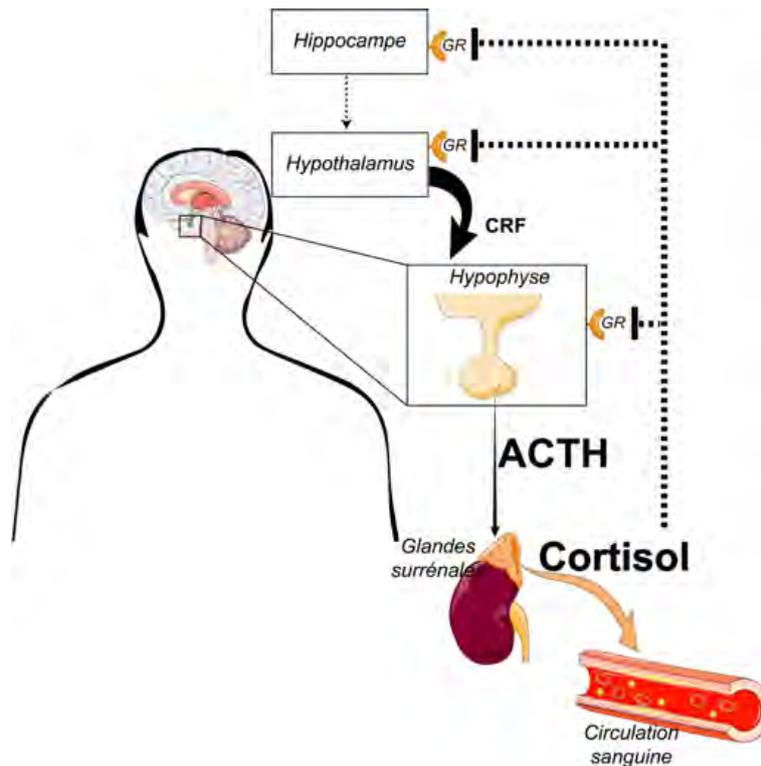


Figure 2 : Représentation schématique de l'axe HPA.

L'hypothalamus libère la corticolibérine (CRF) qui stimule la libération d'hormone corticotrope (ACTH) par l'hypophyse. L'ACTH favorise la production et la libération de cortisol par les glandes surrénales. Lors d'un stress aigu, l'élévation des taux plasmatique de cortisol ou de corticostérone entraîne un rétrocontrôle négatif au niveau de l'hypophyse, l'hypothalamus et l'hippocampe par l'intermédiaire des récepteurs aux glucocorticoïdes (GR). Ce rétrocontrôle inhibiteur permet un retour rapide à l'homéostasie : retour à des taux normaux de cortisol/corticostérone et ralentissement de l'activité du système orthosympathique.

Le cortisol libéré peut activer deux types de récepteurs (Reul & De Kloet 1985) : les récepteurs glucocorticoïdes (GR) et les récepteurs minéralocorticoïdes (MR). Les MR et les GR appartiennent à la famille des récepteurs nucléaires. Leur dimérisation permet d'une part leur translocation au noyau (Baker et al 2013) et d'autre part, l'activation de motifs spécifiques au niveau du génome pouvant moduler l'expression de plusieurs gènes. Sur le plan génomique, ces récepteurs n'activent pas les mêmes gènes. En effet, quatre-vingt-dix-huit gènes ont été décrits comme répondeurs aux MR contre soixante-douze pour les GR. Trente-trois gènes seulement sont dits répondeurs aux deux types de récepteurs. C'est notamment le cas du gène *FKBP5*, codant pour une protéine de transport intracellulaire. En co-immunoprecipitant des MR et les GR, sur des extraits hippocampiques, deux équipes révèlent une forte association de ces récepteurs avec le gène *FKBP5* (Mifsud & Reul 2016, Van Weert et al 2019) pour lequel certains polymorphismes ont été associés à une augmentation de l'apparition de symptômes dépressifs (Binder et al 2004). En accord avec ces données, une activation importante des GR réduit le phénomène de LTP, favorable à l'apprentissage, au détriment d'une augmentation de la LTD mesurées dans l'hippocampe (Pavlidis & McEwen 1999, Pavlidis et al 1996) en modulant l'expression du BDNF (Chen

et al 2017). Enfin, l'activation des GR module l'expression de certaines cytokines importantes dans la réponse inflammatoire liée à un excès de cortisol (pour revue Rook 1999) ou encore des canaux ioniques comme les canaux potassiques (Joëls & De Kloet 1994) indispensables à l'excitabilité neuronale (Figure 3). Alors que les MR sont principalement exprimés dans l'hippocampe (Reul et al 2000), l'expression des GR est beaucoup plus répandue puisqu'ils ont été identifiés dans d'autres régions du SNC dont le cortex préfrontal cingulaire, l'hippocampe, l'amygdale et l'hypothalamus (Rosenfeld et al 1993).

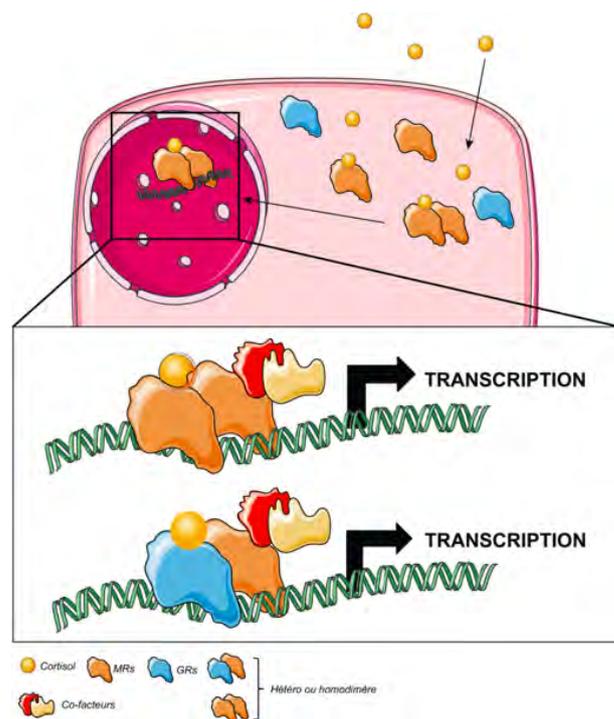


Figure 3 : Représentation schématique du mode d'action des récepteurs GR et MR.

Lorsque le cortisol/ la corticostérone se fixe sur les GR/MR, ceux-ci se dimérisent en hétéro — ou homo-dimères puis sont transloqués dans le noyau. Lorsqu'un dimère de récepteurs entre en interaction avec l'ADN via des séquences de réponses aux récepteurs aux glucocorticoïdes, la transcription de nouveaux gènes est activée ou inhibée. Figure adaptée de Le Menuet & Lombès 2014.

2.1.1. Rôle des MR

Les MR présentent une forte affinité pour toutes les hormones stéroïdes et plus particulièrement pour le cortisol (De Kloet et al 1975, McEwen et al 1968). En effet, l'affinité du cortisol pour les MR est dix fois plus importante que pour les récepteurs GR (Reul & De Kloet 1985). L'activité des MR est difficile à évaluer puisque ces récepteurs sont toujours occupés, même à faible concentration par l'hormone de stress. Toutefois, il a été montré chez des rats soumis à un stress de nage, une augmentation de l'expression des MR dans les différentes sous-régions de l'hippocampe CA1, CA2, CA3 et le DG (Gesing et al 2001). Ce mécanisme pourrait s'avérer protecteur puisqu'il a été montré que leur

surexpression est suffisante pour réduire l'anxiété, améliorer la mémoire spatiale et la néophobie (Lai et al 2007). Ensemble ces données vont dans le sens d'un effet rapide et neuro-protecteur des MR en condition de stress et donc bénéfique dans la DM.

Bien que leur mode de fonctionnement soit similaire, les MR et les GR proposent des rôles différents dans la réponse au stress. Les MR jouent un rôle important dans les premières phases du stress notamment dans l'appréciation, l'évaluation et le début d'une éventuelle réponse comportementale tandis qu'en permettant la mobilisation de l'énergie, l'activation des GR permet l'exécution d'une réponse comportementale adaptée.

2.1.2. Rôle des GR :

L'activité de l'axe HPA est finement régulée au moyen d'une boucle de rétrocontrôle négatif (Figure 2) en activant les MR et GR situés dans l'hippocampe, l'hypothalamus ou l'hypophyse (Aguilera et al 2007). Toutefois, le rétrocontrôle négatif impliquerait une activité plus importante des GR, peut-être en requérant la saturation concomitante des récepteurs MR. L'intervention des GR dans ce phénomène est largement corroborée par l'utilisation clinique de la dexaméthasone, qui a un effet agoniste assez important pour les GR et relativement faible pour les MR, dans l'évaluation du rétrocontrôle négatif sur l'axe HPA (Holsboer 2000, Sher 2006, Ströhle et al 2008).

Comme nous venons de le voir, l'exposition à un stress est à l'origine du recrutement de l'axe HPA dont le but est de faire face, de façon adaptée, à la situation qui génère le stress. Même si les GR jouent un rôle fondamental dans le rétrocontrôle négatif, le système limbique constitue un autre élément incontournable dans la mise en place des mécanismes de contrôle. L'hippocampe fait partie de ces régions qui exercent une influence inhibitrice importante sur le PVN de l'hypothalamus. Une lésion au niveau du fornix, reliant l'hippocampe à l'hypothalamus, induit quant à elle des perturbations dans la libération de cortisol (Fischette et al 1980), argumentant en faveur d'un lien anatomique et fonctionnel entre l'hippocampe et l'axe HPA. La régulation de l'axe HPA semble être plus précisément médiée par la partie ventrale de l'hippocampe et notamment le subiculum ventral (vSUB). Des études ont montré que des lésions du vSUB augmentent l'expression du CRF (peptide et ARNm) ainsi que l'expression du gène *cFos* en réponse à un stress de contention (Herman et al 1998). Le vSUB constitue donc une voie de sortie des informations de l'hippocampe destinées à l'hypothalamus. Les efférences venant du vSUB entrent en contact avec les neurones projetant vers le PVN notamment au niveau du noyau de la strie terminale (BNST), ainsi que d'autres noyaux hypothalamiques (Herman et al 2003). Ces structures constituent des relais formés principalement par des neurones GABAergiques dont la plupart projettent directement sur le PVN (Cullinan et al 1993). Les influx provenant de l'hippocampe, principalement

glutamatergiques, atteignent des noyaux « relais » que l'on appelle aussi noyaux péri-PVN, majoritairement constitués de neurones GABAergiques dont l'activation entraîne donc une inhibition du PVN.

2.2. Stress chronique

Une exposition prolongée aux glucocorticoïdes et donc une activation élevée des GR, induit chez l'animal des effets délétères sur l'organisme, comparables à ceux observés chez certains patients déprimés (Krishnan & Nestler 2008). Les raisons pour lesquelles un excès de corticoïdes diminue l'effet du rétrocontrôle négatif sont en partie connues. Ils résultent d'une diminution de l'expression des récepteurs GR au niveau de l'hippocampe (Li et al 2017, Raone et al 2007) de l'hypothalamus (Raone et al 2007) levant ainsi le frein inhibiteur sur l'axe HPA. Cette désensibilisation peut être mise en évidence à l'aide du test à la dexaméthasone. Suite à un stress chronique, la capacité de la dexaméthasone à inhiber les taux plasmatiques de cortisol/corticostérone est fortement diminuée, traduisant ainsi une perte de fonction du rétrocontrôle inhibiteur exercé par les GR. Des études récentes proposent également l'apparition de modifications épigénétiques permettant d'expliquer la perte de fonction des récepteurs GR (pour revue Farrell & O'Keane 2016). En effet, des méthylations au niveau de gènes codant pour des protéines partenaires des récepteurs GR ont été rapportés comme source de résistance réduisant l'activation de ces récepteurs par le cortisol/corticostérone. Chez le rongeur, une diminution de la densité de récepteurs aux GR dans l'hippocampe et le cortex préfrontal en réponse à un stress chronique a été observée (Boyle et al 2005). Outre la levée d'inhibition de l'axe HPA, l'excès de cortisol/corticostérone peut avoir des effets délétères à long-terme en agissant dans d'autres régions cérébrales pour favoriser l'apparition de symptômes retrouvés dans la DM (McEwen 2007). D'ailleurs, différents travaux menés chez le rongeur soulignent le fait qu'une surrénalectomie (ablation des glandes surrénales), permet une meilleure résistance au stress dans un modèle de stress chroniques imprévisibles (Chen et al 2016).

Résultant d'une activation de l'axe hypothalamo-hypophysaire-surrénalien (HPA), le cortisol/la corticostérone libéré dans la circulation sanguine peut activer les MR et GR centraux de manière à exercer un rétrocontrôle négatif et ainsi limiter les effets du stress (phase de résistance au stress) en mobilisant l'hippocampe ou directement l'hypothalamus. Lorsque le stress se prolonge le frein inhibiteur exercé par les GR sur l'axe HPA est levé provoquant une augmentation accrue de cortisol/corticostérone (phase d'épuisement). Les corticoïdes circulant en fortes concentrations induisent des effets délétères (inhibition de la plasticité cérébrale...) responsables, du moins en partie, de comportements anxio/dépressifs.

3. Modèles animaux de la dépression

3.1. *Modéliser la dépression*

Afin de préciser les mécanismes de la DM ou d'identifier de nouvelles molécules à visée thérapeutique ou encore de préciser les déterminants génétiques de la pathologie, différents modèles animaux ont été développés notamment basés sur des stress environnementaux (Tableau 1).

Plusieurs stratégies ont été adoptées dans la création de ces modèles (pour revue [Czéh et al 2016](#)) :

- La création de modèles récapitulant plusieurs symptômes de la dépression permet d'étudier la pathologie dans son ensemble,
- La mise en place de tests évaluant un symptôme unique tel que l'anhédonie, l'incurie, l'anxiété ou encore les troubles cognitifs permet l'étude spécifique d'un seul aspect de la pathologie.

Idéalement, un modèle animal de dépression doit répondre à trois principaux critères ([Willner 1984](#)) :

- Présenter les mêmes symptômes que la pathologie humaine (Face Validity)
- Présenter les mêmes mécanismes physiopathologiques que la pathologie humaine (Construct Validity)
- Répondre aux traitements antidépresseurs connus pour être efficaces chez l'Homme (Predictive Validity)

En somme, un modèle animal idéal de dépression doit refléter au plus possible la pathologie humaine d'un point de vue symptomatique, mécanistique et en termes de sensibilité aux antidépresseurs. La question que l'on peut alors se poser est de savoir si l'ensemble de ces critères doit être respecté pour considérer qu'un modèle est pertinent ou si un seul de ces critères est suffisant ? Quoi qu'il en soit, il ne peut exister de modèle idéal compte tenu de l'importante variabilité des symptômes d'un patient à l'autre. Toutefois, le stress constituant un des principaux facteurs précipitant l'apparition des troubles dépressifs, il semble que les modèles basés sur l'exposition répétée à des stressseurs soient les plus adaptés à l'étude et à la compréhension des mécanismes physiopathologiques sous-jacents.

Modèle animal	Caractéristiques	Avantages	Inconvénients	Références
				(Sun & Alkon 2003)
5D-rFSS	Exposition répétée pendant 3 à 5 jours à une nage forcée	Phénotype pro-dépressif rapide et durable	À réaliser en période nocturne	(Sun et al 2011) (Sun et al 2015) (Serchov et al 2015) (Delcourte et al 2017)
Stress chroniques imprévisibles (UCMS)	Exposition à plusieurs types de stress de manière aléatoire	Induction d'un phénotype pseudodépressif (comportement et neurochimie) durable	Difficile à reproduire	(Katz et al 1981) (Willner 1991) (Ducottet et al 2003) (Nollet et al 2013) (Willner & Belzung 2015) (Willner 2016)
Stress précoce (Early Life Stress)	Manipulation de l'environnement d'élevage aux stades précoces	Induction d'un phénotype pseudodépressif durable	Réponse aux antidépresseurs méconnue	(Francis et al 1996) (Ladd et al 2000) (Caldji et al 2000)
Exposition chronique à la corticostérone (CORT)	Exposition chronique à la corticostérone dans l'eau de boisson	Induit un phénotype pseudodépressif et altérations neurochimiques durables Bonne réponse aux antidépresseurs	Provoque une importante réaction inflammatoire	(David et al 2009) (Rainer et al 2011) (Quesseveur, Portal et al 2015) (Mendez-David et al 2017b)
Défaite sociale (Social Defeat)	Introduction d'un individu étranger dans la cage d'élevage	Induction d'un phénotype pseudo-dépressif durable avec effets comportementaux et neurochimiques faibles	Stress multimodal	(Berton et al 2006) (Bartolomucci et al 2003) (Golden et al 2011) (Vialou et al 2014)

Tableau 1 : Principaux modèles animaux de dépression basés sur le stress chronique.

Tableau adapté et complété d'après Nestler et al 2002.

Modèle animal	Caractéristique	Avantage	Inconvénient	Références
Impuissance acquise (Learn helplessness)	Exposition à des chocs électriques au niveau des pattes	Induction d'un phénotype pseudodépressif (comportement et neurochimie) durable. Bonne réponse aux antidépresseurs	Plus faible activité locomotrice	(Seligman & Maier 1967) (Sherman et al 1982) (Enkel et al 2010) (Richter et al 2012) (Vollmayr & Gass 2013)
Stress de contention (Restrained stress)	Maintien des animaux dans un tube de contention pendant 120 min	Induction d'un fort niveau de CORT plasmatique et une forte anxiété sans adaptation possible. Convient au stress aigu (7 jours) ou au stress chronique (21 jours)	N'induit pas de comportement de résignation à long terme	(Kvetnansky & Mikulaj 1970) (Padovan & Guimarães 2000) (Campos et al 2010) (Zhu et al 2014)

Tableau 1 (suite) : Principaux modèles animaux de dépression basés sur le stress chronique.

Tableau adapté et complété d'après Nestler et al 2002.

Il est important de différencier le fait de modéliser l'étiologie (modéliser les causes et les facteurs influençant le développement d'une pathologie), et le fait de modéliser la physiopathologie (modéliser le fonctionnement exact d'une pathologie). L'évaluation précise de leurs critères de validité permet de mieux apprécier leur utilisation en fonction des questions posées.

Il est également important de souligner que la DM est une maladie mentale multifactorielle dont le stress n'est pas la seule cause. D'autres facteurs sont impliqués et notamment la dimension génétique. En ce sens, différents marqueurs génétiques ont été identifiés comme source de sensibilité accrue à la DM. Différentes revues de la littérature portent sur les variants génétiques susceptibles d'influencer la vulnérabilité à la DM (Mandelli & Serretti 2013).

3.2. Le modèle CORT

Dans ce modèle utilisé chez la souris, l'hormone de stress est délivrée dans l'eau de boisson pendant au moins huit semaines. Il a été démontré qu'une telle exposition provoque des anomalies comportementales (Guilloux et al 2011b) comme une augmentation de l'anxiété mesurée dans les tests de champ ouvert ou dans le labyrinthe en croix surélevé (Mendez-David et al 2017b), une augmentation de l'incurie mesurée dans le test d'éclaboussures, mais aussi des perturbations de l'architecture du sommeil (Le Dantec et al 2014), des déficits d'apprentissages mesurés dans des paradigmes de localisation et de reconnaissance d'objets (Darcet et al 2014). En utilisant un test de sensibilité à la chaleur,

une étude révèle également qu'une exposition chronique à la CORT induit une augmentation de la sensibilité à la douleur (Hache et al 2012). De manière intéressante, plusieurs classes antidépresseurs ont été décrites comme ayant des effets comportementaux bénéfiques dans ce modèle. C'est le cas des ISRS et notamment la fluoxétine (David et al 2009) qui, lorsqu'elle est administrée de manière chronique (18 mg/kg/jour pendant vingt-et-un jours) dans l'eau de boisson, améliore les effets délétères de la CORT dans la plupart des paradigmes comportementaux cités ci-dessus. De tels effets bénéfiques ont également été obtenus avec des inhibiteurs mixtes de recapture de 5-HT et de NA comme l'imipramine ou la venlafaxine (Bacq et al 2012). Ces données ne se limitent pas aux antidépresseurs classiques. Plus récemment, l'administration de kétamine (30 mg/kg injection aigüe i.p.) s'est révélée suffisante pour atténuer les effets pro-dépresseurs d'un traitement chronique à la CORT (Brachman et al 2016).

Il est intéressant de noter que plusieurs variantes à ce modèle CORT ont été développées avec succès. En particulier, l'administration chronique de CORT par voie sous-cutanée provoque également un comportement pro-dépresseur marqué (Demuyser et al 2016, Zhang et al 2015b). Fort de ces observations et en accord avec l'hypothèse de l'hyper-cortisolémie de la DM, le modèle CORT est un modèle courant pour modéliser la dépression, tester l'efficacité des antidépresseurs et préciser leurs mécanismes d'action chez le rongeur.

Les études portant sur l'effet de la CORT sur l'activité des neurones sérotoninergiques ont généré des données complexes et de plus amples investigations sont nécessaires pour les réconcilier avec l'hypothèse monoaminergique de la dépression. Une étude *in vivo* chez le rat montre une augmentation des concentrations extracellulaires de 5-HT dans l'hippocampe ventral suite à l'injection de CORT à travers une sonde de microdialyse (Barr & Forster 2011). Ces résultats sont en accord avec la capacité de la CORT à stimuler l'enzyme de synthèse de la 5-HT, la TPH-2, et vont dans le sens d'une augmentation de la décharge des neurones sérotoninergiques du noyau dorsal du raphé (NRD) chez la souris exposée à cette hormone (5 mg/kg/jour ; p.o. correspondant à 35 µg/ml/jour) (Rainer et al 2011). Au contraire, dans les zones de projection de ces neurones sérotoninergiques, l'exposition à un stress prolongé provoque une augmentation de l'expression des ARNm d'autres récepteurs (5-HT_{2A}/5-HT_{2C}) (Harada et al 2008) qui pourrait, du moins en partie, rendre compte des effets comportementaux délétères induit par la CORT.

L'hyper-cortisolémie affecte également les autres monoamines. Par exemple, dans un modèle de rats hyper-cortisolémiques, Pacak et ses collaborateurs montrent que l'administration chronique de CORT (25 mg/kg/jour ; s.c.) délivrée à l'aide d'une pompe osmotique, diminue la production de NA dans le PVN (Pacak et al 1995). Les auteurs révèlent qu'un stress de contrainte, additionnel au traitement CORT, n'affecte pas les

concentrations extracellulaires de cette catécholamine pourtant augmentées chez des animaux ayant reçu un traitement contrôle. La même équipe révèle plusieurs années plus tard qu'en traitant les animaux avec un inhibiteur pharmacologique de la DOPA décarboxylase (responsable de la conversion du précurseur L-DOPA en dopamine), la même exposition chronique à la CORT diminue la production de DA dans le noyau accumbens (Pacak et al 2002). Il semble donc que la synthèse mais aussi le renouvellement de DA soient réduits après l'exposition chronique à la CORT. En accord avec ces données, vingt-et-un jours d'exposition à la CORT (100 µg/ml) délivrée dans l'eau de boisson augmente l'anhédonie, l'expression du NET et la dopamine β- hydroxylase dans le locus coeruleus, l'hippocampe, le cortex préfrontal et l'amygdale (Fan et al 2014).

D'un point de vue morphologique, les altérations liées à une exposition prolongée à la CORT sont nombreuses. Plusieurs groupes de recherche ont identifié des altérations anatomiques et des modifications des branchements synaptiques dans le cortex préfrontal médian (Seib & Wellman 2003, Wellman 2001), l'hippocampe (Sousa et al 2000, Southwick et al 2005) ou encore l'amygdale (Mitra & Sapolsky 2008). Dans le cortex préfrontal médian, l'arborisation dendritique dans les couches II et III est diminuée suite à un traitement chronique à la CORT (Wellman 2001). De la même manière dans l'hippocampe, il est aujourd'hui admis qu'une exposition prolongée à la CORT réduit le nombre et le volume des dendrites des neurones pyramidaux des aires CA1 et CA3 (Magariños et al 1999, Sousa et al 1998) et une perte des fibres mossus du CA3 (Tata et al 2006). Le phénomène inverse est observé dans l'amygdale (Mitra & Sapolsky 2008) où une exposition prolongée à la CORT induit une augmentation du nombre de boutons synaptiques et l'apparition de nouvelles dendrites. En somme, ces données suggèrent que les altérations morphologiques et fonctionnelles liées à une exposition prolongée à la CORT sont régions- et circuits-dépendants (Pittenger & Duman 2008).

Une autre forme de plasticité est la production de nouveaux neurones dans l'hippocampe chez l'adulte. En injectant du BrdU, un agent intercalant de l'ADN, une étude rapporte qu'un traitement chronique à la CORT réduit la prolifération cellulaire mesurée dans le DG de l'hippocampe mais n'a aucun effet sur la survie des neurones néoformés (David et al 2009). Ces résultats ont été complétés par des études plus approfondies sur le plan moléculaire révélant qu'une exposition chronique à la CORT réduit fortement l'expression de plusieurs facteurs de transcription comme le facteur de transcription CREB (c-AMP Response Element Binding) (Gourley et al 2008) connu pour ses effets activateurs de la neurogenèse hippocampique (Nakagawa et al 2002) ou encore certains facteurs neurotrophiques comme le BDNF (Duman 2002). En effet, il a été décrit une diminution de la quantité d'ARNm codants pour le BDNF dans l'hippocampe (Jacobsen & Mørk 2006).

4. Pharmacologie

L'hypothèse monoaminergique de la dépression a permis le développement de composés pharmacologiques ciblant principalement la 5-HT, la NA et la DA. Étudiées séparément, ces trois monoamines sont responsables de plusieurs symptômes qui, lorsqu'ils deviennent suffisamment nombreux et durables, peuvent déclencher une DM (Figure 4).

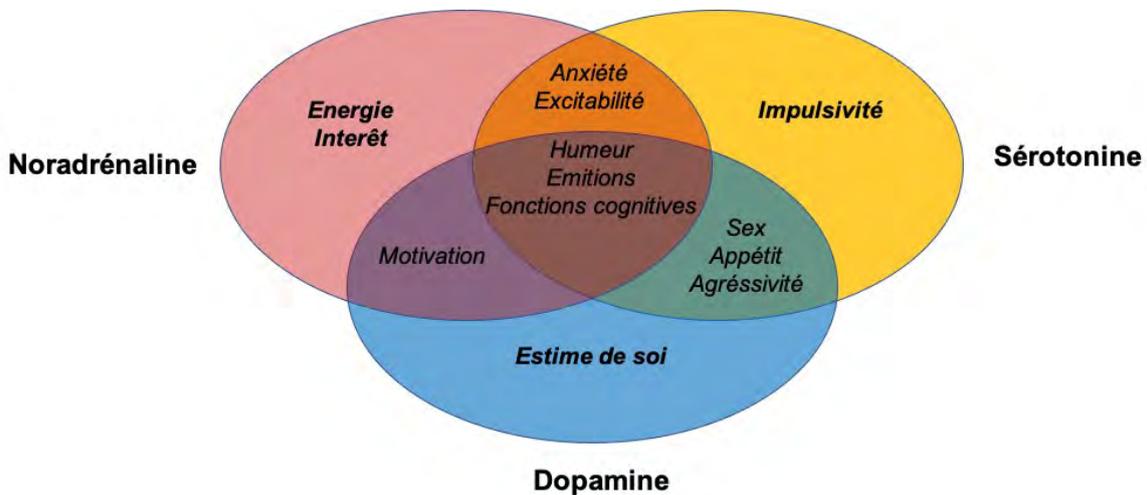


Figure 4 : Implication de la 5-HT, de la NA et de la DA dans la symptomatologie de la dépression majeure.

Figure adaptée de Stahl 2013.

Les premiers antidépresseurs ont été introduits dès les années cinquante avec la découverte des TCA et des IMAO. En accord avec l'hypothèse monoaminergique de la dépression, ces deux classes de médicaments augmentent les concentrations en monoamines dans la fente synaptique soit en inhibant leur recapture soit en inhibant leur dégradation. Ces propriétés pharmacologiques ont été démontrées chez le rongeur à l'aide de la technique de microdialyse intracérébrale (Tableau 2)

Classe	Molécule	Administration	Région cible	Concentration	Références
TCA	Chlorimipramine	Aigüe	Cortex préfrontal	↑[5-HT] _{ext} ↑[NA] _{ext}	(Koch et al 2003)
IMAO	Clorgiline	Chronique	Raphé dorsal	↑[5-HT] _{ext}	(Celada & Artigas 1993)
	Tranlycypromine Deprenyl		Cortex préfrontal		
ISRS	Fluoxétine	Aigüe	Cortex préfrontal	↓[DA] _{ext} après stress	(Bymaster et al 2002)
				↑[DA] _{ext} ↑[NA] _{ext} ↑[5-HT] _{ext}	(Cuadra et al 2001) (Hervás & Artigas 1998)
	Fluvoxamine	Chronique	Cortex préfrontal	↓[NA] _{ext} après stress	(Dazzi et al 2005)
				↓[5-HT] _{ext} après stress	
				↑[DA] _{ext} ↑[5-HT] _{ext}	
Citalopram	Aigüe	Cortex préfrontal Locus coeruleus	↑[5-HT] _{ext}	(Ortega et al 2013)	
Escitalopram	Aigüe	Cortex préfrontal	↑[5-HT] _{ext}	(Nguyen et al 2012)	
IRN	Désipramine	Chronique	Cortex préfrontal	↑[DA] _{ext}	(Tanda et al 1996)
	Atomoxétine	Aigüe	Cortex préfrontal	↑[DA] _{ext}	(Swanson et al 2006)
				↑[NA] _{ext}	
Réboxétine	Aigüe	Cortex préfrontal	↑[NA] _{ext}	(Page & Lucki 2002)	
Inhibiteurs mixtes	Duloxétine	Aigüe	Cortex préfrontal	↑[5-HT] _{ext} ↑[NA] _{ext}	(Kihara & Ikeda 1995)
			Hypothalamus	↑[DA] _{ext}	(Engleman et al 1995)
	Milnacipran	Aigüe	Cortex préfrontal	↑[NA] _{ext}	(Koch et al 2003)
	Venlafaxine	Aigüe	Cortex préfrontal	↑[NA] _{ext} ↑[5-HT] _{ext}	(Koch et al 2003)

Tableau 2 : Effets des différentes classes d'antidépresseurs sur les systèmes monoaminergiques, mesurés à l'aide de la technique de microdialyse intracérébrale *in vivo*.

Par la suite, des molécules plus sélectives ont été découvertes ouvrant la voie vers le développement de nouvelles molécules présentant un meilleur profil de tolérance tels que les inhibiteurs sélectifs de recapture de la 5-HT, de la NA ou de la DA.

4.1. Cas des antidépresseurs monoaminergiques

4.1.1. Screening des antidépresseurs suite à une administration unique

Le test de suspension caudale (TST) et le test de nage forcée (FST) pour lesquels le temps total d'immobilité est le reflet de l'état de résignation des animaux, sont deux tests couramment utilisés pour évaluer le potentiel antidépresseur d'une molécule (Porsolt et al 1978, Steru et al 1985). En effet, l'injection intrapéritonéale (i.p.) d'imipramine (dès 5 mg/kg), de fluoxétine (dès 10 mg/kg) ou encore de venlafaxine (dès 4 mg/kg) réduit de façon dose dépendante, l'immobilité mesurée dans ces deux tests en comparaison à des souris (souche Swiss) ayant reçu un traitement contrôle (Kulkarni & Dhir 2007). Plus récemment, une étude rapporte chez la souris C57Bl6/J que l'escitalopram (10 mg/kg) diminue l'immobilité mesurée dans le TST (Pałucha-Poniewiera et al 2017).

Si l'efficacité de ces molécules ne fait aujourd'hui aucun doute, des études révèlent une forte variabilité interlignée. Par exemple, la fluoxétine (5-40 mg/kg i.p.) a révélé un fort effet antidépresseur mesuré dans le TST chez la souris C57Bl6/J alors qu'aucune modification du comportement n'a été observée dans une lignée DBA/2j (Jin et al 2017). À l'inverse, les auteurs montrent que le citalopram (5-40 mg/kg i.p.) n'a aucun effet dans une lignée C57Bl6/J tandis qu'il réduit l'immobilité de souris DBA/2j de manière dose dépendante. De manière intéressante, la paroxétine (5-40 mg/kg), ne semble avoir aucun effet antidépresseur chez ces deux lignées de souris.

4.1.2. Screening des antidépresseurs dans des modèles de dépression suite à une administration chronique

L'action des ISRS dans les modèles animaux de dépression est aujourd'hui bien décrite dans la littérature. Par exemple, dans un modèle de stress chroniques imprévisibles, la fluoxétine (10 mg/kg) atténue les effets délétères du stress chronique tant au niveau du comportement qu'au niveau fonctionnel (rétablissement de la neurogenèse hippocampique, augmentation de l'arborisation dendritique) (Morais et al 2014). Le citalopram (Furr et al 2012) a révélé son efficacité notamment sur les altérations cognitives induites par le stress chronique. Il est important de noter que ces résultats ont été retrouvés dans d'autres modèles de stress chroniques comme le stress de défaite social ou encore le modèle d'impuissance acquise (pour revue Ramaker & Dulawa 2017). Néanmoins, des différences interlignées ont également été mises en avant après un traitement chronique aux antidépresseurs (Yalcin et al 2008). En effet, cette étude révèle qu'un traitement chronique à la fluoxétine (10 mg/kg/j i.p.) à l'imipramine (20 mg/kg/j i.p.) ou à la désipramine (10 mg/kg/j i.p.) pendant cinq semaines corrige les effets de

stress chroniques imprévisibles (notamment sur le comportement d'incurie) dans une lignée BalbC alors qu'aucun effet de ces molécules n'est observé chez des souris Swiss.

4.1.3. *Limites thérapeutiques des antidépresseurs sérotoninergiques*

4.1.3.1. Long délai d'action

Chez l'Homme quatre à six semaines sont nécessaires avant de voir apparaître les premières améliorations des symptômes dépressifs. En s'intéressant au système 5-HT, on s'aperçoit que ce délai d'action est compatible avec le temps nécessaire aux ISRS pour provoquer une désensibilisation des autorécepteurs inhibiteurs somatodendritiques 5-HT_{1A} situés dans le NRD. Cette désensibilisation résulte de l'accumulation de sérotonine endogène autour des corps cellulaires consécutive au blocage du transporteur SERT, situé sur les collatérales des neurones sérotoninergiques re-innervant le raphé (Figure 5). Le rôle de l'autorécepteur 5-HT_{1A} dans la réponse aux ISRS a été mis en évidence à l'aide de différentes approches utilisant des souris knock-out (KO) constitutives ou conditionnelles (Guilloux et al 2006, Richardson-Jones et al 2010), de shRNA-5-HT_{1A} (Bortolozzi et al 2012, Ferrés-Coy et al 2013), ou différents agents pharmacologiques (Blier et al 1997, Haddjeri et al 1999, Romero et al 1996). Il a été démontré que quatre semaines étaient nécessaires pour voir apparaître une augmentation de la neurotransmission monoaminergique et donc une amélioration des symptômes (Albert & Vahid-Ansari 2019, Hyman & Nestler 1996, Stahl 1998).

De manière intéressante chez l'animal, la vortioxétine (5 mg/kg/jour) présente des effets antidépresseurs dès quatorze jours alors qu'un traitement à la fluoxétine (18 mg/kg/jour) sur une même période de temps n'a aucun effet sur le comportement anxio/dépressif (Guilloux et al 2013).

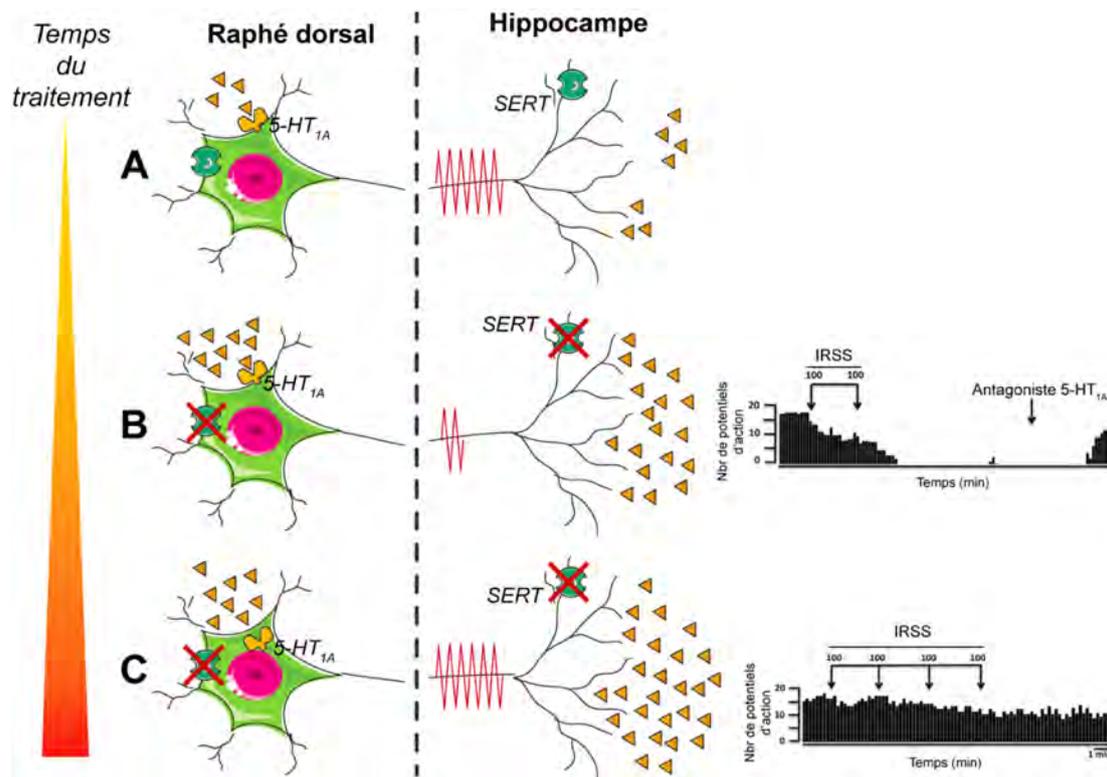


Figure 5 : Représentation schématique des effets d'un IRSR sur la neurotransmission 5-HT en fonction de la durée de traitement.

Le tonus sérotoninergique basal est représenté en (A). Un traitement aux IRSRS bloque le transporteur de la sérotonine (SERT) permettant ainsi une augmentation des taux extracellulaires de 5-HT d'une part dans les aires de projection et d'autre part autour des corps cellulaires des neurones situés dans le noyau dorsal du raphé (B). L'élévation de taux de sérotonine endogène autour des corps cellulaires sérotoninergiques facilite l'activation des autorécepteurs somatodendritiques inhibiteurs 5-HT_{1A}. Ceci a pour conséquence l'inhibition de l'activité électrique des neurones sérotoninergiques limitant la neurotransmission au niveau des aires de projection. À long terme, l'activation prolongée des autorécepteurs 5-HT_{1A} somatodendritiques conduit à leur désensibilisation, à une restauration d'une activité neuronale normale et à une augmentation importante des concentrations synaptiques en sérotonine. Le délai nécessaire à la désensibilisation des autorécepteurs 5-HT_{1A} coïncide avec l'apparition des premiers signes thérapeutiques des IRSRS. Figure adaptée d'après [David & Gardier 2016](#) et [Rainer et al 2011](#).

4.1.3.2. Faible taux de réponse

Un tiers des patients sont toujours résistants à au moins deux antidépresseurs classiques utilisés en première intention ([Little 2009](#)). En effet, plusieurs études cliniques révèlent chez les patients déprimés un taux de rémission (c'est-à-dire une disparition totale des symptômes dépressifs après traitement) qui varie entre 22% et 30%. Une étude démontre qu'un an après le début du traitement, 60% des patients traités dont 50% souffrant de dépression légère présentent toujours les mêmes symptômes dépressifs ([Goldberg et al 1998](#)).

À notre connaissance, les études précliniques ne portent pas sur le taux de réponse bien que certains travaux dissocient les animaux répondeurs des animaux non-répondeurs

(Carrillo-Roa et al 2017, Mendez-David et al 2017a) pour étudier ensuite les déterminants génétiques qui caractérisent ces deux populations d'animaux.

4.1.3.3. Résistance aux traitements

En clinique, la résistance se définit par une non-réponse à au moins deux antidépresseurs (ou plus) issus de classes pharmacologiques différentes. On compte 20% des patients qui, malgré de multiples interventions, présentent toujours de nombreux symptômes de la pathologie (Holtzheimer & Mayberg 2011).

L'utilisation de modèles animaux s'est développée afin de mieux comprendre les mécanismes de résistance. En outre, une première étude révèle une distribution bimodale dans la réponse chronique à l'escitalopram (5-10 mg/kg/j i.p.) pour laquelle seulement une partie d'une cohorte de souris modèles de stress chroniques imprévisibles voit apparaître des effets antidépresseurs mesurés dans le test de préférence au sucrose (Jayatissa et al 2006). Des résultats similaires ont été retrouvés avec la fluoxétine (10 mg/kg/j i.p.) (Isingrini et al 2010). Une seule étude étudie la résistance au traitement dans un modèle CORT (Samuels et al 2014). Comme pour le modèle UCMS, les auteurs montrent qu'une sous-population d'animaux ne présente pas d'améliorations comportementales dans le test d'alimentation supprimée par la nouveauté et le TST, après un traitement chronique à la fluoxétine (18 mg/kg/j i.p.).

En somme, même si les mécanismes de résistance aux traitements restent méconnus, de nombreux protocoles de recherches précliniques se mettent en place en vue de modéliser et de mieux comprendre ce phénomène.

4.1.3.4. Taux de rechute

La rechute est définie comme un état dépressif, semblable à celui observé avant traitement, qui réapparaît peu de temps après une période de rémission (Frank et al 1991). Aujourd'hui, 50% des patients font l'expérience d'une rechute (Rush et al 2006) ou font l'expérience de « récurrence », c'est-à-dire l'apparition d'un nouvel épisode dépressif après un épisode de rémission plus long (Forte et al 2015, Georgotas 1985). Même si plusieurs méthodes de prévention de la rechute comme les thérapies cognitives (Bockting et al 2005, Godfrin & Van Heeringen 2010) ont montré leur efficacité, la mise en place de ce type d'approche reste aujourd'hui un défi (Rycroft-Malone et al 2014). En outre, si ces thérapies non pharmacologiques utilisées dans le traitement de l'anxiété souffrent d'un faible taux de participation (Batelaan et al 2010, Cuijpers et al 2010), les statistiques pour les thérapies liées à la DM sont aujourd'hui non référencées. Enfin, même si ces données sont principalement décrites pour l'utilisation des ISRS, des données similaires ont également été obtenues avec des IRN ou des inhibiteurs mixtes de recapture de la sérotonine et de la noradrénaline (IRSN) comme la venlafaxine.

Concernant les mécanismes neurobiologiques à l'origine de la rechute, ceux-ci sont mal connus faute de modèles animaux pertinents. Correspondent-ils à une nouvelle dégradation de la neurotransmission monoaminergique ? Dans ce travail de thèse, nous avons modélisé la rechute en réalisant un suivi longitudinal des animaux exposés à la CORT de manière à évaluer leur comportement avant et après arrêt des traitements pharmacologiques (voir [Chapitre 4](#) :). À notre connaissance, une telle étude n'a jamais été élaborée chez l'animal de laboratoire.

4.2. Cas des inhibiteurs mixtes de recapture de la sérotonine et de noradrénaline

Suite à un stress chronique, les IRSN ([Muscat et al 1992](#)) provoquent des effets comportementaux de type antidépresseurs similaires aux ISRS. En effet, l'administration répétée de venlafaxine induit des effets de type antidépresseurs chez des rats modèles de dépression ([Wang et al 2016a](#)). Après trente jours de stress chroniques imprévisibles, vingt jours de venlafaxine sont suffisants pour réduire l'anxiété mesurée dans le test de champ ouvert et l'anhédonie dans le test de préférence au sucrose. D'un point de vue clinique, plusieurs études mettent en évidence les effets antidépresseurs de la venlafaxine. On retiendra principalement l'efficacité des doses allant de 75 à 375 mg/kg/jour, en comparaison à un placebo ([Khan et al 1991](#), [Schweizer et al 1991](#)). Cependant, l'hypothèse selon laquelle l'augmentation simultanée de la neurotransmission sérotoninergique et noradrénergique entraîne une meilleure efficacité que les ISRS est encore controversée. Par exemple, une méta-analyse de la littérature utilisant la duloxétine ne révèle aucune évidence montrant la supériorité de cet IRSN comparé à des ISRS comme la fluoxétine ou l'escitalopram ([Cipriani et al 2012](#)). Dans une autre étude, la venlafaxine exerce les mêmes effets sur la symptomatologie de la DM que la sertraline (ISRS) ([Mehtonen et al 2000](#)). En revanche, le taux de réponse à six semaines de traitement est plus important dans le groupe venlafaxine alors que huit semaines sont nécessaires pour voir apparaître le même taux de réponse chez les patients traités à la sertraline. Des observations similaires ont été décrites avec la fluoxétine ([Silverstone & Ravindran 1999](#)). Même si la majorité des études se focalisent sur les effets à moyen terme des IRSN, quelques études rapportent leurs effets à plus long terme sur le taux de rémission et le risque de rechute. Par exemple, chez des patients ayant répondu positivement après huit semaines de traitement à la venlafaxine, le taux de rechute à six mois est de 11% contre 23% pour des patients traités avec un ISRS ([Entsuah et al 1996](#), [Thase 1999](#)). Dans la même étude, les auteurs révèlent que la rechute est également plus faible un an après le traitement à la venlafaxine.

Basé sur l'hypothèse monoaminergique de la dépression, les antidépresseurs classiques ciblent préférentiellement la recapture de la 5-HT, NA et/ou DA. Bien que leurs modes d'action soient divers, associés à une efficacité certaine, les antidépresseurs présentent encore aujourd'hui de nombreuses limites thérapeutiques comme un long délai d'action, plusieurs effets indésirables et un taux de rechute non négligeable. Une recherche active en psychopharmacologie vise à identifier de nouvelles cibles cellulaires et moléculaires qui permettront de développer des nouveaux médicaments présentant une meilleure efficacité

Partie 2 : Les astrocytes, fonctions et implication dans la dépression

Constituants majoritaires du SNC, les astrocytes forment la barrière hématoencéphalique, protégeant ainsi l'encéphale des infections externes (Allen & Barres 2009). Également décrits comme étant le support énergétique des neurones, les fonctions initialement attribuées aux astrocytes sont diverses et variées. On sait aujourd'hui que leur rôle dans le SNC va au-delà de ces aspects, notamment en participant de manière active à la régulation de la neurotransmission. Les différents paragraphes de cette seconde partie bibliographique s'attachent à décrire les différentes fonctions et mécanismes d'action des astrocytes qui pourraient rendre compte de leurs rôles dans les émotions et la réponse aux antidépresseurs.

1. Généralités sur les astrocytes

Identifiés pour la première fois en 1824 par René Dutrochet, les astrocytes appartiennent à la famille des cellules gliales qui composent 80% du SNC. Faisant référence à l'hypothèse selon laquelle ces cellules non-neuronales assurent la cohésion du système nerveux (de *glaios* en grecque signifiant glue), on distingue aujourd'hui trois grands types de cellules gliales :

- Les oligodendrocytes dont la fonction principale est la myélinisation des axones (en périphérie, on parle de cellules de Schwann),
- La microglie dont le rôle de cellules immunitaires permet de protéger le SNC des réactions inflammatoires,
- Les astrocytes.

Les astrocytes sont sans doute les cellules les plus polyvalentes et les plus abondantes du SNC puisqu'elles constituent la moitié des cellules du cerveau humain (Azevedo et al 2009) et composent près de 40% de la population totale de cellules gliales (Herculano-Houzel 2014, Rowitch & Kriegstein 2010). En forme d'étoile, ils se distinguent des neurones par (Volterra & Meldolesi 2005) :

- La présence de filaments intermédiaires regroupés en faisceaux et composés d'une protéine spécifique : la protéine gliale fibrillaire acide (GFAP) qui est souvent utilisée comme marqueur spécifique des astrocytes, même si tous les astrocytes n'expriment pas cette protéine (Kettenmann & Verkhratsky 2011),
- La présence de grains de glycogène au niveau du corps cellulaire et des prolongements cytoplasmiques appelés pieds astrocytaires,
- La présence de jonctions communicantes permettant une signalisation intracellulaire entre astrocytes adjacents.

Des études morphologiques des prolongements astrocytaires ont permis de définir deux catégories d'astrocytes (Figure 6) :

- Les astrocytes protoplasmiques, majoritairement présents dans la matière grise, présentent des prolongements fins et très ramifiés (Farhy-Tselnicker & Allen 2018),
- Les astrocytes fibrillaires, principalement retrouvés dans la matière blanche, présentent des prolongements très longs mais peu ramifiés (Liedtke et al 1996).

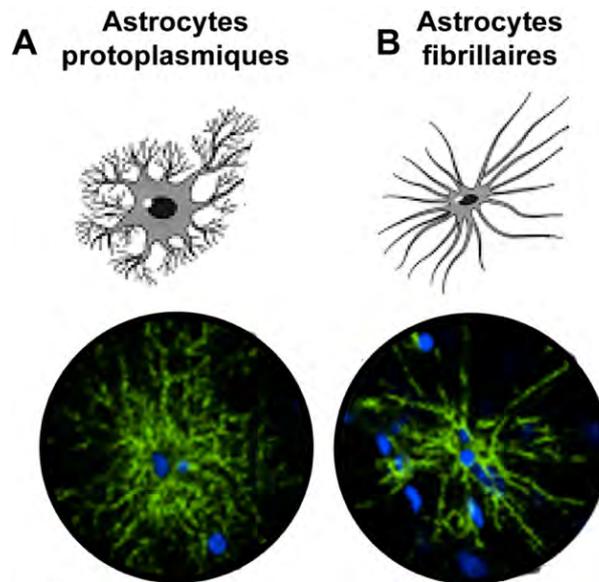


Figure 6 : Différences morphologiques entre astrocytes protoplasmiques et fibrillaires.

Les astrocytes protoplasmiques (A) ont un corps cellulaire plus gros et possèdent de nombreuses ramifications généralement courtes. Les astrocytes fibrillaires (B) ont un corps cellulaire plus petit mais leurs prolongements sont plus longs et peu ramifiés. Figure adaptée d'après Sosunov et al 2014.

Les astrocytes protoplasmiques présentent de nombreux prolongements qui leur permettent d'établir un contact étroit avec les vaisseaux sanguins, de participer à l'apport des nutriments aux neurones et d'envelopper les synapses afin de moduler l'activité neuronale pré- et post-synaptique (Heller & Rusakov 2015). Les astrocytes fibrillaires sont principalement en contact avec les axones au niveau de la matière blanche et participent, aux côtés des oligodendrocytes, au processus de myélinisation.

En exprimant de nombreux récepteurs capables de fixer un large panel de neurotransmetteurs et neuromodulateurs, les astrocytes sont capables d'évaluer la quantité de ces molécules biochimiques et, en réponse, d'en libérer dans l'espace extracellulaire (Panatier et al 2011, Parpura & Verkhratsky 2012). Il s'instaure ainsi une communication bidirectionnelle entre les astrocytes et les autres populations de cellules qui composent le SNC. Il est notamment admis aujourd'hui que les astrocytes sont capables de communiquer avec la microglie (pour revue Jha et al 2019) et/ou les neurones (pour revue Durkee & Araque 2019, Pérez-Alvarez & Araque 2013).

Longtemps considérés comme non-excitables et dans l'incapacité de produire des potentiels d'actions, il a été montré *in vitro* que les astrocytes répondent au glutamate (Cornell-Bell et al 1990). Ainsi, l'application de glutamate sur des cultures primaires d'astrocytes facilite une élévation des concentrations intracellulaire de calcium (Ca^{2+}), marque de l'activation astrocytaire. Sur des coupes de cerveaux, cette élévation intracellulaire de Ca^{2+} peut se propager de proche en proche grâce à la présence de jonctions communicantes (JC ou gap-jonctions) entre astrocytes adjacents. On parle de « vagues calciques » (Fujii et al 2018, Schipke et al 2002). En réalité, ce n'est pas le Ca^{2+} qui diffuse d'une cellule à l'autre mais l'un des acteurs de la signalisation calcique : l'inositol-tri-phosphate (IP_3). Basé sur des observations biologiques, Höfer et ses collaborateurs montrent à l'aide d'un modèle mathématique, que l'élévation intracellulaire de Ca^{2+} induit la production d' IP_3 qui, en se propageant, induit successivement une élévation des concentrations calciques, une nouvelle production d' IP_3 et ainsi de suite (Höfer et al 2002).

La diversité morphologique et les propriétés physiologiques diverses des astrocytes posent la question de la diversité de leurs fonctions (pour revue Ben Haim & Rowitch 2017). Leur distribution dans le SNC est homogène (Sofroniew & Vinters 2010) mais on retiendra une hétérogénéité dans les marqueurs exprimés (Chaboub & Deneen 2012). On observe principalement une forte densité d'astrocytes exprimant la GFAP dans l'hippocampe, les régions sous-ventriculaires et la matière blanche alors que les astrocytes corticaux n'expriment que très peu cette protéine (Kettenmann et al 2013). En microscopie, il est possible d'observer une forte densité d'astrocytes au niveau des synapses, à l'interface avec les vaisseaux sanguins alors que peu d'astrocytes sont présents autour des corps cellulaires neuronaux (Khakh & Sofroniew 2015).

Les astrocytes se distinguent des neurones par leur morphologie mais aussi par leur diversité et leurs nombreuses fonctions qui va au-delà d'un rôle de support pour les neurones. Disposant d'un véritable système de communication, les astrocytes sont capables de transmettre des messages entre cellules voisines grâce à la présence de jonctions communicantes au niveau desquelles diffusent l' IP_3 . Ce dernier est responsable d'élévations de proche en proche des concentrations intracellulaires de Ca^{2+} appelées « vagues calciques ». Celles-ci représentent la forme la mieux décrite d'activation des astrocytes.

2. Grandes fonctions des astrocytes

Il est aujourd'hui admis que les astrocytes jouent un rôle important dans l'intégration et le maintien de l'information neuronale (Oberheim et al 2012, Zhang & Barres 2010). En plus d'apporter un support mécanique et énergétique aux neurones, les astrocytes participent activement à leur activité, faisant de ces cellules gliales un acteur clé et indispensable dans les grandes fonctions du SNC.

2.1. *Astrocytes : modulateurs de l'énergie*

Les astrocytes entrent en étroite communication avec le système sanguin, ce qui leur confère un rôle important dans le couplage neurovasculaire et neurométabolique (Martin et al 2013). On estime aujourd'hui à plus de 99% la surface cérébrovasculaire enveloppée par les prolongements astrocytaires (Simard et al 2003). En conséquence, les astrocytes sont capables de capter et redistribuer les nutriments aux neurones.

2.1.1. *Transport du glucose*

Le cerveau est le plus gros consommateur de glucose de l'organisme. Entre 20% et 30% du glucose circulant est consommé par l'encéphale. Disposant de très peu de réserve, les neurones ont besoin d'un apport énergétique constant. On retrouve à la surface des astrocytes plusieurs types de transporteurs du glucose. Les transporteurs les plus exprimés sont les transporteurs de type 1 & 2 (GLUT-1 & 2) (Kacem et al 1998), exprimés à l'interface astrocyte/sang (Figure 7). Récemment, une équipe a révélé la présence de récepteurs à l'insuline sur les astrocytes (Cai et al 2018). Leur stimulation dans l'hypothalamus est responsable de la capture du glucose par ces cellules gliales (García-Cáceres et al 2016). Dans un modèle de souris KO pour le récepteur à l'insuline dans les astrocytes ou dans un modèle de résistance à l'insuline, une capture plus faible du glucose est observée, altérant ainsi la fonction hypothalamique sur le maintien de l'homéostasie glucidique.

Une fois capté par les astrocytes, le glucose sanguin est métabolisé en glucose-6-phosphate puis en glycogène faisant de ces cellules gliales la source majeure de glycogène cérébral (Cali et al 2019). *In vitro*, les astrocytes consomment plus de glucose que les neurones (Bouzier-Sore et al 2006, Jakoby et al 2014). En revanche, l'activité mitochondriale et la consommation d'ATP sont plus faibles dans les astrocytes (Hyder et al 2006) conduisant à une accumulation de pyruvate puis de lactate.

2.1.2. Transport du lactate

Dans les neurones, le processus d'oxydation du glucose ne peut aboutir puisqu'un des produits de cette oxydation, le phospho-fructose, est systématiquement dégradé avant de pouvoir donner le métabolite suivant (Fernandez-Fernandez et al 2012).

Dans les astrocytes, le glucose-6-phosphate peut être métabolisé en pyruvate puis en lactate qui sera préférentiellement utilisé par les neurones comme substrat énergétique. Une fois produit par les astrocytes, le lactate est libéré dans le milieu extracellulaire par des transporteurs aux monocarboxylates (MCT). Il peut être ensuite capté par les neurones via d'autres sous-types de MCT. En alimentant le cycle de Krebs mitochondrial, ce substrat énergétique permet la production d'ATP dans les neurones et participe à leur fonctionnement.

De manière intéressante, le glutamate libéré par les neurones joue un rôle important dans l'apport énergétique puisqu'il permet d'augmenter la capture de glucose et son métabolisme par les astrocytes, augmentant ainsi la quantité de lactate disponible pour les neurones. Ce phénomène est appelé « Astrocyte/Neuron Lactate Shuttle » et il permet de réguler la production astrocytaire de lactate en fonction des besoins neuronaux (Pellerin & Magistretti 1994).

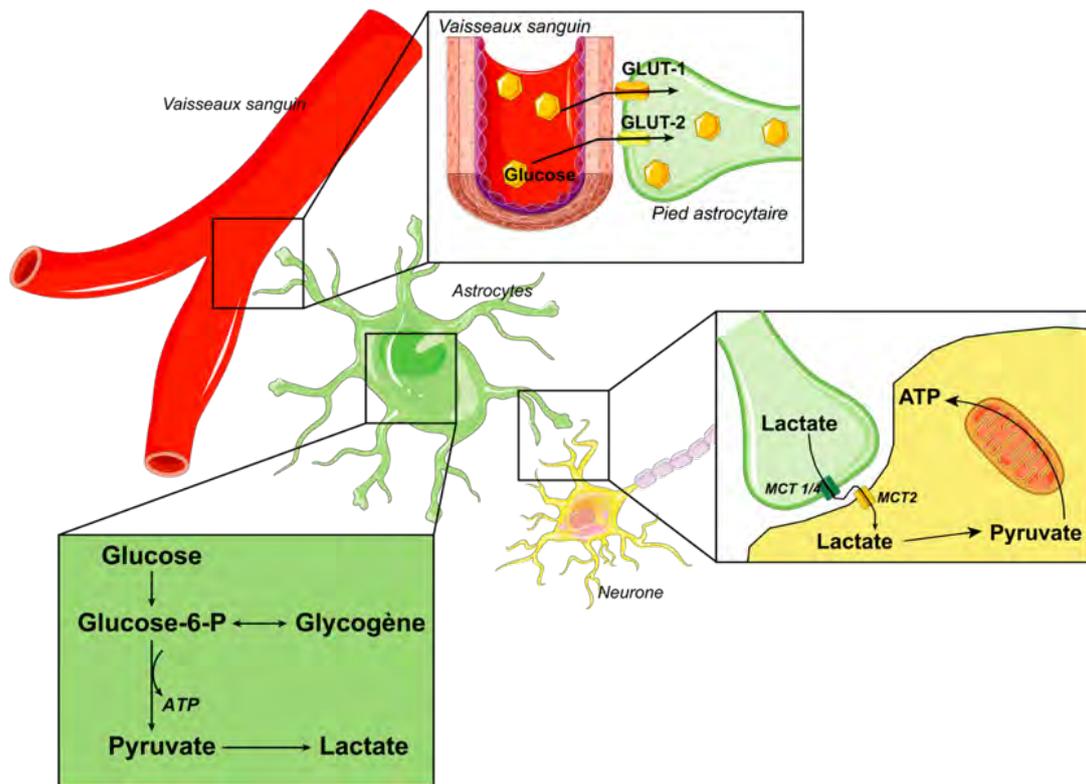


Figure 7 : Représentation schématique du métabolisme glucidique dans la communication astrocytes/neurones.

Le glucose est transporté du système sanguin aux astrocytes par les transporteurs au glucose GLUT-1 et 2. Après plusieurs réactions enzymatiques, il est métabolisé afin de donner soit du glycogène stocké par les astrocytes soit du lactate libéré dans le milieu extracellulaire par différents transporteurs aux monocarboxylates 1/4 (MCT 1/4). Le lactate est ensuite capté par les neurones via un autre transporteur aux monocarboxylates : le MCT-2. Le pyruvate alimente alors la chaîne respiratoire mitochondriale afin de permettre la production d'énergie sous forme d'ATP.

2.2. Astrocytes : modulateurs de l'osmolarité

Les astrocytes sont importants pour le maintien et la régulation du volume de l'espace extracellulaire qui compose la synapse. Plusieurs travaux soulignent la présence dans le cerveau de canaux perméables à l'eau formés par des protéines appelées aquaporines (Hasegawa et al 1994, Jung et al 1994). On sait aujourd'hui que les aquaporines de type 4 (AQP4) sont exprimées principalement par les astrocytes (Nielsen et al 1997).

L'activité neuronale est dépendante du volume de l'espace extracellulaire (pour revue Syková & Nicholson 2008). Un volume extracellulaire plus petit facilitera la diffusion des neurotransmetteurs, augmentant ainsi la probabilité de fixation sur les récepteurs cibles. À l'inverse, un espace extracellulaire plus grand, réduit cette probabilité. Plusieurs études montrent que des souris KO pour les AQP4 ont un volume extracellulaire plus important (Yao et al 2008) s'expliquant par la présence de plus d'eau au niveau de

l'encéphale (Haj-Yasein et al 2011). La présence d'AQP4 sur les terminaisons astrocytaires pose la question du rôle de ces canaux dans le maintien de l'homéostasie potassique au sein de la synapse tripartite. Des études en microscopie électronique ont révélé sur cellules de Müller (astrocytes spécialisés de la rétine), que les AQP4 co-localisent avec les canaux Kir4.1, originellement impliqués dans l'homéostasie potassique de la synapse (Nagelhus et al 1999, Nagelhus et al 1998). Alors qu'aucune étude ne révèle l'implication directe des AQP4 dans l'homéostasie potassique, ces canaux perméables à l'eau pourraient affecter indirectement l'activité des canaux Kir4.1 via des interactions moléculaires ou un étirement membranaire qui faciliterait l'ouverture des canaux K⁺ (Soe et al 2009). Des études plus récentes montrent que le rôle des AQP4 sur l'homéostasie potassique est bien plus complexe. Chez des souris KO pour l'AQP4, des auteurs montrent qu'en plus d'une faible clairance du K⁺ extracellulaire, ces animaux présentent une activité épileptiforme plus importante dans l'hippocampe (Amiry-Moghaddam et al 2003) associée à des crises plus longues (Binder et al 2006). Ainsi, l'exemple de l'augmentation de l'espace extracellulaire chez des souris KO AQP4 (Yao et al 2008) apporte un autre exemple de l'implication des astrocytes, via ces protéines, dans la modulation de l'activité neuronale.

2.3. Astrocytes : modulateurs de la myélinisation

Le rôle des astrocytes dans la myélinisation concerne principalement les astrocytes fibrillaires et intervient majoritairement après un traumatisme au niveau de l'encéphale. Après une lésion, les astrocytes deviennent réactifs (on parle d'astrogliose réactive) et apportent leur support au maintien, la régénération et la production de myéline (Barnett & Linington 2013). Une augmentation de l'expression de GFAP associée aux astrocytes réactifs est le signe d'une lésion au niveau du SNC (Sofroniew & Vinters 2010). Il a été montré que des souris KO pour la GFAP présentent des défauts de myélinisation et de re-myélinisation après lésions (Liedtke et al 1996).

Des études *in vitro* ont révélé qu'un milieu conditionné d'astrocytes favorise la différenciation et la maturation des cellules précurseurs d'oligodendrocytes (Yoshida et al 1995, Zhu et al 2006). Comme décrit précédemment, les astrocytes, notamment fibrillaires, sont capables de libérer des facteurs de croissance comme le facteur de croissance ciliaire (CNTF). *In vitro* (Stankoff et al 2002) comme *in vivo* (Dallner et al 2002, Stöckli et al 1991), ce facteur de croissance favorise la prolifération, la maturation des cellules progénitrices d'oligodendrocytes et la migration des cellules matures (Vernerey et al 2013). Enfin, plusieurs évidences expérimentales montrent que les astrocytes sécrètent des molécules nécessaires à la myélinisation en cas de lésion. Chez des souris, une lésion consécutive à la diminution de l'expression d'un transporteur astrocytaire aux ions fer (ferroportine), induit moins de re-myélinisation et moins de maturations des cellules

précurseurs d'oligodendrocytes (Schulz et al 2012). Plus récemment, il a été démontré que le processus de re-myélinisation nécessite des lipides, et plus particulièrement le cholestérol, sécrété par les astrocytes (Camargo et al 2017). Ceci est un exemple supplémentaire illustrant la manière dont ces cellules gliales peuvent moduler la vitesse de conduction des signaux électriques neuronaux et donc, indirectement la neurotransmission.

2.4. Astrocytes et plasticité synaptique

Les astrocytes jouent un rôle important dans la migration cellulaire et le guidage des axones au cours des étapes précoces de maturation. Par la libération de molécules de la matrice extracellulaire, les astrocytes participent à l'élaboration d'un véritable échafaudage aidant le guidage des axones (Clarke & Barres 2013). De la même manière, les astrocytes participent à la croissance neuronale. Dans une étude *in vitro*, des auteurs révèlent que la neuréguline-2, un facteur de croissance produit par les astrocytes, favorise la croissance des neurites (Nakano et al 2016). Néanmoins les effets *in vivo* des astrocytes sur la croissance neuronale restent aujourd'hui très peu documentés. Ces résultats ont été complétés par un grand nombre d'études décrivant le rôle des astrocytes sur la plasticité synaptique. Les travaux récents de l'équipe du Dr Magistretti révèlent que sur des cultures de neurones, le L-lactate d'origine astrocytaire est capable d'activer la transcription de nombreux gènes impliqués dans la plasticité synaptique (Margineanu et al 2018). Une large analyse transcriptomique en RT-qPCR a permis notamment de mettre en avant l'activation de gènes précoces comme *cFos*, *zif268* ou encore *Arc*, des gènes connus pour être des marqueurs d'activité neuronale. Cette étude montre par ailleurs que l'expression de ces gènes est sous le contrôle des facteurs de transcriptions activés lors du processus de LTP. Les astrocytes sont capables de libérer des facteurs neurotrophiques comme le BDNF ou le GDNF, nécessaires à la prolifération et à la maturation des neurones (Airaksinen & Saarma 2002, Martin & Finsterwald 2011, Martin et al 2013, Paratcha & Ledda 2008). Une lignée de souris KO pour le GDNF ou pour l'un de ses récepteurs GDNF $_{\alpha 1}$, a été utilisée pour montrer que la signalisation cellulaire associée à ce facteur de croissance est nécessaire au développement post-natal (Airaksinen et al 1999). Dans le même ordre d'idée, l'inactivation d'un autre récepteur au GDNF, le récepteur GDNF $_{\alpha 2}$ induit une diminution de la neurotransmission glutamatergique dans l'hippocampe (Gerlai et al 2001). Des données similaires ont été obtenues pour d'autres facteurs comme le BDNF. Plusieurs travaux suggèrent notamment que ce dernier exerce un effet positif sur la croissance neuronale dans les premières phases de développement mais aussi dans le cerveau adulte (Horch 2004). Des résultats *in vitro* montrent que l'application de BDNF sur des cultures de neurones corticaux induit une augmentation de la taille de leurs dendrites (McAllister et al 1996). De plus, il est intéressant de noter que la sur-expression de ce facteur

neurotrophique dans les astrocytes de l'hippocampe de souris adultes stimule la neurogenèse hippocampique (Quesseveur et al 2013a), apportant une preuve expérimentale *in vivo* d'un effet neurotrophique des astrocytes dans cette région cérébrale. Les modalités de libération (calcium-dépendante et/ou indépendante) du BDNF restent encore à être précisées mais d'un point de vue fonctionnel, le BDNF est capable de stimuler *in vitro* la libération de glutamate par les neurones (Takei et al 1998). En utilisant la technique de microdialyse, Paredes et ses collaborateurs corroborent ces résultats *in vivo* et montrant que l'infusion de BDNF dans l'hippocampe augmente les concentrations extracellulaires de glutamate dans cette structure limbique (Paredes et al 2007). L'augmentation de la neurotransmission glutamatergique induite par le BDNF astrocytaire pourrait également résulter de la capacité de ce facteur neurotrophique à augmenter l'expression (Caldeira et al 2007) et la probabilité d'ouverture des récepteurs NMDA (Levine & Kolb 2000) au niveau des neurones post-synaptiques hippocampiques. Ces données montrent que les astrocytes sont capables de moduler la plasticité et l'activité neuronale.

2.5. Astrocytes et synapse tripartite

2.5.1. Modulateurs de la neurotransmission

Le potassium (K^+) extracellulaire est essentiel pour le fonctionnement des neurones, ses concentrations extracellulaires restant stables autour de 3 mM (Somjen 1979). Lorsque l'espace extracellulaire est saturé, les concentrations extracellulaires de K^+ ne varient plus et la stimulation nerveuse devient élevée et constante. Ces observations ont conduit à l'hypothèse de la clairance du K^+ par les astrocytes. Hertz propose pour la première fois le rôle de ces cellules gliales dans l'homéostasie potassique (Hertz 1965). En utilisant des souris KD pour le co-transporteur Na^+/K^+ , *Kir4.1*, Sibille et ses collaborateurs apportent des preuves électrophysiologiques à l'hypothèse posée par Hertz (Sibille et al 2014). On sait également aujourd'hui que la pompe Na^+/K^+ -ATPase est également impliquée dans l'assimilation du K^+ par les astrocytes (Kofuji & Newman 2004) notamment lors de fortes activités neuronales (Larsen et al 2014). Ces caractéristiques ont permis en 1999 d'établir pour la première fois le concept de synapse tripartite (Araque et al 1999) qui repose sur la communication de trois éléments : l'élément neuronal pré-synaptique, l'élément neuronal post-synaptique et l'astrocyte. À titre d'exemple, dans l'hippocampe plus de 50% des synapses glutamatergiques seraient des synapses tripartites (Fellin et al 2006).

Les astrocytes expriment à leur surface de nombreux transporteurs qui leur permettent de réguler finement l'activité neuronale. Entre autres, ces cellules gliales expriment un large panel de transporteurs au glutamate comme les transporteurs GLT-1 et 2 (Perea & Araque 2005, Perea et al 2009), leur permettant de réguler directement les concentrations synaptiques de neurotransmetteurs. En effet, une des propriétés des astrocytes est le recyclage des neurotransmetteurs (Marcaggi & Attwell 2004), notamment celui du

glutamate (Uwechue et al 2012). Lorsque le glutamate est libéré par l'élément pré-synaptique, il peut être capté par les astrocytes grâce aux transporteurs GLT-1 et 2. Sous l'action de la glutamine synthase dans le cytoplasme des astrocytes, le glutamate est alors converti en glutamine puis transféré à l'élément pré-synaptique pour limiter sa néosynthèse coûteuse en énergie.

Par ailleurs, les astrocytes expriment plusieurs sous-types de récepteurs au glutamate comme les récepteurs ionotropiques NMDA, AMPA ou encore les récepteurs métabotropiques mGluR (Perea & Araque 2005). Depuis les premières observations de Cornell-Bell dans les années 1990 (Cornell-Bell et al 1990), la réponse astrocytaire à la stimulation glutamatergique correspond à une élévation des concentrations intracellulaires en Ca^{2+} (Panatier et al 2011, Porter & McCarthy 1997). Il est cependant important de noter que l'élévation locale des concentrations en Ca^{2+} pourrait résulter de l'activation des récepteurs glutamatergiques métabotropiques mGluR de type 5. Une étude sur tranche révèle que ce sous-type de récepteur est exprimé par les astrocytes chez l'adulte et que leur activation est associée à l'induction de vagues calciques (Sun et al 2013).

Des évidences récentes montrent que la fonction astrocytaire au sein même de la synapse tripartite peut être étendue à la synapse monoaminergique (pour revue Quesseveur et al 2013b). Les astrocytes expriment plusieurs transporteurs et récepteurs aux monoamines (Then et al 2017, Vaarmann et al 2010), les rendant sensibles aux variations des concentrations extracellulaires de 5-HT, NA et DA (Figure 8). Les transporteurs des monoamines sont très présents à la surface des astrocytes. *In vitro*, l'application de fluoxétine sur cultures d'astrocytes permet d'augmenter les concentrations extracellulaires de 5-HT apportant une première preuve de la présence du SERT sur les astrocytes (Katz & Kimelberg 1985). Ces résultats ont été confirmés par la détection d'ARNm codants pour le SERT sur des cultures primaires d'astrocytes (Inazu et al 2001, Kittel-Schneider et al 2012). De la même manière, une étude en RT-qPCR a révélé que les astrocytes expriment le transporteur NET (Inazu et al 2003). Même si ces données sont controversées (Hansson et al 1985, Hösli & Hösli 1995, Paterson & Hertz 1989), plusieurs inhibiteurs du NET comme la désipramine ou le milnacipran ont montré leur capacité à bloquer la recapture de la NA sur des cultures primaires d'astrocytes de rats (Inazu et al 2003).

Les récepteurs monoaminergiques sont également présents sur les astrocytes. Par exemple, l'expression du sous-type de récepteur à la sérotonine 5-HT_{1A} a été détectée *in vivo* et *in situ* dans le cortex enthorinal et l'hippocampe de primates (Azmitia et al 1996). Son activation permet une élévation de la libération de s100 β , une protéine capable de se fixer au Ca^{2+} (Eriksen et al 2002, Whitaker-Azmitia et al 1990) et de favoriser le métabolisme énergétique, la communication et la croissance cellulaire (Zimmer et al 1995). De manière intéressante, de faibles concentrations de s100 β ont été associées à

une réduction de la mort neuronale (Ahlemeyer et al 2000, Eriksen & Druse 2001) alors qu'une forte concentration de cette protéine a été associée à plusieurs pathologies notamment psychiatriques (Schroeter et al 2013). La présence d'autres récepteurs sérotoninergiques comme les récepteurs 5-HT₂ a également été rapportée sur des cultures primaires d'astrocytes issus de l'hippocampe (Zhang et al 2010a). Couplé à une protéine Gq, l'activation de ces récepteurs permet le déclenchement d'une cascade de signalisation visant à augmenter les concentrations intracellulaires de Ca²⁺ puis la libération de gliotransmetteurs ou à la production de facteurs de croissance comme le GDNF (Tsuchioka et al 2008). Dans cette dernière étude, les auteurs utilisent une lignée cellulaire d'astrocytes pour montrer que la production de GDNF, passe par l'activation des récepteurs 5-HT₂ et la phosphorylation/activation de facteurs de transcription tel que ERK. D'autres types de récepteurs sérotoninergiques ont été retrouvés sur les astrocytes comme les récepteurs 5-HT₄ ou 5-HT₇ qui, *in vitro*, semblent avoir un effet sur la libération de molécules pro-inflammatoires comme l'interleukine-6 (Lieb et al 2005). Ainsi, la réponse des astrocytes suite à l'augmentation des concentrations extracellulaires de 5-HT au sein de la synapse tripartite monoaminergique dépendra du sous-type de récepteur sérotoninergique activé.

Des études *in vitro* ont également révélé la présence des récepteurs α - (Shao & Sutin 1992) et β -adrénergiques (Junker et al 2002) sur les astrocytes. Alors que la stimulation de ces deux sous-types de récepteurs favorise la production de BDNF par les astrocytes (Juric et al 2008), les voies de communications intracellulaires impliquées diffèrent. Leur couplage à une protéine Gq permet aux récepteurs α -adrénergique, lorsqu'ils sont activés, de déclencher la production d'IP₃, l'augmentation des concentrations intracellulaires de Ca²⁺ et la libération de BDNF (O'Donnell et al 2012). En revanche, l'activation des récepteurs β -adrénergiques permet l'activation d'une adénylate cyclase (Daaka et al 1997), la phosphorylation du facteur de transcription CREB participant à la production de BDNF (Chen et al 2007). À l'instar du glutamate, l'activation des récepteurs α -adrénergiques et notamment le sous type α_1 , favorise l'oxydation du glucose en augmentant la glycolyse (Catus et al 2011), les récepteurs α_2 et β eux étant plus impliqués dans le processus de glycogénolyse (conversion du glycogène stocké en glucose) (O'Dowd et al 1995, Sorg & Magistretti 1991) laissant entrevoir la possibilité qu'une activation adrénergique des astrocytes peut participer au fonctionnement de la synapse fournissant plus d'énergie aux neurones voisins.

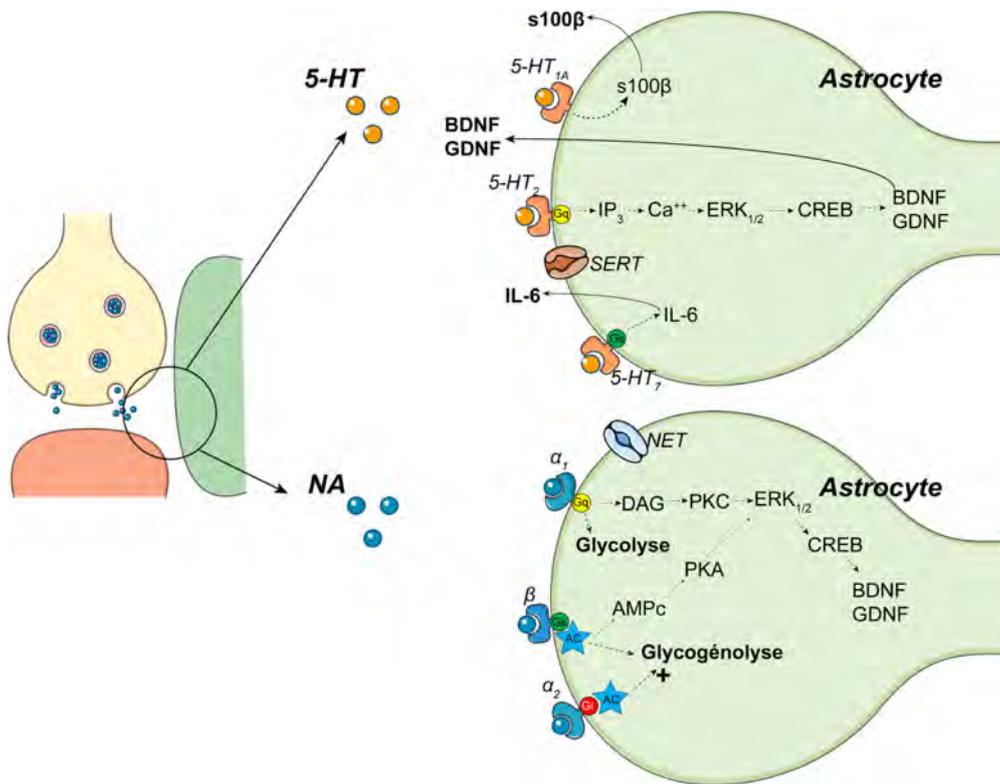


Figure 8 : Régulation de l'activité astrocytaire par la 5-HT, la NA et leurs récepteurs respectifs au sein de la synapse tripartite monoaminergique

Figure redessinée et adaptée d'après [Quesseveur et al 2013b](#).

L'ensemble de ces observations cellulaires et moléculaires montrent que les astrocytes sont, au sein de la synapse tripartite, capables de recevoir des informations des neurones et de répondre à ces signaux à travers un grand nombre de récepteurs, conduisant à une augmentation du Ca^{2+} intracellulaire. Ce signal permet aux astrocytes de libérer des substances neuroactives par un processus appelé gliotransmission ([Araque et al 2014](#)). Celui-ci repose sur le principe de libération de gliotransmetteurs par les astrocytes dans la fente synaptique de manière à moduler l'activité des neurones pré- et/ou post-synaptiques.

2.5.2. Modulateurs de la gliotransmission

Au sein de la synapse tripartite, des études récentes révèlent que les astrocytes sont capables de libérer des molécules neuroactives comme le glutamate ([Orellana et al 2011b](#)), l'ATP ([Kang et al 2008](#)) ou la D-sérine ([Papouin et al 2017](#)). Ces molécules appelées gliotransmetteurs, participent à la modulation de l'activité neuronale pré- et post-synaptique une fois libérées dans l'espace extracellulaire [Tableau 3 ; Figure 9](#)).

Type d'étude	Technique utilisée	Effet	Références
Glutamate			
Culture primaire	Patch clamp	Libération vésiculaire dépendante du Ca ²⁺	(Araque et al 2000)
	Analyse HPLC	Libération via les HC sensible aux stimuli osmotiques	(Jiang et al 2011)
	Capture de colorant	Mort neuronale par activation des Panx1	(Orellana et al 2011b)
ATP			
<i>In vivo</i>	Microdialyse	Module la libération de 5-HT hippocampique	(Okada et al 2001)
Culture primaire	Capture de colorant	Mort neuronale par activation des Panx1	(Orellana et al 2011b)
<i>Ex vivo</i>	Électrophysiologie sur tranches	Synchronisation du réseau neuronal	(Pascual et al 2005)
D-Sérine			
<i>In vivo</i>	Microscopie	Intégration des nouveaux neurones dans l'hippocampe	(Sultan et al 2015)
	Électrophysiologie	Maturation et augmentation de la plasticité synaptique	(Van Horn et al 2017)
<i>Ex vivo</i>	Électrophysiologie sur tranches	Module l'activité NMDA	(Panatier et al 2006)

Tableau 3 : Exemples d'effets de trois gliotransmetteurs (glutamate, ATP et D-sérine) sur l'activité neuronale

- Cas du glutamate

La libération de glutamate a été mise en évidence *in vitro* à l'aide de cultures mixtes neurones/astrocytes. Alors qu'une première étude révèle la présence de vésicules contenant du glutamate au niveau des pieds astrocytaires (Bezzi et al 2004), ces résultats ont été confirmés par une étude montrant que cette libération par les astrocytes est dépendante du Ca²⁺ (Liu et al 2011). En ce sens, tout stimulus augmentant les concentrations intracellulaires de Ca²⁺ comme les stimuli mécaniques (Araque et al 2000, Montana et al 2004), ou encore l'activation de récepteurs couplés aux protéines Gq (Zhang et al 2004) permet la libération du glutamate par les astrocytes. Dans l'hippocampe, il a été démontré que ce processus peut moduler l'activité neuronale (Angulo et al 2004). En effet, l'enregistrement électrophysiologique sur tranches révèle une augmentation des potentiels post-synaptiques excitateurs suite à la libération de glutamate par les astrocytes. Des données viennent appuyer ces observations, précisant que l'effet du glutamate astrocytaire sur les neurones passe principalement par les

récepteurs NMDA (Fellin et al 2004). Néanmoins, en activant les récepteurs kainate ou les récepteurs mGluR, le glutamate astrocytaire favorise respectivement la LTP ou la LTD mesurées en électrophysiologie sur tranches d'hippocampe (Liu et al 2004a, Liu et al 2004b).

Même si la grande majorité du glutamate astrocytaire est libérée selon le mécanisme d'exocytose, d'autres mécanismes de libération ont été identifiés comme le gonflement cellulaire, notamment en conditions pathologiques (Kimelberg et al 1990), par activité inverse des canaux sodiques (Longuemare & Swanson 1995), par l'activation des récepteurs canaux purinergiques P2X7 (Duan et al 2003), ou encore par des canaux spécialisés (pannexines/connexines) qui seront détaillés dans le troisième volet de la partie bibliographique de ce manuscrit de thèse.

- Cas de l'ATP/Adénosine

Bien que l'ATP soit le substrat énergétique principal de toutes les cellules, son action va au-delà d'un rôle intracellulaire puisqu'elle peut également activer des récepteurs purinergiques situés sur les neurones et les astrocytes. En culture, l'ATP libérée par les astrocytes permet le déclenchement de vagues calciques (Guthrie et al 1999) au sein du réseau d'astrocytes. Les mécanismes qui sous-tendent sa libération restent cependant à clarifier (Koizumi 2010). Alors que certaines études soulignent l'importance de l'exocytose (Maienschein et al 1999), appuyées par des observations microscopiques révélant la présence de vésicules astrocytaires contenant de l'ATP (Coco et al 2003), une autre étude révèle l'importance de l'activation des récepteurs-canaux P2X7 et de l'augmentation intracellulaire de Ca^{2+} dans la libération d'ATP (Suadicani et al 2006). Dans une série d'expériences combinant des approches pharmacologiques, microscopiques et électrophysiologiques, il a été montré que l'ATP provenant des astrocytes pouvait faciliter l'expression des récepteurs AMPA à la membrane des neurones post-synaptiques (Gordon et al 2005). L'enregistrement électrophysiologique sur tranches a permis aux auteurs de montrer que l'ATP augmente l'amplitude des potentiels post-synaptiques excitateurs. Néanmoins, les effets activateurs de l'ATP sont limités par son cycle de dégradation. En effet une fois libérée dans l'espace extracellulaire, l'ATP est très vite dégradée en adénosine. En agissant sur les récepteurs purinergiques A_1 situés sur l'élément pré-synaptique, l'adénosine permet, quant-à-elle, d'inhiber la libération de glutamate (Zhang et al 2003) et de coordonner l'ensemble de l'activité synaptique (Pascual et al 2005). Plus récemment des études utilisant des méthodes d'inactivation génétique (Lalo et al 2014) ou d'optogénétique (Tan et al 2017b) proposent un rôle inhibiteur de l'adénosine. Dans un modèle de souris KO pour les récepteurs purinergiques P2X4 post-synaptiques, Lalo et ses collaborateurs montrent une diminution des potentiels post-synaptiques inhibiteurs suite à la libération d'ATP par

les astrocytes, laissant entrevoir l'importance des récepteurs P2X4 dans les effets inhibiteurs de l'adénosine. D'ailleurs, Tan et ses collaborateurs montrent que l'activation par optogénétique des astrocytes hippocampiques, favorise la libération d'ATP par ces cellules gliales, qui active dans un second temps les neurones GABAergiques de cette région. En combinant l'optogénétique et des lignées de souris mutantes pour les récepteurs purinergiques, les auteurs révèlent quant à eux le rôle des récepteurs A₁.

- Cas de la D-sérine

Une première étude *in vitro* menée dans les années quatre-vingt-dix, révèle la présence de D-sérine dans les astrocytes (Schell et al 1995). Les auteurs suggèrent que la libération de D-sérine par les astrocytes est dépendante du glutamate puisque cet acide aminé est retrouvé dans des régions riches en glutamate (comme l'hippocampe ou le cortex préfrontal) et que des agonistes des récepteurs NMDA favorisent ce processus. Ces données apportent une preuve complémentaire en faveur de la présence de D-sérine au niveau des astrocytes qui peut être libérée dans l'espace extracellulaire grâce à des mécanismes d'exocytose Ca²⁺-dépendants (Takata et al 2011). Plusieurs études viennent appuyer ces résultats puisque des observations en microscopie électronique révèlent la présence de D-sérine dans des vésicules situées au niveau des pieds astrocytaires (Bergersen et al 2012, Martineau et al 2013). *In vitro*, l'augmentation de la libération de D-sérine par les astrocytes facilite les processus de LTP sur tranches d'hippocampe (Yang et al 2003). *In vivo*, il a également été démontré que la D-sérine est libérée par les astrocytes par exocytose et qu'elle agit également favorablement sur la LTP (Panatier et al 2006). Dans cette étude les auteurs utilisent des tranches d'hippocampe sur lesquelles la D-sérine se fixe sur les récepteurs NMDA pour renforcer cette forme de plasticité au niveau de l'élément post-synaptique. Ces observations sont néanmoins controversées puisqu'une chute des concentrations de Ca²⁺ dans l'aire CA1 de l'hippocampe ne bloque pas le processus de LTP (Ge & Duan 2007). Or, quelques années plus tard, une étude montre qu'un clamp du Ca²⁺ astrocytaire bloque la LTP des neurones de l'aire CA1 de l'hippocampe alors que ce processus est restauré en réponse à l'application de D-sérine (Henneberger et al 2010).

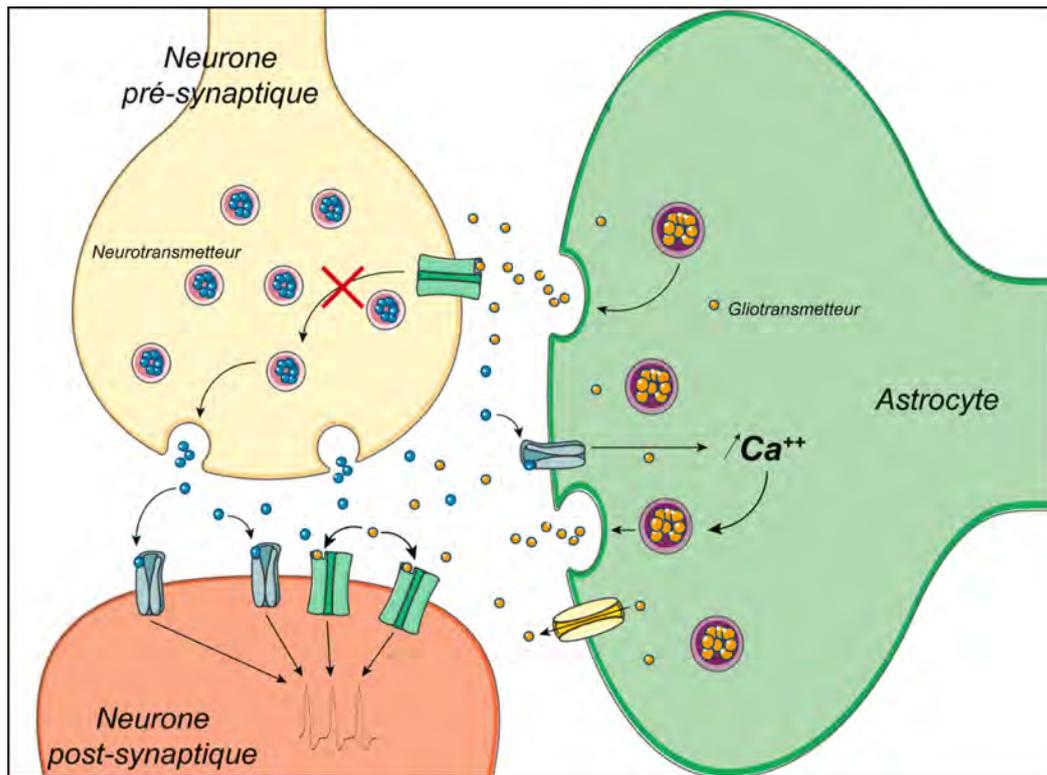


Figure 9 : Représentation schématique d'une synapse tripartite.

L'élément pré-synaptique (jaune) libère des neurotransmetteurs (sphères bleues) qui se fixent sur leurs récepteurs post-synaptiques (orange) régulant ainsi son activité. Les astrocytes (vert) libèrent des gliotransmetteurs (sphères jaunes) qui permettent de moduler l'activité neuronale à la fois au niveau pré- et post-synaptique.

Les astrocytes entretiennent des liens anatomiques et fonctionnels étroits avec les neurones. Ces cellules gliales fournissent aux neurones les substrats énergétiques et les facteurs neurotrophiques nécessaires à leur prolifération, maturation, survie puis à leur fonctionnement. De plus, les astrocytes sont capables de réguler le volume et l'osmolarité du milieu extracellulaire ou encore, favoriser la myélinisation après une lésion du système nerveux central. Enfin, au sein de la synapse tripartite glutamatergique et monoaminergique, les astrocytes sont également capables de moduler l'activité pré- et post-synaptique des neurones par deux processus majeurs : capture/fixation de neurotransmetteurs et libération de substances neuroactives appelés gliotransmetteurs.

3. Astrocyte et physiopathologie

Des altérations dans la physiologie des astrocytes ont conduit à l'hypothèse de leur implication dans plusieurs pathologies neurologiques et psychiatriques (Rossi & Volterra 2009).

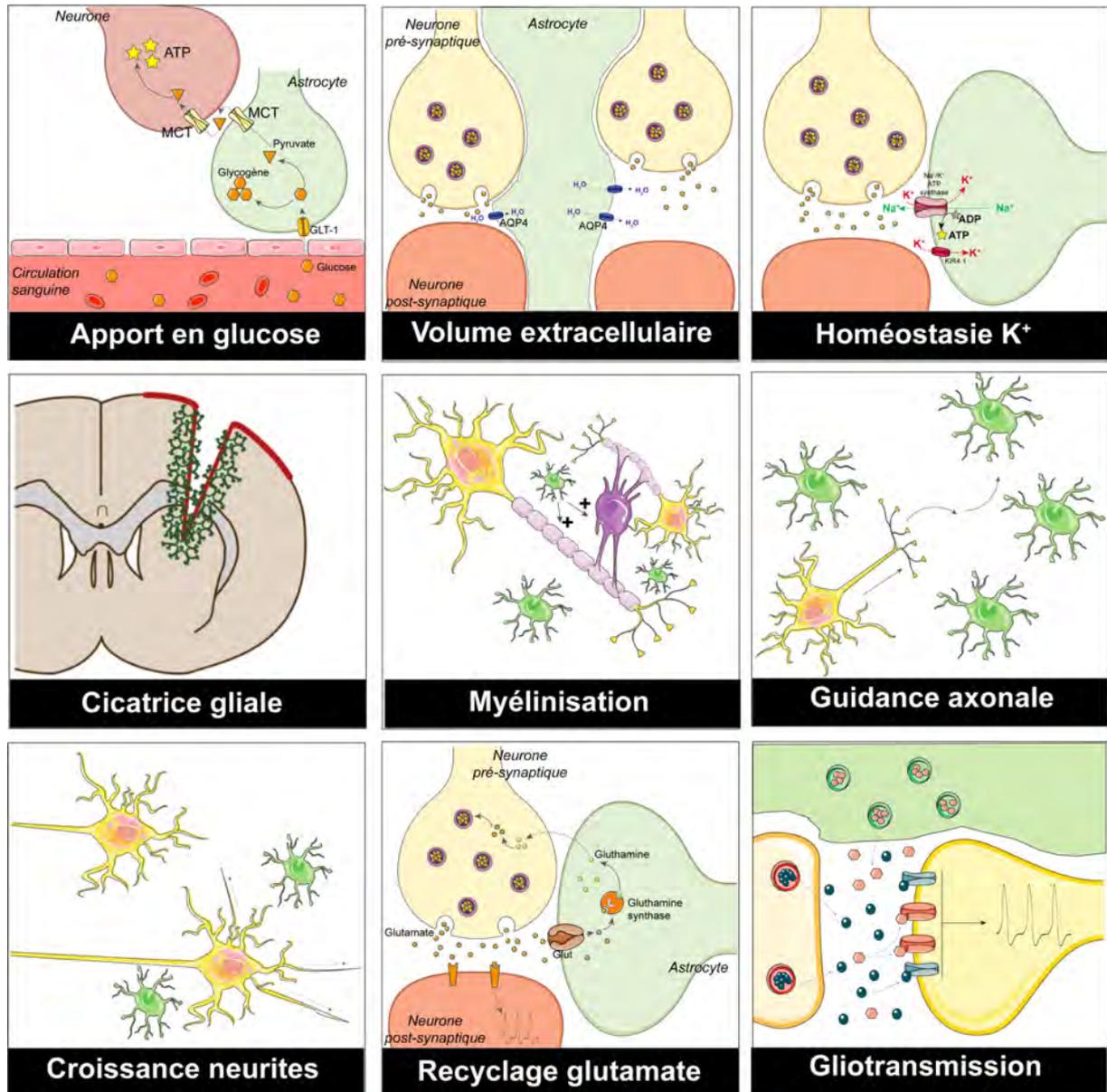


Figure 10 : Représentations schématiques des grandes fonctions astrocytaires.

Figure adaptée d'après Middeldorp & Hol 2011.

Plusieurs pathologies ont été décrites comme présentant des altérations astrocytaires : on parle d'astrogliopathies. On distingue par ailleurs deux types d'astrogliopathies : les astrocytopathies et les astroglieses réactives (Pekny et al 2016). La première peut être définie par des modifications morphologiques associées à une perte de fonction, tandis que

la seconde se caractérise principalement par l'hypertrophie des astrocytes souvent associée à une augmentation de l'expression de la GFAP et une cicatrice gliale.

3.1. *Astrocytes et physiopathologie de la dépression*

En accord avec leurs rôles au sein des synapses tripartites glutamatergiques et monoaminergiques, de nombreuses études suggèrent que la DM est non seulement une pathologie neuronale mais aussi gliale.

3.1.1. *Modifications numériques & anatomiques*

De plus en plus d'études apportent des preuves expérimentales en faveur d'une perturbation astrocytaire dans la DM (Öngür et al 1998). Par exemple, l'utilisation d'anticorps spécifiquement dirigés contre la GFAP ou α 100 β ont permis de montrer à l'aide d'approches immunohistochimiques sur coupes *post-mortem*, une diminution de la densité d'astrocytes dans le cortex préfrontal (Miguel-Hidalgo et al 2000), l'hippocampe (Cobb et al 2016) ou encore l'amygdale (Altshuler et al 2010) de patients souffrant de DM. De manière intéressante, des résultats similaires ont été observés dans différents modèles animaux de dépression. Dans le cortex préfrontal de souris ayant été exposées à des stress chroniques imprévisibles (Banar & Duman 2008) ou encore dans l'hippocampe d'animaux soumis à un stress social (Gong et al 2012), une diminution de la densité de cellules GFAP-positives a été détectée. Par ailleurs, de nombreuses études révèlent des altérations des astrocytes fibrillaires dans la pathologie de la DM. Dans l'une d'entre elles réalisée *post-mortem*, une diminution de la taille des corps cellulaires des astrocytes dans le cortex de patients déprimés a été démontrée (Torres-Platas et al 2015). Les auteurs rapportent par ailleurs une diminution du nombre de ramifications, de la taille de ces ramifications et du nombre d'épines dendritiques de ces astrocytes fibrillaires corticaux. Une étude de recherche translationnelle récente confirme ces résultats (Rajkowska et al 2018).

En analysant plus finement la morphologie astrocytaire dans le cortex préfrontal, notamment à l'aide d'une analyse de Sholl, il a été montré que des animaux soumis à un stress de contention pendant vingt-et-un jours présentent de plus petites extensions (Tynan et al 2013) en termes de longueur, de volume mais aussi de ramifications.

Les thérapies pharmacologiques s'avèrent bénéfiques sur ces anomalies liées à la densité et à la morphologie des astrocytes. Par exemple, un traitement chronique à la fluoxétine (15 mg/kg/jour pendant sept jours) atténue la perte d'astrocytes dans l'hippocampe de rat (Czéh et al 2006). Chez la souris, une autre étude montre qu'un traitement à la paroxétine (10 mg/kg p.o. deux fois par jour pendant vingt-huit jours) induit un comportement de type antidépresseur associé à une surexpression de GFAP dans l'hippocampe (Sillaber et al 2008). Ces résultats sont confirmés avec différentes classes d'antidépresseurs et notamment les TCA comme la clomipramine (Liu et al 2009). Ces résultats sont également

observés dans une lignée de rats génétiquement sélectionnés sur la base de leur phénotype dépressif (Di Benedetto et al 2016).

Compte tenu des multiples rôles des astrocytes décrits précédemment, ces altérations laissent également entrevoir la possibilité qu'elles soient accompagnées d'altérations fonctionnelles dans la physiopathologie de la DM.

3.1.2. Modifications énergétiques

Un nombre croissant d'évidences démontre un dysfonctionnement énergétique dans la DM notamment dans le cortex préfrontal (Li et al 2015a), l'hippocampe (Videbech 2000) ou encore l'amygdale (Drevets et al 2002). Comme décrit précédemment, des études en IRMf ont montré une hypoactivité du cortex préfrontal de patients souffrant de DM (pour revue Willner et al 2013). Cependant ces résultats restent incomplets dans la mesure où aucune étude ne révèle précisément le type cellulaire impliqué dans ces déficits métaboliques.

Une réduction de la surface des terminaisons astrocytaires à l'interface des vaisseaux sanguins a été révélée dans le cortex préfrontal de patients déprimés (Rajkowska & Stockmeier 2013) mais aussi dans une lignée de rats spécifiquement sélectionnés pour leur haut niveau d'anxiété (Di Benedetto et al 2016). Ainsi, l'assimilation de glucose par les astrocytes serait effectivement réduite dans la DM. Par ailleurs, *in vitro* et *in vivo*, l'administration de CORT exerce des effets délétères sur l'activité biochimique des astrocytes puisque cette hormone réduit la production de glycogène par les astrocytes (Allaman et al 2004, Elekes et al 1996, Zhang et al 2015c).

In vitro les antidépresseurs ont une efficacité non-négligeable sur ces altérations métaboliques associées à la DM. Par exemple, l'application de fluoxétine ou encore de paroxétine sur des cultures primaires d'astrocytes pendant vingt-quatre heures permet d'augmenter la libération de lactate. De manière intéressante, deux TCA comme l'imipramine ou la désipramine ne permettent pas d'observer de tels résultats (Allaman et al 2011). En utilisant du glucose radiomarqué, les auteurs révèlent dans la même étude que les ISRS augmentent l'assimilation du glucose alors que les TCA ne semblent pas modifier ce processus. De manière intéressante, soixante-douze heures d'exposition de à la fluoxétine augmente la production et la libération de lactate sur des cultures primaires d'astrocytes humains (Daniele et al 2015). La même étude montre que des antidépresseurs multimodaux comme la trazodone, un inhibiteur du SERT et un antagoniste des récepteurs 5-HT_{2A}, permet d'obtenir des effets encore plus marqués que ceux observés avec les ISRS. Enfin, l'administration périphérique de lactate semble avoir des effets antidépresseurs chez des souris modèles de dépression (Carrard et al 2018). Après vingt-et-un jours de traitement chronique à la CORT, les auteurs montrent que des injections systémiques de L-lactate diminuent le temps d'immobilité dans le test de nage forcée. *In vitro* l'application

de L-lactate sur des cultures de neurones induit l'expression de nombreux gènes impliqués dans la plasticité synaptique (Margineanu et al 2018). Ces derniers résultats restent à être confirmés *in vivo*.

3.1.3. Modifications de l'osmolarité

Une étude *post-mortem* chez l'Homme révèle une réduction des AQP4, associée à une diminution de la couverture hémato-encéphalique dans le cortex orbitofrontal de patients déprimés (Rajkowska et al 2013). De la même manière, une diminution de la quantité d'ARNm codant pour les AQP4 a été observée dans le locus coeruleus (Bernard et al 2011) et l'hippocampe (Medina et al 2016) de patients déprimés laissant penser à un défaut de ces canaux dans la DM.

De manière surprenante, dans un modèle murin de stress chronique (vingt-et-un jours de CORT par voie sous-cutanée) une surexpression des AQP4 dans l'hippocampe a été rapportée (Kong et al 2014). Dans une lignée de souris KO AQP4, ces auteurs révèlent néanmoins une plus forte sensibilité au stress chronique induit par la CORT puisque le temps d'immobilité mesuré dans le FST et le TST est plus important en comparaison à des animaux sauvages non mutés. Ces résultats contredisent une étude précédente montrant que l'inactivation génétique des AQP4 n'affecte pas le comportement anxio/dépressif après sept jours de stress chroniques imprévisibles (Kong et al 2009). Néanmoins, la même étude suggère que les effets thérapeutiques de la fluoxétine nécessitent la présence des AQP4. En effet, alors que quatre semaines de fluoxétine réduisent la latence à aller se nourrir dans le test d'alimentation supprimée par la nouveauté, la diminution d'expression des AQP4 dans une lignée KO prévient l'apparition des effets antidépresseurs de cet ISRS. En dépit de ces découvertes, les effets des antidépresseurs sur l'expression/fonction des AQP4 restent méconnus et peu documentés.

3.1.4. Modification de la myélinisation

L'implication des oligodendrocytes dans la DM est un terrain de plus en plus exploré (Edgar & Sibille 2012). En effet, des études *post-mortem* ont révélé de nombreuses altérations dans la matière blanche de patients déprimés (pour revue Tham et al 2011). Par exemple, l'utilisation d'un colorant spécifique de la myéline révèle un marquage moins important dans le cortex dorsolatéral de patients déprimés (Regenold et al 2007). Sur le plan microscopique, une analyse des marquages histologiques sur coupes *post-mortem* de patients déprimés révèlent une diminution du nombre d'oligodendrocytes dans le cortex préfrontal et l'amygdale (Hamidi et al 2004, Uranova et al 2004). Ces observations ont été confirmées par approche transcriptomique montrant une diminution de l'expression du gène *CNP-1* (impliqué dans le processus de myélinisation) chez le patient déprimé (Aston et al 2005), renforçant l'idée d'un défaut de myéline dans la DM.

Les défauts de myélinisation ont été retrouvés dans des modèles animaux de stress social (Czéh et al 2007) ou UCMS (Banasr et al 2007, Miguel-Hidalgo et al 2018) dans lesquels l'exposition chronique à un stress, réduit la prolifération des oligodendrocytes dans le cortex préfrontal. *In vitro*, l'exposition à la CORT produit des résultats similaires (Miguel-Hidalgo et al 2019). Ces observations révèlent que les défauts de myéline observés en réponse à l'exposition à de fortes concentrations de CORT (Miguel-Hidalgo et al 2019, Miguel-Hidalgo et al 2018) sont associés à une diminution de l'expression des connexines 30 (Cx30) et connexines 43 (Cx43), deux protéines impliquées dans la formation des jonctions communicantes et principalement exprimées par les astrocytes. Ces derniers travaux confirment donc l'importance de ces cellules gliales dans les défauts de myélinisation associés à la DM.

3.1.5. Modification de la réaction inflammatoire

Des altérations du système immunitaire périphérique ont longtemps été associées à la DM. Une élévation plasmatique des concentrations en IL-6 (Kéri et al 2014), IL-1 β (Dahl et al 2014), TNF α (Dahl et al 2014) ou encore en molécules du complément (CRP) (Walker et al 1998) a été rapportée chez des patients souffrant de DM. Cette hypothèse inflammatoire de la DM est confirmée par de nombreuses méta-analyses (Dowlati et al 2010, Haapakoski et al 2015). Si l'ensemble de ces études s'intéressent aux mécanismes inflammatoires périphériques, les mécanismes centraux sont actuellement connus. En utilisant la PCR quantitative, une étude *post-mortem* montre une augmentation de l'expression de ces cytokines pro-inflammatoires dans le cortex orbitofrontal de patients déprimés suicidés (Tonelli et al 2008). En accord avec ces données une étude rapportent une augmentation des ARNm codants pour l'IL-1 β , l'IL-6 et le TNF α dans le cortex préfrontal d'adolescents déprimés suicidés (Pandey et al 2012) mais ces résultats restent discutés (Dean et al 2010).

Plusieurs évidences portent à croire que les astrocytes ont un rôle à jouer dans la réaction inflammatoire (Balasingam et al 1994, Walker et al 1998). En outre, l'augmentation de l'expression de GFAP après « lésion » (Norden et al 2016, Sticozzi et al 2013) et la présence d'une astroglie argumentent en faveur d'un rôle important des astrocytes dans la réaction inflammatoire (Najjar et al 2013). Néanmoins, leur implication semble plus complexe puisque la libération de cytokines pro-inflammatoires est principalement attribuée aux cellules microgliales et aux lymphocytes (Haroon et al 2012). L'activation astrocytaire résulterait donc de leur stimulation par les lymphocytes T via la libération d'IL-6, l'IL-1 β , le TNF α ou encore de CRP par ces cellules immunitaires. Par ailleurs, une étude révèle une diminution de l'expression de GFAP dans l'hippocampe de patients souffrant de DM (Cobb et al 2016). Également observées dans le cortex préfrontal (Torres-Platas et al 2015), les modifications d'expressions de la GFAP en réponse à l'inflammation semblent

confinées spécifiquement aux structures cérébrales impliquées dans la régulation des émotions.

L'inflammation est-elle la cause ou la conséquence de la DM ? Plusieurs études ont rapporté que les glucocorticoïdes comme le cortisol induisent une augmentation de la libération des cytokines pro-inflammatoires en périphérie (pour revue [Glaser & Kiecolt-Glaser 2005](#)). De la même manière, des concentrations plasmatiques élevées en IL-6 ont été observées chez des souris soumises à un stress de défaite sociale ([Hodes et al 2014](#)). Au niveau central, l'augmentation de l'expression de ces interleukines corrèle avec une augmentation de l'activité de l'amygdale et une diminution de la plasticité synaptique hippocampique ([Nagaraja et al 2016](#)). De plus, l'administration intra-cérébro-ventriculaire de TNF α est suffisante pour produire un comportement anxio/dépressif chez la souris ([Manosso et al 2013](#)). Cette étude montre par ailleurs que la fluoxétine, l'imipramine mais aussi le bupropion administrés oralement, corrigent les effets pro-dépresseurs du TNF α . Ainsi, une partie des effets antidépresseurs de ces molécules pourrait passer par des effets anti-inflammatoires indirects.

3.1.6. Modifications de la plasticité synaptique

L'hypothèse neurotrophique de la DM a été formulée pour la première fois dans les années 1990 ([Duman et al 1997](#)). Suivant cette idée, les taux de BDNF ont été rapportés comme réduits dans le cortex préfrontal ([Karege et al 2005](#)), l'hippocampe ([Dunham et al 2009](#)) ou encore l'amygdale ([Guilloux et al 2012](#)) de patients déprimés. Chez ces mêmes patients, une diminution du récepteur TrkB au BDNF a également été rapportée ([Tripp et al 2012](#)) suggérant une réduction de la signalisation du BDNF et par extrapolation, une perte de plasticité synaptique dans la DM. Cette théorie est corroborée par une étude montrant une diminution de l'expression du BDNF dans l'hippocampe de rongeurs soumis à différents types de stress chroniques ([Castrén 2014](#)).

Peu d'études s'intéressent aux concentrations centrales de GDNF. Une étude *post-mortem* révèle cependant une augmentation des concentrations de ce facteur neurotrophique dans le cortex pariétal de patients déprimés ([Michel et al 2008](#)). Toutefois, une autre équipe montre une diminution des concentrations plasmatiques en ARNm codant pour le GDNF ([Otsuki et al 2008](#)). Certaines études décrivent à l'inverse une hausse des concentrations plasmatiques en GDNF chez des patients déprimés ([Rosa et al 2006](#), [Zhang et al 2010b](#)). Chez l'animal, une réduction des concentrations en GDNF dans l'hippocampe ([Liu et al 2012](#)) et dans le striatum ventral ([Uchida et al 2011](#)) de souris soumises au modèle de stress chroniques imprévisibles, a été rapportée. Par ailleurs, des études *in vitro* ([Verity et al 1999](#)) et *in vivo* ([Nakashima et al 2004](#)) rapportent qu'une exposition au cortisol/corticostérone réduit la production et la libération de GDNF.

De nombreuses études montrent que le traitement chronique aux ISRS, IRN ou TCA (Nibuya et al 1996) ou encore des thérapies non-pharmacologiques (Nibuya et al 1995) augmentent l'expression du BDNF dans l'hippocampe de rats. Ces résultats ont été confirmés à maintes reprises notamment en montrant que l'amitriptyline (Hisaka et al 2007) et la fluoxétine (Mercier et al 2004) augmentent la production d'ARNm codant pour le BDNF. Toutefois, la source de cette neurotrophine reste aujourd'hui méconnue. L'utilisation de vecteurs lentiviraux ciblant préférentiellement les astrocytes a permis de montrer que la surexpression de BDNF dans ces cellules gliales favorise l'augmentation de la production de nouveaux neurones ainsi que leur survie dans l'hippocampe de souris adultes (Quesseveur et al 2013a). Par ailleurs, cette augmentation de la neurogenèse induite par la surexpression de BDNF dans les astrocytes corrèle avec une diminution du comportement anxio/dépressif mesuré dans un large panel de paradigmes comportementaux, apportant pour la première fois une preuve expérimentale, *in vivo*, de l'origine astrocytaire du BDNF et de son importance dans les comportements anxio/dépressifs.

Tous les antidépresseurs utilisés en cliniques (i.e. IMAO, TCA, ISRS) modulent la production de GDNF dans des mécanismes dépendants ou indépendants des monoamines (pour revue Tsybko et al 2017). Un exemple de mécanisme « monoamine-dépendant » est la production de GDNF par la fluoxétine (Hisaka et al 2004). En activant les récepteurs 5-HT₂, l'augmentation des concentrations de 5-HT induite par la fluoxétine permet *in vitro* une augmentation de l'expression d'ARNm codant pour le GDNF. À l'inverse, le mécanisme par lequel les IMAO augmentent l'expression de GDNF peut être considéré comme indépendant des monoamines. Sur des cultures d'astrocytes, l'activation de la voie PI3K ou de la voie NFκB par la sélégiline permettrait l'augmentation de la production d'ARNm codant pour le GDNF (Maruyama et al 2004, Mizuta et al 2000). De la même manière, les TCA comme l'amitriptyline augmentent la production d'ARNm codant pour le GDNF (Kajitani et al 2012) de façon temps et concentration dépendantes mais ne mobilisant pas les systèmes monoaminergiques (Hisaka et al 2007) puisque le blocage des récepteurs 5-HT n'affecte pas la capacité de ce TCA à augmenter la production d'ARNm codant pour le GDNF.

Bien que ces observations soient très bien décrites sur des modèles *in vitro*, une confirmation de l'action des antidépresseurs sur la production de BDNF et/ou de GDNF *in vivo* reste nécessaire.

3.1.7. Modification de la gliotransmission

De nombreuses évidences démontrent un défaut de gliotransmission dans la DM (pour revue [Etiévant et al 2015](#)).

- Cas du glutamate

De nombreuses évidences cliniques rapportent une augmentation des concentrations plasmatiques de glutamate chez les patients dépressifs ([Mauri et al 1998](#), [Mitani et al 2006](#)). Bien que remis en question ([Francis et al 1989](#)), des observations similaires ont été observées dans le liquide céphalorachidien ([Levine et al 2000](#)), le cortex frontal ([Hashimoto et al 2007](#)) et le cortex préfrontal dorso-latéral ([Lan et al 2009](#)). En accord avec ces données, des études utilisant l'IRM montrent une diminution du rapport glutamine/glutamate ([Kondo et al 2011](#), [Yüksel & Öngür 2010](#)) suggérant des altérations du cycle de recyclage du glutamate dans la DM. Pour renforcer cette hypothèse, des études *post-mortem* ont montré une diminution de l'expression du GLT-1 dans le cortex préfrontal de patients déprimés ([Choudary et al 2005](#), [Sanacora & Banasr 2013](#)).

Ces altérations ont été retrouvées dans des modèles animaux de dépression, notamment en utilisant des techniques de neuro-imagerie ([Arnone et al 2015](#), [Luykx et al 2012](#)). Plusieurs études rapportent en effet une diminution de GLT-1 dans l'hippocampe de rats soumis à vingt-et-un jours de stress chroniques imprévisibles ([Chen et al 2014b](#)), au modèle d'impuissance acquise « learned helplessness » ([Zink et al 2010](#)), en réponse à l'administration prolongée de CORT ([Gourley et al 2012](#)) ou dans différentes lignées génétiques connues pour leur hypersensibilité au stress ([Gómez-Galán et al 2013](#)). Ainsi, une augmentation des concentrations extracellulaires de glutamate consécutive à la diminution de ses transporteurs aurait des effets délétères dans les troubles de l'humeur. Appuyant le rôle du glutamate dans la dépression, il a été montré que le riluzole, une molécule dont le mode d'action reposerait sur l'inhibition de la neurotransmission glutamatergique et notamment une augmentation de l'expression du transporteur GLT-1 dans le cortex préfrontal de rats, exerce des effets de type antidépresseurs en réponse à des stress chroniques imprévisibles ([Sanacora & Banasr 2013](#)).

Faisant écho à ces travaux, il est aujourd'hui admis que la libération de glutamate peut être altérée par une exposition à la CORT. Sur tranches d'hippocampe, Karst et ses collaborateurs montrent que l'application aiguë de CORT (100 nM) provoque une augmentation rapide de la fréquence des potentiels post-synaptiques excitateurs ([Karst et al 2005](#)). En accord avec ces données, plusieurs études révèlent une augmentation de la libération de glutamate dans le cortex préfrontal ([Musazzi et al 2010](#)) et l'amygdale ([Reznikov et al 2007](#)) de rats soumis à un stress de contention. De manière intéressante, le rôle des GR (et non des MR) dans la libération de glutamate liée au stress a été proposé. Bien que les effets du stress chronique sur la libération du glutamate soient très peu

documentés, il est admis qu'une augmentation rapide et la neuro/gliotransmission glutamatergique conduisant à des concentrations synaptiques de glutamate importantes, entraîne des remodelages synaptiques et dendritiques délétères, qui peuvent expliquer l'apparition de la DM (Gorman & Docherty 2010, Musazzi et al 2011).

Il est important de noter que les antidépresseurs monoaminergiques présentent une efficacité intéressante en modulant l'activité glutamatergique, notamment la neurotransmission médiée par les récepteurs NMDA (Nowak et al 1993, Skolnick 1999). Une administration aiguë d'imipramine (Michael-Titus et al 2000) exerce des effets inhibiteurs sur la libération de glutamate mesurée sur tranches de cortex préfrontal. Une étude de microdialyse révèle qu'une administration aiguë de fluoxétine reverse l'augmentation des concentrations extracellulaires de glutamate dans l'amygdale induite par un stress de contention (Reznikov et al 2007). Des résultats similaires ont été retrouvés avec l'agomélatine (dont une partie des effets serait liée à des mécanismes indépendants des monoamines) dans l'hippocampe et l'amygdale (Reagan et al 2012). À l'instar d'un traitement aigu, il a été démontré qu'un traitement chronique à différentes classes d'antidépresseurs comme la désipramine, la fluoxétine et la réboxétine (Bonanno et al 2005), réduit la libération de glutamate dans l'hippocampe. Observée également dans les cortex frontaux et préfrontaux (Musazzi et al 2010), l'augmentation de la libération de glutamate induite par un choc électrique au niveau de la patte est reversée par un traitement chronique à la fluoxétine, la désipramine, la venlafaxine ou à l'agomélatine. Enfin, l'ensemble de ces molécules ont révélé leur rôle sur la modulation de la fonction et de l'expression des différents récepteurs au glutamate. En particulier, l'imipramine (Nowak et al 1993) mais aussi le citalopram (Skolnick et al 1996), administrés de façon chronique, réduisent la fixation de ligands radiomarqués sur les récepteurs NMDA du cortex frontal (Paul et al 1994) et la quantité d'ARNm codant pour ce récepteur notamment dans le cortex préfrontal, l'hippocampe et l'amygdale (Boyer et al 1998, Pittaluga et al 2007). Ces données ont été précisées sur le plan moléculaire où l'escitalopram (Ryan et al 2009) et la duloxétine (Calabrese et al 2012) administrés de façon chronique bloquent l'augmentation d'expression de la sous unité GluN1 des récepteurs NMDA induite dans le modèle de stress chroniques imprévisibles, renforçant l'intérêt de bloquer ces récepteurs glutamatergiques pour traiter les pathologies liées au stress chronique comme la DM.

Ayant pour objectif de réduire le délai d'action des antidépresseurs classiques mais aussi d'augmenter le nombre de répondeurs, plusieurs études s'intéressent aux molécules ciblant le système glutamatergique. Alors que la forte augmentation synaptique de glutamate est susceptible d'activer les récepteurs NMDA, des antagonistes de ces récepteurs comme la kétamine ont montré à dose sub-anesthésique un effet antidépresseur rapide (dans l'heure qui suit son administration) et durable (jusqu'à une semaine après son administration) chez le patient dépressif (Berman et al 2000, Ibrahim

et al 2012) mais aussi dans différents modèles animaux d'impuissance acquise (Maeng et al 2008) ou dans le modèle de stress chroniques imprévisibles (Li et al 2011). Les effets de la kétamine pourraient passer par une activation du système sérotoninergique (Du Jardin et al 2016, Hamon & Blier 2013). En somme, bloquer la neurotransmission NDMA semble être une perspective thérapeutique intéressante dans le traitement de la DM puisque l'expression et la fonction de ces récepteurs sont augmentées en cas de stress chronique. Malgré ces découvertes, des travaux plus approfondis sont nécessaires pour comprendre les effets des antidépresseurs sur le rôle des astrocytes la régulation du tonus glutamatergique via la régulation de ces processus de recapture/recyclage/libération, à la fois dans des modèles animaux de dépression et chez des patients souffrant de DM.

- Cas de l'ATP/Adénosine/Inosine

Chez l'Homme, les liens entre ATP et DM ont été très peu étudiés aboutissant à des résultats non concluants (Hejjas et al 2009, Lucae et al 2006). En revanche, les études précliniques permettent d'apporter un meilleur éclairage. Une diminution de l'ATP astrocytaire a été rapportée dans le cortex préfrontal et l'hippocampe de souris soumises à un stress de défaite sociale (Cao et al 2013a). Ces résultats sont confirmés par des données génétiques (Cao et al 2013b). En effet, en utilisant une lignée KO pour le récepteur astrocytaire à l' IP_3 ($Itpr2^{-/-}$), les auteurs montrent que la diminution de libération d'ATP est responsable d'un comportement pro-dépresseur. De manière intéressante, l'apport exogène d'ATP au niveau central, par injection intra-cérébro-ventriculaire, ou systémique, permet de corriger les effets du stress et d'induire un comportement de type antidépresseur après seulement sept jours de traitement. L'ATP pourrait ainsi promouvoir des effets antidépresseurs rapides. Grâce à une série d'expériences combinant des approches pharmacologiques et génétiques, les auteurs montrent par ailleurs que les récepteurs P2X2 seraient fortement impliqués dans les effets antidépresseurs de l'ATP (Cao et al 2013b). En effet, l'inactivation génétique des récepteurs P2X2 suite à l'injection d'un ARN interférent (ARNi) dirigé contre ces récepteurs dans le cortex préfrontal, prévient des effets antidépresseurs de l'ATP.

Toutefois, d'autres récepteurs à l'ATP pourraient jouer un rôle dans la DM et la réponse aux antidépresseurs. Une attention particulière est d'ailleurs portée sur les récepteurs P2X7. Une étude chez des souris révèle l'existence d'un polymorphisme génétique pour ce récepteur (Metzger et al 2017), associé à une sensibilité plus importante au stress de défaite sociale, renforçant l'idée que les récepteurs P2X7 sont impliqués dans la DM. Des résultats concordants ont été retrouvés dans d'autres modèles de stress chronique comme le modèle de stress chroniques imprévisibles (Su et al 2018) ou le modèle de stress de contention (Tan et al 2017a) pour lesquels le stress chronique augmente l'expression des récepteurs P2X7 dans le cortex préfrontal et l'hippocampe.

In vitro, l'application de fluoxétine sur cultures d'astrocytes d'hippocampe permet une augmentation des concentrations d'ATP dans le milieu de culture (Kinoshita et al 2018). Par ailleurs, de nombreux antidépresseurs augmentent l'expression et la fonction des récepteurs purinergiques. La paroxétine (mais pas la fluoxétine ni la clomipramine) réduit la libération de cytokines pro-inflammatoires induites par l'activation des récepteurs P2X7 (Dao-Ung et al 2015) et l'amplitude des courants sodiques (Wang et al 2016b). *In vivo*, l'imipramine (Ribeiro et al 2019) et la kétamine (Tan et al 2017a) réduisent l'expression des récepteurs P2X7 dans l'hippocampe de rats exposés à des stress chroniques. Ces observations sont similaires à celles obtenues dans un modèle de délétion des récepteurs P2X7 (Csölle et al 2013) ou de blocage de ces récepteurs par des antagonistes (Aricioglu et al 2019, Farooq et al 2018) renforçant l'hypothèse purinergique de la dépression. À noter que l'ATP est très vite dégradée en adénosine (Pascual et al 2005). Plusieurs thérapies non pharmacologiques comme la privation de sommeil (Hines et al 2013) ou les stimulations hautes fréquences (Etiévant et al 2016, Etiévant et al 2015) ont révélé que leurs effets antidépresseurs passent par l'activation des récepteurs A₁ et A₂ à l'adénosine. De la même manière, la dégradation de l'adénosine en inosine, dont les concentrations plasmatiques sont réduites chez les patients déprimés (Ali-Sisto et al 2016), pourrait aussi avoir des conséquences sur l'humeur. En outre, plusieurs évidences montrent qu'une administration orale (Muto et al 2014) ou par injection i.p. d'inosine (Yuan et al 2018) induit un comportement de type antidépresseur mesuré dans le TST (Kaster et al 2013) et que ces effets sont médiés par l'activation de la voie de signalisation dépendant du facteur de transcription CREB (Gonçalves et al 2017).

- Cas de la D-sérine

Principalement décrite pour ses effets antipsychotiques dans la schizophrénie (MacKay et al 2019), aucune étude clinique ne révèle l'effet de la D-sérine dans la DM. Cependant, plusieurs études suggèrent des effets antidépresseurs dans des modèles animaux. Il a été montré qu'une lignée de rats génétiquement sélectionnés pour leur phénotype pro-dépresseur présente une diminution de D-sérine dans l'hippocampe (Gómez-Galán et al 2013). Ces résultats ont été confirmés dans d'autres modèles de dépression comme le modèle d'impuissance acquise (Malkesman et al 2012) ou des modèles génétiques de surexpression de la sérine racémase, responsable de la production de la D-serine (Otte et al 2013). Dans cette dernière étude, Otte et ses collaborateurs démontrent que l'administration chronique de D-sérine dans l'eau de boisson induit une diminution de l'immobilité dans le FST et une diminution de la latence à aller se nourrir dans le test d'alimentation supprimée par la nouveauté. L'étude de Malkesman quant à elle s'intéresse aux effets d'une injection aiguë de D-sérine sur les comportements pseudo-dépressifs chez le rongeur notamment à l'aide du FST. L'administration de D-sérine atténue le

comportement de type dépressif généré par le stress chronique. De manière intéressante, la diminution de l'expression de la sous unité NR₁ des récepteurs NMDA, (connus comme pouvant être activés par la D-sérine), induit un comportement pro-dépresseur qui ne peut être rétabli par l'injection aigüe de D-sérine. Enfin dans un modèle de défaite sociale, l'utilisation de la microdialyse a permis de mettre en parallèle une diminution des concentrations extracellulaires de D-sérine dans l'hippocampe à un comportement pro-dépresseur mesuré à l'aide du FST (Wang et al 2017). Au contraire, l'injection intra-hippocampique de D-sérine vingt minutes avant le test, corrige les effets comportementaux induits par le stress.

Les effets antidépresseurs de la D-sérine reposeraient sur les mêmes mécanismes d'action que la kétamine (Wei et al 2017). Cette étude montre dans un premier temps que cent à deux cents fois plus de D-sérine sont nécessaires pour obtenir des effets antidépresseurs comparables à ceux de la kétamine ou de la désipramine. Par ailleurs, en étudiant les acteurs moléculaires de la signalisation intracellulaire, les auteurs montrent par western blot, que la D-sérine augmente l'expression des mêmes facteurs de transcriptions activés par la kétamine (mais pas ceux activés par la désipramine). Curieusement, l'administration chronique (quatorze jours) mais pas unique de fluoxétine réduit les concentrations de D-sérine mesurées dans le cortex préfrontal (Ma et al 2017). Aucune modification n'est observée dans l'hippocampe en réponse à un traitement à la fluoxétine administrée seule, alors que la combinaison de cet ISRS avec le brexpiprazole augmente les concentrations hippocampiques de D-sérine. Des études complémentaires sont donc nécessaires afin de préciser le rôle de ce gliotransmetteur dans la DM et les traitements associés.

La dépression est une gliopathie pour laquelle les astrocytes présentent de nombreux dysfonctionnements anatomiques et fonctionnels : diminution du nombre de cellules et de leurs prolongements, mauvaise régulation de l'osmolarité, de la myélinisation, forte inflammation, augmentation de la libération de glutamate, diminution de libération d'ATP ou de D-sérine.

La plupart de ces altérations anatomo-fonctionnelles peuvent être corrigées par un traitement aigu ou chronique aux antidépresseurs. Ceci renforce l'idée que les astrocytes constituent une cible cellulaire pertinente en vue du développement de nouveaux antidépresseurs présentant un mécanisme d'action original.

Nous avons vu dans cette partie que les astrocytes sont capables de communiquer avec les neurones notamment via la libération de gliotransmetteurs tels que le glutamate, l'ATP ou encore la D-sérine au sein de la synapse tripartite. La libération de ces gliotransmetteurs a principalement été décrite par des mécanismes Ca²⁺ dépendant impliquant l'exocytose (pour revue Santello et al 2012). Néanmoins, l'existence d'autres systèmes de libération

de ces molécules neuroactives est également possible. Nous verrons dans la troisième partie de cette introduction bibliographique que les connexines (Cxs), impliquées dans la formation des jonctions communicantes (JC), assurent sous leur forme hémicanal (HC) la libération de glutamate, d'ATP et de D-sérine. Ainsi, ces protéines constituent des cibles moléculaires particulières des astrocytes pour la modulation de l'activité neuronale et les comportements anxio/dépressifs.

Partie 3 : Physiopathologie des connexines

Les jonctions communicantes (JC) sont la forme la plus classique de communication intercellulaire pour les astrocytes. Composées de protéines transmembranaires formant des canaux perméables aux ions et petites molécules (i.e. Ca^{2+} , IP_3 ou ATP), elles permettent notamment à un groupe de cellules de répondre de manière synchrone à un stimulus.

Les JC sont retrouvées au cours de l'évolution. Chez les invertébrés elles sont composées d'innexines (pour revue [Phelan et al 1998](#)), chez les vertébrés, on parle de connexines (Cxs) et de pannexines (Panx).

Dans cette troisième partie, nous aborderons la physiopathologie de ces protéines et plus particulièrement celle des Cxs, leur biochimie, leurs fonctions et leurs implications dans les pathologies du SNC dont la DM et d'autres pathologies souvent associées à ce trouble psychiatrique. En effet, en raison de leurs rôles dans la physiologie de l'astrocyte et de toutes les fonctions qui ont été décrites dans la partie précédente, les Cxs sont des protéines qui pourraient participer à la régulation de l'humeur.

1. Généralités sur les pannexines et connexines

1.1. Les pannexines

La famille des Panx compte trois membres Panx1, Panx2 et Panx3. Chez l'Homme, les Panx1 et Panx3 présentent des homologies de séquence et ont un poids moléculaire semblable, autour de 45 KDa ([Baranova et al 2004](#)). Les Panx2 sont plus lourdes pour un poids moléculaire de 73 KDa ([Baranova et al 2004](#), [Yen & Saier 2007](#)). Découvertes dans les années 2000 ([Panchin et al 2000](#)), l'expression des Panx est aujourd'hui bien caractérisée chez l'Homme et la souris ([Yen & Saier 2007](#)). Les Panx humaines présentent 94% d'homologie avec les Panx murines ([Penuela et al 2009](#)) et donc l'étude de ces protéines dans des modèles pathologiques murins permet d'anticiper leurs rôles dans les pathologies humaines.

Alors que les Panx3 sont principalement présentes dans la peau ([Celetti et al 2010](#)), les cartilages ([Iwamoto et al 2010](#)) et les os ([Ishikawa et al 2011](#)), les Panx1 et Panx2 sont exprimées dans tous les types cellulaires du SNC ([Penuela et al 2007](#)). Une étude *post-mortem* révèle que les Panx2 sont présentes dans le cortex frontal, le cervelet ou encore les noyaux putamen ([Baranova et al 2004](#)).

Les Panx sont composées de quatre domaines transmembranaires, deux boucles extracellulaires et une boucle intracellulaire, orientées dans la membrane plasmique de manière à ce que les extrémités amino- (N-) et carboxyle- (C-) terminales soient dans le cytosol ([Figure 11](#)). Les Panx sont des glycoprotéines ce qui signifie que plusieurs de leurs

acides aminés (généralement des asparagines) portent un sucre ; On parle de N-glycosylation.

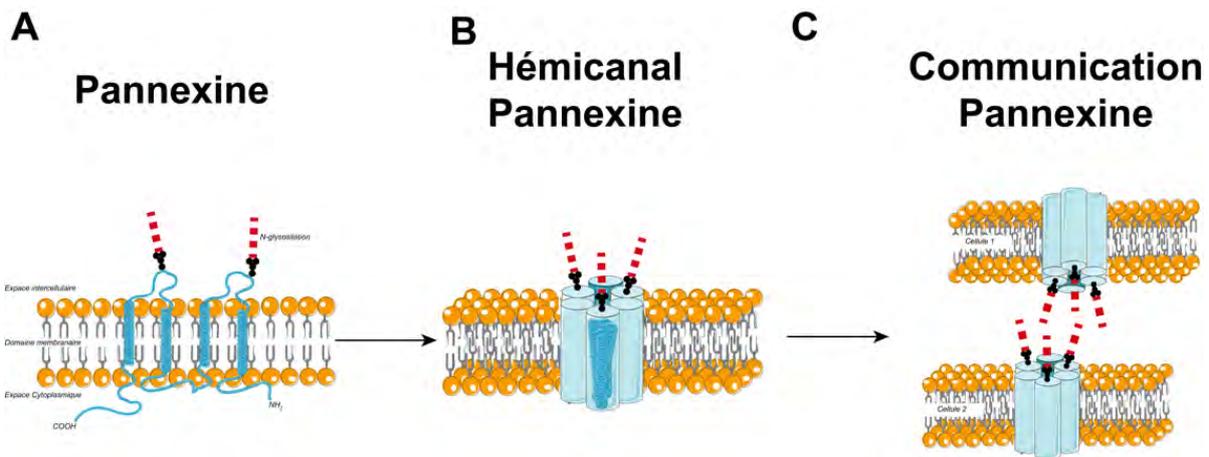


Figure 11 : Représentation schématique d'une Pannexine.

6 Panx (A) sont nécessaires pour la formation d'un hémicanal (B, C). Figure redessinée d'après [Giaume et al 2013](#).

Des études de cristallographie ont montré que les Panx1 forment des canaux hexamériques ([Baranova et al 2004](#)), tandis que les Panx2 forment des canaux hepta- ou octomériques ([Panchin 2005](#)). À ce jour, aucune étude ne révèle l'oligomérisation des Panx3. Une fois transcrits dans le noyau, les ARNm codant pour les Panx sont traduits dans le réticulum endoplasmique. Les protéines réalisent leur maturation dans l'appareil de Golgi puis sont transportées à la membrane plasmique dans des vésicules. L'adressage à la membrane plasmique des Panx1 est très bien documenté ([Ambrosi et al 2010](#)) contrairement aux Panx2 et Panx3. Dans une étude utilisant un inhibiteur du trafic cellulaire, il a été montré que les Panx1 ont une durée de vie très longue ([Bhalla-Gehi et al 2010](#)). Par ailleurs, des études de FRAP montrent que ces canaux sont très mobiles et que la formation de JC n'est pas organisée en domaines ([Penuela et al 2013](#)).

En raison de l'ouverture large des Panx ([Bhalla-Gehi et al 2010](#)) et du nombre important de molécules qui peuvent diffuser à travers ces canaux (i.e. ions, ATP, glutamate, acide arachidonique) ([Bao et al 2004a](#), [Locovei et al 2006](#)), il apparaît évident qu'une régulation fine est nécessaire pour maintenir l'intégrité des cellules ([Figure 12](#)). Dans le cas de la Panx1, il a été proposé que les extrémités C-terminales agissent comme un « bouchon » permettant la fermeture du pore ([D'hondt et al 2011](#)). De nombreuses modifications post-traductionnelles comme des S-nitrosylation ([Lohman et al 2012](#)) ou des phosphorylations ([Bunse et al 2010](#)) participent par ailleurs à la régulation de l'ouverture du pore mais aussi à leur appariement avec les Panx des cellules voisines ([Penuela et al 2014](#)).

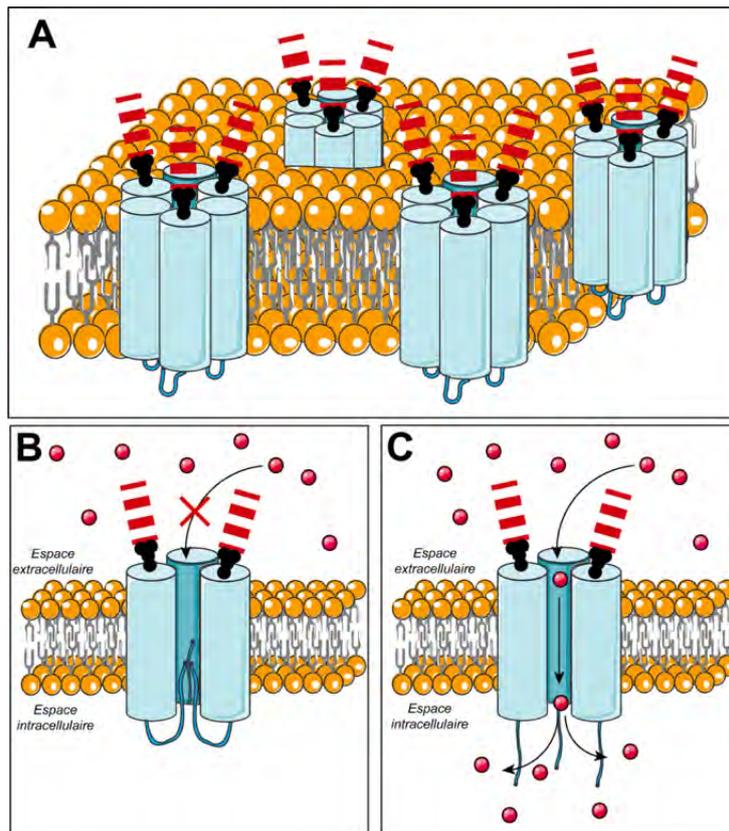


Figure 12 : Régulation de l'ouverture des canaux pannexines.

Les Panx portant des sites de glycosylation sur leur face extracellulaire (A) sont ancrées dans la membrane plasmique et sont très mobiles. En conditions basales, les extrémités C et N-terminales sont repliées à l'intérieur du canal et permettent sa fermeture (B). Lorsque le canal est ouvert (C), les extrémités C et N-terminales restent dans l'espace cytoplasmique et permettent le passage de molécules. Figure redessinée d'après Penuela et al 2014).

1.2. Les connexines

On connaît aujourd'hui vingt-et-une Cxs différentes (Theis et al 2005). Chez la souris, on compte vingt gènes codants pour les Cxs, dix-neuf d'entre eux peuvent être considérés comme orthologues avec les gènes humains.

Au niveau du SNC, tous les types cellulaires expriment des Cxs (Tableau 4). En revanche, on constate que certaines d'entre elles sont plus spécifiquement exprimées par un type cellulaire donné.

Type cellulaire	Cxs exprimées	Cxs prédominantes	Références
Neurones	Cx26, Cx30.1, Cx30.2,	Cx36	(Decrock et al 2015)
	Cx32, Cx36, Cx37, Cx40,		(Willebrords et al 2017)
	Cx50, Cx57		(Xia et al 2018a)
Astrocytes	Cx26, Cx30, Cx40,	Cx30, Cx43	(Contreras et al 2002)
	Cx43, Cx45		(Martinez et al 2002)
			(Sun et al 2005)
			(Willebrords et al 2017)
Microglie	Cx32, Cx36, Cx43	Cx32, Cx36	(Eugenín et al 2001)
			(Decrock et al 2015)
			(Willebrords et al 2017)
			(Dermietzel et al 1989)
Oligodendrocytes	Cx32, Cx39, Cx47	Cx32, Cx39, Cx47	(Micevych & Abelson 1991)
			(Kleopa et al 2004)

Tableau 4 : Distribution cellulaire des différentes isoformes de Cxs exprimées dans le système nerveux central.

Sont indiquées en gras les connexines exprimées par les astrocytes. Tableau adapté et complété d'après Orthmann-Murphy et al 2008 et Xia et al 2018a.

Chaque Cxs est nommée en fonction de son poids moléculaire variant de 20 et 60 KDa. Dans le cerveau, onze Cxs ont été identifiées parmi lesquelles on retrouve les Cx26, Cx29, Cx30, Cx32, Cx36, Cx37, Cx40, Cx43, Cx45, Cx46 et Cx47 (Giaume & Liu 2012). Les astrocytes expriment cinq types de Cxs : La Cx26, Cx30, Cx40, Cx43 et Cx45 (Dermietzel et al 1989, Nagy et al 2004, Nagy et al 2003). En revanche, on observe majoritairement les Cx30 et Cx43 au niveau de ces cellules gliales (Giaume et al 1991a). Ces deux protéines ont des patrons d'expression qui diffèrent. En effet, la Cx30 n'est exprimée qu'à partir de la troisième semaine de développement post-natal (Nagy et al 1999) alors que la Cx43 est exprimée dès les premiers stades embryonnaires (Giaume & Liu 2012). On sait également que l'expression de la Cx43 est trois fois plus importante que celle de la Cx30 dans le cerveau (Kunzelmann et al 1999).

Les Cxs partagent de nombreuses caractéristiques avec les Panx. Ce sont des protéines à quatre domaines transmembranaires (Rackauskas et al 2010), deux boucles extracellulaires et une boucle intracellulaire. De même, les extrémités N- et C-terminales sont cytoplasmiques (Figure 13A). De nombreux sites de modifications post-traductionnelles ont été mis en évidence, notamment de nombreux sites de phosphorylations aux niveaux des extrémités N- et C-terminales et dont le changement de statut a été révélé comme un de mécanismes de régulation d'ouverture/fermeture du canal (Bao et al 2004c).

L'expression cellulaire varie d'une connexine à l'autre, de la même façon que le « cycle de vie » d'une connexine varie en fonction des besoins cellulaires (Oyamada et al 2005, Oyamada et al 2013, Vinken 2016). À l'instar des Panx, après traduction, les Cxs sont

insérées dans la membrane du réticulum endoplasmique puis transportées à l'appareil de Golgi via un système vésiculaire. Assemblées par 6, elles forment un connexon (aussi appelé HC) puis sont acheminées à la membrane plasmique de la cellule où leur fonction est la plus importante. Un HC peut être composé de six mêmes connexines identiques. On parle d'homomère (Figure 13B). En revanche, il peut aussi être composé de Cxs différentes, on parle alors d'hétéromère.

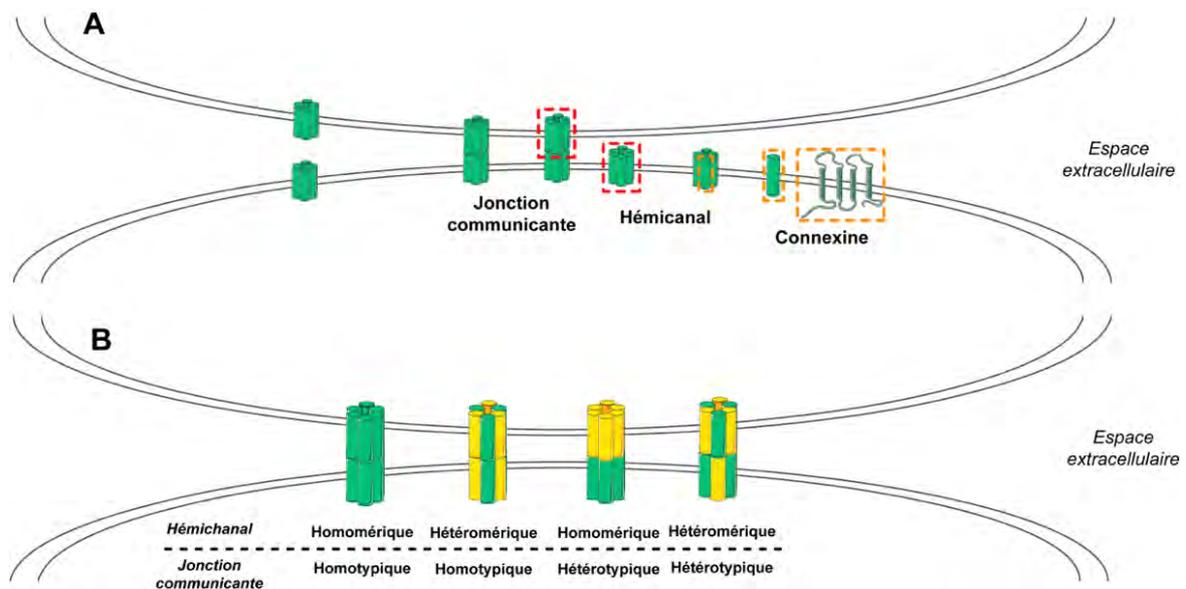


Figure 13 : HC et JC formés par les Cxs.

Six Cxs (cadre jaune) sont nécessaires à la formation d'un hémicanal (HC : cadre rouge). Lorsque deux HC s'assemblent, ils forment une jonction communicante (JC) (A). La figure B représente la diversité des HC et des JC en fonction de la composition en Cxs. Il est important de noter qu'une JC peut être constituée de deux homomères ou de deux hétéromères identiques. On parle de JC homotypique. Si une JC est constituée d'un homomère associé à un hétéromère ou encore de deux hétéromères différents, on parle de JC hétérotypique. Une de leurs particularités est leur regroupement en domaines spécialisés dans la communication intercellulaires : on parle de plaques jonctionnelles. Ces plaques sont composées de plusieurs milliers de canaux intercellulaires permettant une communication plus importante entre deux cellules voisines. Figure redessinée d'après Delvaeye et al 2018.

Les connexines ont une durée de vie courte (une à trois heures pour la Cx43 par exemple) (Beardslee et al 1998, Laird et al 1991). Elles sont donc en permanence recyclées à l'aide du système de lysosome soit par internalisation de la plaque jonctionnelle soit par recyclage d'un HC (Figure 14) (Laird 2006).

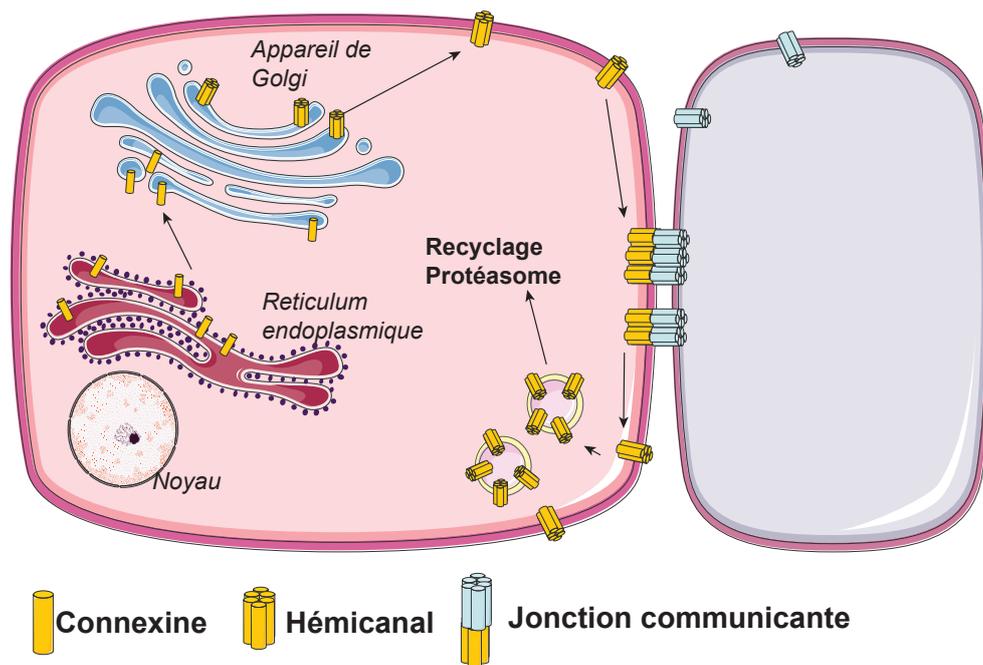


Figure 14 : Représentation schématique et simplifiée du cycle de vie des Cxs.

Une fois traduites dans le réticulum endoplasmique, les Cxs sont adressées à l'appareil de Golgi où elles s'associent en hexamères pour former des HC. Une fois formés ces HC sont adressés à la membrane plasmique et peuvent s'associer (ou non) à d'autres HC situés sur des cellules proches. En fin de vie, ces canaux sont endocytés puis dégradés par le protéasome. Figure adaptée d'après Laird 2006.

Plusieurs études ont mis en avant l'action de sérine-kinases et phosphatases sur les Cxs et plus particulièrement sur la Cx43. Leurs actions post-traductionnelles sur de multiples sites ont permis de mettre en évidence l'importance du processus de phosphorylation/déphosphorylation dans l'assemblage en HC (Thévenin et al 2013) l'adressage à la membrane (Falk et al 2016), l'internalisation ou le recyclage de ces protéines. Ces phosphorylations sont également associées à l'appariement avec des protéines partenaires, nécessaires au fonctionnement des Cxs (Hervé et al 2012). En outre, une étude *in vivo* récente montre chez différents mutants pour des sérines retrouvées à l'extrémité C-terminale, l'incapacité à fixer la protéine ZO-1 (Thévenin et al 2017). Dans cette étude, les auteurs suggèrent que l'appariement Cx43/ZO-1 est nécessaire à l'adressage des Cx43 aux plaques jonctionnelles et au recyclage de ces protéines, apportant un argument supplémentaire en faveur de l'importance des zones de phosphorylations dans le fonctionnement des Cxs.

1.3. Outils d'étude des connexines

Le développement de nouveaux outils génétiques et/ou pharmacologiques, a permis ces dernières années de faciliter l'étude de la fonction des Cxs dans le SNC (pour revue Giaume & Theis 2010).

1.3.1. Outils génétiques

Les modèles de souris transgéniques permettent l'étude des différentes Cxs *in vivo*. Un des avantages à l'utilisation de ces modèles génétiques est l'étude séparée de chacune des connexines dans le SNC. La lignée KO Cx43 présente des malformations cardiaques induisant la mort prématurée des nouveau-nés (Reaume et al 1996), vraisemblablement liée à un dysfonctionnement du couplage des cellules cardiaques via les JC (Naus et al 1997, Scemes et al 1998). De manière intéressante, la double délétion de la Cx43 et de la Cx30 est viable.

L'apparition des techniques d'édition du génome (i.e. Crispr-Cas9, système CRE/lox) a rendu possible le développement de plusieurs lignées de rongeurs transgéniques permettant d'étudier le rôle des Cxs, en ciblant spécifiquement un type cellulaire ou une région cérébrale précise. En effet, le croisement d'une lignée Cx43^{fl/fl} et d'une lignée GFAP-CRE (Recabal et al 2018, Theis et al 2003) ou s100β- CRE (Tanaka et al 2008), permet l'étude de la délétion des Cx43 spécifiquement dans les astrocytes.

Le développement d'outils viraux a également permis l'étude des Cxs au sein de structures particulières. Des ARNi intégrés à des vecteurs viraux permettent l'inactivation locale et durable de l'expression des Cxs et plus particulièrement des Cx30 et Cx43 (Iacobas et al 2008). *In vitro*, il a été démontré que l'utilisation de ces ARNi dirigés contre les Cxs permet une diminution de la prolifération astrocytaire ainsi qu'une diminution de l'assimilation de glucose révélant le rôle des Cx30 et Cx43 dans la physiologie de ces cellules gliales (Herrero-González et al 2009). D'autre part, il a été rapporté une forte régulation des éléments du cytosquelette après l'utilisation d'ARNi dirigés contre les Cxs (Olk et al 2010). Aujourd'hui les outils viraux deviennent de plus en plus performants puisqu'en plus d'une inactivation locale, certains vecteurs proposent un tropisme spécifique. C'est notamment le cas de vecteurs lentiviraux à enveloppe MOKOLA (Colin et al 2009, Merienne et al 2015) ou certains adénovirus (AAV) (Huang et al 2019a, Jollé et al 2019) qui permettent de cibler préférentiellement les astrocytes.

1.3.2. Outils pharmacologiques

De nombreux composés pharmacologiques, administrés de manière systémique ou directement dans le SNC sont disponibles pour l'étude des Cxs *in vitro* et *in vivo* (Tableau 5).

Outils	Cibles	I _{C50} (μ M)	Effets	Références
Bloqueurs mixtes JC & HC				
Octanol	JC et HC Non sélectif des Cxs	n.c.	Inhibe l'activité des récepteurs P2X7	(Suadicani et al 2006)
		122	Bloque les courants Na ²⁺ dépendants	(Bernardini et al 1984) (Dildy-Mayfield et al 1996)
		177	Bloque les courants médiés par les Cx50	(Eskandari et al 2002)
Heptanol	JC et HC Non sélectif des Cxs	10	Inhibe les courants ioniques médiés par les HC	(Bernardini et al 1984) (Dildy-Mayfield et al 1996) (Brokamp et al 2012)
		n.c.	Inhibe l'activité des récepteurs P2X7	(Suadicani et al 2006)
		n.c.	Réduit la conductance des GJ	(Bastiaanse et al 1993)
Halothane	JC Non sélectif des Cxs	n.c.	Bloque les Cx40 et Cx43 à faible concentration	(Mantz et al 1993) (Wentlandt et al 2006) (Bodendiek & Raman 2010)
Acide Glycyréthinique (et dérivés)	JC et HC Non sélectifs des Cxs	n.c.	↘ l'expression Cx43 Inhibe JC et HC	(Long et al 2010) (Bodendiek & Raman 2010)
		2	Inhibe les HC Cx46 et Cx50	(Bruzzone et al 2005) (Bodendiek & Raman 2010)
		n.c.	↘ l'expression Cx43 ↘ la phosphorylation des JC Cx43	(Goldberg et al 1996) (Guan et al 1996)
Carbenoxolone	JC et HC Non sélectifs des Cxs	21	Inhibe HC Cx26	(Ripps et al 2004)
		34	Inhibe les JC Cx38	(Ripps et al 2002)
		n.c.	Inhibe les JC et HC Cx43	(Sun et al 2012)
		n.c.	Reverse ↗ activité HC lié au LPS	(Jeanson et al 2016)
		n.c.	Augmente la recapture de glutamate <i>in vitro</i>	(Takano et al 2018)
INI-0602	Cx32, Cx43	n.c.	Diminue l'expression des Cx32 et Cx43	(Zhang et al 2019)
Quinine (et dérivés)	JC et HC Non sélectifs des Cxs	100	Bloque les HC Cx35, Cx38 et Cx46	(Ripps et al 2002) (Srinivas et al 2001)
		32	Bloque les HC Cx36 et	(Srinivas et al 2001)
		73	Cx50	(Rubinos et al 2012)

Tableau 5 : Tableau récapitulatif des principaux bloqueurs pharmacologiques des Cxs utilisés.
n.c. : non-communicé, JC : jonction communicante ; HC : hémicanal. Tableau adapté et complété d'après Willebrords et al 2017.

Outils	Cibles	IC ₅₀ (μ M)	Effets	Références
Méfloquine	GJ et HC Non sélectifs des Cxs	300	Inhibe les GJ et HC Cx36	(Cruikshank et al 2004)
		1,1	et Cx50	(Srinivas et al 2005)
		n.c.	Inhibe les JC Cx40 et Cx43	(Yamamoto & Suzuki 2008)
		16	Inhibe les HC Cx26 et Cx50	(Levit et al 2015)
THN102	Cx43	18	Bloque les GJ et HC Cx43	(Sauvet et al 2019) (Vodovar et al 2018)
THN212	Cx43	variable	Bloque les HC Cx43	(Picoli et al 2012)
Gap26	HC/GJ, Cx43 (boucle E1)	n.c.	Bloque les JC et HC	(Evans & Boitano 2001) (De Vuyst et al 2006) (De Vuyst et al 2009)
		n.c.	Diminue la libération d'ATP par les HC	(Braet et al 2003) (De Vuyst et al 2009)
		n.c.	Induit un comportement anxio/dépressif (injection dans cortex préfrontal)	(Sun et al 2012)
		n.c.	Bloque les JC et HC	(Evans & Boitano 2001) (Braet et al 2003) (De Vuyst et al 2006) (De Vuyst et al 2009)
Gap27	HC/GJ, Cx32, Cx37, Cx40, Cx43 (Boucle E2)	n.c.	Modifie l'état de phosphorylation de la sérine 268 des Cx43	(Solan & Lampe 2005) (Solan & Lampe 2009)
		n.c.		
Bloqueurs des HC				
Gap19	HC, Cx43 (C-term)	n.c.	Inhibe l'ouverture des HC	(Wang et al 2013) (Abudara et al 2014)
		n.c.	Inhibe la mémoire spatiale à court terme	(Walrave et al 2016)
TAT-L2	HC, Cx43 (boucle intracellulaire)	n.c.	Inhibe l'ouverture des HC	(Seki et al 2004) (Ponsaerts et al 2010)
Anticorps	JC et HC, Cx43	n.c.	<u>Gap13 et Gap15</u> : Inhibe les JC	(Becker et al 1995)
		n.c.	<u>EL186</u> : inhibe les JC	(Meyer et al 1992)
		n.c.	<u>EL2-186</u> : Inhibe les JC et HC	(Hofer & Dermietzel 1998) (Siller-Jackson et al 2008)
	JC, Cx32	n.c.	<u>Des1 et Des 5</u> : Inhibe les JC	(Boitano et al 1998)
		n.c.	<u>Gap9</u> : Inhibe les JC	(Boitano et al 1998)

Tableau 5 (suite) : Tableau récapitulatif des principaux bloqueurs pharmacologiques des Cxs utilisés.
n.c. : non-communicé, JC : jonction communicante ; HC : hémicanal. Tableau adapté et complété d'après
Willebrords et al 2017.

1.3.2.1. Inhibiteurs pharmacologiques

Parmi les molécules les plus utilisées, on retrouve les composés lipophiles qui peuvent bloquer à la fois les JC et les HC, et dont la sélectivité est faible vis-à-vis des différentes isoformes de Cxs (Juszczak & Swiergiel 2009). L'un des plus utilisés en laboratoire est la carbenoxolone (CBX) qui est un dérivé de l'acide glycerrhétic et qui, malgré son activité multi-cible (Tableau 6) est décrit comme un inhibiteur rapide des JC *in vitro* (Blomstrand et al 2004). L'utilisation *in vivo* de ce bloqueur pharmacologique reste aujourd'hui beaucoup moins documentée. En effet, en dépit de son efficacité, cet agent pharmacologique non-sélectif cible toutes les Cxs qu'elles soient astrocytaires ou neuronales (Hervé & Sarrouilhe 2005). Cependant, quelques études montrent que l'utilisation de carbenoxolone *in vivo* induit une diminution de l'activité des JC (Cheung et al 2014, Sun et al 2012) et des HC (Bazzigaluppi et al 2017).

Cible	Type cellulaire	Affinité (IC ₅₀)	Type d'étude	Références
JC	Fibroblastes	n.c	<i>In vitro</i>	(Davidson & Baumgarten 1988) (Davidson et al 1986)
	Cultures primaires d'astrocytes	<50-100 µM	<i>In vitro</i>	(Suadicani et al 2006)
HC	Cultures primaires d'astrocytes	5 µM	<i>In vitro</i>	(Ye et al 2003)
Cx43	Lignée cellulaire PC12	n.c	<i>In vitro</i>	(Zhang et al 2003)
	Cellules 4T-1	n.c	<i>In vitro</i>	(Stoletov et al 2013)
Cx25	Cultures primaires d'astrocytes	n.c	<i>In vitro</i>	(Rana & Dringen 2007)
	Cellules HEK23	n.c	<i>In vitro</i>	(Schalper et al 2008)
	Astrocytes de Rats	n.c	<i>In vivo</i>	(Sun et al 2012)
Cx46	Cellules Jurkat	n.c	<i>In vitro</i>	(Sinyuk et al 2015)
Cx50	Oocytes de xénopes	3 µM (Ki)	<i>In vitro</i>	(Eskandari et al 2002)
Panx1	Oocytes de xénopes	3 µM (Ki)	<i>In vitro</i>	(Eskandari et al 2002)
	Cellules HEK23	5 µM	<i>In vitro</i>	(Bruzzzone et al 2005)
Panx2	Lignées cellulaires d'astrocytes	n.c	<i>In vitro</i>	(Pelegriin & Surprenant 2006)
P2X7	Cellules HEK23	5 µM	<i>In vitro</i>	(Bruzzzone et al 2005)
GR/MR	Cultures primaires d'astrocytes	0,18 µM	<i>In vitro</i>	(Suadicani et al 2006)
	Cellules des glandes surrénales	n.c	<i>Ex vivo</i>	(Souness & Morris 1991) (Souness & Morris 1989)

Tableau 6 : Caractéristiques pharmacologiques de la carbenoxolone CBX.

Plusieurs études (majoritairement *in vitro*) ont montré que la CBX est un agent pharmacologique multi-cible.

Les dérivés de la quinine ou encore la méfloquine sont quant à eux plus sélectifs vis-à-vis des différentes Cxs même si leur action de bloqueurs s'étend à la fois aux JC et aux HC. La quinine a été décrite comme bloqueur des Cx36 et les Cx50, toutes deux exprimées par les neurones (Srinivas et al 2001). Néanmoins, des effets autres que sur les Cxs ont été

rapportés comme le blocage du CYP2D6, connus pour son rôle dans la métabolisation de nombreux médicaments dont les antidépresseurs, les antipsychotiques, les neuroleptiques et les analgésiques (Granvil et al 2002, Lorenc-Koci et al 2004). La méfloquine à elle aussi été décrite comme bloqueur des Cx36 et Cx50 (Cruikshank et al 2004). Cependant, à fortes concentrations (30 μ M), cet agent est capable de bloquer les Cx43 et les Cx32.

L'utilisation de ces composés pharmacologiques a permis de contourner les aléas techniques de lignées génétiquement modifiées décrites précédemment. Néanmoins, malgré une efficacité certaine, leur utilisation thérapeutique reste limitée de par leur faible sélectivité vis-à-vis des différentes isoformes des Cxs (Dhein 2004) et de par leur appartenance à des classes pharmacologiques ayant d'autres effets *in vivo* que le blocage des Cxs comme des effets anti-inflammatoires (Davidson et al 1986, Harks et al 2001). En se focalisant sur trois isoformes humaines, les Cx32, Cx40 et Cx43, Picoli et ses collaborateurs proposent un « screening » novateur permettant d'isoler de nouveaux bloqueurs pharmacologiques des Cxs ayant des effets spécifiquement sur les JC (Picoli et al 2012). Dans cette étude, les auteurs identifient sept nouveaux composés dont le blocage spécifique des JC *in vitro*, est reproductible, sans toxicité et agissant de manière dose dépendante. Dans un « screening » plus récent, la même équipe montre que des agents ciblant les microtubules comme le nocodazole, le paclitaxel ou le docetaxel (utilisés comme traitement de certains cancers) sont de potentiels bloqueurs des Cx43 (Picoli et al 2019).

1.3.2.2. Inhibiteurs mimétiques structuraux

De par leur structure, il est difficile d'inhiber spécifiquement les HC. Toutefois, différents peptides dits mimétiques ont été développés. Ces peptides présentent des séquences identiques aux boucles intra- ou extracellulaires des Cxs et, en se fixant sur la protéine, ils peuvent interférer avec leur fonctionnement. Introduits dans les années 1990, les plus utilisés sont le Gap26 et le Gap27 présentant des séquences homologues avec respectivement la première et seconde boucle extracellulaire. En se fixant sur ces boucles, les peptides mimétiques empêchent l'appariement avec un nouvel HC situé sur une cellule proche (Evans & Boitano 2001, Warner et al 1995). Même si ces peptides ont été décrits comme inhibant les JC (Warner et al 1995), il a néanmoins été démontré que le Gap26 et le Gap27 inhibent les HC en quelques minutes lorsqu'ils sont administrés en fortes concentrations (Matchkov et al 2006). *In vitro*, l'effet de ces peptides révèle une bonne efficacité sur le blocage des HC Cx43 (Ohshima et al 2012, Wang et al 2012). Leur utilisation *in vivo* a par ailleurs permis de révéler l'importance des Cx43 dans la consolidation de la mémoire à la peur dépendante de l'amygdale (Stehberg et al 2012). Cependant, il est important de noter que de nombreuses séquences d'homologies sur les séquences des boucles extracellulaires sont retrouvées sur la plupart des Cxs. En ce sens, le Gap27 initialement décrit comme inhibiteur des HC Cx43 peut aussi inhiber les Cx37,

situées sur les vaisseaux sanguins cérébraux (Martin et al 2005). Des peptides plus spécifiques ont été développés. C'est le cas du Gap19, peptide mimétique de la boucle intracellulaire. Une étude rapporte que l'utilisation de ce peptide *in vivo* permet de bloquer l'activité HC sans pour autant affecter l'activité JC (Abudara et al 2014).

Il est toutefois important de noter que ces peptides mimétiques ne peuvent pas passer la barrière hématoencéphalique. Leur utilisation *in vivo* nécessite donc la mise en place de protocoles proposant leur administration par injection intra-cérébrale.

1.3.2.3. Anticorps spécifiques des HC

Comme décrit ci-dessus, la production d'agents sélectifs d'une forme de Cxs et/ou de la fonction HC reste aujourd'hui un défi.

Les anticorps dirigés contre les Cxs ont principalement été utilisés pour mettre en évidence leur localisation cellulaire (Laird & Revel 1990). Une étude princeps *in vitro* révèle cependant que des anticorps ciblant la deuxième boucle extracellulaire (E2) des Cx43 empêchent la diffusion de colorant au travers des JC (Meyer et al 1992) suggérant que E2 est impliquée dans l'interaction cellulaire et la formation des JC. S'il est par ailleurs difficile de produire des anticorps spécifiques de E2 (en raison de domaines d'homologies avec la première boucle extracellulaire E1), certaines études rapportent l'utilisation de nouveaux anticorps polyclonaux (Hofer & Dermietzel 1998) ou monoclonaux (Baklaushev et al 2009) spécifiques de ce domaine protéique. Plus récemment, une équipe décrit un nouvel anticorps ciblant la boucle E2 (Siller-Jackson et al 2008) sans aucun effet sur les plaques jonctionnelles (Bao et al 2011, Batra et al 2012, Orellana et al 2011c).

Comme pour les peptides mimétiques, ces anticorps ne passent pas la barrière hématoencéphalique rendant leur utilisation thérapeutique limitée pour des pathologies neurologiques ou psychiatriques. Même si par ailleurs de plus amples études *in vivo* sont nécessaires afin de valider ces nouveaux outils, leur utilisation constitue un atout non négligeable pour l'étude de la fonction des Cxs.

1.3.3. *Étude des JC : outils d'étude fonctionnelle*

1.3.3.1. Transfert *in vitro* de sondes colorées /fluorescentes

1) Microinjection

Cette technique fut la première utilisée pour l'étude des JC (Kanno & Loewenstein 1964). Son principe repose sur l'injection intracellulaire, à l'aide d'une micropipette de verre, d'un traceur fluorescent non toxique et non diffusible à travers la membrane plasmique. Si les cellules adjacentes à la cellule microinjectée sont couplées à celle-ci par des canaux jonctionnels, le traceur diffuse à l'intérieur de celles-ci. Le premier traceur utilisé fut la fluorescéine puis le Lucifer Yellow (LY) dont la fluorescence est plus intense.

2) Scrape loading

Cette méthode ressemble à la précédente excepté que le traceur fluorescent n'est pas injecté dans les cellules mais ajouté dans le milieu de culture de cellules adhérentes. Cette monocouche est « rayée » à l'aide d'un scalpel (« scrape »), en présence du traceur afin que celui-ci soit incorporé dans les cellules endommagées (« loading »). La molécule fluorescente peut ensuite diffuser depuis les cellules endommagées vers les cellules intactes adjacentes par les HC (El-Fouly et al 1987).

Ces deux techniques sont aujourd'hui très utilisées pour étudier la fonction des JC (Même et al 2006).

3) Électroporation

Cette technique repose sur une autre approche pour introduire le traceur hydrosoluble dans les cellules (Raptis et al 1994). Les cellules sont cultivées sur une lame de verre dont la moitié est recouverte par un conducteur électrique transparent, l'oxyde d'indium-étain. Une impulsion électrique, en présence de LY, permet l'ouverture des pores membranaires et l'incorporation du traceur dans les cellules cultivées dans la moitié conductrice de la lame. Les cellules cultivées sur la partie non-conductrice ne sont pas perméabilisées puisqu'elles ne reçoivent pas de courant électrique. Le passage du traceur, à travers les JC dans les cellules non perméabilisées, est observé par microscopie à fluorescence (Mitur et al 2003). Pour permettre la quantification de l'activité JC, le nombre de cellules devenues fluorescentes dans la partie non-conductrice est divisé par celui des cellules bordant la partie conductrice de la lame (Raptis et al 2008).

4) Le « Gap-FRAP »

La base de cette technique repose sur le phénomène de recouvrement de la fluorescence après photoblanchiment (Fluorescence Recovering After Photobleaching, FRAP). Les molécules marquées d'une petite région cellulaire sont photoblanchies par un laser puissant et le mouvement des molécules non-photoblanchies peut être suivi dans les membranes plasmiques ou les organelles. La cinétique de retour de fluorescence dans la zone photoblanchie permet de déterminer les constantes de diffusion et la vitesse du flux (Lippincott-Schwartz et al 2001). La technique de Gap-FRAP utilise ces principes pour l'étude de la JC. Le traceur utilisé est lipophile et donc perméable à la membrane plasmique (par exemple la calcéine-AM). Celui-ci est ajouté dans le milieu de culture de cellules adhérentes. Une fois parvenu à l'intérieur des cellules, ce traceur est déestérifié en calcéine non lipophile (622 Da) par des estérases cytoplasmiques permettant sa séquestration intracellulaire (Abbaci et al 2007). Après élimination du traceur en excès par rinçage, une cellule cible est photoblanchie et les cellules adjacentes permettent le transfert du traceur à celle-ci à travers les canaux

jonctionnels. Ce retour de fluorescence dans la cellule cible peut donc être suivi par microscopie à fluorescence et est proportionnel au degré de couplage fonctionnel par jonctions communicantes. Cette technique permet une quantification de la dynamique du retour de la fluorescence en fonction du temps (Délèze et al 2001).

1.3.3.2. Étude des vagues calciques ex vivo

L'augmentation de la concentration cytosolique du Ca^{2+} se propage, comme vu précédemment, de cellule à cellule par des vagues calciques intercellulaires. Ce phénomène permet de mesurer l'activité des JC de manière indirecte. Différentes stimulations (mécaniques, chimiques ou électriques) d'une cellule peuvent augmenter les concentrations calciques du cytosol qui peut diffuser, sous forme de vagues calciques, aux cellules voisines. Ce phénomène est corrélé avec la présence de JC, en absence de Ca^{2+} extracellulaire ou après micro-injection d' IP_3 (Sanderson 1995). Concrètement, les cellules sont chargées avec un traceur fluorescent sensible au Ca^{2+} (par exemple, fura-2 ou fluo-3) et sont ensuite stimulées de manière à générer de l' IP_3 qui passe dans les cellules voisines à travers les JC et permet le largage des stocks calciques intracellulaires. Cette augmentation de la concentration intracellulaire calcique active le traceur qui fluoresce. Ainsi, la quantification de la CIJG sera liée à la fluorescence observée de cellule à cellule.

1.3.3.3. Étude des courants par double patch clamp

Sur tranche de cerveau, la combinaison de techniques d'imagerie et d'électrophysiologie a permis de montrer que la mesure de la conductance était liée au nombre de JC ouvertes entre deux cellules (Wilders & Jongsma 1992). Dans les premières études, chaque cellule de la paire cellulaire était « piquée » de deux microélectrodes permettant des injections et le contrôle de la tension (volt) puis, une seule pipette par cellule fut utilisée (Wilders & Jongsma 1992). Les micropipettes permettent de contrôler les potentiels membranaires de chaque cellule et de mesurer les courants correspondants. Cette mesure de canal unitaire en fait la méthode la plus sensible de quantification des JC (Giaume et al 1991a).

1.3.4. *Étude des HC : « dye uptake »*

Aujourd'hui, l'ouverture des HC a de plus en plus été étudiée notamment dans différentes conditions expérimentales (Bao et al 2004b, Cherian et al 2005, Orellana et al 2011a). Elle repose sur l'incorporation d'un autre colorant, le bromure d'éthidium (EtBr). Une fois capté par les cellules en culture, l'EtBr va s'insérer dans l'ADN. La quantité de fluorescence mesurée sera le reflet de l'ouverture des HC.

L'étude des HC peut elle aussi se faire sur tranches grâce à la technique de patch-clamp. Cependant, la faible résistance membranaire des astrocytes (2-5 M Ω) induit de nombreuses erreurs de mesures puisque l'électrode de stimulation et l'électrode d'enregistrement sont souvent dans la même pipette (Zhou et al 2009). Pour limiter cela, la technique de double patch clamp peut également être appliquée (Ma et al 2014).

L'étude des Cxs astrocytaires est rendue possible grâce à différentes approches génétiques (souris mutantes, shRNA...) et pharmacologiques (inhibiteurs, anticorps, peptides mimétiques). Par ailleurs, différentes techniques ont été développées afin d'évaluer et de dissocier la fonction JC de la fonction HC. La combinaison de ces différents éléments est un atout mais des progrès restent à faire pour appréhender de manière précise, fiable et sélective le rôle des différentes isoformes de Cxs dans des fonctions supérieures contrôlées par le SNC.

2. Rôle des connexines astrocytaires.

La démonstration de l'existence d'une communication astrocytaire a été rendue possible grâce à l'avènement des techniques de microscopie. En particulier, l'utilisation de la microscopie électronique et de la cryofracture a notamment permis la visualisation des JC et des HC et de dissocier leurs rôles respectifs (Lauf et al 2002).

2.1. Les jonctions communicantes (JC)

Comme leur nom l'indique, les JC permettent d'établir une communication entre deux astrocytes voisins et sont perméables à certaines molécules endogènes tel que l'IP₃, les ions calcium Ca²⁺, mais aussi à certains acides aminés (glutamate, aspartate), aux acides nucléiques et à certains métabolites énergétiques (glucose, glucose-6-phosphphate, lactate) (Giaume et al 2001).

2.1.1. JC et transport de glucose

Plusieurs études *in vitro* montrent que les JC sont perméables au glucose (Goldberg et al 2002, Taberbero et al 1996) mais aussi à certains produits de son oxydation comme le glucose-6-phosphate (Taberbero et al 1996) ou le lactate (Taberbero et al 1996). Dans des lignées KO Cx30, KO Cx43 ou double KO Cx30/Cx43, une étude montre une diminution du nombre de cellules couplées révélée par la diminution de la diffusion d'un analogue non-métabolisable et fluorescent du glucose (Rouach et al 2008), apportant une preuve supplémentaire du rôle des JC dans le transfert du glucose d'une cellule astrocytaire à l'autre.

2.1.2. JC et transport de calcium

Comme brièvement décrit dans le chapitre précédent, les astrocytes sont capables de déclencher une réponse synchronisée grâce à la diffusion de vagues calciques (Scemes et al 1998).

Il existe deux méthodes de diffusions :

- La diffusion du second messenger IP_3 qui en diffusant à travers les JC va produire la sortie de calcium du réticulum endoplasmique favorisant une propagation proximale,
- La diffusion de messagers extracellulaires qui permettent la synthèse de novo de $d'IP_3$ et une propagation distale.

La diffusion des vagues calciques par les JC a été la première mise en évidence (Finkbeiner 1992). Dans cette étude, l'octanol ou l'halothane ont montré leur capacité à bloquer la diffusion de ces vagues entre deux astrocytes voisins. L'élargissement de la vague calcique passe par des mécanismes de libération de l'ATP qui, en activant des récepteurs distaux, permet la production de novo d' IP_3 et la libération de Ca^{2+} . Il est important de noter que certains bloqueurs comme la CBX, peuvent bloquer la propagation distale de ces processus, en agissant directement sur les récepteurs à l'ATP P2X7 (Suadicani et al 2006).

Plusieurs études montrent que les vagues calciques peuvent s'étendre jusqu'à environ 200 μm du point d'initiation (Bowser & Khakh 2007, Wang et al 1997). Celles-ci peuvent aussi avoir plusieurs conséquences fonctionnelles comme la libération de gliotransmetteurs (Pellerin & Magistretti 1994), l'assimilation de glucose (Bernardinelli et al 2004) ou le déclenchement de vagues calciques dans les neurones (Nedergaard 1994). Il est également important de noter qu'une signalisation calcique induit une sur-activation des astrocytes et donc une astrogliose réactive potentielle, notamment observable en cas d'inflammation (Strokin et al 2011).

2.1.3. JC et transport des autres ions

Dans une première étude *in vitro*, l'utilisation d'agents fluorescents permettant de suivre les concentrations intracellulaires de Na^+ , montre que la diffusion de ce cation à travers les JC assure l'équilibre des concentrations ioniques. En conditions basales, les auteurs montrent des concentrations similaires dans tous les astrocytes. En revanche, l'utilisation de bloqueurs pharmacologiques des Cxs permet d'observer une augmentation du Na^+ intracellulaire dans 54% des astrocytes apportant un premier argument en faveur du transport des ions par les JC (Rose & Ranson 1997).

L'hypothèse du transport du K^+ d'un astrocyte à un autre a été posée pour la première fois dans les années soixante (Orkand et al 1966). Dans une série d'expériences, Gardner-Medwin montre que l'homéostasie potassique se fait de manière spatiale et dépendante du

temps (Gardner-Medwin 1983a, Gardner-Medwin 1983b, Gardner-Medwin & Nicholson 1983). Néanmoins, dans deux lignées KO Cx30 et KO Cx43, des auteurs révèlent que la diffusion des ions K^+ est seulement médiée à 30% par les JC (Wallraff et al 2006). Ainsi, d'autres mécanismes pourraient être impliqués dans l'homéostasie potassique ouvrant la voie vers de plus amples recherches sur le rôle des JC dans le transport d'ions.

2.2. Les hémicanaux (HC)

Comme décrit précédemment, les HC représentent un canal localisé à la membrane plasmique d'un astrocyte. Même si pendant longtemps leur ouverture n'a jamais été décrite autrement qu'en conformation de JC, il est aujourd'hui admis que ces unités moléculaires possèdent une activité qui leur est propre.

2.2.1. HC et transport du glucose

Une étude montre que les HC formés de Cx43 sont importants dans la détection du glucose et la régulation de la glycémie dans l'hypothalamus (Allard et al 2014). Dans cette étude, les auteurs montrent que les Cx43 sont fortement exprimées dans les astrocytes de l'hypothalamus, notamment au niveau des pieds astrocytaires enveloppant les vaisseaux sanguins. Des résultats similaires ont été observés dans l'hippocampe (Rouach et al 2008) ou le cortex préfrontal (Nagy et al 1999) laissant entrevoir un rôle des HC dans la régulation du glucose. Cependant, l'hypothèse d'une action directe des HC sur l'assimilation du glucose reste à démontrer. Comme premier élément de réponse, une étude montre qu'après une période de jeûne de vingt-quatre heures produisant une diminution de la glycémie, l'expression des Cx43 est fortement réduite (Allard et al 2014).

2.2.2. HC et homéostasie potassique

Le contrôle de l'homéostasie potassique est associé aux canaux Kir4.1. En ce sens, peu d'études révèlent l'implication des Cxs dans le contrôle/maintien des concentrations extracellulaires de K^+ . Néanmoins, une augmentation des courants potassiques chez des souris doubles mutantes KO Cx30/Cx43 a été rapportée (Wallraff et al 2006). Les auteurs montrent sur tranches qu'une stimulation haute fréquence de l'aire CA1 de l'hippocampe, augmente les concentrations extracellulaires de K^+ dans cette région. Par ailleurs, les auteurs proposent que le retour aux concentrations basales, est plus lent dans la lignée double KO en comparaison aux animaux sauvages, laissant penser que les Cx30 et Cx43 sont importantes dans le processus de recapture du K^+ extracellulaire. Ces résultats ont été confirmés quelques années plus tard (Pannasch et al 2011) dans une étude montrant une augmentation des concentrations extracellulaires de potassium et de glutamate dont la recapture par leurs transporteurs respectifs est diminuée.

2.2.3. HC et gliotransmission

Il a été démontré que les Cx43 interviennent dans la libération de glutamate (Orellana et al 2011b), de l'ATP (Kang et al 2008, Orellana et al 2011b) et de la D-sérine (Otte et al 2013) en complément du processus d'exocytose Ca^{2+} -dépendante.

- Cas du glutamate

Il a été montré que la libération de glutamate par les astrocytes est plus élevée dans un milieu de culture dépourvu de cations divalents comparé à des astrocytes cultivés en milieu standard (Ye et al 2003). En utilisant des bloqueurs pharmacologiques des Cxs comme l'octanol ou encore la carbenoxolone, les concentrations extracellulaires de glutamate sont ramenées aux niveaux observés en milieu standard. Ces données suggèrent que la libération de glutamate par les astrocytes par les Cx43 serait indépendante du Ca^{2+} et mobilise les HC. Confirmé par ailleurs (Jiang et al 2011), une exposition au LPS (Abudara et al 2015) ou encore au peptide A β (Orellana et al 2011b) semble également augmenter la libération de glutamate par les HC. Dans cette dernière étude, les auteurs montrent que la libération de glutamate, induite par le peptide A (est inhibée par l'utilisation du peptide mimétique Gap26 mais pas par un bloqueur des HC formés de Panx renforçant l'idée que les Cx43 sont impliquées dans la libération de ce gliotransmetteur. Ces observations ont également été confirmées *in vivo* chez la souris KO Cx43 (Chever et al 2014). En effet, en étudiant les potentiels post-synaptiques excitateurs, les auteurs révèlent une diminution de 30% de la neurotransmission chez les animaux KO en comparaison à des animaux sauvages.

Néanmoins on sait aujourd'hui que les astrocytes ne sont pas les seuls à libérer du glutamate via les HC puisque des cytokines pro-inflammatoires comme le TNF α favorisent ce processus via des canaux formés de Cx32 microgliales (Takeuchi et al 2006). Par ailleurs, des données montrent que les Panx participent à la libération du glutamate dans les synaptosomes corticaux (Di Cesare Mannelli et al 20015) et dans les astrocytes (Wei et al 2016) notamment après l'application d'oxaliplatine.

- Cas de l'ATP/Adénosine

Une première étude datant des années quatre-vingt-dix montre que des cellules non gliales, sur-exprimant la Cx43 assurent une libération d'ATP importante (Cotrina et al 1998). Ces observations ont été validées quelques années plus tard à partir de cultures primaires d'astrocytes dans lesquelles l'activité importante des HC mesurée par la technique de « dye-uptake », corrèle parfaitement avec la libération d'ATP (Stout et al 2002). Plus récemment, l'utilisation des techniques d'imagerie combinées à

l'enregistrement électrophysiologique a permis de valider cette hypothèse (Kang et al 2008).

À l'instar du glutamate, l'ATP peut être libéré par d'autres types cellulaires comme la microglie (Higashi et al 2011, Orellana et al 2013) ou les tanicytes (Lazutkaite et al 2017, Orellana et al 2012). De même, les Panx semblent une fois de plus impliquées dans la libération de cette purine (Garré et al 2016, Suadicani et al 2012) posant la question de l'origine de l'ATP et de la spécificité de son moyen de libération.

- Cas de la D-sérine

Aucune étude ne révèle aujourd'hui le lien direct entre Cx43 et D-sérine. Cependant, il a été montré que le blocage des HC par le TAT-Gap19 dans l'amygdale induit des déficits mnésiques (Stehberg et al 2012) alors que l'injection d'un cocktail de gliotransmetteurs, dont la D-sérine, permet aux animaux de récupérer des performances normales. En revanche, cette étude ne montre pas les effets de l'injection de D-sérine seule. Plus récemment, des données révèlent que la neurotransmission glutamatergique au niveau du cortex préfrontal est dépendante de l'ouverture des HC Cx43 et de la D-sérine libérée par les astrocytes (Meunier et al 2017). Néanmoins comme pour le glutamate ou l'ATP, la libération de D-sérine peut également être associée à l'ouverture des canaux Panx (Pan et al 2015).

Comme les JC, les HC participent activement à la modulation de l'activité neuronale. En effet, ces unités fonctionnelles sont perméables au glucose jouant donc un rôle dans l'homéostasie énergétique et potassique, indiquant leur capacité à moduler l'excitabilité des neurones.

En retour, les HC sont capables de libérer des gliotransmetteurs dans la fente synaptique par un mécanisme différent de l'exocytose. Les Cx30 et Cx43 constitueraient des cibles privilégiées pour moduler cette gliotransmission qui pourrait être perturbée dans certaines conditions pathologiques.

3. Connexines astrocytaires et pathologies

Comme vu précédemment, des altérations morphologiques et fonctionnelles des astrocytes peuvent entraîner des pathologies neurologiques et psychiatriques comme la DM. Par ailleurs, on connaît aujourd'hui quatorze pathologies liées à des mutations sur au moins un des vingt-et-un gènes codant pour les Cxs (Laird 2014). De la dégénérescence oculaire aux douleurs neuropathiques, des altérations de la quantité et/ou de la fonction de ces protéines ont été rapportées (Figure 15) notamment dans la DM (Xia et al 2018a).

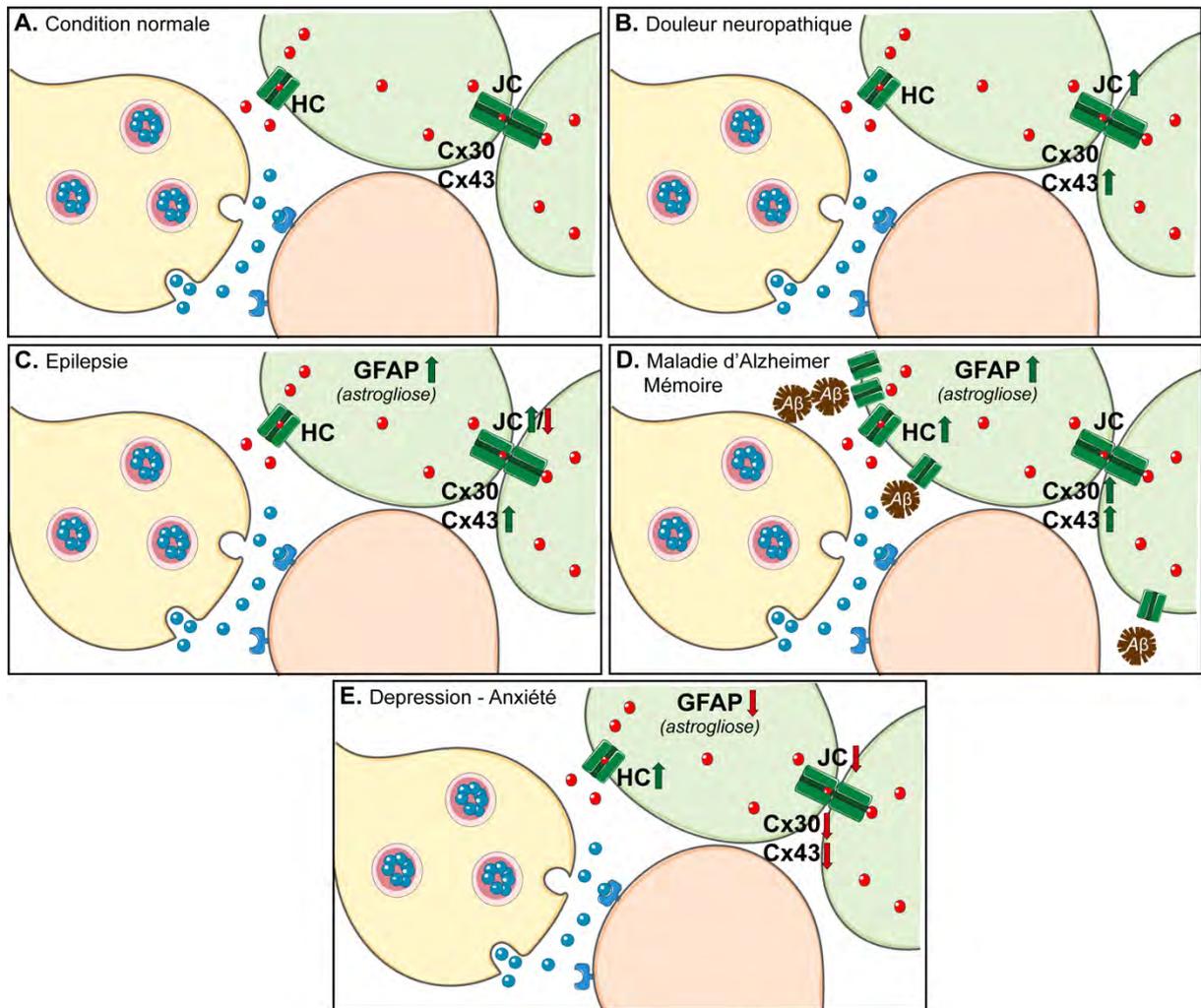


Figure 15 : Altérations des Cxs astrocytaires dans différentes pathologies du système nerveux central. (A) expression et fonction des Cxs dans le cerveau sain. (B-D) Régulation de l'expression et de la fonction des Cxs dans la douleur neuropathique (B), l'épilepsie (C), la maladie d'Alzheimer (D) et la dépression majeure (E). L'augmentation d'expression et/ou de fonction est représentée par les flèches vertes alors que la diminution est représentée par des flèches rouges. Figure redessinée et adaptée d'après [Dossi et al 2018](#).

3.1. Cxs astrocytaires et douleur neuropathique

On sait aujourd'hui que la douleur neuropathique peut résulter de la section d'un nerf. Dans cette pathologie, les astrocytes et la microglie ont montré leur importance ([Mika et al 2013](#)). L'activation de la microglie en réponse à ce type de section entraîne la libération de molécules pro-inflammatoires (comme le $TNF\alpha$, ou les $IL-1\beta$ et $IL-6$) responsables de l'activation des astrocytes et de la mise en place d'une astroglie réactive ([Ji et al 2013](#)). Néanmoins, il est important de noter que l'activation astrocytaire ne dépend pas uniquement de la microglie puisque dans un modèle murin d'inhibition de la microglie, la quantité d'astrocytes réactifs est la même après ligature du nerf sciatique ([Vallejo et al 2010](#)).

L'implication des Cxs et plus particulièrement des Cx43 dans cette pathologie, a été rapportée dans plusieurs études précliniques ([Chen et al 2014a](#), [Lee et al 2005](#), [O'Carroll](#)

et al 2013b, Rohlmann et al 1993, Yoon et al 2013). Menées dans les années quatre-vingt-dix à partir d'un modèle de section du nerf facial gauche, des auteurs révèlent une surexpression des Cx43 observable dès trente minutes après la section du nerf (Rohlmann et al 1994). En accord avec ces résultats, une étude plus récente montre qu'après ligature du nerf sciatique (Chen et al 2014a), l'expression des Cx43 est augmentée dans la moelle épinière dix jours après section du nerf. Dans cette même étude, l'utilisation de peptides mimétiques comme le Gap26, Gap27 ou encore des bloqueurs pharmacologiques comme la carbenoxolone permettent (i) de réduire le seuil de douleur, (ii) d'augmenter la fréquence des potentiels post-synaptiques excitateurs de la moelle épinière et (iii) de réduire la libération de CXCL1, une chimiokine pro-inflammatoire. Néanmoins, la surexpression des Cx43 suite à la ligature du nerf sciatique reste controversée puisque plusieurs études mettent en évidence, au contraire, une diminution d'expression (Morioka et al 2018, Morioka et al 2015, Zhang et al 2015a). Suite à l'injection d'oxaliplatine (Tonkin et al 2018), de bortezomine (Morioka et al 2018) ou encore à la section de la moelle épinière (Choi et al 2016), une augmentation de l'expression des Cx43 a été détectée dans la moelle épinière.

Dans des modèles plus centraux de douleur, l'inhibition de l'expression des Cx30 et Cx43 dans la moelle épinière prévient l'hyperalgésie induite par la chaleur (Chen et al 2012). De manière intéressante, l'inhibition des deux Cxs est nécessaire pour obtenir ces effets analgésiques. Ces résultats ont été confirmés par des approches génétiques et pharmacologiques montrant que le blocage des Cxs par des ARNi (Dorn et al 2000), les peptides mimétiques (Choi et al 2016) ou par la CBX (Yang et al 2018) réduit les signes de douleurs dans ces différents modèles. Par ailleurs, dans un modèle de ligature du nerf sciatique, l'amitriptyline exerce des effets analgésiques pouvant être potentialisés lorsque ce TCA est administré en combinaison avec un bloqueur des Cxs (Jeanson et al 2016). En effet, dans un test de nociception basé sur l'application de pressions de plus en plus fortes sur les pattes de rats, alors qu'un traitement aigu n'a aucun effet, un traitement chronique (quatorze jours) à l'amitriptyline augmente le seuil de douleur. Cette réponse est encore plus élevée en présence de méfloquine. Si la diminution d'expression des Cx43, la perte d'activité JC et l'augmentation du seuil de douleur semble exacerbée par cette association médicamenteuse, il reste à déterminer s'il existe réellement un lien causal entre ces différentes observations moléculaires et comportementales.

3.2. Cxs astrocytaires et épilepsie

Il existe plusieurs formes d'épilepsies dont la principale est l'épilepsie du lobe temporal. Elle se caractérise par une activité neuronale anormalement élevée et même si son apparition et son développement ont été initialement attribués aux neurones, l'implication des astrocytes est aujourd'hui étudiée (Tian et al 2005). En particulier, plusieurs études

montrent des altérations d'expression et de fonction de nombreux canaux et récepteurs astrocytaires, appuyant le rôle important de ces cellules gliales dans l'épilepsie.

L'implication des Cxs dans l'épilepsie est possible et fait l'objet d'études approfondies. Leur capacité à capter le glutamate (Malarkey & Parpura 2008, Ye et al 2003) ou les ions K⁺ (Walz 2000) leur confère un rôle potentiellement antiépileptique alors que leur capacité à libérer du glucose (Rouach et al 2008) ou des gliotransmetteurs tels que le glutamate (Angulo et al 2004) ou l'ATP (Rassendren & Audinat 2016) leur confère, au contraire, un rôle pro-épileptique.

Chez l'Homme, plusieurs études *post-mortem* se sont intéressées à l'expression des Cx43 dans l'épilepsie et ont montré une augmentation de l'expression de ces protéines dans le cortex aussi bien au niveau de l'ARNm (Naus et al 1991) qu'au niveau protéique (Collignon et al 2006). En revanche, il semble que l'implication des Cx43 dépende du degré de l'épilepsie puisqu'aucune modification d'expression n'est observée chez des patients souffrant de formes d'épilepsie modérées (Elisevich et al 1997). Une étude plus récente montre une diminution du nombre de cellules connectées entre elles dans l'hippocampe de patients épileptiques (Bedner et al 2015). Une autre étude montre à la fois chez des patients épileptiques et chez des souris modèles d'épilepsie, une diminution de la fonction JC liée à une augmentation de la phosphorylation des Cx43. En effet, alors que l'expression de ces protéines est augmentée dans l'hippocampe de patients épileptiques, le nombre de protéines à la membrane est le même en comparaison à des patients contrôles. Les auteurs proposent que la formation de JC soit réduite chez les patients épileptiques, en raison d'une augmentation de son degré de phosphorylation (Deshpande et al 2017).

Dans des modèles murins d'épilepsie basés sur l'administration chronique de kainate, l'étude de l'expression de la Cx43 a conduit à des résultats contradictoires puisque certaines études montrent une augmentation de l'expression des Cx43 dans l'hippocampe (Takahashi et al 2010), d'autres montrent une diminution (Condorelli et al 2003) ou encore aucun effet (Söhl et al 2000). D'autres modèles comme le modèle de stimulation de l'amygdale (Elisevich et al 1997) ou le modèle d'induction au lithium (Su & Tong 2010) révèlent également des données ne permettant pas d'apporter de conclusions définitives quant au rôle de ces protéines dans l'épilepsie. Il est possible que le choix du modèle soit un critère majeur dans l'identification du rôle des Cx43 dans ce type de troubles neurologiques.

Plusieurs traitements existent pour traiter l'épilepsie et certains d'entre eux ciblent les cellules gliales (Baulac & Pitkänen 2009). Néanmoins, l'utilisation de lignées KO (Nielsen et al 2017) ou de bloqueurs pharmacologiques des Cxs (Willebrords et al 2017) a conduit à des résultats difficilement interprétables (Carlen 2012) puisque des mécanismes de compensations associés à la faible sélectivité des molécules utilisées ne permettent pas d'étudier précisément le rôle des HC ou des JC dans la physiopathologie de l'épilepsie. Une

étude récente s'est toutefois intéressée au rôle des HC dans l'épilepsie en utilisant le peptide mimétique TAT-Gap19 (Abudara et al 2014). L'enregistrement électrophysiologique montre une diminution de l'activité épileptiforme induite par la pilocarpine après l'injection de TAT-Gap19 dans l'hippocampe (Walrave et al 2018). De manière intéressante, cette même étude montre une diminution des concentrations extracellulaires de D-sérine dans l'hippocampe, suggérant un rôle pro-épileptique de ce gliotransmetteur dont la libération serait, du moins en partie, sous le contrôle des Cxs.

3.3. Cxs astrocytaires et maladies d'Alzheimer

La maladie d'Alzheimer (MA) est la maladie neurodégénérative la plus répandue dans le monde. Cette pathologie se caractérise par la formation de plaques séniles extracellulaires, composées de peptides amyloïde- β ($A\beta$) et d'agrégats intracellulaires formés par la phosphorylation anormale de la protéine Tau (pour revue Querfurth & LaFerla 2010).

L'astrogliose réactive observée dans la MA est aujourd'hui reconnue comme étant une caractéristique clinique de la maladie mais les causes restent à déterminer. Dans une étude *in vitro*, l'application d'A (sur des cultures d'astrocytes montre que ce peptide induit une augmentation de l'expression de la GFAP, accompagnée de modifications morphologiques comme un corps cellulaire plus gros par exemple (DeWitt et al 1998), suggérant une origine amyloïde de l'activation astrocytaire. Concernant les Cxs, une étude *post-mortem* révèle une augmentation de la présence de Cx43 aux alentours des plaques d' $A\beta$ (Nagy et al 1996) laissant entrevoir un rôle de ces protéines dans la clairance et/ou le développement des plaques séniles. Cette hypothèse a été confirmée dans une étude montrant une augmentation des Cx43 dans une large cohorte de patients souffrant de la MA (Kajiwara et al 2018). Dans cette analyse, le gène *GJA1* (codant pour la Cx43) semble surexprimé dans plusieurs régions cérébrales et corrèle avec l'expression de nombreux gènes connus pour être impliqués dans la MA.

Des observations similaires ont été faites à partir de modèles animaux de la MA. Par exemple, une lignée porteuse d'une mutation sur le gène du précurseur amyloïde APP (lignée APP/PS1) connue pour présenter les mêmes symptômes que la pathologie humaine (Clark et al 1995, Sherrington et al 1995), montre une surexpression des Cx43 particulièrement aux alentours des plaques d' $A\beta$ (Mei et al 2010), associée à une augmentation de l'activité des HC (Yi et al 2016). En accord avec ces données, l'inhibition pharmacologique des Cx43 et plus particulièrement des HC permet une réduction du stress oxydatif, du nombre de neurites dystrophiques (Yi et al 2017) mais aussi d'améliorer les altérations cognitives observées dans la pathologie (Ren et al 2018). De manière intéressante, le blocage des HC ne semble pas influencer la densité de plaques amyloïdes suggérant un lien indirect entre les astrocytes et l'aspect amyloïde de la MA.

Concernant les symptômes de la MA, Il a été démontré que le blocage des HC réduit la mémoire à court terme sans altérer la mémoire spatiale (Walrave et al 2016). Dans le test de labyrinthe en « Y », l'injection de TAT-Gap19 n'affecte ni le nombre ni l'alternance des visites des différents bras, montrant que le TAT-Gap19 est sans effet sur la mémoire de travail. Néanmoins, dans une version où un des bras est ouvert après un certain délai, l'injection intra-cérébro-ventriculaire du peptide mimétique entraîne une diminution du temps passé dans le nouveau bras, semblable à ce qui est observé après injection de scopolamine connue pour provoquer des déficits mnésiques. Ces observations laissent entrevoir une perturbation de la mémoire à court terme après le blocage des HC. Une confirmation dans un modèle animal de la MA reste toutefois nécessaire. Il est intéressant de noter qu'un traitement aux canabinoïdes prévient l'ouverture des HC induite par l'A (sur astrocytes en culture (Gajardo-Gómez et al 2017)). Dans la même étude, les auteurs proposent que les canabinoïdes préviennent l'augmentation des courants électriques, possiblement sous-tendus par les Cx43, mesurés en patch clamp sur tranches d'hippocampe. En accord avec ces résultats, une étude *in vitro* montre sur des cultures primaires d'astrocytes issues de souris KO Cx43, que la libération d'espèces réactives de l'oxygène (ROS), marque d'un fort stress oxydatif, est réduite en comparaison à des astrocytes issus d'animaux WT (Ye et al 2015). Dans la même idée, le blocage des Cxs avec la carbenoxolone rétablit un niveau basal de ROS, produites en grandes quantités après un traitement à l'A β (Sharma et al 2019). Ces observations ont été retrouvées dans plusieurs régions du cerveau comme l'hippocampe, le cortex préfrontal, le striatum ou encore le cervelet. De manière remarquable, cette étude montre qu'un traitement chronique (six semaines) à la carbenoxolone réduit également le phénotype anxieux induit par l'A (suggérant l'implication des Cxs dans d'autres pathologies comme l'anxiété ou la dépression).

3.4. Cxs astrocytaires et maladie psychiatrique

3.4.1. Exemple des troubles anxio/dépressifs

Comme décrit précédemment, plusieurs anomalies astrocytaires ont été rapportées dans la dépression notamment une diminution du nombre d'astrocytes (Cotter et al 2001, Öngür et al 1998) ou d'expression de plusieurs marqueurs astrocytaires comme la GFAP, les transporteurs au glutamate GLT-1 & 2 mais aussi des gènes codant les Cx30 et Cx43 (Nagy et al 2015). Ces derniers résultats sont notamment en accord avec des études cliniques antérieures rapportant une diminution de l'expression des Cx43 dans le cortex préfrontal (Ernst et al 2011), le locus coeruleus (Bernard et al 2011), le cortex orbitofrontal (Miguel-Hidalgo et al 2014) et l'hippocampe (Medina et al 2016) de patients suicidés. De même, des agents pharmacologiques connus pour inhiber les Cxs astrocytaires comme la

méfloquine, induiraient des effets pro-dépresseurs (Meier et al 2004) et des tendances suicidaires plus importantes chez les patients souffrants de DM (Nevin 2012).

L'utilisation de modèles *in vitro* apporte des résultats cohérents avec ces données cliniques (Tableau 7). Par exemple, une étude *in vitro* indique que l'incubation de cultures primaires d'astrocytes corticaux et d'hippocampe, avec des doses croissantes de CORT induit la diminution de l'expression de Cx43, associée à une diminution de la diffusion de LY suggérant la perte de fonction des JC (Xia et al 2018b). Ce résultat n'est pas limité aux modèles *in vitro*. En effet, l'inactivation des Cx43 spécifiquement dans les astrocytes induit une augmentation de la locomotion et une diminution du comportement d'anxiété mesuré dans le test de champ ouvert (Frisch et al 2003). Néanmoins, il a été démontré qu'une inactivation des Cx30 dans les astrocytes induit, à l'inverse, une augmentation du comportement anxieux mesuré dans le test de champ ouvert (Dere et al 2003). Ainsi, les deux sous-types de Cxs seraient impliqués dans les comportements liés au stress et à l'anxiété mais de manière opposée. Outre ces modifications spontanées du comportement, différentes études ont porté sur le rôle des Cxs en conditions pathologiques.

Dans un modèle de défaite sociale chez la souris, Huang et ses collaborateurs montrent une diminution de l'expression des Cx30 et Cx43, associée à une diminution de la fréquence des potentiels post-synaptiques excitateurs dans le cortex préfrontal et l'hippocampe (Huang et al 2019a). Ces résultats sont confirmés par l'utilisation de shRNA injectés directement dans le cortex préfrontal et l'hippocampe. À l'inverse, en sur-exprimant les Cx30 et Cx43 dans les astrocytes de ces deux régions, les auteurs montrent une augmentation des potentiels post-synaptiques excitateurs accompagnée d'une amélioration des comportements pro-dépresseurs induit par le stress. En accord avec ces données, Sun et ses collaborateurs montraient une diminution d'expression des Cx43 et de la fonction JC chez des rats soumis au modèle de stress chroniques imprévisibles, (Sun et al 2012). En parallèle de ces perturbations, les auteurs observaient une anhédonie et un niveau d'anxiété élevé. Un tel phénotype a également été observé suite à l'injection intra-corticale de peptides mimétiques. Cependant, un stress chronique de contention ne semble pas altérer l'expression des Cx43 (Orellana et al 2015).

Modèle	Tissus ou type cellulaire	Effets	Références
Études cliniques			
Patients suicidés	Tranches <i>post-mortem</i>	↘ Cx30 et Cx43 dans le cortex préfrontal	(Ernst et al 2011)
Patients déprimés et suicidés	Tissus congelés	↗ méthylation des gènes GJB6 (Cx30) et GJA1 (Cx43)	(Nagy et al 2015)
Patients déprimés et suicidés	Tissus congelés	↘ ARNm codant pour Cx30 et Cx43	(Medina et al 2016)
Patients déprimés et suicidés	Tissus <i>post-mortem</i>	↘ Cx43 dans le cortex préfrontal	(Miguel-Hidalgo et al 2014)
Patients déprimés	Tissus <i>post-mortem</i>	↘ Cx43 dans le Locus Coeruleus	(Bernard et al 2011)
Études pré-cliniques			
Stress Chroniques Imprévisibles	Cultures primaires d'astrocytes	↘ Cx43	(Sun et al 2012)
Stress de contention	Coupes de cerveaux	↘ JC et HC = Cx43 ↗ HC	(Orellana et al 2015)
	Extraits protéiques (rat)	↗ translocation des Cx43 à la membrane	(Unuma et al 2010)
Exposition chronique à la CORT	Extraits protéiques (souris)	↗ phosphorylation des Cx43 dans l'hippocampe	(Quesseveur, Portal et al 2015)
	Coupes de cerveaux	↗ phosphorylation des Cx43 dans le cortex préfrontal et l'hippocampe ↘ GJ dans le cortex préfrontal et l'hippocampe	(Xia et al 2018b)
	Coupes de cerveaux	↘ JC et HC dans le cortex préfrontal et hippocampe	(Xia et al 2017)
CORT	Cultures mixtes	↘ Cx43	(Miguel-Hidalgo et al 2019)

Tableau 7 : Niveaux d'expression et statut fonctionnel des connexines chez des patients déprimés et dans plusieurs modèles murins de dépression basés sur différentes procédures de stress chronique

D'après ces travaux, il semble donc évident que les Cxs astrocytaires participent à la régulation de la réponse au stress et très vraisemblablement aux troubles anxio/dépressifs. Différentes hypothèses peuvent être avancées pour tenter d'expliquer ces liens. Tout d'abord, la possibilité que la manipulation génétique ou pharmacologique influence l'activité des systèmes monoaminergiques est une piste qui mérite d'être explorée. Toutefois, peu d'études s'intéressent aux effets des Cxs astrocytaires sur les neurones 5-HT, NA ou DA. Quelques travaux, en revanche, portent sur l'influence des monoamines sur les Cxs. Une étude princeps montrait dans les années quatre-vingt-dix que l'application de NA sur des cultures d'astrocytes induit une diminution de la diffusion de LY (Glaume et al 1991b) témoignant d'une diminution de l'activité JC. Plus récemment, des auteurs apportent un complément d'information en montrant que la NA augmente la phosphorylation de la Cx43 sans modifier le niveau d'expression de la protéine totale (Nuriya et al 2018). Il est possible que cette phosphorylation induise une diminution de la perméabilité des Cxs et une dissociation des JC (Bao et al 2004c, Lampe et al 2000).

L'hypothèse d'un effet des Cxs sur la neurogenèse hippocampique adulte représente une autre piste pertinente qui a fait l'objet de différents travaux. Alors que la production de nouveaux neurones dans cette région est cruciale dans l'apparition d'un comportement antidépresseur/anxiolytique (Tunc-Ozcan et al 2019), il a été montré que les Cxs astrocytaires sont exprimées dans les cellules-souches de la zone sous-granulaire du gyrus denté de l'hippocampe (Kunze et al 2009). Des souris privées des Cx30 ou Cx43 présentent une diminution drastique des cellules-souches ainsi que des neurones néoformés (Kunze et al 2009). Un travail plus récent (Liebmann et al 2013) suggère un rôle distinct des Cx30 et Cx43 sur le processus de neurogenèse hippocampique puisque l'ablation des Cx43 chez la souris induit une diminution de la prolifération et de la survie des néo-neurones alors que celle des Cx30 produit des effets opposés. En accord avec ces derniers résultats, une diminution de l'activité proliférative et neurogénique a été observée chez des souris mutantes présentant une mutation ponctuelle de la Cx43 (Cx43G138R) (Zhang et al 2018). Une hypothèse séduisante concernant le rôle des Cx43 dans la dépression a récemment été avancée. Deux études menées par Miguel-Hidalgo et ses collaborateurs montrent que l'application de CORT sur cultures mixtes d'astrocytes et d'oligodendrocytes (Miguel-Hidalgo et al 2019) ou l'injection de cette hormone chez le rat (Miguel-Hidalgo et al 2018) entraîne non seulement une réduction de l'expression des Cx43 dans des astrocytes mais aussi de la production de la myéline par les oligodendrocytes. Ainsi, il a été proposé que la perte des Cx43 puisse altérer le processus de myélinisation dont on connaît aujourd'hui l'importance dans la DM (Edgar & Sibille 2012, Edgar et al 2011).

Enfin, la relation entre les Cxs astrocytaires et l'inflammation se précise (Dantzer et al 2008). On sait par exemple qu'une exposition chronique à la CORT induit une forte astroglie réactive (Ghaemi et al 2018) et une forte inflammation (Mendez-David et al

2017a, Mendez-David et al 2015) responsables de comportements anxio/dépressifs. Or il a été montré que cette neuro-inflammation favorisait l'augmentation de l'expression des Cx43 (O'Carroll et al 2013a, Pekny & Nilsson 2005) et l'ouverture des HC dans l'hippocampe (Abudara et al 2014, Orellana et al 2015) permettant la libération de gliotransmetteurs comme l'ATP et le glutamate (Stout et al 2002, Ye et al 2003) en quantité neurotoxique.

Le stress chronique et plus généralement la DM provoque des altérations dans l'expression et la fonction des connexines. Ces dernières sont impliquées dans de nombreuses fonctions connues pour favoriser l'apparition de symptômes anxio/dépressifs tels que l'atténuation des processus de neurogenèse hippocampique ou de myélinisation ou encore l'activation de processus pro-inflammatoires. Selon les causes de la pathologie le rôle des Cxs pourrait s'avérer différent, parfois neuro-protecteurs, parfois neurotoxique en lien avec des modifications des JC et/ou des HC.

3.4.2. Effets des antidépresseurs sur les connexines astrocytaires

Certaines données expérimentales démontrent que les antidépresseurs régulent l'expression des Cxs et probablement leurs fonctions (Tableau 8).

In vitro, plusieurs études mettent en évidence que l'application de différentes classes d'antidépresseurs augmente l'expression des Cx43. Ces observations ont été rapportées avec la fluoxétine (Mostafavi et al 2014), l'amitriptyline, la clomipramine ou la fluvoxamine (Morioka et al 2014). À ce jour, aucun effet de ces molécules n'a été rapporté sur l'expression des Cx30.

En accord avec ces observations, un traitement chronique à la fluoxétine (20 mg/kg pendant vingt-et-un jours) induit une augmentation de l'expression de la Cx43 dans le cortex préfrontal de rats (Fatemi et al 2008). De la même façon, le même traitement chronique à la fluoxétine (10 mg/kg pendant vingt-et-un jours) ou la duloxétine (10 mg/kg pendant vingt-et-un jours) prévient la diminution d'expression des Cx43 induite par le stress chronique imprévisible (Sun et al 2012). Cependant, les effets de ces antidépresseurs sur l'expression des Cxs, en particulier ceux de l'amitriptyline, ne semblent pas liés à l'activité de blocage de recapture des monoamines (Morioka et al 2014). En effet, en utilisant la technique de western blot, les auteurs montrent que les effets de l'amitriptyline sur l'expression des Cx43 passent par une cascade de phosphorylations entraînant l'activation de la voie de signalisation des MAP kinases. En somme, une modification de l'expression des Cx43 par certains antidépresseurs laisse entrevoir la possibilité d'une modulation de l'activité des JC et/ou des HC.

Antidépresseur	Classe	Dose	Tissus Type cellulaire	Effet	Références
Fluoxétine	ISRS	10µM	Cultures primaires d'astrocytes corticaux (souris)	↗ expression facteur neurotrophiques ↗ libération de lactate	(Allaman et al 2011)
		10-30 µg/ml	Cultures d'astrocytes	↗ Cx43	(Mostafavi et al 2014)
		10 µM 24h	Cultures primaires d'astrocytes	↗ JC	(Jeanson et al 2017)
		15 mg/kg 28 jours	Coupes d'hippocampe	↘ cellules GFAP+	(Czéh et al 2006)
		10 mg/kg 14 jours	Hippocampe (souris)	↗ GLT-1 et GLT-2	(Zink et al 2010)
		10 mg/kg 21 jours	Cortex préfrontal (rat)	↗ Cx43	(Fatemi et al 2008)
		10 mg/kg	Cortex préfrontal (rat)	↗ Cx43 ↗ JC	(Sun et al 2012)
		18 mg/kg	Hippocampe (souris)	↘ phosphorylation de Cx43	(Quesseveur, Portal et al 2015)
		0-20 µM 10 jours	Cultures d'astrocytes corticaux (souris)	↘ nombre de cellules GFAP+	(Cho et al 2010)
		Amitriptyline	TCA	25 µM 1-12h	Cultures d'astrocytes corticaux (souris)
25 µM 1-48h	Cultures cellulaires			↗ expression de GDNF	(Hisaoaka et al 2007)
25 µM 48h	Cultures d'astrocytes corticaux (souris)			↘ HC	(Jeanson et al 2017)

Tableau 8 : Effets de différents antidépresseurs sur l'anatomie et la fonction des astrocytes et des Cxs astrocytaires.

Tableau adapté et complété d'après Xia et al 2018a.

Antidépresseur	Classe	Dose	Tissus Type cellulaire	Effet	Références
		0-20 μ M 10 jours	Cultures d'astrocytes	↘ nombre de cellules GFAP+	(Cho et al 2010)
Clomipramine	TCA	10 μ M 48h	Cultures d'astrocytes	Réverse la diminution du nombre de cellules GFAP+ induite par le stress	(Liu et al 2009)
		5 mg/kg 21 jours	Hippocampe (rat)	↗ Cx43	(Jeanson et al 2017)
Venlafaxine	ISRN	5 μ m 24 heures	Cultures d'astrocytes	↘ JC et HC	(Jeanson et al 2017)

Tableau 8 (suite) : Effets de différents antidépresseurs sur l'anatomie et la fonction des astrocytes et des Cxs astrocytaires.

Tableau adapté et complété d'après Xia et al 2018a.

3.4.2.1. Antidépresseurs et JC

Une première étude montre que l'amitriptyline appliquée sur des cultures primaires d'astrocytes corticaux, augmente la diffusion de LY, indiquant une augmentation de l'activité JC (Morioka et al 2014). Ces données ont néanmoins été remises en question puisqu'une inhibition de l'activité JC suite à l'application de ce même antidépresseur sur des cultures primaires d'astrocytes a été observée (Jeanson et al 2017). De manière intéressante, la combinaison amitriptyline et mifloquine accentue encore plus l'effet de l'amitriptyline sur l'activité JC puisque la combinaison diminue la diffusion de LY sur des cultures primaires d'astrocytes (Jeanson et al 2016). Jeanson et ses collaborateurs montrent par ailleurs une diminution de l'activité JC avec la fluoxétine et la venlafaxine, alors que la paroxétine favorise cette fonction. L'imipramine, la réboxétine et la duloxétine restent sans effets. À la lumière de ces résultats, il apparaît primordial de déterminer l'effet des différentes classes des antidépresseurs et même des différents antidépresseurs au sein d'une même classe, sur la fonction des Cxs astrocytaires *in vivo*. Même si Sun et ses collaborateurs rapportent que la fluoxétine restaure l'activité JC corticales dans le modèle de stress chroniques imprévisibles (Sun et al 2012), ces travaux doivent être complétés à partir d'autres modèles murins de dépression et d'autres régions cérébrales. De manière intéressante, la kétamine (300 μ M) a révélé avoir des effets inhibiteurs sur l'activité JC sur des cultures primaires d'astrocytes. Cette inhibition reste tout de même plus faible qu'avec un antidépresseur classique (Liu et al 2016).

3.4.2.2. Antidépresseurs et HC

Peu d'études se sont intéressées aux effets des antidépresseurs sur la fonction HC. *In vitro*, l'incubation de cultures primaires d'astrocytes avec du LPS augmente l'activité des HC. La carbenoxolone bloque les effets du LPS et réduit l'ouverture des HC (Jeanson et al 2017). Dans cette étude, les auteurs montrent que toutes les classes d'antidépresseurs ont des effets comparables à ce bloqueur des Cxs mais aucune différence n'est observée entre les différentes classes d'antidépresseurs. Si on s'intéresse aux TCA, la même équipe montre qu'un traitement combiné amitriptyline et méfloquine présente les mêmes effets qu'un traitement à l'amitriptyline seule (Jeanson et al 2016). Comme pour la fonction JC, une confirmation *in vivo* est néanmoins nécessaire afin de mieux comprendre le rôle des antidépresseurs sur les HC en conditions basales et pathologiques.

Les antidépresseurs monoaminergiques corrigent les altérations observées après un stress chronique sur l'expression et la fonction des connexines astrocytaires.

In vitro ou in vivo, les effets des antidépresseurs semblent différents selon la classe pharmacologique sur la fonction JC alors que toutes les classes ont des effets comparables sur la fonction HC.

L'ensemble des observations décrites dans cette introduction bibliographique apportent des arguments en faveur de l'aspect multimodal de la dépression. En considérant les multiples fonctions astrocytaires au sein de la synapse tripartite, ces données montrent que la physiopathologie de la dépression s'étend au-delà des systèmes monoaminergiques faisant de la dépression, une pathologie reposant également sur des mécanismes non-neuronaux. L'hypothèse d'une balance fonctionnelle entre les JC et les HC a été soulevée (Xia et al 2018a). Alors que la fonction JC semble atténuée en conditions de stress, une augmentation de l'activité HC est également observée (Orellana et al 2015).

Cette augmentation de l'activité des HC constitués de Cx30 et Cx43 suite à un stress chronique pose la question du rôle des gliotransmetteurs dans la physiologie de la synapse et la régulation des comportements anxio/dépressifs. Bien que des études pharmacologiques avec des antidépresseurs ont montré une atténuation de l'activité HC, des études *in vivo* plus poussées sont nécessaires afin de mieux comprendre l'activité des Cx30 et Cx43 en conditions pathologiques ainsi que l'action des antidépresseurs sur l'expression et la fonction de ces protéines.

OBJECTIFS

À la lumière de ces informations, nous avons émis l'hypothèse qu'un blocage des connexines dans l'hippocampe est suffisant pour induire un comportement de type antidépresseur.

Pour répondre à cette question, nous avons articulé ces travaux de thèse autour de quatre axes :

- Le premier axe s'intéresse à la fonction des Cx43 en conditions physiologiques. À l'aide d'inactivations génétiques constitutive ou spécifique dans l'hippocampe, nous avons cherché à comprendre (i) l'importance des connexines hippocampique sur le comportement anxio/dépressif, (ii) quels sont les mécanismes moléculaires des phénotypes observés.
- Le second axe s'intéresse au rôle des Cx43 dans la réponse aiguë aux psychotropes. Basé sur des études précédentes qui révèlent l'effet des antidépresseurs sur l'expression et la fonction des connexines, nous avons cherché à comprendre si à l'inverse, l'inactivation des Cx43 peut influencer la réponse à ces agents pharmacologiques après administration unique.
- Le troisième axe explore le rôle des connexines astrocytaires en conditions pathologiques. Dans un modèle murin de dépression basé l'exposition chronique à la corticostérone, nous avons cherché à comprendre le rôle des Cx43 sur le comportement anxio/dépressif dans ce modèle murin de dépression ainsi que les mécanismes moléculaires sous-jacents.
- Le quatrième axe, quant à lui, s'intéresse à la réponse chronique aux antidépresseurs dans le modèle CORT. Pour cela, nous avons comparé la réponse d'un traitement chronique avec un inhibiteur de recapture mixte de 5-HT et NA seul ou en combinaison avec un bloqueur pharmacologique des Cxs.

L'objectif final de cette thèse est de mieux caractériser le rôle des Cx43 d'un point de vue fonctionnel mais aussi leur implication dans des pathologies liées à des dérégulations de l'axe du stress comme la dépression.

MATÉRIEL & MÉTHODES

1. Autorisation d'expérimenter

Ces travaux de thèse ont été réalisés en accord avec les directives du Conseil Européen des Communautés (86/609/EE), du Comité Français (87/848) et du comité local (Direction Départementale de la protection des populations, C31-555-11). Toutes les expériences réalisées dans ce travail de thèse ont été menées dans la stricte conformité des règles vétérinaires sur le bien-être animal. Elles ont été recensées au sein d'un projet évalué et validé par le comité d'éthique de Toulouse puis par le ministère (autorisation APAFIS# 2018100110245946#16913).

2. Animaux

Différentes souches de souris ont été utilisées lors de ces travaux de thèse : les souris connexines 43 knock-down (Cx43 KD) et leurs contrôles sous fond C57Bl6/J, des souris Swiss et des souris BalbC/J. Celles-ci ont été hébergées entre deux et six par cage au sein de l'animalerie conventionnelle du Centre de Recherches sur la Cognition Animale (CRCA) avec un accès à l'eau et la nourriture *ad libitum* (hors expériences nécessitant la mise à jeun). Les conditions d'animalerie étaient une température tempérée ($23 \pm 2^\circ\text{C}$) et une rythmicité circadienne de 12h (cycle lumineux commençant à 8h00).

2.1. *Souris Connexine 43 « knock-down » (Cx43 KD)*

La souche de souris Cx43 KD a été introduite au CRCA en 2014. Les premières souris issues de la lignée ont été généreusement cédées au Pr Bruno Guiard par le Pr Corinne Leloup (CSGA, Dijon). Sur fond génétique C57Bl6/J, cette lignée présente deux sites LoxP encadrant l'exon 2 du gène de la Cx43 (Figure 16). Lors du processus de transgénèse, deux gènes rapporteurs ont été ajoutés (tk/neo et lacZ) afin de faciliter la sélection des clones recombinants. Décrit dans la littérature, le mode de construction de la souris « floxée » pour la Cx43 provoque une diminution inattendue de 50% de l'expression de la protéine (Theis et al 2003). Les animaux utilisés lors de ces travaux étaient tous issus de croisements entre mâles et femelles Cx43 KD réalisés au CRCA.



Figure 16 : Construction génétique simplifiée du gène de la Cx43 chez les souris Cx43 KD.

Les triangles gris représentent les sites loxP insérés dans la construction pour permettre la délétion du gène sous l'influence de la CRE recombinase. Les boîtes noires représentent les zones non transcrites du gène. tk/neo et lacZ sont des gènes rapporteurs. Figure adaptée d'après Theis et al 2001.

2.2. Souris C57Bl6/J

Les souris sauvages utilisées dans ces travaux sont issues de la lignée C57Bl6/J de l'élevage Charles Rivers (L'Arbresle, France). Elles ont été testées entre sept et dix semaines à l'exception de l'étude de la réponse à un traitement chronique aux antidépresseurs (voir [Chapitre 4](#) :) où les animaux ont été testés à treize et à vingt-sept semaines en raison de la durée d'exposition à la corticostérone.

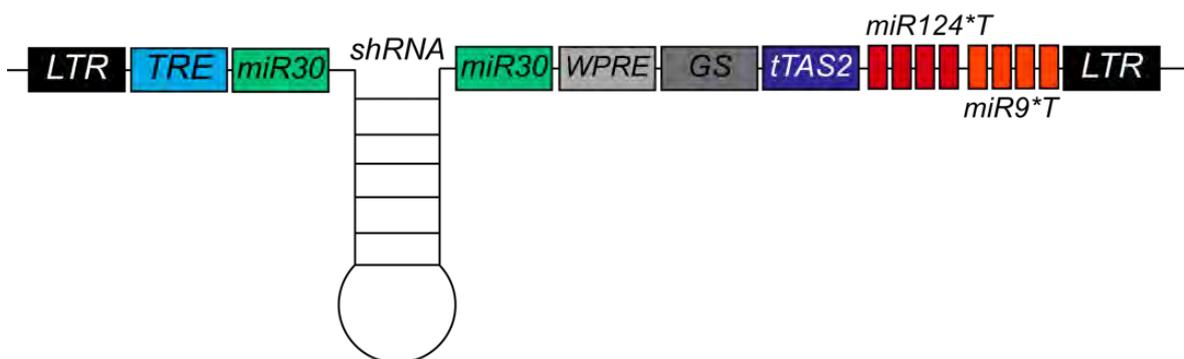
2.3. Souris BalbC/J et Swiss

Les souris sauvages utilisées, issues de la lignée BalbC/J et Swiss proviennent de l'élevage Janvier (Le Genest-Saint-Isle, France) et ont été testées entre 7 et 10 semaines. La souche BalbC/J a été sélectionnée dans ces travaux en raison de sa sensibilité accrue au stress comparée à celle observée dans d'autres souches ([Griebel et al 1993](#))

3. Pharmacologie

3.1. Outils lentiviraux

Les lentivirus ont été obtenus à la faveur d'une collaboration avec le Pr Nicole Déglon (Laboratoire de Neurothérapie et Neuromodulation, Centre Hospitalier Universitaire Vaudois, Lausanne, Suisse). Il s'agit de lentivirus pseudo-typés MOKOLA contenant un shRNA dirigé contre la protéine GFP (shRNA-GFP) ou contre la protéine d'intérêt, la Cx43 (shRNA-Cx43) ([Figure 17](#)). L'enveloppe MOKOLA confère au lentivirus un tropisme principalement astrocytaire ([Colin et al 2009](#)). Par ailleurs, des séquences supplémentaires miR124*T et miR9*T ont été insérées dans le transgène de manière à empêcher l'expression résiduelle éventuelle du shRNA respectivement dans les neurones et les cellules-souches ([Merienne et al 2015](#))



[Figure 17](#) : Schéma de la construction du shRNA

LTR : Séquence longue terminale ; TRE : Récepteur sensible à la tetrodotoxine, miR30 : MicroARN précurseur ; WPRE : élément de régulation post-transcriptionnel ; GS : Promoteur glutamine synthase ; tTAS2 : gène codant pour la tetrodotoxine ; miR124*T : MicroARN régulateur ; miR9*T : MicroARN régulateur. Figure adaptée d'après [Merienne et al 2015](#).

3.2. Préparation

Les solutions de lentivirus ont été fraîchement préparées le matin de leur injection stéréotaxique. Chaque solution contenant les vecteurs lentiviraux a été titrée à 150 000 np/p24 pour assurer une bonne disponibilité une fois injectée dans la structure cérébrale d'intérêt. La solution mère de lentivirus a été diluée dans une solution de tampon phosphate (Phosphate Buffer Salin, PBS) contenant 1% de sérum d'albumine bovine (Bovine Serum Albumin fraction V, BSA, Roth Cat# 8076-1).

3.3. Stéréotaxie et injection

Après anesthésie à l'hydrate de chloral (400 mg/kg i.p. dilué dans du NaCl 0,9%, Sigma-Aldrich Cat# 302-17-0), les animaux ont été placés dans un appareil stéréotaxique puis injectés avec le shRNA-GFP ou le shRNA-Cx43 dans l'hippocampe droit et gauche. (HPd et HPg, 1 µL/coté). Les sites d'injections ont été déterminés à partir du bregma selon les coordonnées décrites dans l'atlas stéréotaxique de [Franklin & Paxinos 2000](#) : antéropostérieur (AP) -2,5 mm, latéralité (L) ±2,8 mm et ventralité (V) -3 mm. Les injections ont été réalisées à l'aide d'un micro-injecteur (QSI apparatus, Stoelting Co. USA) et d'une seringue Hamilton 5 µL (Microliter™ syringe #65, Hamilton Co., USA), à raison d'un débit de 0,1 µL/minute pendant dix minutes. À la fin de chaque injection, la seringue a été maintenue en place pendant cinq minutes supplémentaires afin de s'assurer d'une diffusion optimale du vecteur injecté.

4. Outils pharmacologiques

4.1. Solutions pharmacologiques pour les administrations aiguës

Les produits suivants ont été utilisés pour des administrations uniques :

- La carbenoxolone (CBX, 10 mg/kg, Sigma-Aldrich, Cat# 7421-40-1) a été diluée dans du NaCl 0,9% puis administrée par injection intra-péritonéale (i.p.) trente minutes avant le début du test. La dose de CBX a été choisie sur la base d'une étude précédente *in vivo* montrant la capacité de la CBX à passer la barrière hémato-encéphalique et à promouvoir des effets centraux ([Gareri et al 2004](#)),
- La fluoxétine (FLX, 18 mg/kg, LTD Laboratories Cat# F4780) a été diluée dans une solution de NaCl 0,9% et a été administrée par injection i.p. trente minutes avant le début du test. Le choix de la dose de fluoxétine repose sur des études précédentes montrant *in vivo* la capacité de cette molécule à augmenter les concentrations extracellulaires de sérotonine ([Zemdegs et al 2019](#)) et à produire un effet de type antidépresseur ([O'Leary et al 2007](#)).

- La kétamine (10 mg/kg ; Laboratoires Virbac) a été diluée dans du NaCl 0,9% puis administrée par injection i.p. trente minutes avant le début du test. La dose de kétamine a été choisie sur la base d'une étude précédente *in vivo* montrant la capacité de cette molécule à exercer des effets antidépresseurs à doses sub-anesthésiques (Pham et al 2018).
- Le NBQX (10 mg/kg ; AOBIOS Cat# AOB0734) a été dilué dans du NaCl 0,9% + 3% DMSO puis administré par injection i.p. trente minutes avant le début du test.

Une solution de NaCl 0,9% a été utilisée comme solution contrôle.

4.2. Solutions pharmacologiques pour les administrations chroniques

Les produits suivants ont été utilisés pour des administrations répétées :

- La corticostérone (CORT 5 mg/kg par jour, Sigma-Aldrich, Cat# C2505-500MG) administrée dans l'eau de boisson a été diluée dans de l'eau et de la β -cyclodextrine (20%) (Kleptose®, Roquette Cat# 341001) pour atteindre la concentration souhaitée. En raison de sa photosensibilité, la CORT a été placée dans des biberons opaques, préparée fraîchement et renouvelée deux fois par semaine. Une solution de β -cyclodextrine a été utilisée comme contrôle à ce traitement. La dose de CORT a été sélectionnée sur la base d'études précédentes *in vivo* montrant sa capacité à développer un phénotype anxio/dépressif (David et al 2009).
- La venlafaxine (VENLA 16 mg/kg par jour, Sigma-Aldrich, Cat# V7264) administrée dans l'eau de boisson a été diluée dans la solution de corticostérone puis délivrée dans des biberons opaques comme précédemment décrit. La dose de VENLA a été sélectionnée sur la base d'études précédentes montrant sa capacité à promouvoir des effets de type antidépresseurs dans des modèles animaux de dépression (Bacq et al 2012) et à bloquer à la fois le système 5-HT et NA (Redrobe et al 1998)
- La CBX (10 mg/kg par jour), diluée dans une solution de NaCl 0,9%, a été administrée par injection i.p. une fois par jour pendant dix jours.

4.3. Solutions peptidiques

Les peptides mimétiques Gap26 scramble ([NH₂]PSFDSRHCIYKYV[COOH]) et Gap26 ([NH₂]VCYDKSFPISHVR[COOH]) ont été obtenus déshydratés après production à façon chez ThermoFisher (Thermoscientific USA).

4.3.1. Préparation

Chaque composé déshydraté a été suspendu dans du liquide céphalo-rachidien artificiel (LCRa) pour une concentration finale de peptide à 1 mM (Stehberg et al 2012) soit une dose équivalente à 25 µg/kg.

4.3.2. Stéréotaxie et injection

Après anesthésie à l'hydrate de chloral (400 mg/kg i.p.), les animaux ont été placés dans un appareil stéréotaxique puis implantés avec une sonde de microdialyse à trois voies (voir *Microdialyse intracérébrale*) permettant pour la première voie, l'injection du peptide, et pour les autres voies la perfusion et le recueil du LCRa. Les sondes ont été implantées dans HPd et HPg aux coordonnées suivantes : AP -2,7 mm, L ±2,8 mm, V -3,5 mm. L'injection a ensuite été réalisée à l'aide d'une seringue Hamilton (1 ml Gastight syringe 1001RN, gauge 22) à un débit constant de 0,1 µL/min pendant 5 minutes pour un volume total injecté de 0,5 µL par hémisphère.

5. Tests comportementaux

Les animaux ont été soumis à une batterie de tests comportementaux allant du test le moins stressant au plus stressant. Avant chaque test, une période de soixante minutes d'acclimatation à la salle d'expérimentation a été respectée afin de limiter les effets liés au changement d'environnement. Une période de deux jours a été respectée entre deux tests comportementaux.

5.1. Tests d'anxiété

5.1.1. Hyperthermie induite par le stress aigu

La température corporelle des rongeurs est une variable sensible au stress ou à l'environnement. Le test d'hyperthermie repose sur le principe d'une augmentation de la température corporelle après l'application d'un stress (pour revue Oka 2018) mesurée entre deux prises consécutives. Le jour du test une première prise de température est effectuée puis une seconde dix minutes plus tard. Une souris contrôle présente une augmentation de la température corporelle suite à l'insertion par l'expérimentateur de la sonde intrarectale.

5.1.2. Champ ouvert (*Open Field, OF*)

Ce test est basé sur la tendance naturelle des rongeurs à éviter les espaces ouverts considérés comme anxiogènes (pour revue Walsh & Cummins 1976). Les animaux sont placés dans une arène circulaire de 40 cm de diamètre exempt d'indices spatiaux (Figure 18). Chaque animal est libre d'explorer ce nouvel environnement pendant dix minutes. Le

dispositif est placé sous une caméra connectée à un système de trajectométrie (Ethovision, Noldus Tech., Netherlands) permettant la mesure de différents paramètres comme la distance parcourue, le temps passé dans le compartiment central (situé à 10 cm des parois de l'arène et considéré comme anxiogène) et le compartiment périphérique (compartiment considéré comme non anxiogène). Il est important de noter que tout animal présentant une activité locomotrice aberrante a été exclu pour le reste de l'étude comportementale.

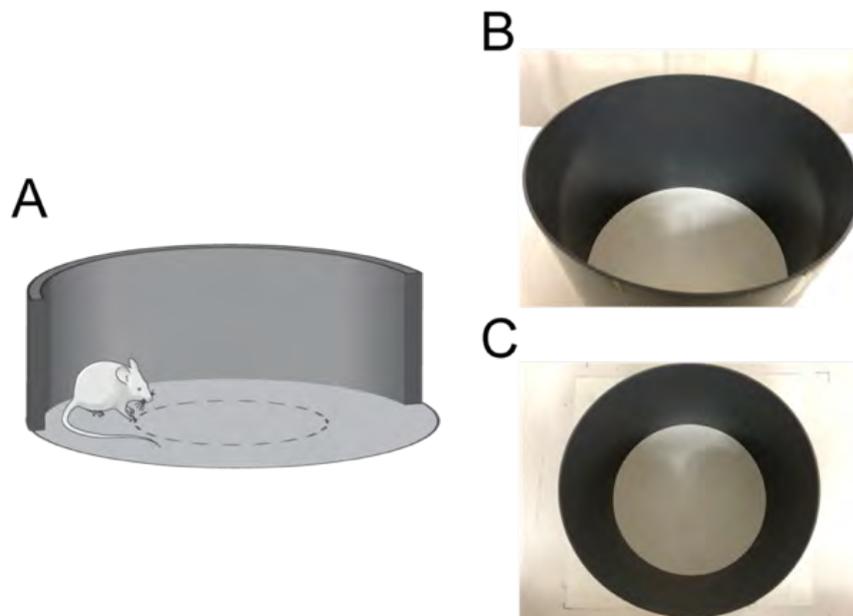


Figure 18 : Dispositif expérimental du test d'OF

A : Représentation schématique du dispositif ; B et C : Photographies du dispositif vu du dessus.

5.1.3. Labyrinthe en croix surélevé (*Elevated plus Maze, EPM*)

Basé sur le conflit entre l'exploration d'un nouvel environnement et la peur du vide, l'EPM est classiquement utilisé pour mesurer l'anxiété chez les rongeurs (pour revue Carobrez & Bertoglio 2005). Un animal dit « anxieux » aura tendance à se réfugier dans les bras fermés, clos et sombres, et à éviter les bras ouverts.

Le dispositif est constitué d'un labyrinthe en forme de croix, surélevé à 50 cm au-dessus du sol (Figure 19A-D). Trois parties distinctes composent ce dispositif :

- Une plateforme centrale (3 cm x 3 cm)
- Deux bras fermés (d'une longueur de 80 cm, Figure 19D)
- Deux bras ouverts (d'une longueur de 80 cm Figure 19C)

Le dispositif est entouré d'un rideau blanc sans indices spatiaux sous lumière tamisée.

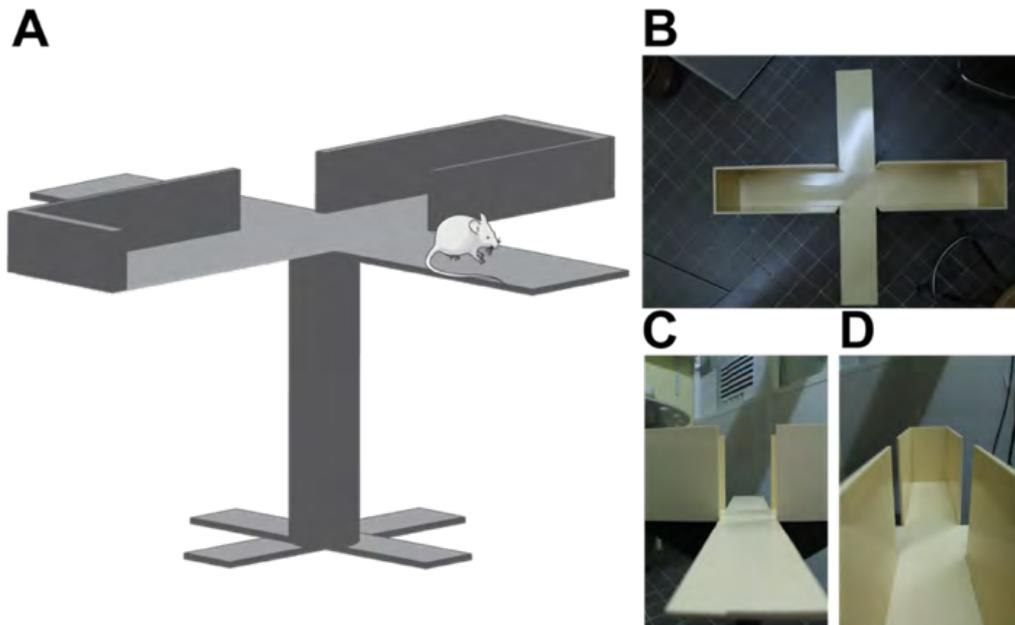


Figure 19 : Dispositif expérimental du test d'EPM

À : Représentation schématique du dispositif ; B : Photographie du dispositif vue du dessus ; C : Vue depuis un bras ouvert ; D : Vue depuis un bras fermé.

Durant le test, les animaux sont introduits dans le dispositif sur la plateforme centrale, faisant face à l'un des deux bras ouverts et sont libres d'explorer leur environnement durant cinq minutes. De par le principe du test, le temps passé dans les bras ouverts ainsi que le nombre d'entrées dans ces bras sont considérés comme le reflet du niveau d'anxiété de l'animal. Un animal est considéré comme « dans le bras » lorsque ses quatre pattes franchissent la ligne séparant la plateforme centrale et le bras considéré.

5.1.4. Alimentation supprimée par la nouveauté (*Novelty Suppressed Feeding, NSF*)

Basé sur le conflit entre la faim et la peur de s'aventurer dans un environnement anxiogène, le test de NSF est souvent utilisé comme test d'anxiété chez le rongeur (Santarelli et al 2001). Une particularité de ce test est qu'il permet de mettre en évidence à la fois les effets des anxiolytiques (après administration aiguë) ou des antidépresseurs (après administration chronique) (Guilloux et al 2013). Le dispositif est constitué d'une boîte en plexiglas (40 cm x 60 cm) avec en son centre une croquette déposée sur du papier blanc. Ce dernier est fortement éclairé par une lampe placée à 40 cm au-dessus et d'une puissance équivalente à environ 60 W afin de renforcer le caractère anxiogène de la situation pour la souris (Figure 20).

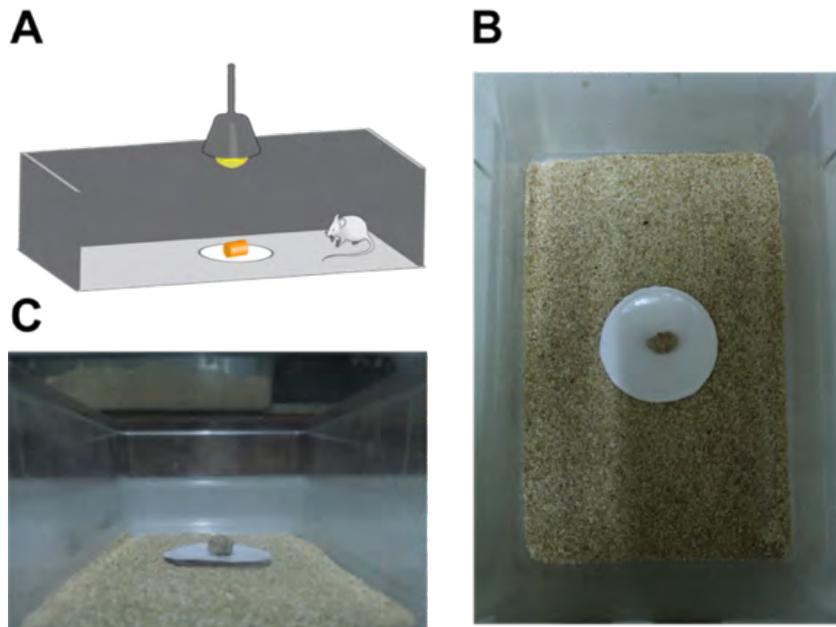


Figure 20 : Dispositif expérimental du test de NSF.

À : représentation schématique ; B : Photographies du dispositif vu du dessus ; C : Dispositif vu de face.

Vingt-quatre heures avant le début du test, les animaux ont été mis à jeun avec uniquement accès à l'eau. Le test a été réalisé le lendemain sous réserve que chaque animal ait perdu au moins 10% de son poids corporel. Le jour du test, l'animal est placé dans un coin de l'arène, libre d'explorer son environnement. La latence à aller se nourrir est alors mesurée pour chaque animal et un temps limite (« cut-off ») de dix minutes est fixé avant l'arrêt de l'expérimentation (Samuels & Hen 2011). À l'issue de cette phase de test, la quantité de nourriture consommée par chaque souris est mesurée pendant cinq minutes dans la cage d'élevage (environnement familier) afin de s'assurer de l'absence de différences du niveau de faim entre les animaux.

En raison d'un stress trop important, il est possible que certains animaux n'aillent pas se nourrir dans les dix minutes imparties. D'autres paramètres d'évaluation de l'anxiété peuvent alors être utilisés comme le temps passé sur le cercle blanc et le nombre d'entrées sur ce cercle.

5.2. Test de dépression

5.2.1. Suspension caudale (Tail Suspension Test, TST)

Le TST est un test permettant de mesurer le niveau de résignation, un des symptômes de la dépression (Cryan et al 2005). Le dispositif est constitué de trois compartiments (16 cm x 38 cm x 15 cm) chacun surmonté d'un crochet (Figure 21). Le jour du test, l'animal est pendu par la queue au moyen d'un scotch. Le temps total d'immobilité est mesuré pour une durée de test de six minutes. Une souris résignée verra son temps d'immobilité

augmenté par rapport à une souris contrôlée. Au contraire, une souris moins résignée s'efforcera de se débattre et présentera donc un temps d'immobilité réduit.

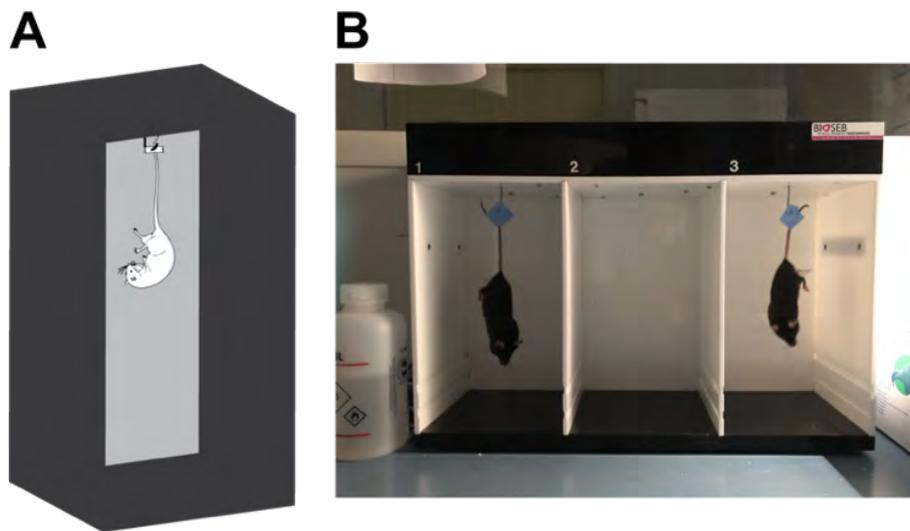


Figure 21 : Dispositif expérimental du TST.

À : Représentation schématique ; B : Photographie du dispositif expérimental.

5.2.2. Nage forcée (*Forced Swim Test, FST*)

Le FST repose sur le même principe que celui du TST et permet également de mesurer un état de résignation chez le rongeur. Le dispositif et le protocole utilisés durant ces travaux de thèse ont été adaptés du modèle originalement proposé par Cryan et ses collaborateurs (Cryan et al 2002) et dans d'autres études (Nguyen et al 2012). Le dispositif est composé d'un cylindre transparent, haut de 24 cm et de 17,5 cm de diamètre. Le jour du test, le cylindre est rempli d'eau sur une hauteur de 17,5 cm à une température de 25 ± 1 °C. Une fois placé dans le dispositif, l'animal peut explorer librement son environnement durant six minutes (Figure 22) mais seules les quatre dernières minutes d'explorations sont utilisées pour évaluer la résignation.

On distingue trois types de comportements :

- L'immobilité reflète la résignation de l'animal. Un animal est considéré comme immobile lorsqu'il flotte et qu'aucun de ses membres ne bouge.
- Un comportement d'escalade (climbing) dont les variations sont un reflet de changements d'activité du système noradrénergique (Cryan et al 2002). On considère qu'un animal escalade lorsque l'intégralité de son corps est en contact à la paroi du cylindre et que l'animal tente de se hisser hors du dispositif.
- Un comportement de nage (swimming) qui peut être le reflet d'une activité plus importante du système sérotoninergique. Un animal est considéré comme nageant à partir du moment où il n'effectue pas du climbing et qu'il n'est pas immobile.

Dans ces travaux de thèse, seul le comportement d'immobilité a été mesuré.

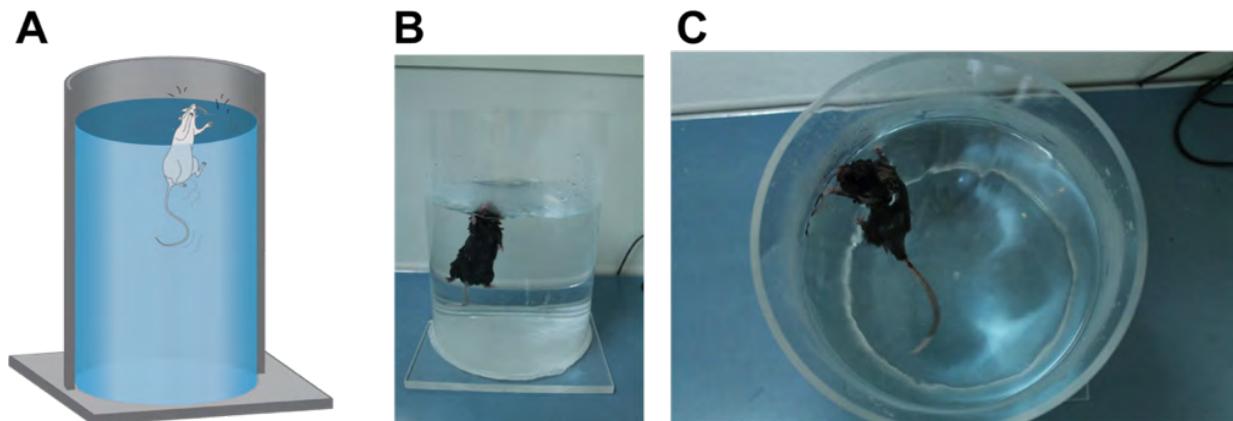


Figure 22 : Dispositif expérimental du FST.

À : représentation schématique. B : Photographie du dispositif expérimental vue de face. C : Photographie du dispositif expérimental vue de haut.

5.2.3. Test d'éclaboussures (Splash Test, ST)

Le ST est un test qui se réfère à un autre symptôme de la dépression : l'incurie (ou « négligence »). Dans ce test, la capacité à prendre soin de son pelage est évaluée suite à la vaporisation d'une solution collante de saccharose à 10% sur le dos de la souris. Le test a été réalisé dans la cage d'élevage (environnement connu) pour éviter les biais liés à l'exploration (Yalcin et al 2005). Le temps ainsi que le nombre de toilettage ont été mesurés pendant 5 minutes (Ducottet & Belzung 2004).

5.2.4. État du pelage (Fur Coat State)

À l'instar du ST, la dégradation de l'état du pelage reflète également une forme de négligence, un comportement d'incurie se traduisant par la capacité des animaux à prendre moins soin de leur pelage. L'état du pelage est évalué en huit points sur l'ensemble du corps de l'animal, comme décrit précédemment dans la littérature (Bergner et al 2009). Pour un point précis du corps, si le pelage est de bonne qualité et paraît entretenu, un score de 0 est attribué. À l'inverse, un score de 0,5 ou 1 est attribué pour un pelage dégradé, gras, abimé et/ou ébouriffé. La moyenne des scores sur les 8 parties du corps permettra de comparer l'état du pelage entre deux individus ou deux groupes. Plus un animal sera stressé, plus le score moyen de l'état du pelage sera élevé traduisant ainsi une altération de soin corporel chez ces animaux (Figure 23). Il est important de noter que des molécules favorisant le stress provoquent une dégradation du pelage. À l'inverse, un traitement chronique avec un antidépresseur permet une amélioration de ce paramètre (Dournes et al 2013).

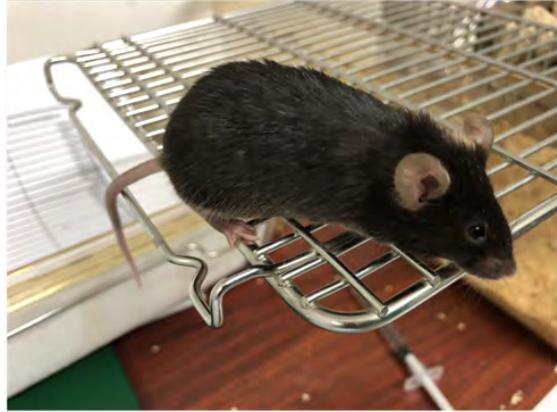
A**B**

Figure 23 : Dégradation de l'état du pelage chez des souris exposées à la CORT.

A : état du pelage avant exposition. B : forte dégradation de l'état du pelage après treize semaines d'exposition.

5.3. Test de mémoire : Reconnaissance d'objet (Object recognition, OR)

Ce test repose sur la capacité d'un rongeur à discriminer un objet connu d'un objet inconnu (Ennaceur & Delacour 1988). En effet, dans ce test, une souris disposant de capacités d'apprentissages « normales » passera plus de temps à explorer un nouvel objet par rapport à un objet déjà connu. Le dispositif se compose d'une arène circulaire de 40 cm de diamètre et de trois objets : deux parfaitement identiques et un nouvel objet (Figure 24). Le test se déroule en trois phases :

- Une phase d'habitation (J1) au cours de laquelle les animaux sont placés dans une nouvelle arène exempte d'indices spatiaux. Une fois placé dans le dispositif, l'animal peut explorer librement son environnement pendant dix minutes.
- Une phase d'exploration (J2) au cours de laquelle les animaux sont mis en présence de deux objets identiques (O1 et O2). Une fois placé dans le dispositif, l'animal peut explorer ces deux objets pendant une durée de dix minutes.
- Une phase de test (J3) durant laquelle les animaux sont réintroduits dans le même contexte mais un des deux objets est remplacé pour un nouvel objet, libre à l'exploration pendant dix minutes

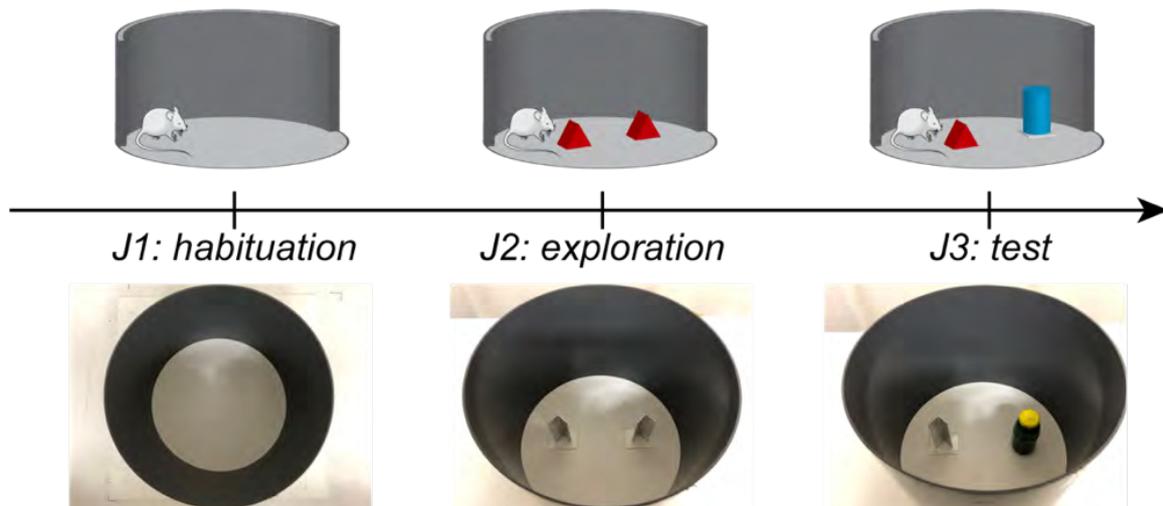


Figure 24 : Dispositif expérimental du test d'OR.

J1 : Phase d'habitation à l'arène vierge. J2 : Phase d'exploration de deux objets strictement identiques. J3 : Phase de test où l'un des deux objets a été modifié.

Le dispositif est placé sous une caméra connectée à un système de trajectométrie (Ethovision, Noldus Tech., Nederlands) permettant de suivre en direct le comportement exploratoire de chaque animal. Les résultats ont été exprimés sous forme d'un indice de préférence exploratoire du nouvel objet en pourcentage, calculé de la manière suivant :

$\frac{\text{Temps d'exploration du nouvel objet}}{\text{Temps d'exploration total des deux objets}} \times 100$. Si l'animal se « souvient » de la configuration précédente, l'indice exploratoire sera significativement différent de 50% (représentant le niveau de chance qu'a un animal d'explorer le nouvel objet (Goodman et al 2010)).

6. Études fonctionnelles

6.1. *Microdialyse intracérébrale*

6.1.1. *Principe et fonctionnement*

La microdialyse intracérébrale chez la souris éveillée, libre de ses mouvements repose sur le principe de diffusion passive de petites molécules à travers une membrane poreuse. Conformément à la loi de l'osmose, les neurotransmetteurs se déplacent du compartiment le plus concentré (espace extracellulaire) vers le compartiment le moins concentré (intérieur de la sonde de dialyse perfusée avec du LCRa sans neurotransmetteurs) jusqu'à atteindre l'équilibre des concentrations.

Cette technique utilisée dans ces travaux de thèse repose sur le savoir-faire de l'équipe du Pr Alain Gardier à la faculté de Pharmacie de Paris-Saclay (Trillat et al 1997). Celle-ci permet le recueil d'échantillons (dialysats) toutes les 15 minutes à un débit de perfusion constant de LCRa de 1,5 $\mu\text{L}/\text{min}$ au travers d'une sonde implantée dans la région cérébrale d'intérêt (Figure 25). Les échantillons contiennent l'ensemble des neurotransmetteurs

libérés dans cette région et peuvent ensuite être dosés par une méthode analytique de chromatographie liquide en vue de la détection de la 5-HT et du glutamate.

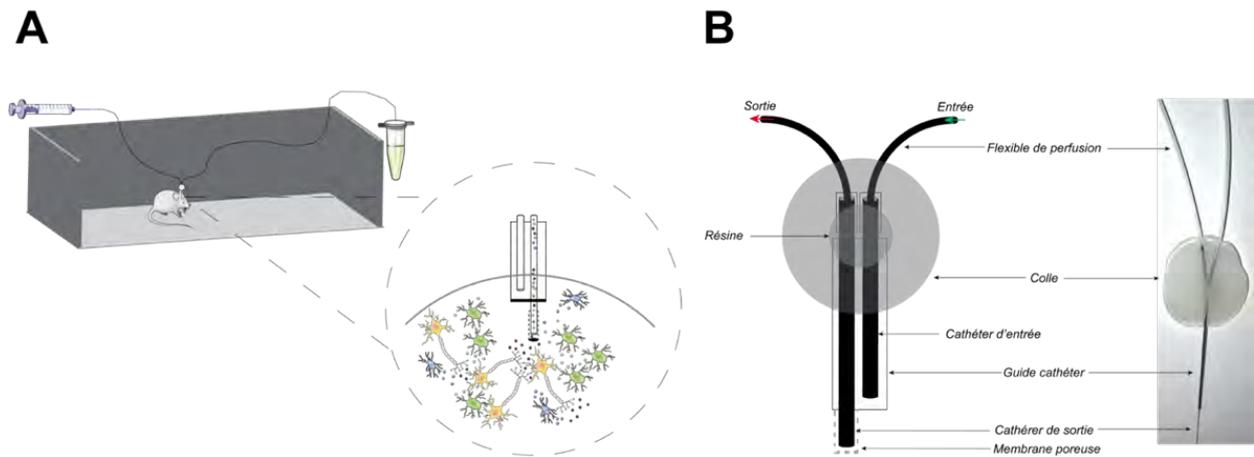


Figure 25 : Dispositif expérimental de la microdialyse intracérébrale.

(A) Représentation schématique du dispositif. Le zoom représente ce qui se déroule à l'interface sonde/cerveau
(B) Représentation schématique et photographie d'une sonde de microdialyse fabriquée au laboratoire.

6.1.2. Chirurgie

Après anesthésie à l'hydrate de chloral (400 mg/kg i.p.), les animaux ont été placés dans un appareil stéréotaxique. Les coordonnées d'implantation ont été définies de manière à implanter la sonde de microdialyse dans l'hippocampe à l'aide de l'atlas de **Franklin & Paxinos 2000** fournissant les coordonnées suivantes : AP -2,7 mm, L \pm 2,8 mm, V - 3,5 mm. Après incision de la peau et détermination des coordonnées exactes d'implantation, le crâne a été percé en prenant soin de ne pas toucher l'encéphale. Une fois la sonde placée, le scalpe a été recouvert de ciment dentaire afin de maintenir les sondes en place durant toute la durée de l'expérience. Après la chirurgie, les animaux ont été isolés pour faciliter la récupération et éviter toutes lésions liées à leur activité sociale.

6.1.3. Recueil et dosage des neurotransmetteurs

6.1.3.1. Principe et fonctionnement

Le jour du test, les animaux ont été placés dans la salle d'expérimentation au moins 50 minutes avant le début de la dialyse. Après cette période d'acclimatation, les sondes de dialyse ont été perfusées avec une solution de LCRa (**Tableau 9**), filtrée à un débit constant de 3 μ L/min pendant une heure Cette étape, dite de stabilisation, permet d'atteindre l'équilibre des concentrations de part et d'autre de la membrane, ce qui permet de se placer dans des conditions optimales pour observer d'éventuelles variations des concentrations extracellulaires en neurotransmetteurs.

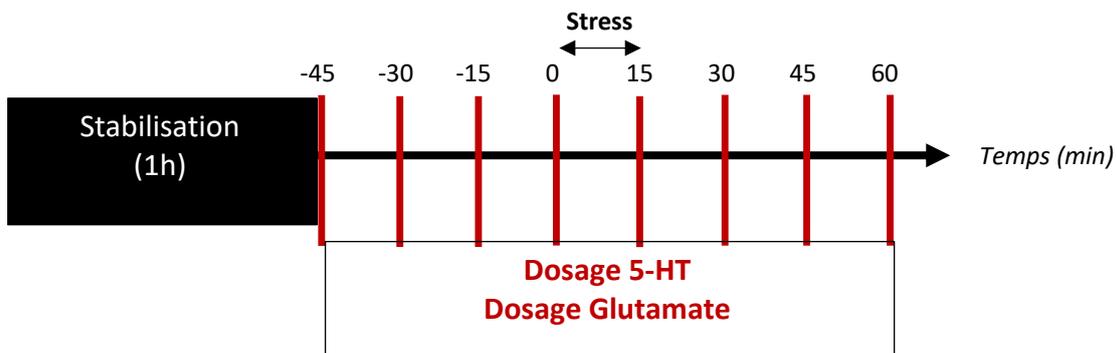
	Concentration (mM)	Masse volumique (g/mol)
NaH ₂ PO ₄	2	177,99
Na ₂ HPO ₄	2	156,01
NaCl	147	58,44
KCl	2,7	74,56
MgCl ₂	1	203,31
CaCl ₂	1,2	147,02

Tableau 9 : Composition ionique du Liquide Céphalo-Rachidien artificiel (LCRa).

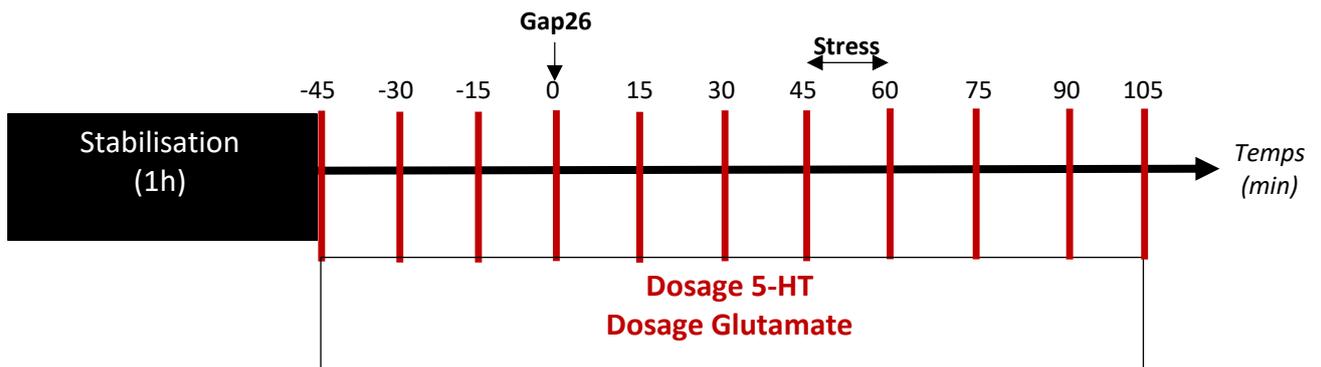
Après cette étape de stabilisation, la perfusion de la sonde est maintenue à un débit constant de 1,5 µL/min jusqu'à la fin de l'expérience.

Dans ces travaux de thèse, trois protocoles distincts ont été utilisés :

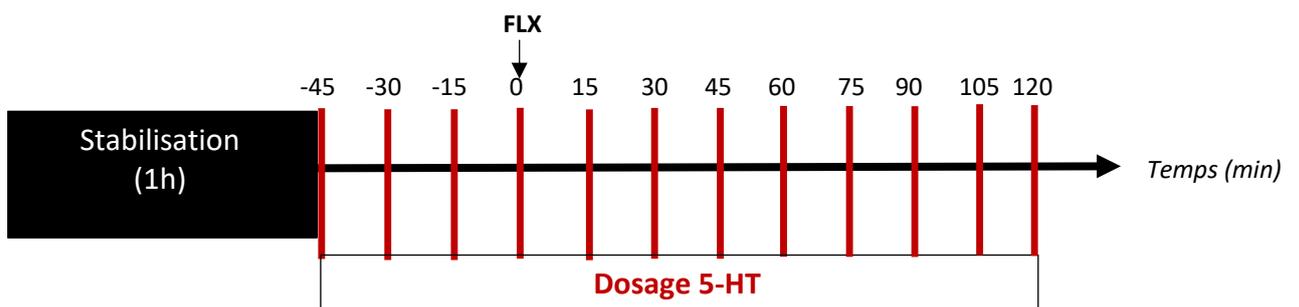
- Protocole 1



- Protocole 2



- Protocole 3



Les dialysats ont été récoltés toutes les quinze minutes dans des tubes en polyéthylène avec bouchon puis placés à -80°C jusqu'au dosage. Les quatre premiers dialysats (-45 à 0 minute) ont été utilisés dans le but d'établir une moyenne des concentrations extracellulaires basales en neurotransmetteurs tandis que les suivants ont été utilisés pour étudier la réponse aux agents pharmacologiques testés.

6.1.3.2. Dosage de la 5-HT

Une fois récoltés, les dialysats ont été dosés par chromatographie liquide haute performance en phase liquide (HPLC). Une phase spécifique à la 5-HT (pH 5,60 ajusté avec une solution de NaOH, [Tableau 10](#)) a été utilisée :

	Concentration	Masse volumique (g/mol)
NaH ₂ PO ₄	150 mM	156,01
Acide Citrique	4,76 mM	192,13
EDTA	50 µM	292,25
SDS	2 mM	288,38
Acétonitrile	15%	150 mL
Méthanol	10%	100 mL
Eau MilliQ		750 mL

[Tableau 10](#) : Composition de la phase spécifique à la sérotonine.

Dans un premier temps une gamme étalon a été réalisée : 1 mg de 5-HT (Roth Cat# 8367.2) diluée dans 1 ml de LCRa (solution mère à 1 mg/ml). Après plusieurs dilutions sériées, une solution à 10 pg/15 µL a été utilisée pour établir une gamme étalon à quatre points (10, 5, 2,5 et 1,25 pg/15 µL). Pour le dosage, les échantillons vont traverser une colonne d'affinité (Accucore C18, 50 mm x 3 mm, Thermo Scientific) permettant de séparer les différents composés contenus dans l'échantillon. À la sortie de la colonne, l'échantillon passe à travers une sonde électrostatique. Tout passage de molécules à travers cette sonde provoque une modification du potentiel électrique aux bornes de la sonde. Grâce au logiciel Chroméléon Lab 7.2 (Chroméléon Chromatography Data System, ThermoFisher, USA), cette variation de potentiel est interprétée comme un pic sur le chromatogramme de sortie. La hauteur de ce pic est le reflet de la concentration extracellulaire du composé étudié dans un dialysat. Par extrapolation et par report sur la courbe étalon, il est donc possible de connaître la concentration en sérotonine d'un dialysat.

6.1.3.3. Dosage du Glutamate

À l'instar de la 5-HT, le glutamate (Glut) a été dosé par chromatographie liquide à haute performance.

Trente minutes avant l'analyse, chaque échantillon est incubé avec un cocktail de trois solutions :

- Une solution « E » contenant du tétraborate de sodium et de l'acide borique,
- Une solution D contenant du cyanure de potassium,
- Une solution « C » contenant de l'acétonitrile et du 2,3 Naphthalenedicaboxaldéhyde (NDA) fluorescent.

Une fois séparés par une colonne d'affinité C18 (300 µm x 150 mm, Dionex, France), les échantillons traversent un laser LIF de détection (Picometrics, France). Ce laser est connecté à un ordinateur permettant d'interpréter la fluorescence détectée comme une variation des concentrations extracellulaires de glutamate, traduite par un pic plus ou moins important sur le chromatogramme de sortie : plus le pic sera grand, plus la quantité de Glut dans le dialysat est importante.

6.2. *Électrophysiologie in vivo*

L'enregistrement extracellulaire unitaire des neurones 5-HT du noyau du raphé dorsal (NRD) a été utilisé afin de mesurer la fréquence de décharge des cellules (Guiard et al 2011). Après anesthésie à l'hydrate de chloral (400 mg/kg i.p.), les animaux sont placés dans un appareil stéréotaxique. Les enregistrements des neurones sérotoninergiques dans le NRD ont été réalisés à l'aide d'une micropipette en verre (Stoelting, UK) contenant une solution de NaCl à 2M. L'impédance moyenne de ces micropipettes était de 4-7 MΩ.

Pour l'enregistrement physiologique, la micropipette de verre est descendue dans le NRD aux coordonnées suivantes (par rapport à la ligne interéurale) : AP : 0 mm ; L 0 mm ; V de -2,5 à -4 mm. Les neurones sérotoninergiques ont été identifiés comme suit (Aghajanian & Vandermaelen 1982) :

- Fréquence de décharge lente (0,5 à 2,5 Hz)
- Régularité des potentiels d'actions (0,8 à 1,2 ms)
- Potentiels d'action de forme bi- ou triphasiques

L'enregistrement électrophysiologique de chaque neurone identifié sur cinq descentes consécutives a été réalisé à l'aide du logiciel Spike 2 (Spike 2 v6.09, Cambridge electronic design). Les résultats sont exprimés en fréquence de décharge (hertz, Hz : nombre de potentiels d'actions / 10 secondes).

7. Autre dosage : corticostéronémie.

Les concentrations plasmatiques de corticostérone ($[CORT]_{\text{plasmatiques}}$) ont été étudiées à l'aide d'un kit de dosage ELISA (Euromedex, Cat #EC3001-1). Le principe du dosage par ELISA repose sur le principe de compétition enzymatique. Des échantillons standards et des extraits plasmatiques préparés au laboratoire sont déposés sur une plaque 96-puits, pré-chargée avec des anticorps primaires dirigés contre la corticostérone, assurant l'hybridation spécifique de cette molécule. Après plusieurs rinçages, les molécules non désirées sont retirées de la plaque afin qu'il n'y reste que la CORT. Cette dernière est mise en présence d'un nouvel anticorps primaire couplé à une peroxydase de Raifort (streptavidine-peroxydase). La dégradation de son substrat (3,3',5,5'-tétraméthylbenzidine ou TMB) permet une teinte bleue de la solution dont l'absorbance à 450nm est le reflet de la concentration de CORT présente dans l'échantillon.

8. Analyse de l'expression

8.1. *Western Blot*

Cette technique de biologie moléculaire est couramment utilisée en laboratoire pour étudier l'expression d'une protéine particulière. Après euthanasie des souris par dislocation cervicale, les cerveaux ont été extraits et les régions cérébrales d'intérêts disséquées. Afin d'obtenir une conservation parfaite de l'état des structures et de l'expression protéique au moment du prélèvement, chaque structure a été immédiatement congelée dans de l'azote liquide après prélèvement puis conservé à -80°C jusqu'à utilisation. Chaque structure a ensuite été broyée dans du Laemmli 1X (BioRad Cat# 161-0747) contenant 40% de β -mercapto éthanol, soniqué à 4°C , centrifugé à 14000rpm et les surnageants dosés afin de connaître la concentration relative en protéines dans chaque échantillon. Ceux-ci ont été dosés à l'aide d'un kit de dosage (DC™ Protein Assay, BioRad Cat# 500-0113/0114/0115). Basé sur un principe de spectrophotométrie, les échantillons ont été décolorés puis recolorés. L'absorbance mesurée à 750nm a ensuite été comparée à celle obtenue pour une gamme étalon de BSA (concentration 8, 4, 2, 1, 0,5 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$; Albumin Fraction V, Roth, Cat# 8076-1) afin d'obtenir la concentration finale en protéine dans chaque échantillon.

Le jour de l'électrophorèse, les échantillons ont été préparés de façon à obtenir 20 μg de protéines par échantillon. Après dénaturation à 95°C , 10 μL d'échantillon a été déposé sur un gel contenant 10% de polyacrylamide (NuPAGE™ 10%Bis-Tris Gel 12-wells, Ivitrogen Cat# NP0302BOX). Le gel a été plongé dans une solution d'électrolytes MES 1X (Novex LifeTech Cat# NP0002). La migration a été réalisée pendant 4h sous un courant de 80V. Suite à cette étape de migration, le gel est retiré de sa cuve puis placé dans une chambre de transfert semi-sec permettant un transfert des protéines contenues dans le gel sur une membrane de nitrocellulose, préalablement humidifiée avec une solution d'électrolytes

spécifiques pour le transfert (**Tableau 11**). Le transfert a été réalisé pendant quarante-cinq minutes sous un courant de 15V.

	Quantité
Tris Base	3,03 g
Glycine	14,4 g
Éthanol absolu	200 mL
Eau	qsp 1L
pH 8,3	

Tableau 11 : Composition du tampon de transfert.

Une fois le transfert terminé, la membrane a été saturée en protéines afin d'éviter toute hybridation non spécifique. La membrane a ensuite été incubée toute la nuit à 4°C avec les anticorps primaires dirigés contre nos protéines d'intérêt :

- Anti-Cx43 (souris anti-Cx43, BD Transduction Cat# 610062) 1:250
- Anti-Cx30 (lapin anti-Cx30, Ivitrogen Cat# 712200) 1:250
- Anti-actine (lapin anti-actin, Cell Signalling Cat# 14967) 1:1000 (témoin de charge)
- Anti-GAPDH (lapin anti-GAPDH, AbCAM Cat#ab75834) : 1:20000 (témoin de charge)

Le lendemain, la membrane a été lavée puis incubée à l'abri de la lumière avec les anticorps secondaires couplés à un fluorochrome :

- Anti-souris (anti-mouse 680, Li-Core Cat# 926-6807) 1:10000
- Anti-lapin (anti-rabbit 800, Li-Core Cat# 926-3221) 1:10000

Après une incubation de 1h30 à température ambiante, la membrane a été rincée puis révélée à l'aide d'une machine Odyssey.

8.2. Immunohistochimie

L'immunohistochimie (IHC) en fluorescence est une technique permettant la localisation de protéines au niveau cellulaire et subcellulaire (**Figure 26**). Dans ce travail de thèse, les réactions immunohistochimiques ont été réalisées sur coupes flottantes obtenues après perfusion, extraction et coupe des cerveaux comme décrit précédemment (**Richetin et al 2015**).

8.2.1. Perfusion

Après anesthésie à l'hydrate de chloral (400 mg/kg i.p.), les animaux ont été perfusés avec une solution de paraformaldéhyde (PFA) 4% en intracardiaque. Après extraction et une post-fixation de quarante-huit heures dans cette même solution, les cerveaux sont rincés dans un tampon phosphate (PBS) pendant vingt-quatre heures puis transférés dans une

solution de sucre 30% afin d'éviter l'éclatement des cellules lié à une éventuelle congélation.

8.2.2. Coupes histologiques

Les cerveaux ont été placés sur la platine d'un microtome (Leica SM2010R), surmontés de sucre 10% puis congelés afin d'en faciliter la découpe. Des coupes sériées de 30 µm ont alors été réalisées puis conservées dans une solution cryoprotectrice (pH 7,3-7,5 ajusté avec HCL ; [Tableau 12](#)) évitant l'éclatement des cellules après congélation. Les coupes sont conservées à -20°C jusqu'à utilisation.

	Quantité
Tris HCL	66 g
Tris Base	9,6 g
NaCl	18 g
Éthylène Glycol	600 mL
Glycérol	600 mL
dH2O	800 mL

[Tableau 12](#) : Composition du liquide de conservation cryoprotectant.

8.2.3. Immunohistochimie

Après deux rinçages d'une heure dans un tampon phosphate contenant du Triton X-100 (PBS-T), les coupes dites flottantes, ont été incubées avec une solution inhibant les peroxydases endogènes (1/10 H2O2, 1/10 MeOH 100%, 8/10 PBS) pendant quinze minutes à température ambiante. Après plusieurs rinçages, les coupes ont alors été saturées en protéines à l'aide d'une solution à base de sérum d'âne (NDS, 10% BioRad Cat# C06SBZ) et de sérum bovin (BSA, 0,1%). Après trente minutes, les coupes sont incubées avec les anticorps primaires, sous agitation toute la nuit à 4°C :

- Anti-Cx43 (souris anti-Cx43, BD Transduction Cat# 610062) 1:250
- Anti-Cx30 (lapin anti-Cx30, Ivitrogen Cat# 712200) 1:250
- Anti-GFAP (chèvre anti-GFAP, Abcam Cat# ab53554) 1:500

Le lendemain après plusieurs rinçages, les coupes ont été incubées avec les anticorps secondaires :

- Alexa fluor® âne anti-souris 555 (Ivitrogen, Cat# A31570) 1:500
- Alexa fluor® âne anti-lapin 488 (Life Tech, Cat# A21206) 1:500
- Alexa fluor® âne anti-chèvre 647 (Life Tech, Cat# A2447) 1:500

Après deux heures d'incubation à température ambiante, les coupes ont été montées entre lame et lamelle en utilisant un milieu de montage à base de Mowiol (Millipore Cat# 475904).

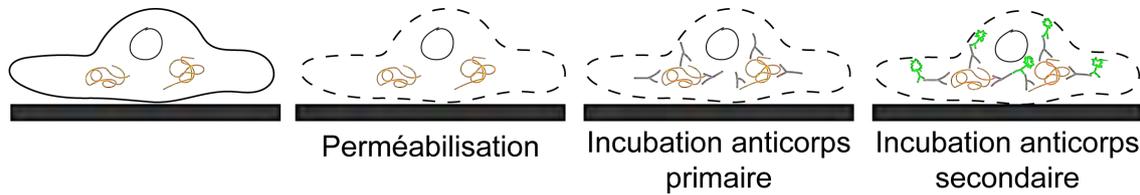


Figure 26 : Schéma simplifié de la technique d'immunohistochimie.

Après perméabilisations, les coupes flottantes ont été incubées avec les anticorps primaires dirigés contre la/les protéine(s) d'intérêt(s) (« Y » gris sur le schéma). Enfin, les coupes ont été incubées avec des anticorps secondaires couplés à un fluorochrome et dirigés contre les anticorps primaires utilisés précédemment (« Y » verts).

8.2.4. Analyse

Chaque lame a ensuite été analysée soit à l'aide d'un microscope photonique à fluorescence permettant une analyse confocale, soit à l'aide d'un microscope photonique à fluorescence permettant une analyse en champ large. Les deux types de microscopes sont connectés à une caméra CCD elle-même connectée à un ordinateur équipé du logiciel Leica ou du logiciel Mercator (Explora Nova, La Rochelle, France) respectivement. L'utilisation d'une caméra CCD permet le traitement du signal et l'obtention d'images numériques. Deux prises de vues par région d'intérêt ont été réalisées par lame : l'une au niveau de l'hémisphère gauche, l'autre au niveau de l'hémisphère droit sous un objectif x20.

La quantification a ensuite été réalisée sur le logiciel FIJI (<http://imagej.nih.gov/ij/>, NIH, USA). Pour chaque image obtenue le niveau de gris moyen a été analysé sur un carré de 500 x 500 pixels au niveau de la région d'intérêt.

9. Analyses statistiques

Dans ces travaux de thèse, les différentes analyses statistiques ont été réalisées à l'aide du logiciel IBM® SPSS® statistics (v23, IBM CORP. USA). Tous les résultats ont été représentés en moyenne \pm S.E.M.

- Étude 1 : Les tests comportementaux (OF, EPM, NSF, TST, FST, SP, OR) ont été analysés par un test-t de Student.

Le FST réalisé chez les souris Gap26 \pm kétamine \pm NBQX a été étudié à l'aide d'un test ANOVA. Un test post-hoc de Sidak a été réalisé pour mettre en évidence une quelconque différence entre les groupes.

Les cinétiques de microdialyse ont été analysées par une ANOVA à deux facteurs (génotype x temps) à mesures répétées. Un test post-hoc de Sidak a ensuite été

réalisé pour mettre en évidence une quelconque différence entre les groupes. Les aires sous la courbe ont été analysées avec un test-t de Student.

Un test-t de Student a permis d'étudier l'expression protéique mesurée en western blot et en IHC.

- Étude 2 : Les données générées dans le TST ont été analysées à l'aide d'une ANOVA à deux facteurs (génotype x traitement) suivit d'un test post-hoc de Sidak pour mettre en évidence une quelconque différence entre les groupes.

Les cinétiques de microdialyse ont été analysées par une ANOVA à deux facteurs (génotype x temps) à mesures répétées suivit d'un test post-hoc de Fisher (LSD) pour mettre en évidence une quelconque différence entre les groupes. Les aires sous la courbe ont été analysées avec un test-t de Student.

Les données générées en électrophysiologie ont été analysées par une ANOVA à deux facteurs (génotype x traitement) à mesures répétées suivit d'un test post-hoc de Fisher (LSD) pour mettre en évidence une quelconque différence entre les groupes.

Un test-t de Student a permis d'étudier l'expression protéique mesurée en IHC.

- Étude 3 : Un test-t de Student a permis d'étudier les données générées en comportement (OF, NSF, TST, FST, OR).

La corticostéronémie et l'hyperthermie induite par le stress ont été étudiées à l'aide d'un test ANOVA à deux facteurs (génotype x temps) à mesure répétées. Un test post-hoc de Sidak a été réalisé pour mettre en évidence une quelconque différence entre les groupes.

Les cinétiques de microdialyse ont été analysées par une ANOVA à deux facteurs (génotype x temps) à mesures répétées. Un test post-hoc de Sidak a été utilisé pour mettre en évidence une quelconque différence entre les groupes.

- Étude 4 : Tous les tests comportementaux (Fur Coat State, OF, NSF, TST, z-score émotionnel) ont été analysés avec une ANOVA, le facteur traitement utilisé comme facteur de variation. Un test post-hoc de Sidak afin de mettre en évidence une quelconque différence entre les groupes.

RÉSULTATS

Chapitre 1 : Étude des effets comportementaux et neurochimiques de l'inactivation des Cx43 en conditions physiologiques

Ouvrant la voie à de nouvelles recherches en psychopharmacologie, des études récentes suggèrent que les astrocytes pourraient jouer un rôle important dans le développement de la DM. En particulier, Nagy et ses collaborateurs ont observé chez des patients souffrant de DM, une réduction significative de l'expression de plusieurs marqueurs astrocytaires comme la protéine GFAP ou encore les transporteurs GLT-1 et GLT-2 du glutamate (Nagy et al 2015). De telles observations ont été également rapportées dans un modèle de dépression chez le rat (Banar et al 2010). En soumettant les animaux à trente-cinq jours de stress imprévisibles, les auteurs ont mis en évidence une corrélation entre le phénotype pseudodépressif des animaux et une diminution de GFAP dans le cortex préfrontal. De manière intéressante, ces altérations sont corrigées par un traitement au riluzole, un inhibiteur de la neurotransmission glutamatergique. Principalement décrite dans le cortex (Torres-Platas et al 2015), une région dans laquelle la morphologie des neurones est fortement perturbée chez des patients dépressifs (Zhang et al 2015b), la diminution d'expression de protéines astrocytaires peut être étendue à de nouveaux marqueurs dont la Cx43 (Medina et al 2016). Plusieurs travaux révèlent une diminution de ces protéines dans le cortex préfrontal de patients suicidés (Miguel-Hidalgo et al 2014). Chez le rongeur, une étude *in vitro* révèle par ailleurs qu'une forte concentration de corticostérone (CORT : 50 μ M) induit une diminution de l'expression des Cx43 non seulement à partir de cultures primaires d'astrocytes corticaux mais aussi issues de l'hippocampe (Xia et al 2018b).

Les Cx43 interviennent dans la formation de deux entités fonctionnelles distinctes : les JC et les hémicanaux HC qui seraient altérées dans la DM. En effet, une diminution de l'activité JC dans le cortex préfrontal de rats soumis à vingt-huit jours de stress chroniques imprévisibles a été mise en évidence à l'aide de la technique de « scrape-loading » et de diffusion de LY (Sun et al 2012). En revanche, il a été montré que l'application d'un stress chronique augmente l'activité HC (Orellana et al 2015) à l'aide d'étude de diffusion du bromure d'éthidium (EtBr).

Face à de telles modifications laissant entrevoir que le stress influence la balance fonctionnelle entre JC et HC, nous avons cherché à déterminer quels étaient les effets comportementaux et neurochimiques de l'inactivation des Cxs astrocytaires en nous focalisant sur différentes réponses modulées par le stress telles que l'anxiété, la résignation ou l'incurie. Dans ce premier chapitre, nous avons utilisé différentes méthodes d'inactivation notamment génétique des Cx43. Dans ce travail de thèse, nous nous

sommes focalisés sur les Cx43 qui sont les formes les plus abondantes des Cxs astrocytaires dans le SNC (Lynn et al 2011, Perez Velazquez et al 1996).

1. Modèle d'inactivation constitutive des Cx43 : souris Cx43 KD

1.1. *Caractérisation histologique et comportementale*

La lignée Cx43 Knock-Down (Cx43 KD) a été décrite pour la première fois en 2001 par Martin Theis et ses collaborateurs (Theis et al 2001). Des anomalies d'expression géniques et comportementales ont été décrites chez ces animaux. Le simple fait d'insérer des séquences « loxP » dans le gène de la Cx43 induit une diminution de 50% de l'expression de la protéine (Theis et al 2003).

Dans nos travaux, nous avons profité de cette délétion afin de caractériser plus précisément le phénotype de cette lignée de souris ayant transité dans différents laboratoires avant que le CRCA n'en assure l'élevage. En accord avec les données de Theis, nous avons pu mettre en évidence une diminution de l'expression des Cx43 en conditions physiologiques. De manière surprenante, notre analyse en western blot révèle que cette diminution est de l'ordre de 90% dans différentes régions cérébrales dont l'hippocampe ($p < 0,001$), le cortex préfrontal ($p < 0,001$) et l'hypothalamus ($p < 0,001$) (Figure 27A-C). Pour une raison encore inconnue, nous avons également remarqué que dans les tissus périphériques comme le cœur, le niveau d'expression de la Cx43 n'est pas impacté, ce qui explique probablement la viabilité de cette lignée de souris, alors que les souris KO Cx43 meurent prématurément. Theis et ses collaborateurs ayant, par ailleurs, montré une augmentation de l'expression des Cx30, nous avons quantifié ce sous-type de Cxs dans la lignée de souris Cx43 KD (Figure 27D-F). Notre étude n'a pas permis de mettre en évidence un tel phénomène de compensation dans l'hippocampe ($p = 0,408$), le cortex préfrontal ($p = 0,078$) ou l'hypothalamus ($p = 0,365$).

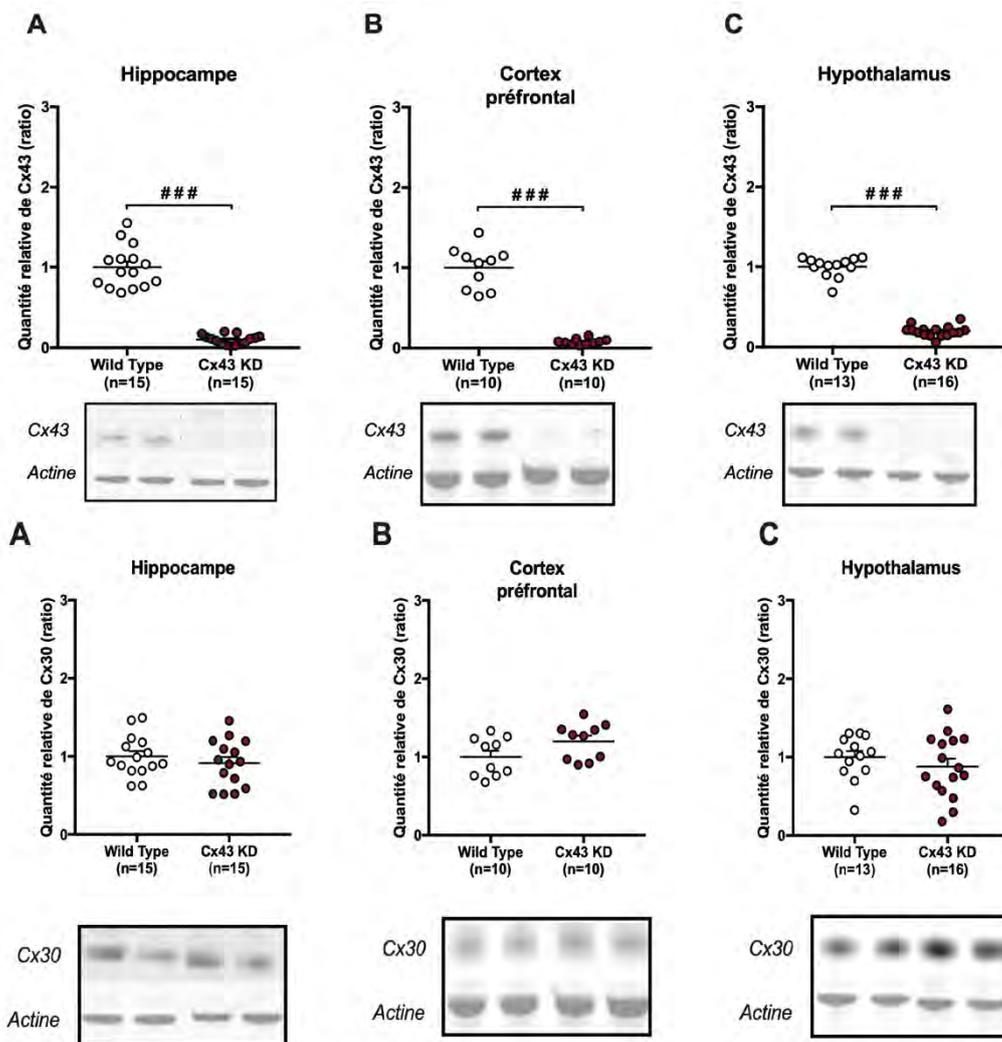


Figure 27 : Expression des Cx43 et Cx30 dans l'hippocampe, le cortex préfrontal et l'hypothalamus mesurée par western-blot chez des souris Cx43 floxées dites Cx43 KD.

L'expression des Cx43 est fortement diminuée dans les régions du système limbique et de l'axe hypothalamo-hypophysaire-surrénalien telle que l'hippocampe (A), le cortex préfrontal (B) ou l'hypothalamus (C). L'expression des Cx30 reste inchangée dans ces trois structures (D, E et F). Pour chaque graphique, les résultats sont représentés en moyenne \pm S.E.M de l'expression relative de protéine. Test-t de Student comparant les moyennes des groupes de souris sauvages (wild-type, WT) et knock-down (Cx43 KD). ### $p < 0,001$: significativement différent du groupe WT.

Dans l'hippocampe, nous avons apporté une seconde vérification de la diminution des Cx43 (Figure 28A-B) en utilisant la microscopie photonique à fluorescence. Nos résultats montrent que l'expression des Cx43 est diminuée dans l'hippocampe (test-t de Student $p=0,032$) alors que l'expression de la Cx30 reste inchangée ($p=0,442$). De manière intéressante, cette diminution de l'expression des Cx43 s'accompagne d'une diminution de l'expression de GFAP dans cette même région ($p < 0,001$).

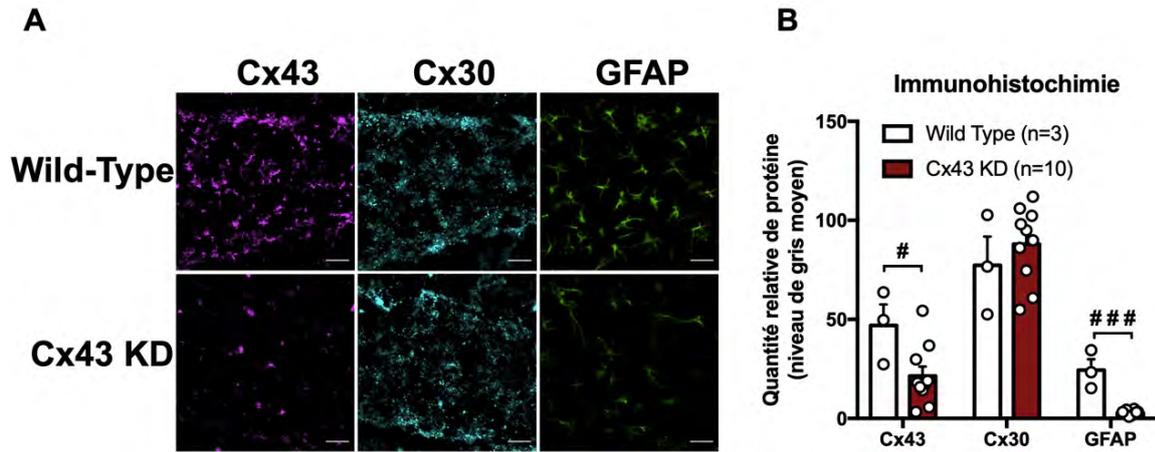


Figure 28 : Expression de la Cx43, Cx30 et de la GFAP dans l'hippocampe dorsal de souris Cx43 floxées dites Cx43 KD, par immunohistochimie.

L'expression des Cx43 et de la GFAP est fortement diminuée dans l'hippocampe dorsal, alors que l'expression des Cx30 reste inchangée. (A). Quantification de l'intensité de fluorescence des Cx43, Cx30 et GFAP (B). Les résultats sont représentés en moyenne \pm S.E.M de l'intensité moyenne de fluorescence. Test-t de Student comparant les moyennes des groupes de souris sauvages (wild-type, WT) et knock-down (Cx43 KD). # $p < 0.05$ et ### $p < 0,001$: significativement différent du groupe WT.

Il est donc possible que la diminution de Cx43 résulte d'une diminution du nombre d'astrocytes. Pour exclure cette hypothèse (Figure 29), nous avons utilisé un autre marqueur astrocytaire (ALDH1L1) comme reflet de la densité d'astrocytes alors que la GFAP traduit l'état d'activation de ces cellules. De manière intéressante, l'expression d'ALDH1L1, mesurée en western blot est comparable entre les souris Cx43 KD et WT (test-t de Student, $p = 0,1704$).

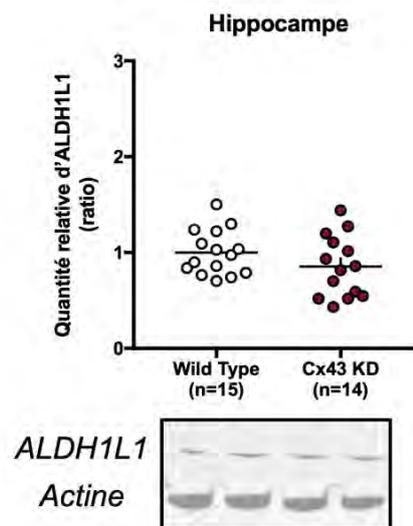


Figure 29 : Expression de la protéine ALDH1L1 dans l'hippocampe mesurée par western-blot. L'expression d'ALDH1L1 n'est pas diminuée dans l'hippocampe de souris Cx43 KD. Les résultats sont représentés en moyenne \pm S.E.M de l'expression relative de protéine. Test-t de Student comparant les moyennes des groupes de souris sauvages (wild-type, WT) et knock-down (Cx43 KD).

En utilisant une batterie de tests permettant l'étude des comportements anxio/dépressifs, nous avons mis en évidence que la perte d'expression des Cx43 au niveau du SNC chez les souris Cx43 KD était suffisante pour induire un comportement de type anxiolytique/antidépresseur, notamment dans des paradigmes provoquant un fort niveau de stress comme le test d'alimentation supprimée par la nouveauté ou encore le test de suspension caudale.

Ces travaux font l'objet d'une publication intitulée « *Attenuated Levels of Hippocampal Connexin43 and its Phosphorylation Correlate with Antidepressant- and Anxiolytic-Like Activities in Mice* » (Quesseveur G.[†], Portal B.[†], Basile J-A., Ezan P., Mathou A., Halley H., Leloup C., Fioramonti X., Déglon N., Giaume C., Rampon C., Guiard B. P.) parue en décembre 2015 dans la revue *Frontiers in Cellular Neuroscience* (<http://doi.org/10.3389/fncel.2015.00490>).

ARTICLE 1

Attenuated Levels of Hippocampal Connexin43 and its Phosphorylation Correlate with Antidepressant- and Anxiolytic-Like Activities in Mice.

Quesseveur G.[†], Portal B.[†], Basile J-A., Ezan P., Mathou A., Halley H., Leloup C., Fioramonti X., Déglon N., Giaume C., Rampon C., Guiard B.

Front Cell Neurosci. 2015 Dec 22 ; 9:490

[†] : Ces auteurs ont contribué de manière égale à cette étude

Résumé :

De nombreuses évidences cliniques et précliniques révèlent l'importance d'un dysfonctionnement glial dans la dépression majeure. De la même manière, l'effet des antidépresseurs passerait, en partie, par l'augmentation et/ou la stimulation de l'activité des astrocytes. Néanmoins, le ou les mécanisme(s) par lesquels les astrocytes régulent les émotions restent peu documentés.

Ces cellules gliales communiquent entre elles par des jonctions communicantes mais interagissent également avec les neurones par l'intermédiaire de canaux non appariés, les hémicanaux. Ces deux unités fonctionnelles de communications sont composées de connexines dont les sous-types sont les connexines 30 et 43 (Cx30/Cx43) exprimés majoritairement par les astrocytes.

En utilisant des approches génétiques et pharmacologiques, cette étude s'intéresse aux Cx43 et leur(s) rôle(s) dans les comportements anxio/dépressifs. Le premier objectif de cet article est d'étudier le rôle de l'inactivation génétique des Cx43 dans une lignée Cx43 knock-down, sur le comportement anxio/dépressif. Nous avons également étudié l'expression des Cx43 dans l'hippocampe de souris exposées de manière chronique à la corticostérone (CORT) administrée seule ou en combinaison avec un inhibiteur sélectif de la recapture de sérotonine (ISRS), la fluoxétine.

Nos résultats montrent que l'inactivation génétique des Cx43 induit des comportements de type anxiolytiques/antidépresseurs associés à une amélioration des performances mnésiques. Dans une deuxième cohorte d'animaux sauvages, nous montrons qu'un traitement chronique à la CORT induit un comportement anxio/dépressif qui est atténué par un traitement chronique à la fluoxétine. De manière intéressante, la CORT augmente la phosphorylation des Cx43 dans l'hippocampe alors que la fluoxétine normalise cette expression.

Les résultats de cette étude laissent entrevoir la possibilité que les effets antidépresseurs de la fluoxétine passent (du moins en partie) par une diminution de l'expression/fonction

des Cx43, résultant d'une diminution de la phosphorylation de ces protéines dans l'hippocampe.

Contribution personnelle

Au cours de ce travail :

- J'ai participé à la caractérisation comportementale des souris Cx43 KD sous la responsabilité du Pr Bruno Guiard,
- J'ai réalisé les western blots permettant l'analyse de l'expression des Cx43.



Attenuated Levels of Hippocampal Connexin 43 and its Phosphorylation Correlate with Antidepressant- and Anxiolytic-Like Activities in Mice

Gaël Quesseveur^{1†}, Benjamin Portal^{2†}, Jean-Arnaud Basile², Pascal Ezan³, Alexia Mathou⁴, Hélène Halley², Corinne Leloup⁴, Xavier Fioramonti⁴, Nicole Déglon⁵, Christian Giaume³, Claire Rampon² and Bruno P. Guiard^{1,2*}

¹ Institut National de la Santé et de la Recherche Médicale UMR-S 1178 – Dépression, Plasticité and Résistance Aux Antidépresseurs, Laboratoire de Neuropharmacologie EA 3544, Faculté de Pharmacie, Université Paris-Sud, Châtenay-Malabry, France, ² Centre National de la Recherche Scientifique, Centre de Recherches sur la Cognition Animale UMR 5169, Centre de Biologie Intégrative, Université Toulouse III– Paul Sabatier, Toulouse, France, ³ Center for Interdisciplinary Research in Biology, Centre National de la Recherche Scientifique UMR 7241, Collège de France, Paris, France, ⁴ Centre des Sciences du Goût et de l'Alimentation – Centre National de la Recherche Scientifique UMR 6265 – Institut National de la Recherche Agronomique UMR 1324, Université de Bourgogne, Dijon, France, ⁵ Laboratory of Cellular and Molecular Neurotherapies, Department of Clinical Neurosciences, Centre Hospitalier Universitaire Vaudois, Lausanne, Switzerland

OPEN ACCESS

Edited by:

Luisa Pinto,
University of Minho, Portugal

Reviewed by:

Bernhard J. Mitterauer,
Volitronics-Institute for Basic
Research, Psychopathology
and Brain Philosophy, Austria
Maciej Figiel,
Institute of Bioorganic Chemistry,
Polish Academy of Sciences, Poland

*Correspondence:

Bruno P. Guiard
bruno.guiard@univ-tlse3.fr

[†]These authors have contributed
equally to this work.

Received: 23 October 2015

Accepted: 03 December 2015

Published: 22 December 2015

Citation:

Quesseveur G, Portal B, Basile J-A, Ezan P, Mathou A, Halley H, Leloup C, Fioramonti X, Déglon N, Giaume C, Rampon C and Guiard BP (2015) Attenuated Levels of Hippocampal Connexin 43 and its Phosphorylation Correlate with Antidepressant- and Anxiolytic-Like Activities in Mice. *Front. Cell. Neurosci.* 9:490. doi: 10.3389/fncel.2015.00490

Clinical and preclinical studies have implicated glial anomalies in major depression. Conversely, evidence suggests that the activity of antidepressant drugs is based, at least in part, on their ability to stimulate density and/or activity of astrocytes, a major glial cell population. Despite this recent evidence, little is known about the mechanism(s) by which astrocytes regulate emotionality. Glial cells communicate with each other through gap junction channels (GJCs), while they can also directly interact with neurons by releasing gliotransmitters in the extracellular compartment via an hemichannels (HCs)-dependent process. Both GJCs and HCs are formed by two main protein subunits: connexins (Cx) 30 and 43 (Cx30 and Cx43). Here we investigate the role of hippocampal Cx43 in the regulation of depression-like symptoms using genetic and pharmacological approaches. The first aim of this study was to evaluate the impact of the constitutive knock-down of Cx43 on a set of behaviors known to be affected in depression. Conversely, the expression of Cx43 was assessed in the hippocampus of mice subjected to prolonged corticosterone (CORT) exposure, given either alone or in combination with an antidepressant drug, the selective serotonin reuptake inhibitor fluoxetine. Our results indicate that the constitutive deficiency of Cx43 resulted in the expression of some characteristic hallmarks of antidepressant-/anxiolytic-like behavioral activities along with an improvement of cognitive performances. Moreover, in a new cohort of wild-type mice, we showed that CORT exposure elicited anxiety and depression-like abnormalities that were reversed by chronic administration of fluoxetine. Remarkably, CORT also increased hippocampal amounts of phosphorylated form of Cx43 whereas fluoxetine treatment normalized this parameter. From these results, we envision that antidepressant drugs may exert their therapeutic activity by decreasing the expression and/or activity of Cx43 resulting from a lower level of phosphorylation in the hippocampus.

Keywords: astrocytes, connexin 43, antidepressants, depression, anxiety, hippocampus, stress, behavior

INTRODUCTION

Major depression (MD) is one of the most common mental disorders, affecting 350 million people worldwide and is a leading cause of disability (Milanovic et al., 2015). MD imposes substantial economic costs and its impact on disability, productivity, and quality of life further accentuates these costs (Lecrubier, 2001). Evidence indicates that stressful life events increase the risk for MD (Binder and Nemeroff, 2010). As a consequence, classically used animal models of depression rely on the activation of the hypothalamus-pituitary-adrenal (HPA) axis in order to reproduce part of the physiological, neurochemical and morphological maladaptive changes detected in depressed patients (Dalvi and Lucki, 1999). Selective serotonin reuptake inhibitors (SSRIs) represent the most widely prescribed class of antidepressant drugs, but approximately 50% of depressed patients do not respond adequately to SSRI. Moreover even in responders, the onset of therapeutic action is of 2–4 weeks (Blier, 2001). Considering the prevalence of MD and its consequences on life's quality, a better knowledge of its pathophysiology is required to envision the identification of new therapeutic targets.

Opening the way for a promising area of pharmacological interventions, recent data suggest that glia plays an important role in MD and in antidepressant drugs response (Quesseveur et al., 2013a). Indeed, reduced expression of the glial fibrillary acidic protein (GFAP) has been observed in the brain of depressed patients (Miguel-Hidalgo et al., 2000; Webster et al., 2001; Si et al., 2004; Nagy et al., 2015). This glial anomaly, specifically identified in limbic regions (Torres-Platas et al., 2015), is not restricted to GFAP since a decrease in cortical mRNA expression of astrocyte-enriched genes including ALDH1L1, SOX9, GLUL, SCL1A3 has been reported in a large cohort of depressed patients (Nagy et al., 2015). In agreement with the latter findings, subjecting animals to unpredictable chronic mild stress (UCMS) or prolonged social defeat, two animal models of depression, also elicits an attenuation of GFAP (mRNA or protein) in the cortex (Banasr et al., 2010) or the hippocampus of rats (Czeh et al., 2006; Araya-Callis et al., 2012). An elevation in stress-induced glucocorticoids might have contributed to this effect as studies indicated that corticosterone (CORT) can lower GFAP levels in the rat brain (Nichols et al., 1990). Despite this evidence, little is known about the mechanism(s) by which astrocytic activity may regulate emotionality and its related brain circuits.

Astrocytes have the ability to communicate with each other through GJCs, while they can also communicate directly with neurons by releasing gliotransmitters in the extracellular compartment via hemichannels (HCs). In astrocytes, both GJCs and HCs are formed by two main subunits: connexins 30 and 43 (Cx30 and Cx43; Rouach and Giaume, 2001). A few months ago, a post-mortem study correlated MD with decreased levels of Cx43 immunoreactivity in the prefrontal cortex (Miguel-Hidalgo et al., 2014). Similarly, rats subjected to UCMS exhibit a significantly decreased expression and function of cortical and hippocampal Cx43 GJCs whereas typical antidepressant drugs such as fluoxetine, duloxetine, or the tricyclic amitriptyline increased astroglial Cx43 protein levels (Li et al., 2010; Sun et al.,

2012; Morioka et al., 2014; Mostafavi et al., 2014). Although the latter studies focused their attention on Cx43 without providing information about Cx30, these clinical and preclinical observations raise the possibility that the down-regulation and/or functional inactivation of astroglial Cx GJCs could produce deleterious effects on mood. Conversely, the over-expression and/or activation of astroglial Cxs GJCs might underlie, at least in part, antidepressant drugs response. However, the role of astroglial Cxs in the regulation of emotional states could be more complicated than expected. Indeed, it was recently reported that restraint stress increases the opening of Cx43 HCs in the hippocampus, thereby promoting the release of glutamate in a neurotoxic concentration for neighboring cells (Orellana et al., 2015). Connexin 43 HCs activity may thus constitute a prerequisite condition for the damaging effects of chronic stress on neuronal activity and related functions. Consequently and given the importance of adult hippocampal neurogenesis in antidepressant drug response (Santarelli et al., 2001; Surget et al., 2008; David et al., 2009), the latter results suggest, that the inactivation of Cx43 HCs might positively influence emotionality.

Here, we questioned the role of hippocampal Cx43 in the regulation of emotion-related behaviors using complementary genetic and pharmacological approaches. In the first part of this study, we evaluated the impact of the constitutive knock-down of Cx43 on a set of well-defined behavioral paradigms known to recapitulate several symptoms of depression. The second part of this work was designed to investigate the putative changes in hippocampal Cx43 expression in mice chronically exposed to the stress hormone CORT, either alone or in combination with the SSRI fluoxetine. The choice of the hippocampus was based on the fact that this brain region is subjected to intense structural changes and remodeling in MD while an important part of the therapeutic activity of antidepressant drugs relies on their ability to block or reverse impairments of plasticity caused by stress or related pathologies (Warner-Schmidt and Duman, 2006).

MATERIALS AND METHODS

Animals

For experiment 1, 7 week-old male transgenic Cx43^{fl/fl} mice were used and wild-type littermates (Cx43^{wt/wt}) with a similar mixed 129P2-C57BL/6 background served as controls (Theis et al., 2001). For experiments 2 and 3, 7 week-old wild-type C57BL/6J mice were used. All mice weighed between 25 and 35 g at the time of behavioral assessment. Mice were housed by 4–5 per cage under standard conditions (12:12 h light-dark cycle, light on at 7 am, 22 ± 1°C ambient temperature, 60% relative humidity). The “Centre de Recherches sur la Cognition Animale (CRCA)” has received French legal approval for experiments on living vertebrate animals (Arrêté Préfectoral: 9-02-2011). This work was carried out in accordance with the Policies of the French Committee of Ethics. Animal surgery and experimentations conducted in this study were authorized by the French Direction of Veterinary Services to CR (#31-1155521, 2002) and all efforts were made to improve animals' welfare and minimize animals suffering.

Drugs and Surgery

Corticosterone (from Sigma–Aldrich, Saint-Quentin Fallavier, France) was dissolved in vehicle (beta-cyclodextrin 0.45%) as previously described (David et al., 2009). CORT (35 μ g/ml, equivalent 5 mg/kg/day) was delivered alone or in presence of the antidepressant drug fluoxetine in opaque bottles to protect it from light, available *ad libitum* in the drinking water. Fluoxetine hydrochloride (18 mg/kg per day for 1 month) was purchased from Anawa Trading (Wangen, Switzerland) and was used at a dose that reversed CORT-induced behavioral anomalies (David et al., 2009). In this study, we also used the non-selective Cx blocker carbenoxolone (CBX; Rouach et al., 2003) at a concentration of 10 mM based on a previous report showing its ability to modulate memory (Bissiere et al., 2011; Sun et al., 2012). One week before the tests, wild-type mice were anesthetized with chloral hydrate (400 mg/kg; i.p.). They were then placed on a stereotaxic frame and bilaterally implanted with 29 gage guide cannulae (Cooper's needle works LTD) in the ventral hippocampus using the following coordinates: -2.5 posterior from bregma, ± 2.8 mm lateral to midline and 2.0 ventral from the dura. The implants were secured to the skull with dental acrylic. Dummy cannulae were inserted from the end of surgery until the infusion day to prevent clogging of the guides. For its bilateral micro-infusion in the ventral hippocampus (0.3 μ l per side at a constant rate of 0.1 μ l/min), CBX was dissolved in 0.1 M sterile PBS. 33 gage internal injection cannulae, extending 0.5 mm beyond the guide cannulae, were inserted and connected to a microsyringe driven by a microinfusion pump. The cannulae were left in place for an additional 2 min before being withdrawn and the animals were allowed an additional 15 min before the beginning of experimentation. Vehicle animals were also cannulated and received similar volumes of 0.1 M sterile PBS.

Behavioral Tests

All behavioral tests were performed in the morning to avoid differences in locomotor activity and other variables affected by circadian rhythm. Previous studies have indicated that certain test variables are sensitive, whereas others are resistant, to test order (McIlwain et al., 2001). Bearing this in mind, performance was then evaluated from the least to the most stressful test, thereby decreasing the chance that one test might impact the behavior evaluated in the subsequent paradigm. Importantly, since prior handling and testing have been described to reduce exploratory activity and emotionality in mice (Vöikar et al., 2004), animals were tested only once in each paradigm. Finally, given that it has been demonstrated that the interval between behavioral tests could be as short as 1 day, with a weak effect on overall performance (Paylor et al., 2006), in the present study, a 2-day recovery period between tests was provided. It is also important to state that by reducing the inter-test interval, we reduced the possible effects of time on drug administration on tests.

The Sucrose preference test (SPT) was performed in singed-house mice habituated for 48 h to drink water from two bottles. On the following 3 days, the mice could choose between a water bottle and a 1% sucrose solution bottle, switched daily. Sucrose solution intake for 24 h was measured during the last day and

expressed as a percentage of the total amount of liquid ingested and normalized to the mouse body weight.

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

The tail suspension test (TST) was performed using the BIOSEB's Tail Suspension Test system (Bioseb) during a 6-min session period. Immobility time was scored as an index of resignation. Movements in terms of energy and power in motion were measured to ensure the absence of any locomotor bias.

The Elevated plus maze (EPM) was performed by placing animals into the central area facing one closed arm and were allowed to explore the maze for 5 min. Testing took place in bright dimmed light conditions (800–900 lux). Automated scoring was done using ANY-maze(tm) behavioral video-tracking software from Stoelting Co (Bioseb, Vitrolles, France). Total number of entries and time spent in the open arms were measured.

The Open field (OF) was performed in 40 cm \times 40 cm Plexiglas boxes (Mouse Open Field Arena ENV-510; Med Associates Inc.) during a 30-min session period. Activity chambers were computer interfaced for data analysis (SOF-811; Med associates Inc.), and two regions were defined by grid lines that divided each box into center and periphery areas, with each of the four lines located 11 cm away from each wall. The total number of entries, the ambulatory distance and the time spent in each compartment were measured.

The Novelty suppressed feeding (NSF) was performed in a white plastic box (30 cm \times 60 cm). Mice were food deprived for 24 h before testing and then placed in the corner of the box with their respective food pellet on a white square filter paper at the center of the arena under a bright light (~ 60 W) placed about 60–80 cm above the food pellet. Latency to begin eating was scored by a single experimenter, with a cut-off time of 10 min. Upon return to their home-cage, the total amount of food intake was measured for each animal and for a 5-min period to ensure the absence of differences in hunger/motivation to eat.

The Object location test (OLT) and the Object recognition test (ORT) started with an habituation to the open-field by exposing the mice to the apparatus for 10 min 1 day before starting the trials (day 1). During the training session, two identical objects were placed 15 cm away from the two opposite corners (day 2). Each mouse was placed in the center of the open-field, facing the objects and was allowed to freely explore the objects for 10 min. During the retention session held 24 h later (day 3), one object was displaced to a new position (in the OLT), or replaced by another one (in the ORT). Then, each mouse was placed in the center of the open-field facing the objects and was allowed to freely move for 10 min. Time spent exploring the different objects was recorded using Noldus Ethovision software.

The Fear conditioning (FC) consisted of a single conditioning session. During conditioning, each mouse was introduced into the conditioning chamber for a total of 4 min 30 s. After a 2-min exploration period, a sound (CS) was emitted for 30 s, and a foot-shock (US) was superposed to the tone during the last 2 s. The mice were then maintained in the chamber

for two additional min. After this procedure, the mouse was gently removed from the chamber. 24 h after the conditioning session, freezing to the context was assessed by again placing each mouse in the conditioning chamber. The level of freezing was measured during 4 min, no tone or foot-shock being presented to the animal. Two hours later, mice were tested for freezing to the tone in a modified context. Two minutes after introduction in the modified chamber, freezing was recorded during a 2-min tone presentation. Freezing behavior was both automatically recorded and scored by an experimenter blind to the experimental conditions. Data was calculated for the 4-min context recall test, the 2-min pre-tone, and the 2-min tone tests.

Emotionality z-Score

Z-normalization across complementary measures of emotionality-related behaviors assessed from different paradigms was applied after each experimental protocol. Simple mathematical tools were used to normalize data from each individual raw behavioral data to the mean of the control groups within each experimental cohort. Data were then integrated into a single value, named emotionality z-scores. Values were obtained by subtracting the average of observations in a population from an individual raw value and then dividing this difference by the population standard deviation as described previously (Guilloux et al., 2011; Petit et al., 2014). This type of normalization allows data on different scales to be compared. The emotionality z-score included the parameters measured in the ST (grooming time), the TST (immobility time), the elevated plus maze (open arms entries and open arms times), the open-field (center entries, center time, and center to total distance ratio) and the NSF (latency to feed). It is noteworthy that several parameters were calculated in the OF and EPM to evaluate anxiety. In order to have a same impact of each test on the emotionality z-score, we averaged the normalized parameters evaluated in the OF and EPM to obtain a single value per mouse and per behavioral test. More details about the mathematical method for emotionality z-score calculation are provided in **Supplementary Table S1**.

Western-Blot

Expression of Cx30 and Cx43 were analyzed by western blot as previously described (Ezan et al., 2012). Briefly, frozen hippocampi or hypothalamus were pulverized on dry ice, resuspended in boiling 2% SDS containing protease inhibitors (Roche), β -glycerophosphate (10 mM) and orthovanadate (1 mM), and sonicated on ice. Lysates were centrifugated at 13,000 rpm at 4°C and supernatants were diluted with 5x Laemmli buffer, and boiled 5 min. After quantification using the BCA protein assay kit (Pierce), protein samples (20 μ g/lane) were separated by electrophoresis on 10% polyacrylamide gels (Gel Nupage 4–12%, Bis-Tris) and transferred onto nitrocellulose membranes. Membranes were blocked for 1 h with 5% fat-free dried milk/TBS1x-0.1% Tween and incubated overnight at 4°C either with anti-Cx30 (rabbit polyclonal, Invitrogen 71-2200, 1/500) or anti-Cx43 (mouse monoclonal, BD Biosciences 610062, 1/500). The next day membranes were washed and incubated with peroxidase-conjugated goat anti-rabbit or goat

anti-mouse (HRP-IgG, Santa Cruz, respectively, sc-2004 or sc-2005, 1/2500), for 2 h at room temperature. Chemiluminescent signal was obtained using Western Lighting Plus ECL detection kit (Perkin-Elmer NEL104001EA). Blots were reprobed with anti-tubulin or anti-actin (mouse monoclonal, Sigma, 1/10,000 and 1/30,000; respectively, T6199, A3853) to check protein load. Semi-quantitative densitometric analysis was performed using ImageJ software. The analysis of Cx43 activity was assessed through its level of phosphorylation.

Experimental Design

In the experiment 1 (**Supplementary Figure S1A**), control Cx43^{wt/wt} and Cx43^{fl/fl} mice were subjected to a full comprehensive battery of behavioral tests to evaluate their phenotype. Separate cohorts were used to assess putative changes in depressive, anxious and cognitive symptoms.

In the experiment 2 (**Supplementary Figure S1B**), wild-type mice were subjected to CORT or its vehicle for 1 month and then administered with vehicle or fluoxetine for one additional month. The efficacy of CORT or antidepressants on behavioral performances were assessed in different paradigms. At the end of this procedure, mice brains were removed for the analysis of Cx43 activity through its level of phosphorylation.

Statistical Analysis

For all experiments, statistical data analysis (StatView 5.0 Abacus Concepts, Berkeley, CA, USA) used means \pm SEM. Student *t*-tests and one-way ANOVA followed on treatment factor by Fisher Protected Least Significance Difference *post hoc* test were used. The linear relationship between emotionality z-scores and the level of expression of non-phosphorylated Cx43 was analyzed by the Pearson's correlation coefficient after a Shapiro-Wik normality test. Significant level was set at $p < 0.05$.

RESULTS

Cx43 Controls Behavioral Symptoms Related to Depression and Anxiety

Given the distribution of Cx43 in astroglial and stem cells in the central nervous system (Dermietzel et al., 1989; Kunze et al., 2009), we proposed to generate mice with a specific inactivation of astroglial Cx43 in the hippocampus. To this end, we generated a pseudotyped MOKOLA lentiviral vectors to selectively drive the *in vivo* expression of the Cre-recombinase within hippocampal astrocytes of Cx43^{fl/fl} mice. The envelope confers to the virus a tropism toward these glial cells (Colin et al., 2009; Quesseveur et al., 2013b) and coupling with a detargeting strategy using miRNA9T and miRNA124T eliminates the putative residual expression of this Cre-recombinase in hippocampal stem cells and neurons, respectively, thus providing a selective astrocytic targeting. However, and as previously shown (Theis et al., 2003; Unger et al., 2012), we observed that Cx43^{fl/fl} mice themselves displayed a dramatic decrease in the expression of Cx43 relative to control Cx43^{wt/wt} mice in various brain regions including the hippocampus ($\sim -95\%$; $t_{1,11} < 0.001$) and the hypothalamus

(~85%; $t_{1,6} < 0.05$; **Figures 1A–D**). On this background, the relevance and the interest of our strategy consisting in over-expressing the Cre-recombinase within hippocampal astrocytes was limited. However, we took advantage of the knock-down of this protein to assess the consequences of constitutive Cx43 deficiency in a set of behavioral aspects known to be affected in depression: hedonic state, behavioral despair, self-care, anxiety, and cognition/memory by comparing Cx43^{fl/fl} mice and Cx43^{wt/wt} mice maintained on the same genetic background.

With respect to hedonic state, no differences in sucrose preference was detected between control Cx43^{wt/wt} and Cx43^{fl/fl} mice ($t_{1,16} = 0.34$; **Figure 2A**) suggesting that the loss of Cx43 did not interfere with mice's ability to experience pleasure. In the ST evaluating self-care, no difference in the time of grooming was noticed between Cx43^{wt/wt} and Cx43^{fl/fl} mice ($t_{1,16} = 0.8$; **Figure 2B**). We also assessed immobility during exposure to inescapable stress using the TST. Cx43^{fl/fl} mice showed a marked decrease in the immobility time compared to Cx43^{wt/wt} mice, indicative of a low level of despair ($t_{1,16} < 0.001$; **Figure 2C**).

Mice were then tested in behavioral paradigms assessing anxiety. In the elevated plus maze, no difference was observed between Cx43^{wt/wt} and Cx43^{fl/fl} mice in the time spent in the open arms ($t_{1,15} = 0.3$; **Figure 2D**) nor in the number of entries in these arms ($t_{1,15} = 0.4$, data not shown). In the OF, which evaluates locomotor activity in a novel environment as well as the level of anxiety, an increase, albeit not statistically significant, in the time spent ($t_{1,12} = 0.07$; **Figure 2E**) and the number of entries in the center area ($t_{1,12} = 0.09$; data not shown) was observed in Cx43^{fl/fl} mice. To eliminate a putative bias, we

verified that the loss of Cx43 did not affect the total distance traveled (Cx43^{wt/wt}: 8595 ± 575 vs. Cx43^{fl/fl}: 7679 ± 598 cm; $t_{1,12} = 0.3$). In the NSF, which evaluates animal's latency to consume food in a novel aversive environment, Cx43^{fl/fl} mice exhibited a decreased latency to feed compared to Cx43^{wt/wt} mice ($t_{1,16} < 0.05$; **Figure 2F** and **Supplementary Figure S2A** for survival curve). Importantly, body weight loss and food consumption in the home-cage were similar in both genotypes (**Supplementary Figures S2B,C**).

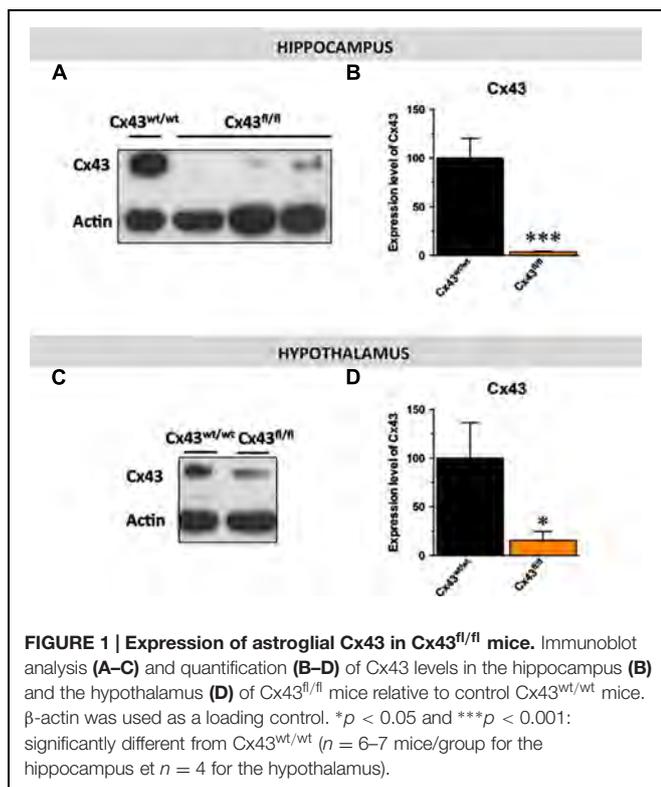
Finally, cognitive/memory functions were assessed by the measure of performances in the OLT (spatial memory), in the ORT (non-spatial working memory) and in the fear conditioning (contextual memory) successively. In the OLT, we found that Cx43^{fl/fl} mice did not display notable spatial memory deficits compared to control Cx43^{wt/wt} mice. Indeed, during memory testing 24 h after the acquisition phase, exploratory preference for mice of both groups were significantly higher than chance value (50%), indicating that animals from both genotypes remembered the initial position of the objects (Cx43^{wt/wt} mice: $p < 0.01$ and Cx43^{fl/fl} mice: $p < 0.05$; **Figure 2G**). Moreover, Cx43^{fl/fl} and control Cx43^{wt/wt} mice similarly explored the displaced object ($t_{1,15} = 0.1$; **Figure 2G**) indicating that Cx43 knock-down had no effect on spatial memory in this task.

During memory testing in the ORT, Cx43^{fl/fl} and control Cx43^{wt/wt} mice also explored to the same extent the novel object ($t_{1,15} = 0.6$) and both values were significantly different from chance value (Cx43^{wt/wt} mice: $p < 0.05$ and Cx43^{fl/fl} mice: $p < 0.01$; **Figure 2H**). It is noteworthy that during the acquisition phase of object location ($p = 0.5$) and ORT ($p = 0.7$), both groups of mice spent the same amount of time exploring the objects (**Supplementary Figures S2D,E**). In the fear conditioning, 24 h after the conditioning session, Cx43^{fl/fl} mice exhibited significantly more freezing than Cx43^{wt/wt} mice ($t_{1,15} < 0.01$; **Figure 2I**). These data are in favor of an improvement of the associative memory in Cx43^{fl/fl} mice. Interestingly, freezing to the tone was also studied in a modified context. As a validation of the experiment, freezing was measured before the shock on day 1 and no differences occurred between Cx43^{fl/fl} and control Cx43^{wt/wt} mice ($t_{1,15} = 0.12$; **Supplementary Figure S2F**).

These results indicate that the genetic loss of Cx43 elicits a behavioral phenotype which is similar to that observed in response to the chronic administration of antidepressant drugs.

Stress and the Selective Serotonin Reuptake Inhibitor Fluoxetine Display Opposite Effects on the Functional Activity of Hippocampal Cx43

Wild-type mice were first tested in behavioral paradigms assessing mood. In the splash and tail suspension tests, the one-way ANOVA indicated a significant effect of treatment factor [$F_{(2,29)} = 21.4$; $p < 0.001$ and $F_{(2,29)} = 3.7$; $p < 0.05$; respectively]. In the ST, chronic CORT exposure induced a significant decrease in the time of grooming relative to control mice ($p < 0.001$) whereas this depressive-like phenotype was reversed by the chronic administration of fluoxetine (18 mg/kg/day for 1 month; p.o.; $p < 0.001$; **Figure 3A**). In the TST, although CORT failed



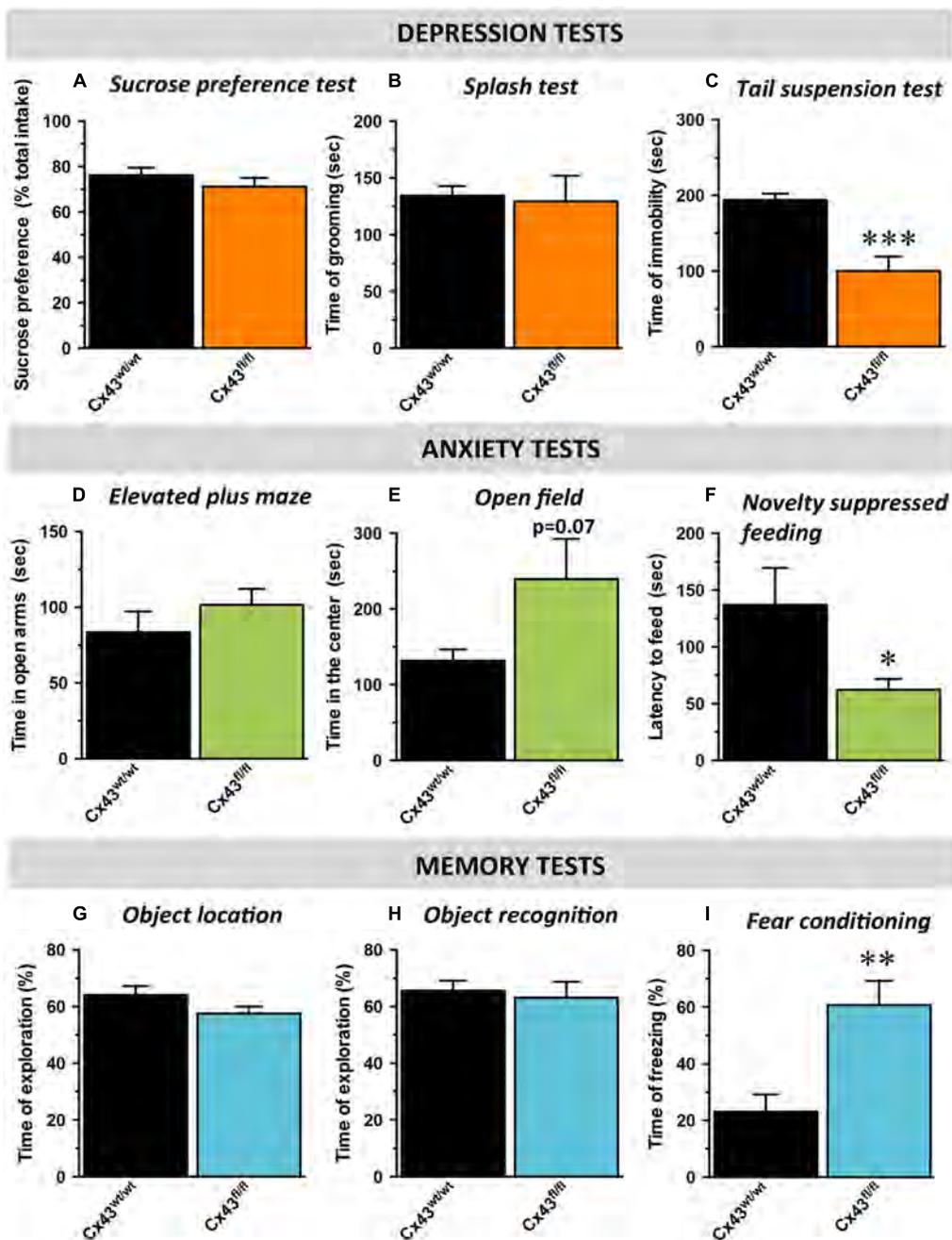
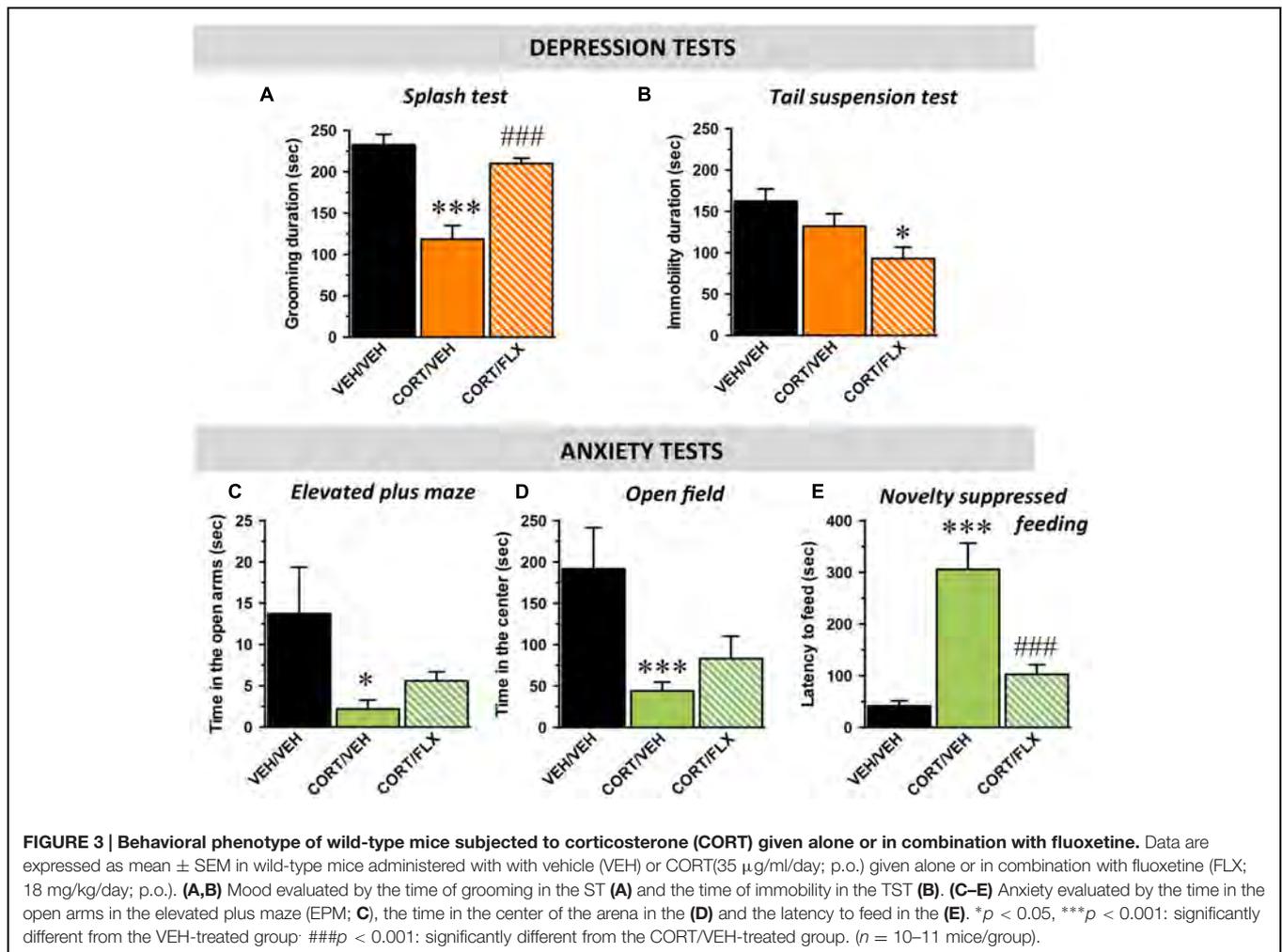


FIGURE 2 | Behavioral phenotype of Cx43^{fl/fl} mice related to mood, anxiety, and memory. Data are expressed as mean ± SEM. **(A–C)** Mood evaluated by the sucrose consumption in the sucrose preference test (SPT; **A**), the time of grooming in the splash test (ST; **B**) and the time of immobility in the tail suspension test (TST; **C**). **(D,E)** Anxiety evaluated by the time in the open arms of the elevated plus maze (EPM; **D**), the time in the center of the open field (OF; **E**) and the latency to feed in the novelty suppressed feeding (NSF; **F**). **(G–I)** cognitive performances evaluated by the time of exploration of the displaced object in the object location test (OL; **G**), of exploration of the novel object in the object recognition test (OR; **H**) and the time of freezing in the contextual fear conditioning (CFC; **I**). **p* < 0.05, ***p* < 0.01, ****p* < 0.001: significantly different from Cx43^{wt/wt} (*n* = 8–10 mice/group).

to decrease the time of immobility (*p* > 0.05), the addition of fluoxetine significantly reduced this parameter pointing its antidepressant-like activity (*p* < 0.05; **Figure 3B**).

With respect to anxiety, in the elevated plus maze, the one-way ANOVA on the time spent in the open arms revealed a significant

effect of treatment factor [*F*(_{2,29}) = 4.3; *p* < 0.05]. Indeed, CORT decreased this parameter (*p* < 0.05) whereas fluoxetine did not reverse this effect (*p* = 0.3; **Figure 3C**). In the OF, the one-way ANOVA revealed a significant effect of treatment factor on the time spent in the center but not on the number of entries in



this compartment [$F_{(2,29)} = 8,4$; $p < 0.01$ and $F_{(2,29)} = 2,1$; $p = 0.14$; respectively]. Hence, CORT decreased the time in the center ($p < 0.001$) and again, fluoxetine failed to significantly reverse this effect ($p = 0.3$; **Figure 3D**). Finally, in the NSF, the one way-ANOVA showed a significant effect of treatment factor [$F_{(2,29)} = 14,6$; $p < 0.001$]. CORT induced a significant increase in the latency to feed ($p < 0.001$) and this effect was reversed by fluoxetine ($p < 0.001$; **Figure 3E**). To eliminate putative bias, body weight loss and food consumption in the home cage were monitored and no differences were observed between the experimental groups [$F_{(2,29)} = 0,1$; $p = 0.8$ and $F_{(2,29)} = 0,2$; $p = 0.7$; respectively] (**Supplementary Figures S3A–C**).

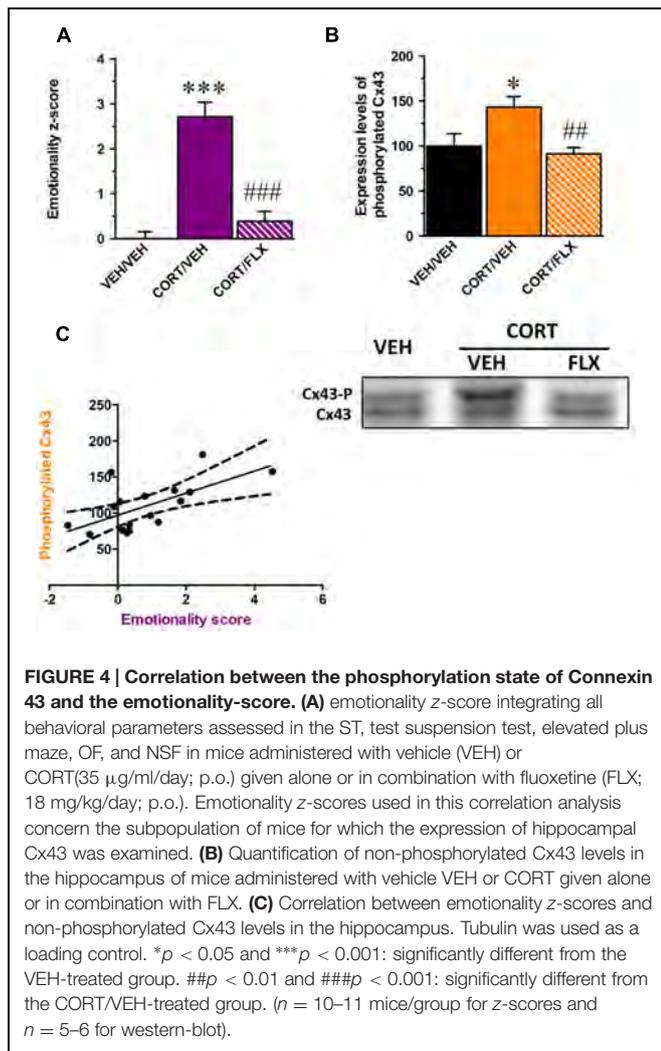
Because MD is multimodal, quantifiable assessment of depressive-like state is possible when different behavioral parameters can be measured in the same animal. Based on the *z*-score method, we thus normalized each parameter from the average of the corresponding values observed in the control group and integrated these values into a single score (**Supplementary Table S1**). We obtained an emotionality *z*-score for which the one-way ANOVA showed a significant effect of treatment factor [$F_{(2,29)} = 32,1$; $p < 0.001$]. As expected, CORT significantly increased the emotionality *z*-score relative to control

animals ($p < 0.001$) and this effect was reversed by fluoxetine ($p < 0.001$; **Figure 4A**).

In a subgroup of animal subjected to the behavioral paradigms, we examined their levels of Cx43 expression in the whole hippocampus. Although one way-ANOVA revealed no effect of treatment factor on total Cx43 levels [$F_{(2,14)} = 0,6$; $p = 0.5$] (**Supplementary Figure S4A**), a significant effect was reported on its phosphorylated form [$F_{(2,14)} = 5,8$; $p < 0.05$]. We showed that CORT increased the levels of phosphorylated Cx43 ($p < 0.05$) and this was reversed by fluoxetine ($p < 0.01$; **Figure 4B**). Interestingly, western blot analysis did not reveal any effect of treatment factor for the expression of total Cx30 in the hippocampus [$F_{(2,14)} = 1,2$; $p = 0.3$] (**Supplementary Figure S4B**).

A significant positive correlation between emotionality *z*-scores and the level of expression of phosphorylated Cx43 was unveiled (Pearson $r = 0.64$; $p < 0.01$; **Figure 4C**). The higher the level of phosphorylated Cx43, the higher the emotionality *z*-score.

These results demonstrate that the anxiety and depressive-like symptoms induced by CORT correlate with an increase in the level of Cx43 phosphorylation in the hippocampus



whereas chronic administration with fluoxetine normalizes this parameter.

DISCUSSION

In the present study, we provide evidence that the constitutive knock-down of astroglial Cx43 in mice leads to behavioral changes reminiscent of antidepressant-/anxiolytic-like activities specifically in paradigms producing a high level of stress. In parallel of these experiments and in a mouse model of depression, we also report that the antidepressant-/anxiolytic-like activities of the SSRI fluoxetine is associated with a decrease in the phosphorylation level of Cx43 in the hippocampus.

To examine the role of Cx43 on emotion-related behaviors, our initial strategy was to selectively drive the inactivation of Cx43 within hippocampal astrocytes through a local injection of pseudotyped lentivirus containing the Cre-recombinase (Colin et al., 2009). However, the observation that the expression of Cx43 in Cx43^{fl/fl} mice was dramatically decreased led us to abandon this strategy and challenge the relevance of

comparing these floxed mice with their counterparts injected with the Cre-recombinase in discrete brain regions. Although the reason of such a constitutive deletion in Cx43^{fl/fl} mice remains unknown, we decided to compare the behavior of Cx43^{fl/fl} mice having a constitutive decrease in Cx43 expression as previously reported (Theis et al., 2003; Unger et al., 2012) with Cx43^{wt/wt} mice. Our results demonstrate that Cx43^{fl/fl} mice displayed an antidepressant- and anxiolytic-like phenotype in the TST and the NSF but not in the ST, the elevated plus maze and the OF. Hence, we unveiled that the constitutive Cx43 deletion improves mood and decreases anxiety specifically in paradigms producing a high level of stress. Although the role of Cx43 on these behaviors has been poorly investigated, our results are in line with earlier experiments showing increased exploratory and anxiolytic-like behaviors in mice with astrocyte-directed deletion of Cx43 in the whole brain (i.e., Cx43^{fl/fl}:GFAP-Cre mice; Frisch et al., 2003). We also examined the mnemonic performances of Cx43^{fl/fl} mice because learning and memory impairments represent other symptoms usually affected in MD as shown in clinical (Trivedi and Greer, 2014) and preclinical studies (Darcet et al., 2014). Interestingly, we observed that the constitutive Cx43 deletion improves the long-term memory in the contextual fear conditioning as antidepressant drugs do (for review see Keefe et al., 2014). Again, Cx43 deletion produced beneficial effects in a paradigm for which the intensity of the experienced stress is high whereas it failed to improve memory in the object location and ORTs. Together these data shed new light on the fact that deficiency in Cx43 would favor stress response whereas part of antidepressant activity might rely on the blockade of this protein. This statement is in line with a recent work showing that Cx43 in astrocytes may participate in the pathogenesis of stress-associated psychiatric disorders (Orellana et al., 2015).

To further explore the putative link between stress response and Cx43, we subjected wild-type mice to CORT and evaluated the levels of Cx expression. The chronic administration of CORT in the drinking water is a well-recognized neuroendocrine-based model of depressive-like behavior (David et al., 2009). As expected and previously reported in mice (David et al., 2009; Hache et al., 2012; Quesseveur et al., 2013b; Le Dantec et al., 2014), we showed that CORT elicited behavioral anomalies typically observed in depressed patients such as carelessness, despair, and anxiety. Because full quantifiable assessment of mood-related behavior is possible when the same animal is exposed to multiple tests covering a wide range of representative symptoms of depression, we established an emotionality z-score integrating all these behavioral parameters into a single value. We provided evidence that CORT significantly increased emotionality z-score compared to control animals as a valid index of pathological state. Indeed, the higher the emotionality z-score, the higher the behavioral impairments (Guilloux et al., 2011; Petit et al., 2014). On the contrary, the sustained administration of the SSRI decreased this emotionality z-score notably due to its ability to produce antidepressant-/anxiolytic-like activities in the ST, TST, and the NSF. Interestingly, neither CORT nor fluoxetine changed the expression of total Cx43 in the hippocampus but both treatments affected its levels of phosphorylation. One of the most remarkable result obtained herein is the fact that

emotionality z -score is positively correlated with the levels of Cx43 phosphorylation in the hippocampus. If we consider that phosphorylation is a prerequisite for acute function of Cx (Solan and Lampe, 2009), then our results suggest that the therapeutic effects of antidepressant drugs might implicate the functional inactivation of Cx43. There is now evidence that SSRIs inhibit 5-HT uptake through the blockade of neuronal and astrocytic SERT. The subsequent enhancement of extracellular 5-HT levels likely contributes to activate astroglial 5-HT receptors (Quesseveur et al., 2013a) which, in turn, might directly regulate Cx function and/or expression. In keeping with this hypothesis, it has been shown that the application of 5-HT on hippocampal primary culture of astrocytes decreases intracellular Ca^{2+} wave propagation or dye transfer between neighboring cells (Blomstrand et al., 1999). The latter findings strengthen the hypothesis that the therapeutic activity of SSRIs would result, at least in part, from the reduction of glial cells coupling. However, these considerations are not necessarily consistent with data showing that chronic treatments with antidepressant drugs such as fluoxetine or duloxetine increase, on the contrary, astrocytic Cx43 GJC coupling (Sun et al., 2012) raising the possibility that the enhancement of astrocyte–astrocyte communication, notably in the cortex, plays an important role in antidepressant drugs response. Several explanations might be advanced to explain the discrepancies between the latter results and the findings described in the present study. The brain region (i.e., the PFC vs. the hippocampus) is an important concern that should be taken into consideration. Functional imaging studies of depressed patients indicate that the clinical response of fluoxetine is associated with a decreased functional activity of limbic regions including the hippocampus and an increased activity of the cortex (Mayberg et al., 2000). It is therefore possible that cortical and hippocampal astrocytes, according to their cellular and molecular environment, differentially impact neuronal activity. If the activation of Cx43 GJCs in the cortex seems to exert beneficial antidepressant-like effects, it is possible that its inactivation in the hippocampus is also a necessary condition to obtain similar therapeutic responses. To test for this hypothesis, we directly injected the Cx inhibitor CBX in the ventral hippocampus. However, our results indicate that the intra-hippocampal CBX elicited depressive-like state in the TST (Supplementary Figure S5) similarly to the observation made after its intra-cortical infusion (Sun et al., 2012). The latter results strongly suggest that Cx43 GJC and HC exert different effects on stress and antidepressant drugs response.

Opposite Effects of Gap-Junctions and Hemi-Channels in Response to Stress and Antidepressant Drugs

On this background, the question may then arise as to whether the apparent beneficial effects of Cx43 down-regulation and/or inactivation on antidepressant-/anxiolytic-like activities and cognitive performances reported herein result from change in GJC and/or HC activity? The behavioral phenotyping of Cx43-deficient mice along with pharmacological studies using Cx blockers in relevant animal models of depression emphasize the

importance of these proteins in the regulation of mood-related behaviors, while the respective contribution of each function is at present unknown, in particular for the HC function of Cx43.

Our results unveil a deleterious effect of Cx43 on antidepressant response. Besides their role in GJC, Cx43 also form HC to allow a direct communication with neurons by releasing gliotransmitters or other neuroactive substances in the extracellular compartment (Saez et al., 2005; Ransom and Giaume, 2013). Interestingly, acute restraint stress stimulates the opening of astrocytic Cx43 HC and a corollary of such functional change is an enhancement of glutamate release from astrocytes HCs thereby leading to neurotoxic effects (Orellana et al., 2015). These findings along with the observation that CRF stimulate the expression of Cx43 (Hanstein et al., 2009), suggest that enhanced HC activity in astrocytes could contribute to dysfunction in emotional brain circuits. In our experimental conditions, one would assume that chronic CORT exposure stimulated Cx43 HC activity to promote a prolonged and exaggerated release of glutamate in the hippocampus thereby producing neuronal damage and/or alteration in mood-related neurotransmission as previously reported in this model (David et al., 2009; Rainer et al., 2012). In this case, fluoxetine would have exerted its beneficial effects by attenuating Cx43 HC activity reflected herein by its ability to decrease Cx43 phosphorylation in response to stress. In this case, it is, however, unclear why the majority of gliotransmitters (ATP, adenosine, lactate or D-Serine) released by Cx43 are known to elicit antidepressant-like effects (for review Etievant et al., 2013) or to improve fear learning and memory in rodents (Suzuki et al., 2011; Stehberg et al., 2012; Yang et al., 2014). One explanation would be that stress specifically triggers the release of deleterious gliotransmitters in a Cx43 HC-dependent manner. Different ionic selectivities for Cx have already been observed (Wang and Veenstra, 1997) but data on gliotransmitters are still lacking. It is, however, noteworthy that the degree of Cx43 phosphorylation would be an important process to regulate such selectivity (Bao et al., 2007). Finally, we should take into consideration that Cx43 might also allow the secretion of pro-inflammatory factors such as interleukines, cytokines or chemokines. This has been already observed in response to different pathological conditions including neuropathic pain (Chen et al., 2012, 2014) and this would reconcile our results with the inflammatory hypothesis of depression.

The second hypothesis regarding Cx43 and emotionality implies that a normal activity of Cx43-mediated GJC function is required for antidepressant response. Astroglial GJC are permeable for several endogenous molecules, i.e., second messengers [cyclic AMP, inositol-1,4,5-trisphosphate (InsP3), and Ca^{2+}], amino acids (glutamate, aspartate, and taurine), nucleotides (ADP, ATP, CTP, and NAD) but also energy metabolites and their transfer facilitate information processing and integration from a large number of neurons, in providing metabolites during high neuronal demand (Giaume and Theis, 2010). Considering that antidepressant-like effects of SSRIs are associated with an enhancement of brain plasticity (cell proliferation, neuronal growth and sprouting, dendritic remodeling; Duman et al., 1999), one would expect that the

facilitation of astrocyte–astrocyte communication would be in favor of a therapeutic response. As an example of the physiological importance of communication among these glial cells, we recently demonstrated that astrocytes are able to release Brain-Derived Neurotrophic Factor (BDNF) in response to fluoxetine (Quesseveur et al., 2013b). Given that such a release can be regulated by the intracellular astrocytic concentration of Ca^{2+} (Zafra et al., 1992) or glutamate (Jean et al., 2008) through Cx43 GJC, we can fairly anticipate their beneficial effects on antidepressant drug response notably owing to their proximity with neuronal synapses (Araque et al., 1999; Perea and Araque, 2010). Indeed, this widespread transfer of signaling molecules through Cx43 GJC should stimulate brain plasticity as it represents a neurotrophic supply to neurons. Interestingly, in a recent study exploring the role of astroglial Cx on various stages of hippocampal adult neurogenesis, it was reported that ablation of astroglial Cx43 significantly attenuated proliferation and reduced the survival of adult-born cells (Kunze et al., 2009; Li et al., 2010; Liebmann et al., 2013) confirming that these proteins are required to promote hippocampal adult neurogenesis and related antidepressant-/anxiolytic-like activities.

CONCLUSION

Although the influence of antidepressant drugs on Cx43 expression is well described, little is known about the effects of these treatments on the functional status of Cx43 GJC and Cx43 HC. Our discussion illustrates the fact that both GJC and HC may have different effects on antidepressant drugs response leading to a complex regulation of emotionality by astrocytes. In the present study, we focused our attention on the hippocampus suggesting that the inactivation of Cx43 HC might induce beneficial effects through an attenuation of the stress response. The recent identification of anatomical and functional interactions between the hippocampus and the hypothalamus (Radley and Sawchenko, 2011) reinforces the interest to further explore the influence of hippocampal astroglial Cx43 in the regulation of the neuroendocrine system.

AUTHOR CONTRIBUTIONS

GQ in charge of the behavioral experiments in mice subjected to corticosterone. BP western-blot analysis in Cx43^{fl/fl} mice. J-AB in charge of the behavioral experiments in Cx43^{fl/fl} mice. PE western-blot analysis in mice subjected to corticosterone. AM in charge of behavioral experiments. HH mice genotyping. CL article writing. Scientific expertise. XF in charge of the behavioral experiments in Cx43^{fl/fl} mice. ND article writing. Scientific expertise. CG provide de Cx43^{fl/fl} mice. Article writing. Scientific expertise. CR article writing. Scientific expertise. BG project designer – article writing.

FUNDING

Fondation Recherche Médicale (FRM): DPP20151033959: BG; Région Midi-Pyrénées: BG.

ACKNOWLEDGMENT

We thank Stéphane Pech for his technical support and the ABC facility for housing mice.

SUPPLEMENTARY MATERIAL

The Supplementary Material for this article can be found online at: <http://journal.frontiersin.org/article/10.3389/fncel.2015.00490>

FIGURE S1 | Schematic representation of the experimental designs.

(A) Cx43^{wt/wt} and Cx43^{fl/fl} mice were subjected to behavioral tests over a 1-week period. (B) Wild-type mice were subjected to a 8-week exposure to corticosterone (CORT) followed by a 4-week exposure to fluoxetine or its vehicle. Behavioral tests were then conducted for 1 week with a 2-day period between each test.

FIGURE S2 | (A) Survival curve showing the fraction of animal not eating during the novelty suppressed feeding (NSF). (B) Similar body weight loss (in gr) between Cx43^{wt/wt} and Cx43^{fl/fl} mice after a 24-h period of fasting. (C) Similar home cage consumption (in gr/gr of mouse body weight) during 5 min between Cx43^{wt/wt} and Cx43^{fl/fl} mice after the NSF test. (D,E) Time of exploration of the objects in the OL (D) and OR (E) during the acquisition phase at D1. (F) Time of freezing before the shock in the FCF.

FIGURE S3 | (A) Survival curve showing the fraction of animal not eating during the NSF. (B) Similar body weight loss (in gr) between VEH/VEH-, CORT/VEH-, and CORT/FLX-treated mice after a 24-h period of fasting. (C) Similar home cage consumption (in gr/gr of mouse body weight) during 5 min between VEH/VEH-, CORT/VEH-, and CORT/FLX-treated mice after the NSF test.

FIGURE S4 | Expression of total astroglial Cxs. (A) Levels of Cx43 in VEH/VEH-, CORT/VEH-, and CORT/FLX-treated mice. (B) Levels of Cx30 in VEH/VEH-, CORT/VEH-, and CORT/FLX-treated mice.

FIGURE S5 | Depressive-like effect of intra-hippocampal infusion of an astroglial Cx43 blocker in wild-type mice in the tail suspension test.

(A) Experimental protocol. Wild-type mice were bilaterally implanted with cannula within the ventral hippocampus and after a 1-week period of recovery, they were tested in the tail suspension test 15 min after the intra-hippocampal infusion of carboxolone (CBX 10 mM) or its vehicle. The same animals were tested 1 week later with a higher dose of CBX (100 mM). (A,B) Data are expressed as mean \pm SEM of the time of immobility after CBX (10 mM) (B) or (100 mM) (C). * $p < 0.05$: significantly different from the VEH-infused group ($n = 7$ mice/group).

TABLE S1 | Mathematical method for Emotionality score calculation. The Z-score is a dimensionless mathematical value obtained by subtracting each individual data (X) from the mean of the control group (μ) and then dividing the difference by the standard deviation of the control group (σ). Z-score of the Splash Test (ST), the Elevated Plus Maze (EPM) and the Open Field (OF) were converted into opposite values (i.e., by putting the negative sign in front of the formula) in order to standardize the directionality of these scores and to ensure that increased values reflected a pathological state. An individual z-score was therefore determined for each parameter. In the case of behavioral tests integrating multiple parameters, such as the EPM and the OF, an averaged Z-score was calculated across parameters. Locomotor activity in the EPM and OF was integrated in the averaged Z-score of these tests in order to avoid potential biases induced by locomotion on anxiety-like behaviors. Finally, an individual Emotionality score is obtained by averaging Z-score of all tests.

REFERENCES

- Araque, A., Sanzgiri, R. P., Parpura, V., and Haydon, P. G. (1999). Astrocyte-induced modulation of synaptic transmission. *Can. J. Physiol. Pharmacol.* 77, 699–706. doi: 10.1139/y99-076
- Araya-Callis, C., Hiemke, C., Abumaria, N., and Flugge, G. (2012). Chronic psychosocial stress and citalopram modulate the expression of the glial proteins GFAP and NDRG2 in the hippocampus. *Psychopharmacology (Berl.)* 224, 209–222. doi: 10.1007/s00213-012-2741-x
- Banasr, M., Chowdhury, G. M., Terwilliger, R., Newton, S. S., Duman, R. S., Behar, K. L., et al. (2010). Glial pathology in an animal model of depression: reversal of stress-induced cellular, metabolic and behavioral deficits by the glutamate-modulating drug riluzole. *Mol. Psychiatry* 15, 501–511. doi: 10.1038/mp.2008.106
- Bao, X., Lee, S. C., Reuss, L., and Altenberg, G. A. (2007). Change in permeant size selectivity by phosphorylation of connexin 43 gap-junctional hemichannels by PKC. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 104, 4919–4924. doi: 10.1073/pnas.0603154104
- Binder, E. B., and Nemeroff, C. B. (2010). The CRF system, stress, depression and anxiety—insights from human genetic studies. *Mol. Psychiatry* 15, 574–588. doi: 10.1038/mp.2009.141
- Bissiere, S., Zelikowsky, M., Ponnusamy, R., Jacobs, N. S., Blair, H. T., and Fanselow, M. S. (2011). Electrical synapses control hippocampal contributions to fear learning and memory. *Science* 331, 87–91. doi: 10.1126/science.1193785
- Blier, P. (2001). Pharmacology of rapid-onset antidepressant treatment strategies. *J. Clin. Psychiatry* 62(Suppl. 15), 12–17.
- Blomstrand, F., Aberg, N. D., Eriksson, P. S., Hansson, E., and Ronnback, L. (1999). Extent of intercellular calcium wave propagation is related to gap junction permeability and level of connexin-43 expression in astrocytes in primary cultures from four brain regions. *Neuroscience* 92, 255–265. doi: 10.1016/S0306-4522(98)00738-6
- Chen, G., Park, C. K., Xie, R. G., Berta, T., Nedergaard, M., and Ji, R. R. (2014). Connexin-43 induces chemokine release from spinal cord astrocytes to maintain late-phase neuropathic pain in mice. *Brain* 137(Pt 8), 2193–2209. doi: 10.1093/brain/awu140
- Chen, M. J., Kress, B., Han, X., Moll, K., Peng, W., Ji, R. R., et al. (2012). Astrocytic CX43 hemichannels and gap junctions play a crucial role in development of chronic neuropathic pain following spinal cord injury. *Glia* 60, 1660–1670. doi: 10.1002/glia.22384
- Colin, A., Faideau, M., Dufour, N., Auregan, G., Hassig, R., Andrieu, T., et al. (2009). Engineered lentiviral vector targeting astrocytes in vivo. *Glia* 57, 667–679. doi: 10.1002/glia.20795
- Czeh, B., Simon, M., Schmeltz, B., Hiemke, C., and Fuchs, E. (2006). Astroglial plasticity in the hippocampus is affected by chronic psychosocial stress and concomitant fluoxetine treatment. *Neuropsychopharmacology* 31, 1616–1626. doi: 10.1038/sj.npp.1300982
- Dalvi, A., and Lucki, I. (1999). Murine models of depression. *Psychopharmacology (Berl.)* 147, 14–16. doi: 10.1007/s002130051131
- Darcet, F., Mendez-David, I., Tritschler, L., Gardier, A. M., Guilloux, J. P., and David, D. J. (2014). Learning and memory impairments in a neuroendocrine mouse model of anxiety/depression. *Front. Behav. Neurosci.* 8:136. doi: 10.3389/fnbeh.2014.00136
- David, D. J., Samuels, B. A., Rainer, Q., Wang, J. W., Marsteller, D., Mendez, I., et al. (2009). Neurogenesis-dependent and -independent effects of fluoxetine in an animal model of anxiety/depression. *Neuron* 62, 479–493. doi: 10.1016/j.neuron.2009.04.017
- Dermietzel, R., Traub, O., Hwang, T. K., Beyer, E., Bennett, M. V., Spray, D. C., et al. (1989). Differential expression of three gap junction proteins in developing and mature brain tissues. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 86, 10148–10152. doi: 10.1073/pnas.86.24.10148
- Duman, R. S., Malberg, J., and Thome, J. (1999). Neural plasticity to stress and antidepressant treatment. *Biol. Psychiatry* 46, 1181–1191. doi: 10.1016/S0006-3223(99)00177-8
- Etievant, A., Lambas-Senas, L., Scarna, H., Lucas, G., and Haddjeri, N. (2013). Astrocytes and gliotransmitters: new players in the treatment of major depression? *Curr. Drug. Targets* 14, 1295–1307. doi: 10.2174/1389450113149990197
- Ezan, P., Andre, P., Cisternino, S., Saubamea, B., Boulay, A. C., Doutremer, S., et al. (2012). Deletion of astroglial connexins weakens the blood-brain barrier. *J. Cereb. Blood Flow Metab.* 32, 1457–1467. doi: 10.1038/jcbfm.2012.45
- Frisch, C., Theis, M., De Souza Silva, M. A., Dere, E., Sohl, G., Teubner, B., et al. (2003). Mice with astrocyte-directed inactivation of connexin43 exhibit increased exploratory behaviour, impaired motor capacities, and changes in brain acetylcholine levels. *Eur. J. Neurosci.* 18, 2313–2318. doi: 10.1046/j.1460-9568.2003.02971.x
- Giaume, C., and Theis, M. (2010). Pharmacological and genetic approaches to study connexin-mediated channels in glial cells of the central nervous system. *Brain Res. Rev.* 63, 160–176. doi: 10.1016/j.brainresrev.2009.11.005
- Guilloux, J. P., Seney, M., Edgar, N., and Sibille, E. (2011). Integrated behavioral z-scoring increases the sensitivity and reliability of behavioral phenotyping in mice: relevance to emotionality and sex. *J. Neurosci. Methods* 197, 21–31. doi: 10.1016/j.jneumeth.2011.01.019
- Hache, G., Guiard, B. P., Le Dantec, Y., Orvoen, S., David, D. J., Gardier, A. M., et al. (2012). Antinociceptive effects of fluoxetine in a mouse model of anxiety/depression. *Neuroreport* 23, 525–529. doi: 10.1097/WNR.0b013e328353d70a
- Hanstein, R., Trotter, J., Behl, C., and Clement, A. B. (2009). Increased connexin 43 expression as a potential mediator of the neuroprotective activity of the corticotropin-releasing hormone. *Mol. Endocrinol.* 23, 1479–1493. doi: 10.1210/me.2009-0022
- Jean, Y. Y., Lercher, L. D., and Dreyfus, C. F. (2008). Glutamate elicits release of BDNF from basal forebrain astrocytes in a process dependent on metabotropic receptors and the PLC pathway. *Neuron Glia Biol.* 4, 35–42. doi: 10.1017/S1740925X09000052
- Keefe, R. S., Fox, K. H., Davis, V. G., Kennel, C., Walker, T. M., Burdick, K. E., et al. (2014). The Brief assessment of cognition in affective disorders (BAC-A): performance of patients with bipolar depression and healthy controls. *J. Affect. Disord.* 166, 86–92. doi: 10.1016/j.jad.2014.05.002
- Kunze, A., Congreso, M. R., Hartmann, C., Wallraff-Beck, A., Huttmann, K., Bedner, P., et al. (2009). Connexin expression by radial glia-like cells is required for neurogenesis in the adult dentate gyrus. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 106, 11336–11341. doi: 10.1073/pnas.0813160106
- Lecrubier, Y. (2001). The burden of depression and anxiety in general medicine. *J. Clin. Psychiatry* 62(Suppl. 8), 4–9.
- Le Dantec, Y., Hache, G., Guilloux, J. P., Guiard, B. P., David, D. J., Adrien, J., et al. (2014). NREM sleep hypersomnia and reduced sleep/wake continuity in a neuroendocrine mouse model of anxiety/depression based on chronic corticosterone administration. *Neuroscience* 274, 357–368. doi: 10.1016/j.neuroscience.2014.05.050
- Li, D. Q., Li, X. J., Duan, J. F., and Cai, W. (2010). Wuling Capsule promotes hippocampal neurogenesis by improving expression of connexin 43 in rats exposed to chronic unpredictable mild stress. *Zhong Xi Yi Jie He Xue Bao* 8, 662–669. doi: 10.3736/jcim20100710
- Liebmann, M., Stahr, A., Guenther, M., Witte, O. W., and Frahm, C. (2013). Astrocytic Cx43 and Cx30 differentially modulate adult neurogenesis in mice. *Neurosci. Lett.* 545, 40–45. doi: 10.1016/j.neulet.2013.04.013
- Mayberg, H. S., Brannan, S. K., Tekell, J. L., Silva, J. A., Mahurin, R. K., McGinnis, S., et al. (2000). Regional metabolic effects of fluoxetine in major depression: serial changes and relationship to clinical response. *Biol. Psychiatry* 48, 830–843. doi: 10.1016/S0006-3223(00)01036-2
- McIlwain, K. L., Merriweather, M. Y., Yuva-Paylor, L. A., and Paylor, R. (2001). The use of behavioral test batteries: effects of training history. *Physiol. Behav.* 73, 705–717. doi: 10.1016/S0031-9384(01)00528-5
- Miguel-Hidalgo, J. J., Baucom, C., Dilley, G., Overholser, J. C., Meltzer, H. Y., Stockmeier, C. A., et al. (2000). Glial fibrillary acidic protein immunoreactivity in the prefrontal cortex distinguishes younger from older adults in major depressive disorder. *Biol. Psychiatry* 48, 861–873. doi: 10.1016/S0006-3223(00)00999-9
- Miguel-Hidalgo, J. J., Wilson, B. A., Hussain, S., Meshram, A., Rajkowska, G., and Stockmeier, C. A. (2014). Reduced connexin 43 immunolabeling in the orbitofrontal cortex in alcohol dependence and depression. *J. Psychiatr. Res.* 55, 101–109. doi: 10.1016/j.jpsychires.2014.04.007
- Milanovic, S. M., Erjavec, K., Poljicanin, T., Vrabec, B., and Brecic, P. (2015). Prevalence of depression symptoms and associated socio-demographic factors in primary health care patients. *Psychiatr. Danub.* 27, 31–37.

- Morioka, N., Suekama, K., Zhang, F. F., Kajitani, N., Hisaoka-Nakashima, K., Takebayashi, M., et al. (2014). Amitriptyline up-regulates connexin43-gap junction in rat cultured cortical astrocytes via activation of the p38 and c-Fos/AP-1 signalling pathway. *Br. J. Pharmacol.* 171, 2854–2867. doi: 10.1111/bph.12614
- Mostafavi, H., Khaksarian, M., Joghataei, M. T., Hassanzadeh, G., Soleimani, M., Eftekhari, S., et al. (2014). Fluoxetine upregulates connexin 43 expression in astrocyte. *Basic Clin. Neurosci.* 5, 74–79.
- Nagy, C., Suderman, M., Yang, J., Szyf, M., Mechawar, N., Ernst, C., et al. (2015). Astrocytic abnormalities and global DNA methylation patterns in depression and suicide. *Mol. Psychiatry* 20, 320–328. doi: 10.1038/mp.2014.21
- Nichols, N. R., Osterburg, H. H., Masters, J. N., Millar, S. L., and Finch, C. E. (1990). Messenger RNA for glial fibrillary acidic protein is decreased in rat brain following acute and chronic corticosterone treatment. *Brain Res. Mol. Brain Res.* 7, 1–7. doi: 10.1016/0169-328X(90)90066-M
- Orellana, J. A., Moraga-Amaro, R., Diaz-Galarce, R., Rojas, S., Maturana, C. J., Stehberg, J., et al. (2015). Restraint stress increases hemichannel activity in hippocampal glial cells and neurons. *Front. Cell Neurosci.* 9:102. doi: 10.3389/fncel.2015.00102
- Paylor, R., Spencer, C. M., Yuva-Paylor, L. A., and Pieke-Dahl, S. (2006). The use of behavioral test batteries, II: effect of test interval. *Physiol. Behav.* 87, 95–102. doi: 10.1016/j.physbeh.2005.09.002
- Perea, G., and Araque, A. (2010). GLIA modulates synaptic transmission. *Brain Res. Rev.* 63, 93–102. doi: 10.1016/j.brainresrev.2009.10.005
- Petit, A. C., Quesseveur, G., Gressier, F., Colle, R., David, D. J., Gardier, A. M., et al. (2014). Converging translational evidence for the involvement of the serotonin 2A receptor gene in major depressive disorder. *Prog. Neuropsychopharmacol. Biol. Psychiatry* 54, 76–82. doi: 10.1016/j.pnpbp.2014.04.013
- Quesseveur, G., Gardier, A. M., and Guiard, B. P. (2013a). The monoaminergic tripartite synapse: a putative target for currently available antidepressant drugs. *Curr. Drug Targets* 14, 1277–1294. doi: 10.2174/13894501113149990209
- Quesseveur, G., David, D. J., Gaillard, M. C., Pla, P., Wu, M. V., Nguyen, H. T., et al. (2013b). BDNF overexpression in mouse hippocampal astrocytes promotes local neurogenesis and elicits anxiolytic-like activities. *Transl. Psychiatry* 3:e253. doi: 10.1038/tp.2013.30
- Radley, J. J., and Sawchenko, P. E. (2011). A common substrate for prefrontal and hippocampal inhibition of the neuroendocrine stress response. *J. Neurosci.* 31, 9683–9695. doi: 10.1523/JNEUROSCI.6040-10.2011
- Rainer, Q., Nguyen, H. T., Quesseveur, G., Gardier, A. M., David, D. J., and Guiard, B. P. (2012). Functional status of somatodendritic serotonin 1A autoreceptor after long-term treatment with fluoxetine in a mouse model of anxiety/depression based on repeated corticosterone administration. *Mol. Pharmacol.* 81, 106–112. doi: 10.1124/mol.111.075796
- Ransom, B. R., and Giaume, C. (2013). “Gap junctions, hemichannels,” in *Neuroglia*, 3rd Edn, eds H. Kettenmann and B. R. Ransom (Oxford: Oxford University Press), 292–305.
- Rouach, N., and Giaume, C. (2001). Connexins and gap junctional communication in astrocytes are targets for neuroglial interaction. *Prog. Brain Res.* 132, 203–214. doi: 10.1016/S0079-6123(01)32077-0
- Rouach, N., Segal, M., Koulakoff, A., Giaume, C., and Avignone, E. (2003). Carbenoxolone blockade of neuronal network activity in culture is not mediated by an action on gap junctions. *J. Physiol.* 553(Pt 3), 729–745. doi: 10.1113/jphysiol.2003.053439
- Saez, J. C., Retamal, M. A., Basilio, D., Bukauskas, F. F., and Bennett, M. V. (2005). Connexin-based gap junction hemichannels: gating mechanisms. *Biochim. Biophys. Acta* 1711, 215–224. doi: 10.1016/j.bbame.2005.01.014
- Santarelli, L., Gobbi, G., Debs, P. C., Sibille, E. T., Blier, P., Hen, R., et al. (2001). Genetic and pharmacological disruption of neurokinin 1 receptor function decreases anxiety-related behaviors and increases serotonergic function. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 98, 1912–1917. doi: 10.1073/pnas.98.4.1912
- Si, X., Miguel-Hidalgo, J. J., O'Dwyer, G., Stockmeier, C. A., and Rajkowska, G. (2004). Age-dependent reductions in the level of glial fibrillary acidic protein in the prefrontal cortex in major depression. *Neuropsychopharmacology* 29, 2088–2096. doi: 10.1038/sj.npp.1300525
- Solan, J. L., and Lampe, P. D. (2009). Connexin43 phosphorylation: structural changes and biological effects. *Biochem. J.* 419, 261–272. doi: 10.1042/BJ20082319
- Stehberg, J., Moraga-Amaro, R., Salazar, C., Becerra, A., Echeverria, C., Orellana, J. A., et al. (2012). Release of gliotransmitters through astroglial connexin 43 hemichannels is necessary for fear memory consolidation in the basolateral amygdala. *FASEB J.* 26, 3649–3657. doi: 10.1096/fj.11-198416
- Sun, J. D., Liu, Y., Yuan, Y. H., Li, J., and Chen, N. H. (2012). Gap junction dysfunction in the prefrontal cortex induces depressive-like behaviors in rats. *Neuropsychopharmacology* 37, 1305–1320. doi: 10.1038/npp.2011.319
- Surget, A., Saxe, M., Leman, S., Ibaguen-Vargas, Y., Chalou, S., Griebel, G., et al. (2008). Drug-dependent requirement of hippocampal neurogenesis in a model of depression and of antidepressant reversal. *Biol. Psychiatry* 64, 293–301. doi: 10.1016/j.biopsych.2008.02.022
- Suzuki, A., Stern, S. A., Bozdagi, O., Huntley, G. W., Walker, R. H., Magistretti, P. J., et al. (2011). Astrocyte-neuron lactate transport is required for long-term memory formation. *Cell* 144, 810–823. doi: 10.1016/j.cell.2011.02.018
- Theis, M., Jauch, R., Zhuo, L., Speidel, D., Wallraff, A., Doring, B., et al. (2003). Accelerated hippocampal spreading depression and enhanced locomotory activity in mice with astrocyte-directed inactivation of connexin43. *J. Neurosci.* 23, 766–776.
- Theis, M., Mas, C., Doring, B., Kruger, O., Herrera, P., Meda, P., et al. (2001). General and conditional replacement of connexin43-coding DNA by a lacZ reporter gene for cell-autonomous analysis of expression. *Cell Commun. Adhes.* 8, 383–386. doi: 10.3109/15419060109080758
- Torres-Platas, S. G., Nagy, C., Wakid, M., Turecki, G., and Mechawar, N. (2015). Glial fibrillary acidic protein is differentially expressed across cortical and subcortical regions in healthy brains and downregulated in the thalamus and caudate nucleus of depressed suicides. *Mol. Psychiatry* doi: 10.1038/mp.2015.65 [Epub ahead of print].
- Trivedi, M. H., and Greer, T. L. (2014). Cognitive dysfunction in unipolar depression: implications for treatment. *J. Affect. Disord.* 152–154, 19–27. doi: 10.1016/j.jad.2013.09.012
- Unger, T., Bette, S., Zhang, J., Theis, M., and Engele, J. (2012). Connexin-deficiency affects expression levels of glial glutamate transporters within the cerebrum. *Neurosci. Lett.* 506, 12–16. doi: 10.1016/j.neulet.2011.10.032
- Võikar, V., Vasar, E., and Rauvala, H. (2004). Behavioral alterations induced by repeated testing in C57BL/6J and 129S2/Sv mice: implications for phenotyping screens. *Genes Brain Behav.* 3, 27–38. doi: 10.1046/j.1601-183X.2003.0044.x
- Wang, H. Z., and Veenstra, R. D. (1997). Monovalent ion selectivity sequences of the rat connexin43 gap junction channel. *J. Gen. Physiol.* 109, 491–507. doi: 10.1085/jgp.109.4.491
- Warner-Schmidt, J. L., and Duman, R. S. (2006). Hippocampal neurogenesis: opposing effects of stress and antidepressant treatment. *Hippocampus* 16, 239–249. doi: 10.1002/hipo.20156
- Webster, M. J., Knable, M. B., Johnston-Wilson, N., Nagata, K., Inagaki, M., and Yolken, R. H. (2001). Immunohistochemical localization of phosphorylated glial fibrillary acidic protein in the prefrontal cortex and hippocampus from patients with schizophrenia, bipolar disorder, and depression. *Brain Behav. Immun.* 15, 388–400. doi: 10.1006/brbi.2001.0646
- Yang, J., Ruchti, E., Petit, J. M., Jourdain, P., Grenningloh, G., Allaman, I., et al. (2014). Lactate promotes plasticity gene expression by potentiating NMDA signaling in neurons. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 111, 12228–12233. doi: 10.1073/pnas.1322912111
- Zafra, F., Lindholm, D., Castren, E., Hartikka, J., and Thoenen, H. (1992). Regulation of brain-derived neurotrophic factor and nerve growth factor mRNA in primary cultures of hippocampal neurons and astrocytes. *J. Neurosci.* 12, 4793–4799.

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

Copyright © 2015 Quesseveur, Portal, Basile, Ezan, Mathou, Halley, Leloup, Fioramonti, Déglon, Giaume, Rampon and Guiard. This is an open-access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution License (CC BY). The use, distribution or reproduction in other forums is permitted, provided the original author(s) or licensor are credited and that the original publication in this journal is cited, in accordance with accepted academic practice. No use, distribution or reproduction is permitted which does not comply with these terms.

1.2. Caractérisation neurochimique

Plusieurs hypothèses ont été formulées quant aux mécanismes physiopathologiques de la dépression. Basés sur l'hypothèse d'un déficit monoaminergique, nous nous sommes naturellement intéressés à l'impact de l'inactivation génétique constitutive des Cx43 sur les concentrations extracellulaires de 5-HT dans l'hippocampe, une région limbique fortement impliquée dans la DM (Lindqvist et al 2014, McKinnon et al 2009, Travis et al 2015) et dans laquelle les terminaisons sérotoninergiques sont nombreuses et plus sensibles aux inhibiteurs de recapture de la sérotonine que celles du cortex frontal (Malagié et al 2002). Nos résultats montrent que les $[5\text{-HT}]_{\text{ext}}$ basales mesurées dans l'hippocampe sont similaires entre les deux groupes ($1,38 \pm 0,37$ vs. $1,18 \pm 0,12$ pg/15 μL respectivement pour le groupe contrôle WT et Cx43 KD ; test-t de Student $p=0,105$). L'évolution des $[5\text{-HT}]_{\text{ext}}$ suite à un stress de nage forcée de 15 minutes est représentée en Figure 30A-B. L'ANOVA à deux facteurs n'a révélé aucun effet du génotype ($F_{(1,8)}=11,31$; $p=0,745$), du temps ($F_{(4,32)}=0,319$; $p=0,863$) ou de leur interaction ($F_{(4,32)}=0,829$; $p=0,516$, Figure 30A). L'analyse des AUC n'a également pas permis de mettre en évidence de différences significatives entre les 2 groupes ($p=0,882$).

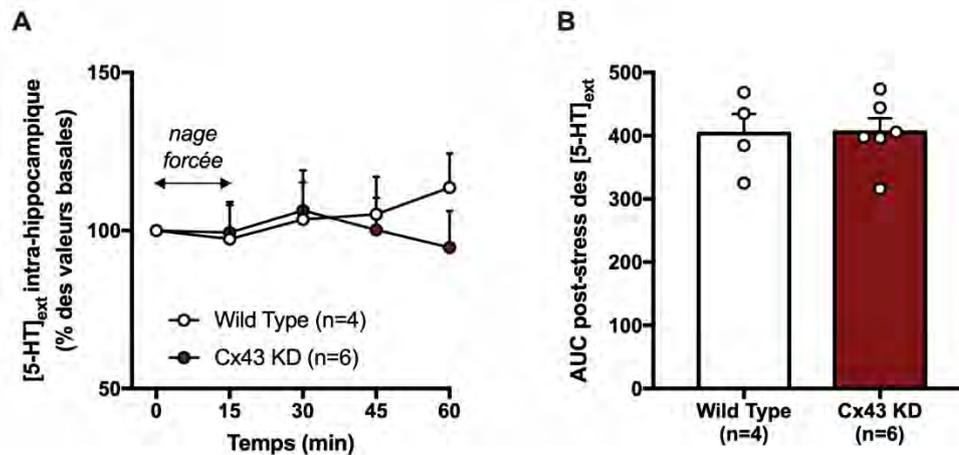


Figure 30 : Effet de l'inactivation constitutive des Cx43 sur les $[5\text{-HT}]_{\text{ext}}$ hippocampiques.

Suite à l'application d'un stress de nage forcée, les concentrations extracellulaires de 5-HT ($[5\text{-HT}]_{\text{ext}}$) restent stables au cours du temps. Les résultats sont représentés en moyenne \pm S.E.M des pourcentages des valeurs basales des $[5\text{-HT}]_{\text{ext}}$ intra-hippocampique en réponse à un stress de nage forcée (A) Aire sous la courbe calculée après le stress de nage forcée (B). Test-t de Student comparant les moyennes des groupes de souris WT et Cx43 KD.

Ces résultats laissent donc entrevoir que la diminution du niveau d'anxiété et les effets de type antidépresseurs observés chez les souris Cx43 KD (Quesseveur, Portal et al 2015), ne passent pas par le recrutement du système sérotoninergique.

Nous avons tenté de confirmer ce résultat en utilisant un inhibiteur de synthèse de la sérotonine, la parachlorophénylalanine (PCPA). Nos résultats montrent que la PCPA a été

efficace puisque les $[5\text{-HT}]_{\text{ext}}$ basales mesurées dans l'hippocampe sont diminuées chez les souris contrôles WT, traitées avec cette enzyme ($1,04 \pm 0,2$ vs. $0,42 \pm 0,04$ pg/15 μL ; $p < 0,05$) et chez des souris Cx43 KD ($1,18 \pm 0,12$ vs. $0,17 \pm 0,08$ pg/15 μL ; $p < 0,01$). De manière intéressante, le comportement de type antidépresseur des souris Cx43 KD mesurés dans le FST est toujours détectable en présence de PCPA (Figure 31) (test-t de Student $p < 0,001$).

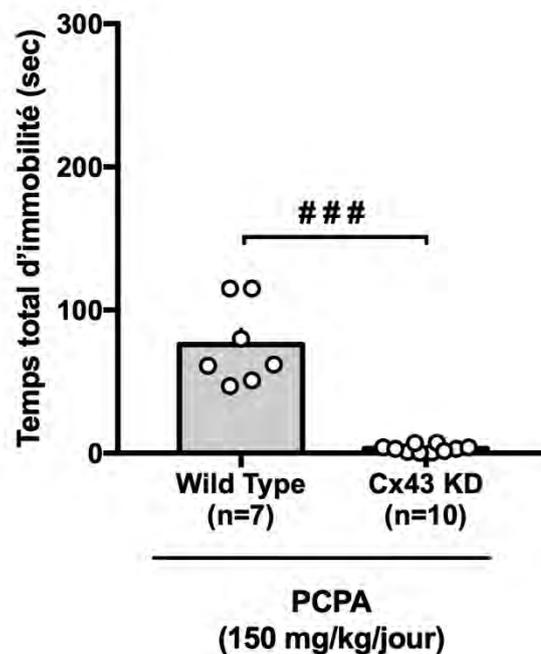


Figure 31 : Effet de l'inactivation constitutive des Cx43 le comportement de résignation après un traitement à la PCPA.

Les résultats sont représentés en moyenne \pm S.E.M du temps d'immobilité dans le FST après un traitement à la PCPA (150 mg/kg/j i.p. pendant 3 jours) chez les animaux sauvages WT et Cx43 KD. Test t de Student ###, $p < 0,001$ significativement différent du groupe sauvage WT.

L'hippocampe est une région riche en neurones glutamatergiques, cibles de nouveaux antidépresseurs dont la kétamine (Faquih et al 2019, Wilkinson & Sanacora 2019). Par ailleurs, des études *in vitro* démontrent que les astrocytes sont capables de libérer du glutamate via les HC composés de Cx43. Ce processus est principalement observable après un stress comme le retrait du Ca^{2+} de l'espace extracellulaire (Ye et al 2003) ou l'induction d'un processus inflammatoire résultant de l'incubation de cultures primaires d'astrocytes avec le peptide amyloïde ou du LPS (Orellana et al 2011b). Nous nous sommes donc intéressés aux concentrations extracellulaires hippocampiques de Glut ($[\text{Glut}]_{\text{ext}}$) dans notre modèle de souris Cx43 KD (figure 32A-B).

Les $[\text{Glut}]_{\text{ext}}$ basales étaient les mêmes entre les animaux WT et Cx43 KD ($4,73 \pm 0,63$ vs. $4,14 \pm 0,52$ pg/15 μL ; test-t de Student $p = 0,224$). En revanche, des différences ont été observées suite à l'application d'un stress de nage forcée. Alors que l'ANOVA à deux

facteurs a mis en évidence un effet significatif du génotype ($F_{(1,10)}=5,336$; $p=0,044$), nous n'avons pas dévoilé d'effets du temps ($F_{(4,40)}=1,636$; $p=0,184$) ou de l'interaction de ces deux facteurs ($F_{(4,40)}=2,034$; $p=0,118$). L'analyse des AUC indique une diminution des $[Glut]_{ext}$ intra-hippocampiques après le stress chez les souris Cx43 KD en comparaison aux souris WT (test-t de Student $p=0,012$).

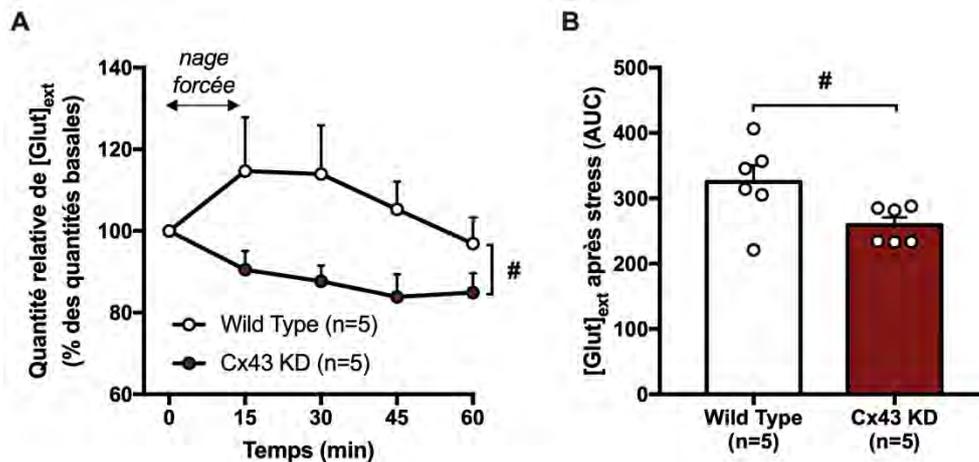


Figure 32 : Effet de l'inactivation constitutive des Cx43 sur les $[Glut]_{ext}$ hippocampiques.

Suite à l'application d'un stress de nage forcée, une augmentation des concentrations extracellulaires de glutamate ($[Glut]_{ext}$) sont observées au cours du temps chez les souris WT mais pas chez les souris Cx43 KD. Les résultats sont représentés en moyenne \pm SEM des $[glut]_{ext}$ intra-hippocampiques en réponse à un stress de nage (A) Aire sous la courbe calculée après le stress de nage forcée (B). Test t de Student # $p<0,05$: significativement différent du groupe WT.

Ces résultats suggèrent que les comportements anxiolytiques/antidépresseurs observés chez les souris Cx43 KD (Quesseveur, Portal et al 2015) s'accompagnent d'une diminution de la neurotransmission glutamatergique hippocampique. Fort de ces observations, nous avons fait l'hypothèse qu'une inactivation des Cx43 spécifiquement dans l'hippocampe induirait le même type de résultats comportementaux et neurochimiques.

2. Modèle d'inactivation tissu-spécifique des Cx43 : souris WT avec shRNA-Cx43 intra-hippocampique

2.1. Validation histologique

Grâce à l'injection d'un lentivirus ciblant préférentiellement les astrocytes (Merienne et al 2015), nous avons été en mesure d'inactiver les Cx43 spécifiquement dans l'hippocampe. Nous avons dans un premier temps validé la diminution de l'expression de la Cx43 dans l'hippocampe. Comme présenté dans la figure ci-dessous, l'analyse de l'expression de la Cx43 en western blot n'a révélé aucune différence dans l'hippocampe (test-t de Student

p=0,422, Figure 33) probablement en raison d'une analyse sur structure entière alors que le vecteur lentiviral a été infusé dans une sous-région de l'hippocampe.

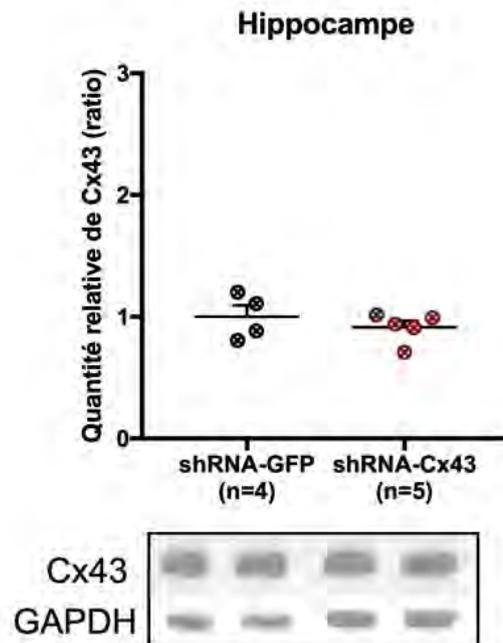


Figure 33 : Analyse de l'expression des Cx43 par western blot dans l'hippocampe de souris injectées localement avec un shRNA-Cx43.

L'injection d'un shRNA-Cx43 dans l'hippocampe ne modifie pas l'expression des Cx43 dans cette structure. Les résultats sont représentés en moyenne \pm S.E.M de l'expression relative de protéine.

Afin de contourner ce problème technique, nous avons mis en place une analyse immunohistochimique plus fine. Nous avons alors observé une diminution de l'expression de la protéine au site d'injection du vecteur lentiviral (test-t de Student, p=0,005 ; Figure 34A-B), en comparaison à l'injection d'un vecteur contrôle contenant un shRNA-GFP. À l'instar du modèle Cx43 KD, aucune différence dans l'expression de la Cx30 (p=0,232) n'a été observée. Aucune différence n'a été observée sur l'expression de GFAP (p=0,505).

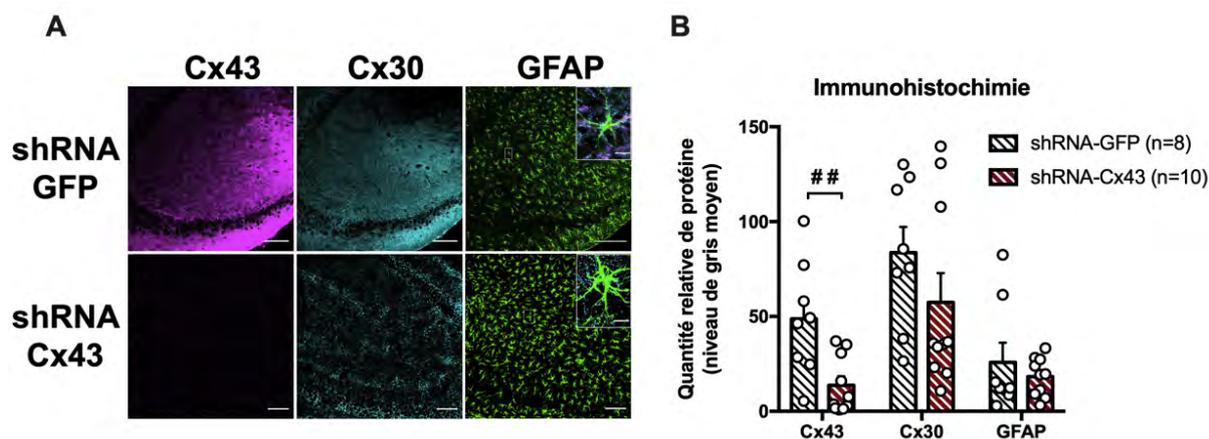


Figure 34 : Expression des Cx43, Cx30 et de la GFAP dans l'hippocampe de souris injectées localement avec un shRNA-Cx43.

L'expression des Cx43 est fortement diminuée au niveau du site d'injection, alors que l'expression des Cx30 ou de la GFAP reste inchangée. Un grossissement plus important (voir encart) nous indique que les Cxs sont présentes principalement au niveau des processus astrocytaires (A). Quantification de l'intensité de fluorescence de la Cx43, Cx30 et GFAP (B). Les résultats sont représentés en moyenne \pm S.E.M de l'intensité moyenne de fluorescence. Test-t de Student $##p < 0,01$: significativement différent du groupe shRNA-GFP.

2.2. Caractérisation comportementale

Trois semaines sont nécessaires pour que le shRNA encapsulé dans le vecteur lentiviral s'intègre au génome et s'exprime de manière ubiquitaire dans la région ciblée (Colin et al 2009). Nous avons donc respecté ce délai avant de réaliser une batterie de tests comportementaux visant à caractériser l'effet de l'inactivation hippocampique des Cx43, sur les comportements anxio/dépressifs mais aussi de mémoire. La pathologie de la DM étant définie en clinique comme un syndrome (ensemble de symptômes), plusieurs types de comportements appelés « endophénotypes » ont été mesurés de manière à se rapprocher le plus possible de la pathologie humaine (Holmes 2003).

2.2.1. Tests d'anxiété

Dans cette étude, nous avons réalisé trois tests visant à mesurer le niveau d'anxiété des animaux : le test de champ ouvert (Open Field, OF), le test de labyrinthe en croix surélevée (Elevated plus Maze, EPM) et le test d'alimentation supprimée par la nouveauté (Novelty Suppressed Feeding, NSF, Figure 35A-C).

La distance totale parcourue dans une nouvelle arène nous a permis d'évaluer l'activité locomotrice de chaque animal et de vérifier ainsi l'absence d'effet sédatif ou psychostimulant du shRNA-Cx43 dans l'hippocampe. Aucune différence n'a été observée entre les groupes shRNA-Cx43 et shRNA-GFP (1793 ± 156 vs. 1807 ± 119 cm parcourus respectivement pour les groupes shRNA-GFP et shRNA-Cx43, test-t de Student $p = 0,355$).

Dans les tests d'OF, EPM et NSF, nous n'avons pas observé de différences significatives entre les deux groupes d'animaux sur les différents paramètres comportementaux étudiés (respectivement $p=0,483$, $p=0,432$ et $p=0,137$).

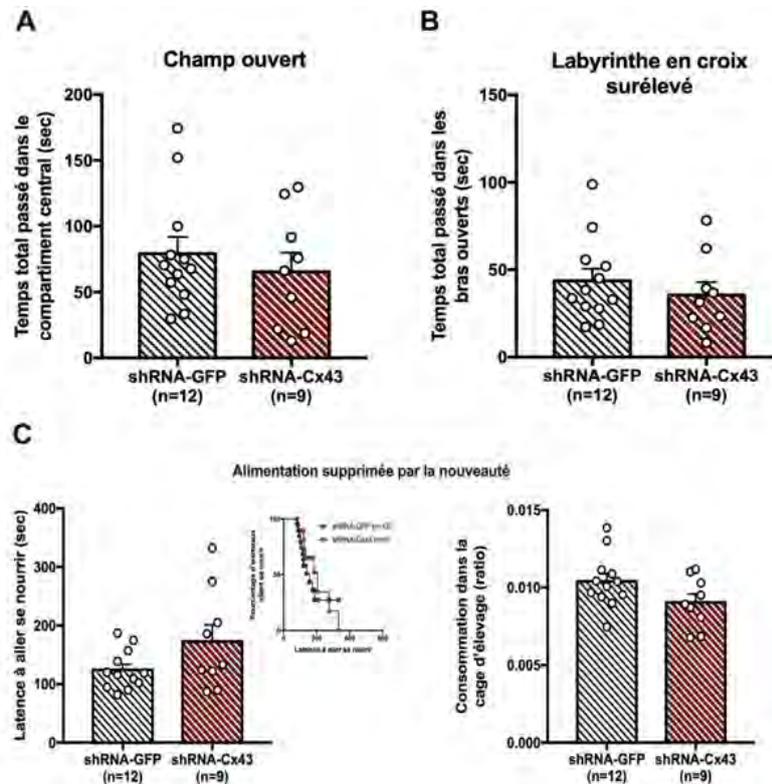


Figure 35 : Effet de l'inactivation intra-hippocampique des Cx43 sur le comportement anxieux.

Dans le test d'OF, le temps total passé dans la zone centrale n'est pas différent entre les deux groupes d'animaux (A). Dans l'EPM, le temps passé dans les bras ouverts n'est pas différent entre les deux groupes d'animaux (B). Dans le NSF, la latence à aller se nourrir n'est pas différente entre les deux groupes d'animaux. De la même manière, la consommation dans la cage d'élevage reste inchangée (C). Les résultats sont représentés en moyenne \pm S.E.M. pour chacun de ces paramètres.

2.2.2. Tests de résignation et d'incurie

Bien que le test de suspension caudale (Tail Suspension Test, TST, Figure 36A-C) ait été développé pour sélectionner des molécules pharmacologiques ayant un potentiel thérapeutique, ce test est également utilisé dans le but de prévoir un éventuel effet pathologique (pour revue Cryan et al 2005). Aucune différence entre les deux groupes n'a été observée sur le temps total d'immobilité (test-t de Student $p=0,592$).

Basé sur le même principe que le TST, nous avons également évalué la résignation des animaux dans le test de nage forcée (Forced Swim Test, FST). L'analyse statistique ne nous a pas, non plus permis, d'observer de différence dans le temps total d'immobilité entre les deux groupes ($p=0,129$).

Enfin, nous avons réalisé le test d'éclaboussures (Splash Test, ST). En accord avec l'absence d'effet du shRNA-Cx43 sur les comportements de type dépressifs, aucunes

différences statistiques n'ont été mises en évidence entre les deux groupes d'animaux tant au niveau du temps total de toiletteage ($p=0,225$) qu'au niveau de la fréquence ($p=0,242$).

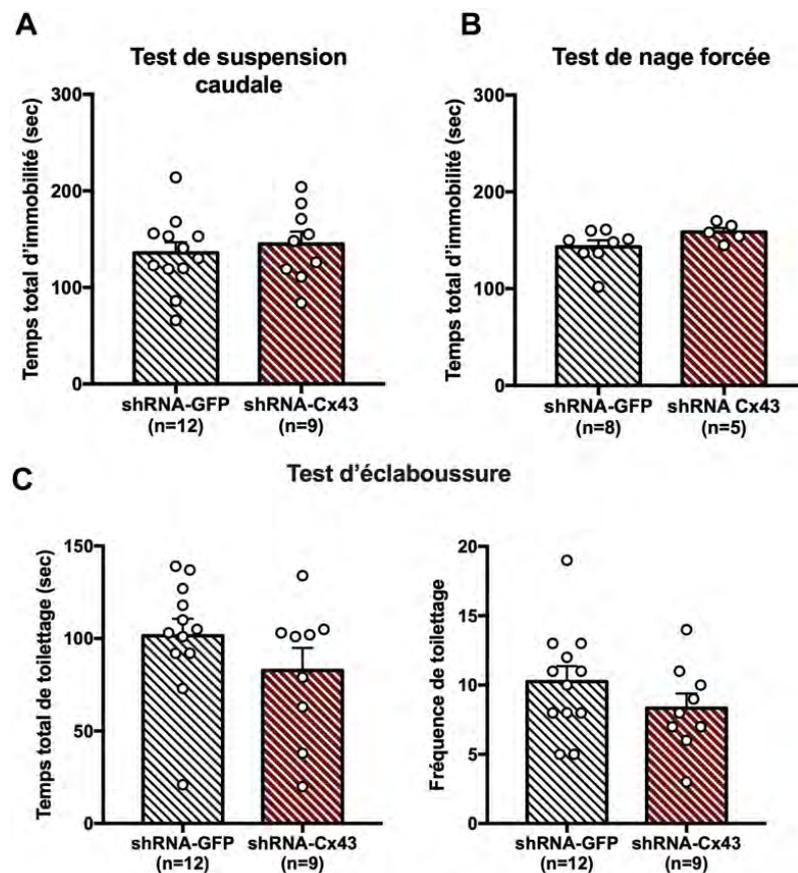


Figure 36 : Effet de l'inactivation intra-hippocampique des Cx43 sur le comportement de résignation et d'incurie.

Le temps d'immobilité, reflet de la résignation, n'est pas affecté chez les animaux shRNA-Cx43 dans le TST (A) et le FST (B). Dans le ST qui se réfère au comportement d'incurie, le temps total de toiletteage et la fréquence ne sont pas affectés chez les animaux shRNA-Cx43 (C). Les résultats sont représentés en moyenne \pm S.E.M. pour chacun de ces paramètres.

Ces données comportementales ne nous permettent pas d'entrevoir d'effet(s) de l'inactivation hippocampique des Cx43 sur le comportement anxio/dépressif des souris. On sait cependant que l'hippocampe joue un rôle déterminant dans les capacités mnésiques (Ennaceur et al 1997, Mumby et al 2002) lesquelles sont fortement impactées dans la DM (Darcet et al 2014, Trivedi & Greer 2014). Nous avons donc testé l'effet du shRNA-Cx43 dans l'hippocampe sur les performances mnésiques.

2.2.3. Test de mémoire

Pour évaluer la mémoire chez la souris, nous disposons au laboratoire de plusieurs paradigmes. Nous avons choisi de réaliser le test de reconnaissance d'objet (OR, Figure 37).

Validé dans notre laboratoire (Goodman et al 2010), le test d'OR repose cette fois-ci sur la discrimination d'un objet connu d'un nouvel objet inconnu. Un indice de préférence proche de 50% représente le niveau de chance qu'a un animal d'explorer le nouvel objet. L'analyse statistique a montré que les animaux explorent préférentiellement le nouvel objet (test-t de Student de comparaison à 50% $p < 0,001$ et $p < 0,001$ respectivement pour les groupes shRNA-GFP et shRNA-Cx43). De manière intéressante, les souris shRNA-Cx43 explorent plus le nouvel objet en comparaison aux animaux contrôles (test-t de Student $p = 0,026$).

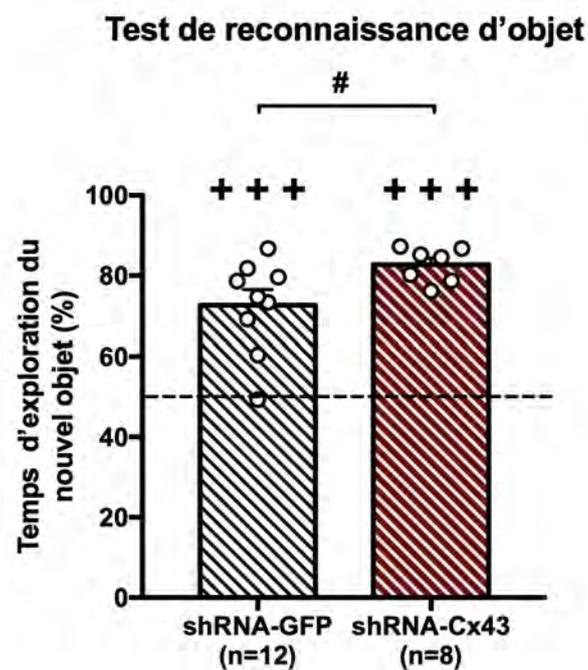


Figure 37 : Effet de l'inactivation intra-hippocampique des Cx43 sur la mémoire.

50% représente la chance d'explorer le nouvel objet. Quel que soit le groupe expérimental, les souris explorent de la même manière un objet connu d'un nouvel objet. Les souris injectées avec un shRNA-Cx43 explorent plus le nouvel objet en comparaison à des souris shRNA-GFP. Les résultats sont représentés en moyenne \pm S.E.M du pourcentage de préférence pour le nouvel objet. Test-t de Student : +++ $p < 0,001$: significativement différent de la valeur chance fixée à 50%. # $p < 0,05$: significativement différent du groupe shRNA-GFP.

Ces résultats suggèrent qu'en conditions physiologiques, la diminution d'expression des Cx43 dans l'hippocampe ne modifie pas les comportements liés aux émotions. On sait aujourd'hui que les astrocytes sont capables de moduler l'activité neuronale sous-jacente. Nous avons donc cherché à savoir si en dépit de l'absence d'un comportement anxio/dépressif, l'inactivation des Cx43 astrocytaires dans l'hippocampe pouvait avoir des conséquences neurochimiques sur les systèmes sérotoninergique et glutamatergique déjà appréhendés chez les souris Cx43 KD.

2.3. Caractérisation neurochimique

Nous avons comparé les $[5\text{-HT}]_{\text{ext}}$ dans l'hippocampe de souris shRNA-GFP et shRNA-Cx43 (Figure 38A-B). Notre analyse a permis de montrer que les concentrations basales de 5-HT étaient les mêmes quel que soit le groupe ($0,96 \pm 0,16$ vs. $0,65 \pm 0,06$ pg/15 μL respectivement pour le groupe shRNA-GFP et le groupe shRNA-Cx43 ; test-t de Student $p=0,205$). Par ailleurs, l'ANOVA à deux facteurs n'a révélé aucune différence significative des $[5\text{-HT}]_{\text{ext}}$ liée au génotype ($F_{(1,16)}=1,281$, $p=0,257$), au temps ($F_{(3,64)}=0,609$, $p=0,658$) ou leur interaction ($F_{(3,64)}=1,132$, $p=0,349$). En accord avec les données obtenues chez les animaux Cx43 KD, un stress n'a pas non plus modifié les $[5\text{-HT}]_{\text{ext}}$ comme le montre l'analyse des aires sous la courbe calculées après l'injection de NaCl (test-t de Student $p=0,525$).

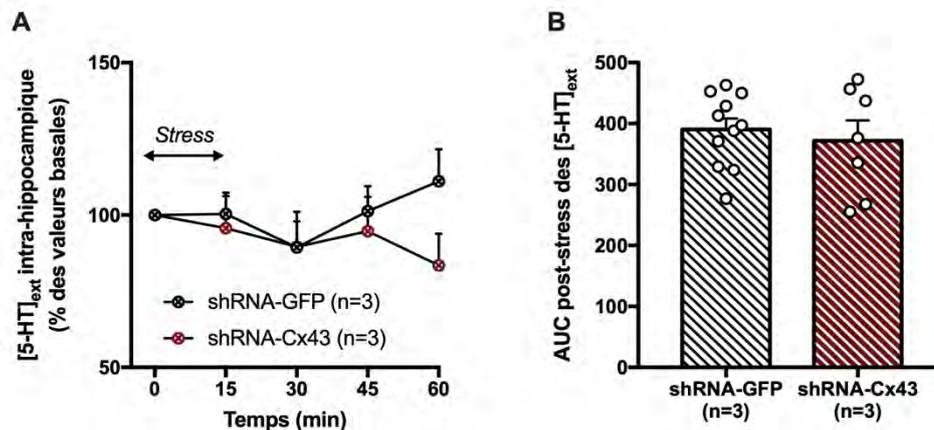


Figure 38 : Effet de l'inactivation intra-hippocampique des Cx43 sur les $[5\text{-HT}]_{\text{ext}}$ hippocampiques. Suite à l'application d'un stress aigu, aucune modification des concentrations extracellulaires de sérotonine ($[5\text{-HT}]_{\text{ext}}$) n'a été observée au cours du temps chez les souris WT et Cx43 KD. Les résultats sont représentés en moyenne \pm SEM des pourcentages des valeurs basales de $[5\text{-HT}]_{\text{ext}}$ intra-hippocampiques (A) et des aires sous la courbe calculées après le stress (B).

Ainsi, l'inactivation hippocampique des Cx43 n'affecte ni le comportement lié aux émotions, ni l'activité du système sérotoninergique dans l'hippocampe. Des études plus poussées sur le système glutamatergique sont nécessaires afin d'étudier d'éventuels effets sur cette neurotransmission.

3. Modèle d'inactivation tissu-spécifique des Cx43 : souris WT avec un peptide mimétique des Cx43 intra-hippocampique par le Gap26

Comme évoqué ci-dessus, il existe une balance d'activité des Cxs astrocytaires dans leurs rôles de JC ou d'HC. Alors que des études suggèrent que la perte de communication astrocytes-astrocytes via les JC serait favorable à un état dépressif, au contraire, la perte de communication astrocytes-neurones médiée par les HC libérant des substances neuroactives, serait quant-à-elle favorable à un profil de type antidépresseur (pour revue [Sarrouilhe et al 2018](#)). Dans ce contexte, nous avons émis l'hypothèse que l'absence d'effets comportementaux chez des souris shRNA-Cx43 injectées dans l'hippocampe pourrait être liée au blocage concomitant des deux entités fonctionnelles (JC et HC). Nous avons donc cherché à déterminer les effets de l'inactivation hippocampique des HC grâce à l'injection du peptide mimétique Gap26 dans l'hippocampe. Composé de treize acides aminés, ce peptide reconnaît la première boucle extracellulaire de la Cx43 permettant ainsi le blocage spécifique des HC rapidement après son injection ([Giaume & Theis 2010](#)) et probablement la libération de gliotransmetteurs par les astrocytes même si très peu d'évidences *in vivo* sont venues étayer cette hypothèse à ce jour ([Stehberg et al 2012](#)).

Suite à l'injection de Gap26 dans l'hippocampe, nous avons observé une diminution significative du temps d'immobilité mesuré dans le FST (test-t de Student $p=0,0035$), en comparaison à des souris contrôles injectées avec un peptide aléatoire (Scramble, [Figure 39A-B](#)). Suite à ces résultats, nous avons étudié l'effet du blocage des HC sur la neurotransmission glutamatergique. L'ANOVA à deux facteurs a révélé un effet du facteur traitement ($F_{(1,12)}=5,725$, $p=0,0034$), mais pas du facteur temps ($F_{(7,84)}=1,217$, $p=0,3026$) ni de leur interaction ($F_{(7,84)}=1,665$, $p=0,0695$). En revanche, l'air sous la courbe calculée suite à l'application d'un stress de nage forcée révèle une diminution des concentrations extracellulaires de glutamate dans l'hippocampe chez les souris injectées avec le Gap26 comparées aux souris contrôles (test-t de Student $p=0,009$; [Figure 39C-D](#)).

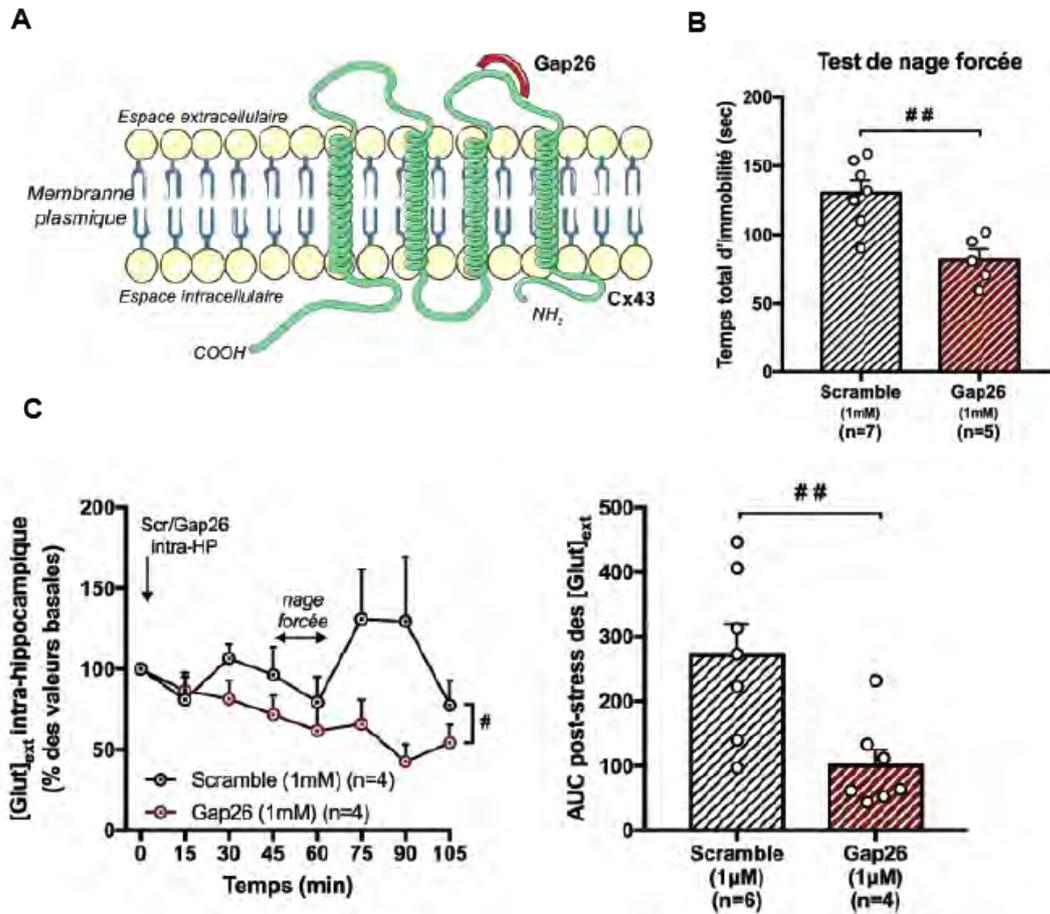


Figure 39 : Effet de l'inactivation intra-hippocampique du Gap26 sur le comportement de résignation et les $[Glut]_{ext}$ hippocampiques.

L'inactivation des Cx43 par le Gap26 spécifiquement injecté dans l'hippocampe induit une diminution de l'immobilité dans le FST (A) et réduit les $[Glut]_{ext}$ suite à l'application d'un stress de nage forcée (B-C). Les résultats sont représentés en moyenne \pm S.E.M. du temps total d'immobilité et des $[Glut]_{ext}$ après le stress de nage forcée, test-t de Student : ## $p < 0,01$: significativement différent du groupe scramble.

Dans le but de mieux comprendre les mécanismes par lesquels le glutamate astrocytaire exerce des effets pro-dépresseurs, nous avons étudié l'effet d'un antagoniste des récepteurs NMDA (kétamine 10 mg/kg i.p.) ou d'un antagoniste AMPA (NBXQ, 10 mg/kg i.p.) sur la réponse au Gap26 (Figure 40).

Dans le FST, l'ANOVA a révélé un effet du facteur traitement sur le temps total d'immobilité ($F_{(3,21)}=23,05$, $p < 0,001$). Comme précédemment, l'inactivation des HC dans l'hippocampe par le Gap26 induit une diminution de l'immobilité ($p=0,003$ en comparaison au groupe scramble) alors que l'injection de kétamine (10 mg/kg i.p.) 30 minutes avant le début du test, potentialise les effets du Gap26 ($p=0,016$ en comparaison au groupe Gap26 seul). En revanche, suite à l'injection de NBXQ (10 mg/kg i.p.), les effets de type antidépresseurs du Gap26 ne sont plus significativement différents du groupe contrôle (peptide scramble) ($p=0,1330$). Nos résultats suggèrent que l'activation des récepteurs AMPA serait un processus important dans l'induction d'une réponse de type antidépresseur.

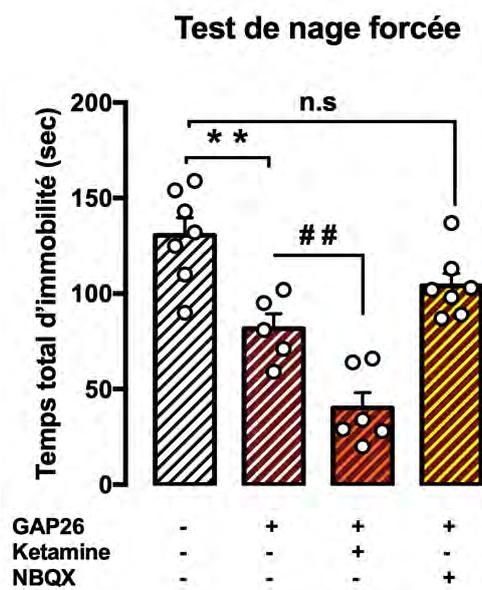


Figure 40 : Effet de l'inactivation intra-hippocampique du GAP26 sur le comportement de résignation en présence ou non d'un antagoniste des récepteurs glutamatergiques NMDA (kétamine) ou AMPA (NBQX).

L'inactivation des HC des Cx43 par le Gap26 spécifiquement dans l'hippocampe induit une diminution de l'immobilité dans le FST. L'injection i.p. de kétamine (10 mg/kg i.p.) potentialise les effets antidépresseurs du Gap26. L'injection i.p. de NBQX (10 mg/kg i.p.) s'oppose aux effets antidépresseurs du Gap26. Les résultats sont représentés en moyenne \pm S.E.M. ** $p < 0,01$: significativement différent du groupe scramble, ## $< 0,01$: significativement différent du groupe Gap26. $n = 5-7$ animaux par groupe

Conclusion de l'étude 1

L'ensemble de ces résultats suggère que si l'inactivation spécifique des Cx43 dans l'hippocampe par un shRNA-Cx43 n'exerce aucun effet anxiolytique ou de type antidépresseur, c'est probablement en raison du fait que cette stratégie ne permet pas de dissocier la fonction JC de la fonction HC. En effet, en ciblant les HC hippocampiques à l'aide de l'injection locale de peptide Gap26, un effet de type antidépresseur accompagné d'une atténuation des concentrations extracellulaires locales de glutamate a pu être mis en évidence chez des souris sauvages. Comme précédemment suggéré (Gerhard et al 2015), cette diminution du tonus glutamatergique hippocampique atténuerait l'activation des récepteurs NMDA mais faciliterait celle des récepteurs AMPA par un mécanisme encore inconnu (augmentation de la densité/sensibilité de ce sous-type de récepteur ?). Ces résultats soulèvent de nombreuses questions et notamment l'impact de l'inactivation des Cx43 sur la réponse aux antidépresseurs. Il a récemment été démontré que le blocage des Cxs avec la méfloquine potentialise les effets analgésiques d'un antidépresseur tricyclique : l'amitriptyline (Jeanson et al 2016). Une potentialisation peut-elle être mise en évidence dans le domaine des troubles de l'humeur ?

Chapitre 2 : Étude des effets comportementaux et neurochimiques de l'inactivation des Cx43 en conditions physiologiques suite à l'injection aigüe d'un antidépresseur : la fluoxétine

Parmi les antidépresseurs actuellement disponibles sur le marché, les ISRS, les IRSN ou les IRN occupent une place importante dans le choix de la stratégie thérapeutique. Leur efficacité repose sur leur capacité à stimuler la neurotransmission monoaminergique notamment dans le cortex frontal et l'hippocampe (Guiard et al 2009). Toutefois, ces traitements présentent certaines limites liées à une capacité modérée à augmenter la neurotransmission monoaminergique dans les premiers jours de traitement. Ces limites sont un long délai d'action et un fort taux de non-répondeurs. Depuis plusieurs années, une recherche active en psychopharmacologie tente de définir les mécanismes neurobiologiques responsables de ces limites afin de développer de nouvelles stratégies combinant différents psychotropes (Blier 2003). L'idée de combiner un antidépresseur classique à un agent pharmacologique ciblant les astrocytes est novatrice mais n'a pas encore trouvé d'écho dans la littérature. Pourtant, dans un travail récent, Jeanson et ses collaborateurs montrent que l'association d'un antidépresseur tricyclique (l'amitriptyline) avec un inhibiteur des Cxs astrocytaires (la méfloquine) induit des effets analgésiques plus marqués que chaque agent administré séparément dans un modèle de ligature du nerf sciatique (Jeanson et al 2016). Fort de ces observations réalisées chez le rat, ce deuxième chapitre pose la question de l'intérêt de bloquer les Cxs astrocytaires dans la réponse aigüe à un antidépresseur appartenant à la classe des ISRS, la fluoxétine (FLX). Pour répondre à cette question, nous nous sommes placés dans trois modèles d'inactivation déjà validés dans ce travail de thèse (voir ci-dessus) ou dans la littérature chez des souris naïves non-déprimées :

- Un modèle d'inactivation génétique constitutive : souris Cx43 KD
- Un modèle d'inactivation génétique tissu-spécifique : souris shRNA-Cx43 dans l'hippocampe
- Un modèle d'inactivation pharmacologique : souris traitées à la CBX dont les effets inhibiteurs sur les Cxs ont été décrits précédemment (Juszczak & Swiergiel 2009).

1. Modèle d'inactivation constitutive des Cx43 : souris Cx43 KD

1.1. Caractérisation comportementale

Les effets de type antidépresseurs de la FLX chez le rongeur sont très bien documentés dans la littérature. Une étude récente chez la souris BalbC révèle que l'administration unique de FLX à la dose de 18 mg/kg induit une diminution de la résignation mesurée dans le test de nage forcée (Guilloux et al 2013). Dans notre étude, nous avons utilisé le TST pour mesurer cet état de résignation. Grâce à une ANOVA à deux facteurs, nous avons mis en évidence un effet du traitement ($F_{(1,31)}=5,365$, $p=0,0273$) mais du génotype ($F_{(1,31)}=2,599$, $p=0,1171$) ni de leur interaction ($F_{(1,31)}=4,696$, $p=0,380$), sur la latence à la première immobilité. Ainsi, l'administration unique de FLX n'affecte pas la latence à la première immobilité ($p=1$) chez des souris WT. En revanche ce paramètre est plus élevé chez les animaux Cx43 KD après traitement à la FLX ($p=0,0236$ comparé aux animaux Cx43 KD/NaCl, Figure 41A). Concernant le temps total d'immobilité, un effet du traitement ($F_{(1,33)}=40,57$, $p<0,001$), du génotype ($F_{(1,33)}=48,39$, $p<0,001$) mais pas de l'interaction entre ces deux facteurs ($F_{(1,33)}=1,696$, $p=0,2019$) a été mis en évidence. L'inhibition constitutive des Cx43 induit un comportement de type antidépresseur représenté par une diminution de l'immobilité totale (WT/NaCl vs. Cx43 KD/NaCl ; $p<0,001$). Cet effet de la mutation est encore plus prononcé en réponse à la FLX (Cx43 KD/NaCl vs Cx43 KD/FLX, $p=0,003$). De plus, suite à l'injection unique de FLX, le temps d'immobilité est significativement plus bas chez les souris contrôles WT que chez les souris Cx43 KD ($p=0,0039$) (Figure 41B).

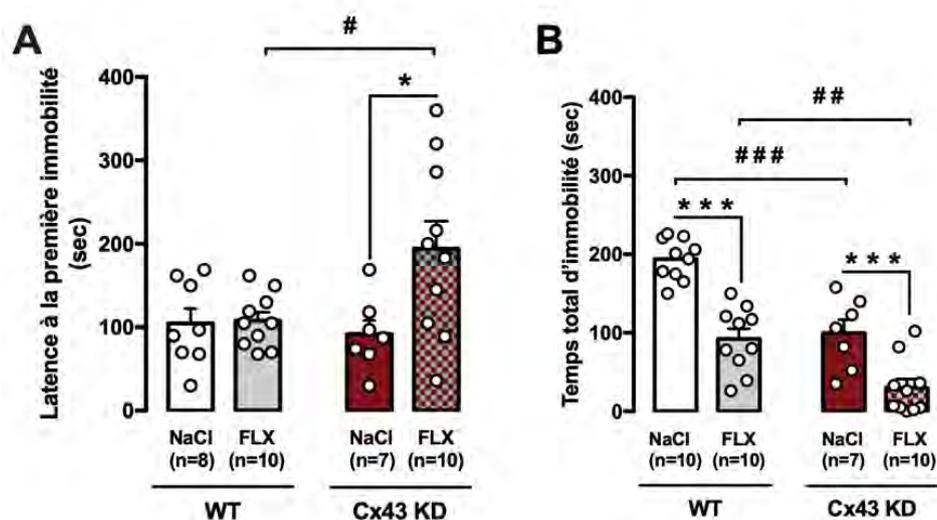


Figure 41 : Effet de l'inactivation constitutive des Cx43 sur la réponse à une administration unique de fluoxétine dans le TST.

(A) Latence à la première immobilité et (B) Temps total d'immobilité. Les résultats sont représentés en moyenne \pm S.E.M. * $p<0,05$ et *** $p<0,001$: significativement différent du groupe NaCl du même génotype ; #, $p<0,05$; ## $p<0,01$ et ### $p<0,001$: significativement différent du groupe WT soumis au même traitement.

1.2. Caractérisation électrophysiologique et neurochimique

Nous avons vu dans le chapitre précédent que les modifications comportementales observées chez les souris Cx43 KD n'étaient pas associées à des modifications de la neurotransmission sérotoninergique. Ici, nous avons tenté de déterminer si ce système pouvait être impacté spécifiquement en réponse à l'administration aiguë de FLX.

1.2.1. Activité électrique des neurones 5-HT dans le noyau du raphé dorsal (NRD)

Les corps cellulaires des neurones sérotoninergiques sont situés dans le NRD (Charnay & Léger 2010) et la régulation de leur activité électrique est un processus important dans la réponse aux ISRS. L'analyse des enregistrements électrophysiologiques (Figure 42) a révélé un effet du traitement ($F_{(1,115)}=28,33$, $p<0,001$) mais pas du génotype ($F_{(1,115)}=0,5264$, $p=0,4696$) ou de leur interaction ($F_{(1,115)}=2,237$, $p=0,1375$). Une diminution significative de la décharge électrique des neurones 5-HT est observée chez les souris WT et Cx43 KD en réponse à la FLX en comparaison aux animaux du même génotype ayant reçu le NaCl (test post-hoc de Fisher LDS $p=0,025$). Toutefois, aucune différence de décharge n'a pu être mise en évidence entre les groupes WT/FLX et Cx43/FLX.

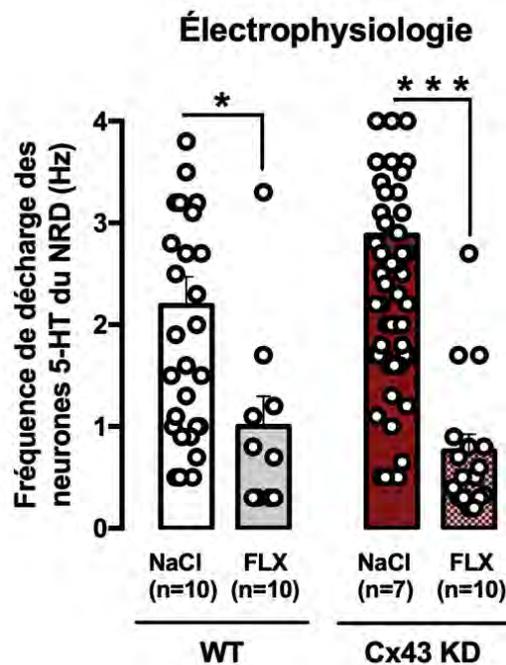


Figure 42 : Effet de l'inactivation constitutive des Cx43 sur la fréquence de décharge des neurones 5-HT du NRD en réponse à l'administration unique de fluoxétine.

Décharge électrique des neurones sérotoninergiques (en Hz) mesuré chez des souris WT ou Cx43 KD suite à l'injection de NaCl ou de fluoxétine (FLX : 18 mg/kg ; i.p.) injecté trente min avant le début des enregistrements. Les résultats sont représentés en moyenne \pm S.E.M. * $p<0,05$ et *** $p<0,001$: significativement différent du groupe NaCl du même génotype.

1.2.2. Activité neurochimique des neurones 5-HT projetant dans l'hippocampe

Grâce à la technique de microdialyse, nous avons ensuite évalué les $[5\text{-HT}]_{\text{ext}}$ hippocampiques après injection unique de FLX. Les concentrations basales de 5-HT étaient les mêmes entre les deux groupes ($1,38 \pm 0,37$ vs. $1,18 \pm 0,12$ pg/15 μL respectivement pour le groupe contrôle WT et le groupe Cx43 KD (test-t de Student $p=0,105$). Les résultats de la cinétique montrent que la FLX augmente les $[5\text{-HT}]_{\text{ext}}$ hippocampiques dans les deux groupes de souris (Figure 43A). L'analyse statistique des AUC suite à l'injection de FLX révèle une augmentation significativement plus importante des $[5\text{-HT}]_{\text{ext}}$ dans le groupe de souris Cx43 KD (test-t de Student $p=0,044$; Figure 43B).

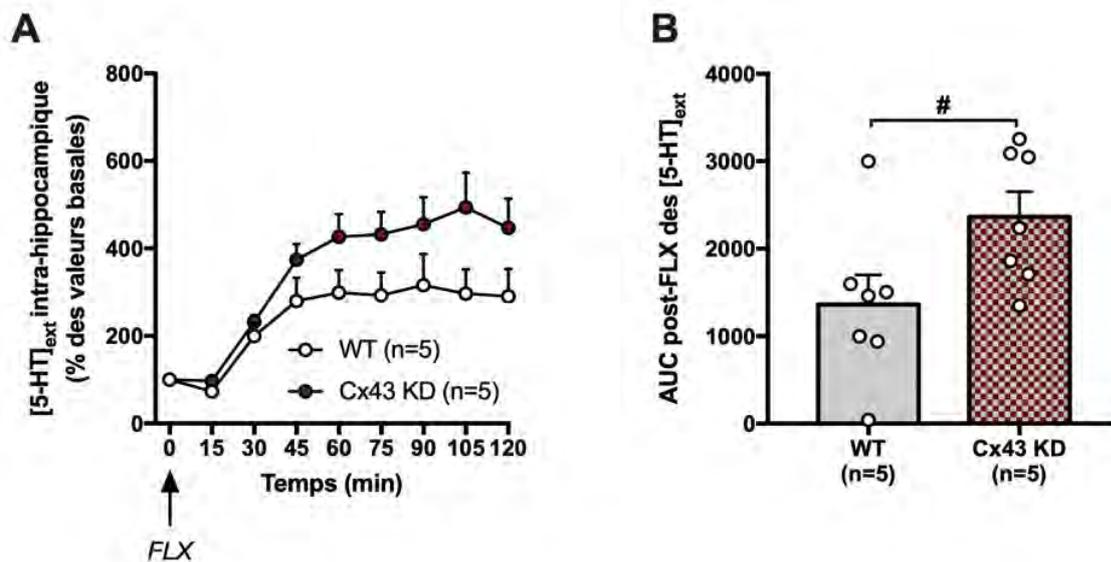


Figure 43 : Effet de l'inactivation constitutive des Cx43 sur la réponse à une administration unique de fluoxétine sur les $[5\text{-HT}]_{\text{ext}}$ hippocampiques.

Alors que les concentrations basales de 5-HT sont les mêmes entre les deux groupes, l'injection de fluoxétine (FLX : 18 mg/kg ; i.p.) augmente les $[5\text{-HT}]_{\text{ext}}$ de manière plus importante chez les souris Cx43 KD en comparaison aux souris WT (A). L'analyse des aires sous la courbe après injection de FLX montre des $[5\text{-HT}]_{\text{ext}}$ plus importantes chez les souris Cx43 KD en comparaison aux animaux WT (B). Les résultats sont représentés en moyenne \pm S.E.M de l'AUC calculée après l'injection de FLX. # $p<0,05$: significativement différent du groupe WT ; $n=5$ déterminations par groupe.

Ces derniers résultats de microdialyse apportent donc une possible explication au fait que les effets comportementaux de la FLX dans le TST sont potentialisés chez les souris Cx43 KD. Afin de mettre en évidence la région responsable de cet effet, nous avons choisi d'inactiver spécifiquement les Cx43 dans l'hippocampe. Pour cela, nous avons utilisé le vecteur lentiviral contenant le shRNA-Cx43 puis mesuré le comportement de résignation en réponse à la FLX chez des souris Swiss dont la sensibilité pour cet antidépresseur est

moins prononcée que chez les souris C57BL6/J et donc adaptées pour mettre en évidence un effet potentialisateur.

2. Modèle d'inactivation tissu spécifique shRNA-Cx43

2.1. *Validation de l'inactivation dans l'hippocampe.*

La première étape a été de vérifier le fait que le shRNA-Cx43 injecté dans l'hippocampe inhibe bien l'expression des Cx43 (Figure 44). Comme attendu et précédemment rapporté (voir Figure 34), l'injection de shRNA-Cx43 dans l'hippocampe inhibe l'expression des Cx43 au site d'injection ($p=0,05$) sans affecter l'expression de la GFAP ($p=0,6535$).

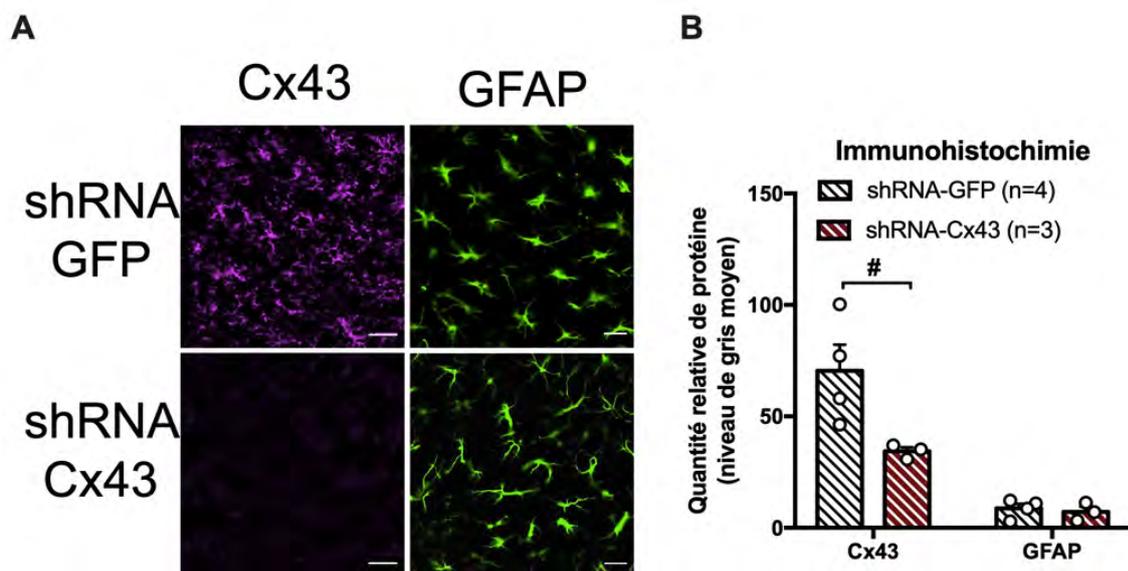


Figure 44 : Expression des Cx43 et de la GFAP dans l'hippocampe de souris injectées avec un shRNA-Cx43.

L'injection d'un shRNA-Cx43 diminue l'expression des Cx43 sans affecter l'expression de la GFAP (A). Les quantifications d'intensité de fluorescence sont représentées en (B). Les résultats sont représentés en moyenne \pm S.E.M du niveau de gris moyen mesuré pour chaque protéine. Échelle : 100 μ m. Test-t de Student de comparaison des moyennes : # $p<0,05$: significativement différent du groupe shRNA-GFP.

2.2. *Inactivation hippocampique*

2.2.1. *Conséquences comportementales*

Dans le TST (Figure 45), l'ANOVA à deux facteurs ne révèle aucun effet du génotype ($F_{(1,32)}=1,872$, $p=0,1808$), du traitement ($F_{(1,32)}=0,006$, $p=0,9383$) et de leur interaction ($F_{(1,32)}=0,015$, $p=0,9015$) sur la latence à la première immobilité. De la même manière, aucun effet du génotype ($F_{(1,32)}=0,2391$, $p=0,6282$) n'a été décelé sur le temps total d'immobilité. En revanche, un effet du traitement ($F_{(1,32)}=30,61$, $p<0,001$) et de l'interaction de ces deux facteurs ($F_{(1,32)}=4,195$, $p=0,048$) a été observé. Ainsi, l'injection

unique de FLX réduit le temps d'immobilité totale (test post-hoc de Sidak $p < 0,001$ en comparaison au groupe shRNA-Cx43/NaCl). Néanmoins, la FLX n'exerce aucun effet sur le comportement de résignation des souris shRNA-GFP ($p = 0,1276$ shRNA-GFP/NaCl vs. shRNA-GFP/FLX).

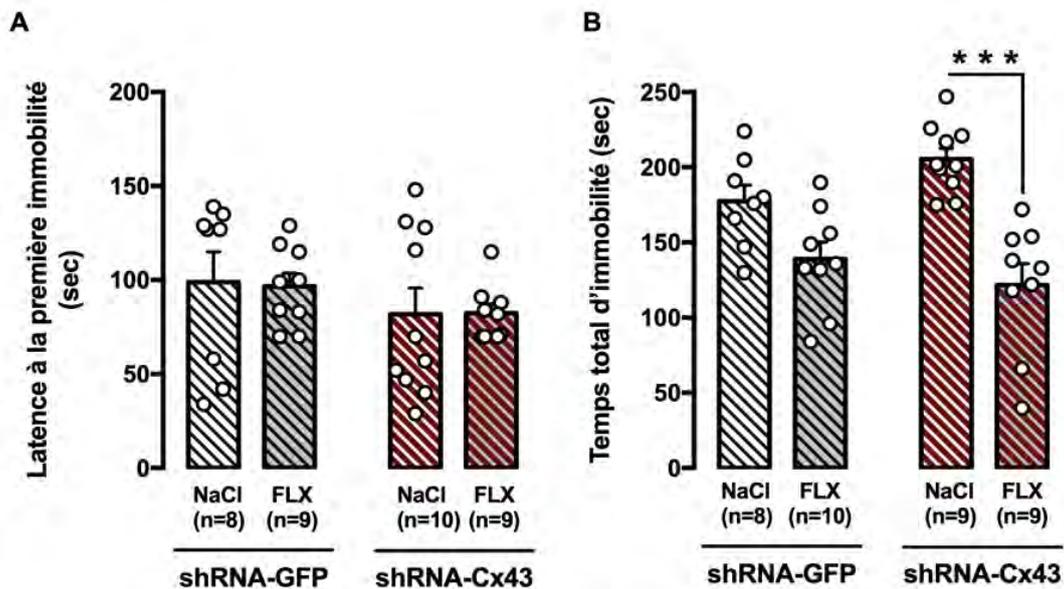


Figure 45 : Effet de l'inactivation hippocampique des Cx43 sur la réponse à une administration unique de fluoxétine dans le TST.

(A) Latence à la première immobilité et (B) Temps total d'immobilité. Les résultats sont représentés en moyenne \pm S.E.M. de la latence à la première immobilité et de l'immobilité totale. $***p < 0,001$: significativement différent du groupe NaCl du même génotype.

2.2.2. Conséquences neurochimiques

L'analyse de microdialyse nous a permis d'étudier les conséquences de l'inactivation des Cx43 dans l'hippocampe sur les $[5\text{-HT}]_{\text{ext}}$ locales. Les concentrations basales de 5-HT dans l'hippocampe étaient les mêmes les souris shRNA-GFP et les souris shRNA-Cx43 ($0,96 \pm 0,16$ vs. $0,65 \pm 0,060$ pg/15 μL respectivement pour les groupes shRNA-GFP et shRNA-Cx43, test de Mann-Whitney $p = 0,539$). Les résultats de la cinétique montrent que la FLX augmente les $[5\text{-HT}]_{\text{ext}}$ hippocampiques dans les deux groupes de souris avec une forte tendance en faveur d'un effet plus prononcé chez les souris shRNA-Cx43 (Figure 46A). Toutefois, l'analyse statistique des AUC post-FLX (Figure 46B) n'a pas permis de révéler un effet significatif en raison du nombre insuffisant d'animaux par groupe (test de Mann-Whitney $p = 0,400$).

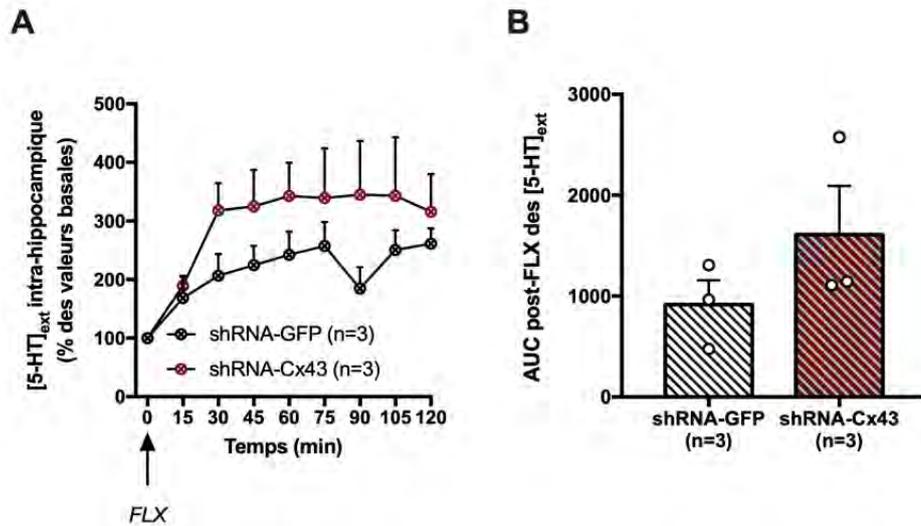


Figure 46 : Effet de l'inactivation intra-hippocampique des Cx43 sur la réponse à une administration unique de fluoxétine sur les [5-HT]_{ext} hippocampiques.

L'injection de fluoxétine (FLX : 18 mg/kg ; i.p.) augmente les [5-HT]_{ext} de manière plus importante chez les souris Cx43 KD en comparaison aux souris WT (A). L'analyse des AUC après injection de FLX confirme cette observation (B). Les résultats sont représentés en moyenne \pm S.E.M de l'aire sous la courbe calculée après l'injection de FLX.

3. Modèle d'inactivation pharmacologique des Cxs par la CBX

A ce jour, de nombreux bloqueurs des Cxs sont disponibles (Pour revue [Glaume et al 2013](#)). Dans cette étude, nous avons utilisé la carbenoxolone (CBX) qui, à notre connaissance, n'a jamais été testé par voie systémique dans un contexte de dépression. Deux travaux précédents montrent que l'injection intra-corticale ou intra-hippocampique de CBX chez le rat ou la souris induit un blocage de la fonction des JC associé à une augmentation de la résignation, de l'anxiété ou de l'anhédonie mais aussi une diminution de l'expression des Cx43 de manière dose dépendante ([Sun et al 2012](#)). Ici, pour la première fois, nous avons testé les effets de type antidépresseurs de la FLX suite à l'administration unique ou répétée de CBX ([Figure 47A-B](#)).

L'ANOVA à deux facteurs montre un effet du traitement ($F_{(1,64)}=10,15$, $p=0,0022$) mais pas du prétraitement ($F_{(2,64)}=2,637$, $p=0,0794$) alors qu'un effet significatif de l'interaction entre ces deux facteurs ($F_{(2,64)}=4,981$, $p=0,0098$) a été observé sur la latence à la première immobilité. Ainsi, la FLX augmente ce paramètre uniquement chez les animaux prétraités de façon aiguë à la CBX ($p=0,0061$). Concernant le temps total d'immobilité, l'ANOVA révèle un effet du traitement ($F_{(1,63)}=24,37$, $p<0,0001$) mais pas du prétraitement ($F_{(2,63)}=0,1807$, $p=0,8352$) ou de l'interaction entre ces deux facteurs ($F_{(2,63)}=1,587$, $p=0,2126$). Cette analyse nous permet de montrer que la FLX diminue l'immobilité totale de 22% des animaux WT ($p=0,6648$), de 50% chez des animaux prétraités avec une

injection unique de CBX ($p=0,0008$) et de 31% chez des animaux prétraités de façon chronique à la CBX comparés aux animaux contrôles ($p=0,2488$).

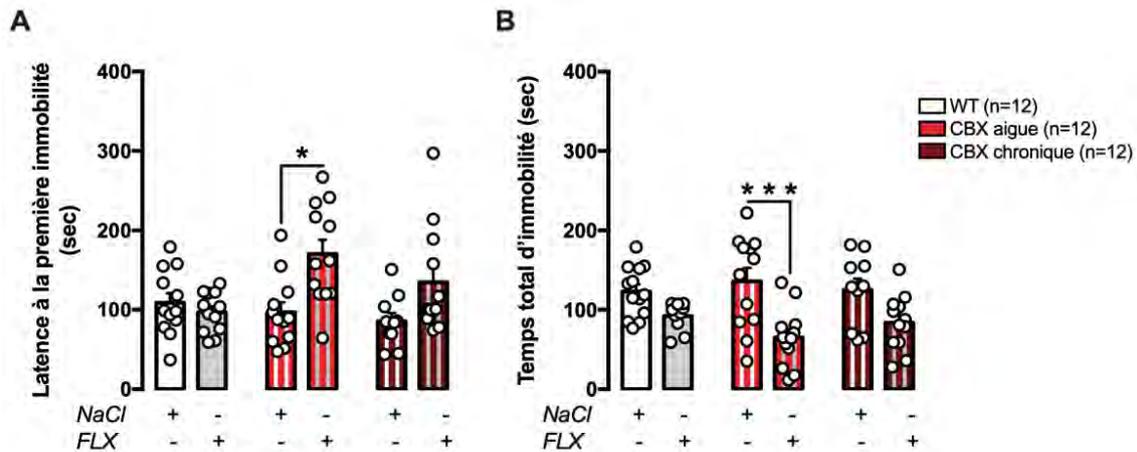


Figure 47 : Effet de l'inactivation pharmacologique des Cxs par la carbenoxolone sur la réponse à une administration unique de fluoxétine dans le TST.

(A) Latence à la première immobilité, et (B) Temps total d'immobilité. Les résultats sont représentés en moyenne \pm S.E.M. de la latence à la première immobilité et de l'immobilité totale * $p<0,05$ et *** $p<0,001$: significativement différent du groupe CBX aigu/NaCl.

Conclusion de l'étude 2

Ces expériences laissent entrevoir la possibilité que l'inactivation génétique et pharmacologique des Cxs permet de potentialiser la réponse d'une administration unique de FLX. Le fait qu'un tel effet potentialisateur soit retrouvé suite à l'injection d'un shRNA-Cx43 dans l'hippocampe souligne l'importance de cette région. D'un point de vue mécanistique, les données de microdialyse sont cohérentes avec ces résultats puisqu'elles soulignent le fait que l'inactivation génétique des Cx43 renforce la capacité de la FLX à augmenter les taux extracellulaires de 5-HT dans l'hippocampe. Alors qu'une forte tendance allant dans ce sens a également été observée chez des souris WT injectées avec le shRNA-Cx43 dans l'hippocampe. Plusieurs questions peuvent être soulevées. Est-ce que cette potentialisation peut être étendue à tous les antidépresseurs d'une même classe ou appartenant à des classes différentes ? Est-ce que cette potentialisation peut être mise en évidence en condition de traitements chroniques dans un modèle murin de dépression ?

Ces travaux font l'objet d'une publication intitulée « Astroglial connexins-mediated cell-to-cell communication differentially influence the acute response of antidepressant and anxiolytic drugs » (Portal, B. ; Rovera, R. ; Lejards, C. ; Lorenzo, N. ; Haddjeri, N. ; Déglon, N. ; Guiard, B. P.) en révision dans la revue *Acta Physiologica*.

ARTICLE 2

Astroglial connexins-mediated cell-to-cell communication differentially influence the acute response of antidepressant and anxiolytic drugs.

Portal, B. ; Rovera, R. ; Lejards, C. ; Lorenzo, N. ; Haddjeri, N. ; Déglon, N. ; Guiard, B. P.

En révision – Acta Physiologica

Résumé :

Les connexines 30 (Cx30) et connexines 43 (Cx43) astrocytaires forment des jonctions communicantes et des hémicanaux. De nombreuses évidences suggèrent que ces unités fonctionnelles participent à la modulation de la neurotransmission permettant la modulation des fonctions cognitives. En particulier, des études récentes mettent en avant le rôle des Cx43 dans des modèles animaux de dépression mais aussi chez des patients déprimés. Cependant, le rôle de ces protéines dans la réponse aux antidépresseurs classiques reste à être précisé.

Pour répondre à cette question, nous avons évalué les effets comportementaux de l'inactivation génétique ou pharmacologique des Cx43 sur la réponse à un inhibiteur sélectif de la recapture de la sérotonine, la fluoxétine.

Dans une lignée de souris Cx43 knock-down (KD) sur fond C57BL6/J, l'administration aiguë de fluoxétine (18 mg/kg i.p.) induit une augmentation des concentrations extracellulaires de sérotonine dans l'hippocampe et un effet antidépresseur mesuré dans le test de suspension caudale plus prononcé que des souris contrôles prétraitées avec le NaCl 0,9%. En accord avec ces résultats, l'injection intra-hippocampique d'un shRNA-Cx43 ou l'injection aiguë et systémique de carbenoxolone (10 mg/kg i.p.) chez des souris Swiss potentialisent les effets antidépresseurs de la fluoxétine.

Ces données démontrent que l'inactivation des Cx43 astrocytaires favoriserait le tonus sérotoninergique hippocampique spécifiquement en réponse à la FLX et que cet effet expliquerait l'effet potentialisé de cet ISRS sur le comportement de résignation chez la souris.

Contribution personnelle :

Au cours de ce travail :

- J'ai réalisé le suivi des animaux Cx43 KD depuis la reproduction à l'utilisation des animaux pour les tests comportementaux,
- J'ai réalisé les analyses immunohistochimiques de validation de l'outil shRNA depuis la perfusion, le prélèvement et les coupes des cerveaux jusqu'à l'incubation des lames avec les anticorps et leur analyse.
- J'ai réalisé les injections intra-hippocampiques et intra-amygdaliennes (données non représentées) des shRNA-Cx43

Chapitre 3 : Étude des effets comportementaux et neurochimiques de l'inactivation des Cx43 hippocampique en condition de stress chronique

Comme nous l'avons vu dans le premier chapitre de cette thèse, l'inactivation des Cx43 dans l'hippocampe en conditions physiologiques n'affecte pas les comportements d'anxiété ou de résignation. Or, comme les cellules gliales adoptent un phénotype particulier en conditions pathologiques (Banar & Duman 2008, Orellana et al 2015, Sun et al 2012, Ye et al 2003), cette partie de thèse s'intéresse aux effets du blocage des Cx43 dans l'hippocampe spécifiquement dans ces conditions expérimentales.

1. Inhibition des Cx43 hippocampiques

Dans cette étude, nous avons utilisé le lentivirus contenant un shRNA-Cx43 (shRNA-GFP utilisé comme contrôle) afin d'inactiver les Cx43 spécifiquement dans l'hippocampe. Après quatre semaines de récupération, les animaux ont été exposés à la CORT pendant au moins onze semaines. L'expression des Cx43 astrocytaires après le traitement à la CORT est représentée en Figure 48A-B. L'injection de shRNA-Cx43 suivit du traitement CORT permet, au site d'injection, une réduction significative de l'expression de la Cx43 (test-t de Student $p < 0,001$) mais pas des Cx30 ($p = 0,2247$). En accord avec la littérature chez l'humain (Cobb et al 2016) et le rongeur (Gong et al 2012), une diminution de GFAP ($p < 0,001$) accompagne également celle des Cx43 dans l'hippocampe.

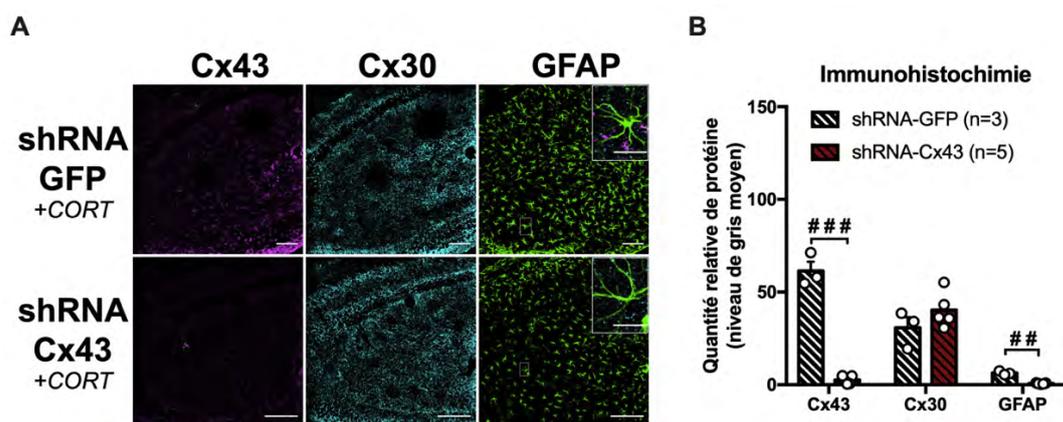


Figure 48 : Expression des Cx43, Cx30 et de la GFAP dans l'hippocampe de souris injectées avec un shRNA-GFP ou shRNA-Cx43 dans un modèle de souris déprimées.

L'injection d'un shRNA-Cx43 suivit d'un traitement chronique à la CORT diminue l'expression des Cx43 et de la GFAP sans affecter l'expression de la Cx30. Un grossissement plus important (voir encart) nous indique les Cxs présentes principalement au niveau des processus astrocytaires (A). Les quantifications d'intensité de fluorescence sont représentées en (B). Échelle : 100 μ m. Les résultats sont représentés en moyenne \pm S.E.M. du niveau de gris moyen mesurés pour chaque protéine. Test-t de Student pour chaque protéine, ## $p < 0,01$ et ### $p < 0,001$: significativement différent du groupe shRNA-GFP.

2. Effets de l'inactivation des Cx43 hippocampiques dans le modèle CORT sur la réponse de l'axe HPA

2.1. *Mesure des taux plasmatiques de corticostérone en réponse à un stress aiguë*

Dans un premier temps, nous avons évalué l'évolution des concentrations plasmatiques de CORT (Figure 49) suite à l'application d'un stress aiguë (injection de CORT par voie i.p.). L'ANOVA à deux facteurs n'a révélé aucun effet du temps ($F_{(3,33)}=2,823$, $p=0,0538$), du génotype ($F_{(1,11)}=1,216$, $p=0,2937$) et de leur interaction ($F_{(3,33)}=1,373$, $p=0,2680$). En revanche, l'analyse des aires sous la courbe après l'application d'un stress de nage forcée révèle une forte tendance à la diminution de l'AUC chez les souris shRNA-Cx43 comparée aux souris shRNA-GFP (test-t de Student $p=0,0538$), laissant entrevoir une meilleure réponse adaptative de l'axe HPA.

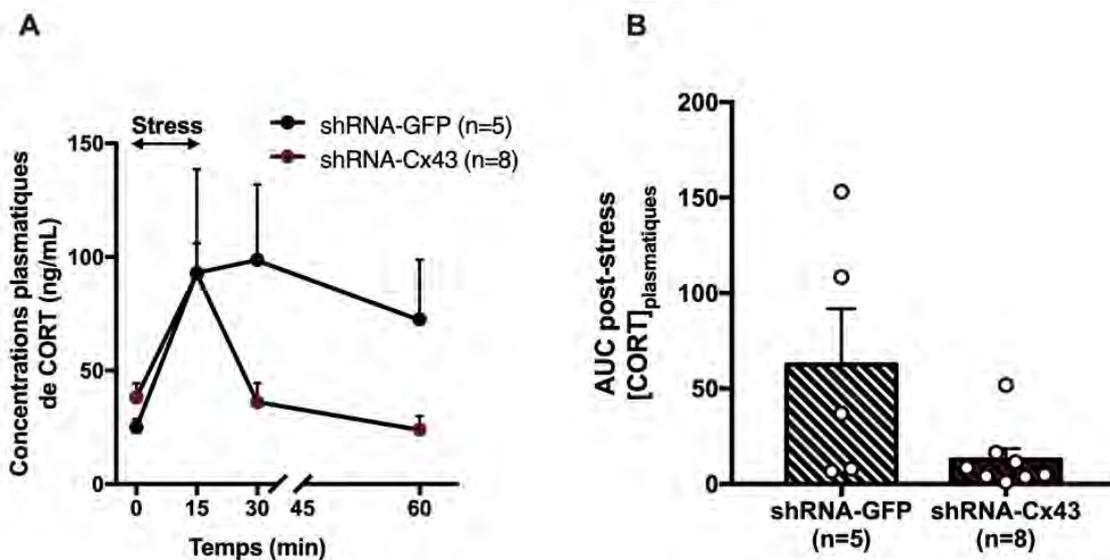


Figure 49 : Effet de l'inactivation des Cx43 sur les concentrations plasmatiques de corticostérone (CORT) dans un modèle de souris déprimées.

L'application d'un stress aiguë permet une augmentation des $[CORT]_{\text{plasmatiques}}$ qui revient progressivement aux valeurs basales (A). L'analyse des aires sous la courbe montre une tendance à une diminution plus importante des $[CORT]_{\text{plasmatiques}}$ après l'arrêt du stress (B). Les résultats sont représentés en moyenne \pm S.E.M. des taux plasmatiques de corticostérone.

2.2. *Mesure de l'hyperthermie induite par le stress aigu*

Un autre moyen d'évaluer l'activité de l'axe HPA est l'étude de la température corporelle. En effet, le stress augmente la température corporelle. Dans cette expérience, nous avons réalisé deux prises de température afin d'évaluer l'hyperthermie induite par un stress de manipulation (Figure 50). L'ANOVA à deux facteurs révèle un effet du temps ($F_{(1,9)}=85,02$,

$p < 0,001$), du génotype ($F_{(1,9)} = 7,434$, $p = 0,0234$) et de leur interaction ($F_{(1,9)} = 7,434$, $p = 0,234$). Ainsi, nous avons observé une augmentation de la température corporelle chez les souris shRNA-GFP (comparaison post-hoc de Sidak $p < 0,001$) et shRNA-Cx43 ($p = 0,002$) lors de la seconde prise comparée à la première. De manière intéressante, cette augmentation est moins importante chez les souris shRNA-Cx43 ($p = 0,002$), soulignant un effet « protecteur » de l'inactivation des Cx43 sur les effets du stress aiguë appliqué chez des animaux exposés à la CORT.

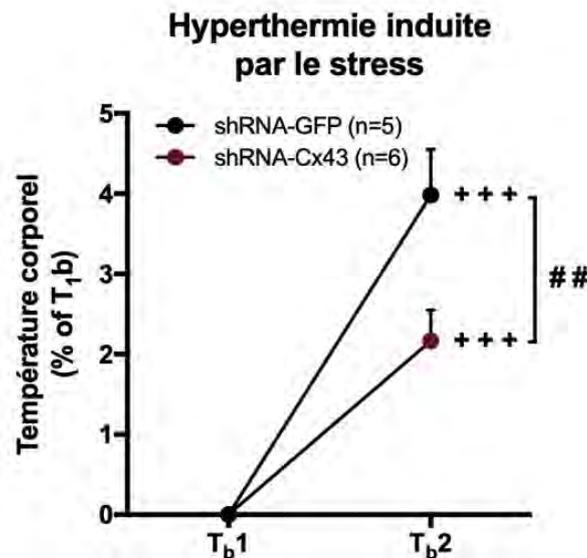


Figure 50 : Effet de l'inactivation intra-hippocampique des Cx43 sur l'hyperthermie dans un modèle de souris déprimées.

Deux prises de températures (T_{b1} et T_{b2}), espacées de 10 minutes ont été réalisées. La température T_{b2} est significativement plus importante que T_{b1} quel que soit le groupe (+++ , $p < 0,001$: statistiquement différent de T_{b1}). Cette augmentation est plus importante chez les souris shRNA-GFP que chez les souris shRNA-Cx43 (## , $p < 0,01$: statistiquement différent du groupe shRNA-GFP) ; Les résultats sont représentés en moyenne \pm S.E.M. du pourcentage de la température corporelle.

3. Effets comportementaux de l'inactivation des Cx43 hippocampiques dans le modèle CORT

3.1. Tests d'anxiété

Nous avons dans un premier temps réalisé un suivi de l'état du pelage (Figure 51A-B). Une dégradation progressive du pelage au cours des semaines d'exposition à la CORT a été observée. L'ANOVA à deux facteurs a permis de mettre en évidence un effet du temps ($F_{(10,120)} = 44,28$, $p < 0,001$), un effet du génotype ($F_{(1,12)} = 7,861$, $p = 0,0159$) mais pas de leur interaction ($F_{(10,120)} = 1,567$, $p = 0,2291$). Quel que soit le groupe, un effet significatif de la CORT est observable dès la première semaine de traitement ($p = 0,002$) et atteint un plateau à partir de la 10^e semaine.

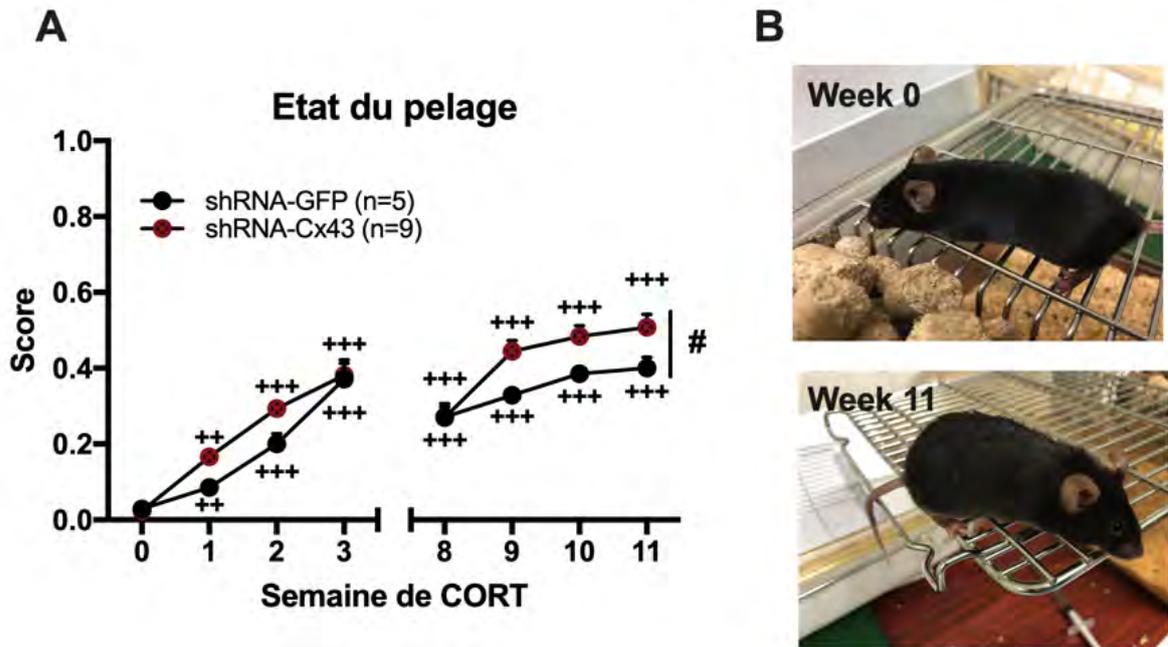


Figure 51 : Effet de l'inactivation intra-hippocampique des Cx43 sur l'état du pelage au cours de l'exposition à la CORT.

Le score de dégradation évolue et augmente progressivement au cours des semaines d'exposition à la CORT (A). À la première semaine, le pelage est bien entretenu et lisse alors qu'à onze semaines de traitement à la CORT, celui-ci commence à devenir mal entretenu et donc ébouriffé (B). Les résultats sont représentés en moyenne \pm SEM du score final obtenu sur huit parties du corps. ++ $p < 0,01$ et +++ $p < 0,001$: significativement différent de la semaine 0 quel que soit le groupe. # $p < 0,05$ significativement différent du groupe shRNA-GFP.

Dans le test d'OF (Figure 52A), aucune différence significative n'a été observée sur le temps passé dans le centre ($p = 0,658$). En revanche, dans le test de NSF (Figure 52B), la latence à aller se nourrir était significativement plus faible chez les souris shRNA-Cx43 en comparaison aux contrôles shRNA-GFP ($p = 0,001$). Dans ce dernier test la consommation dans la cage d'élevage était la même pour les deux groupes (données non présentées).

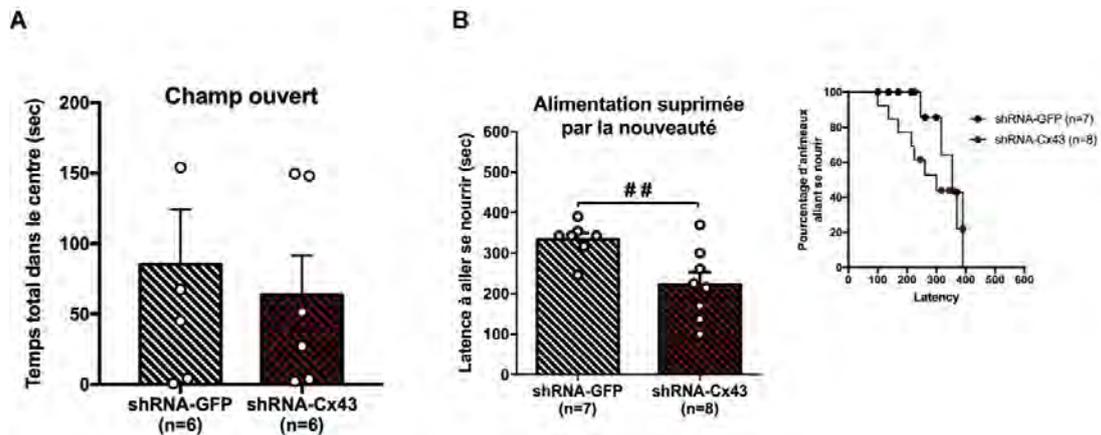


Figure 52 : Effet de l'inactivation intra-hippocampique des Cx43 sur hippocampiques sur l'anxiété dans un modèle de souris déprimées.

Dans le test d'OF, le temps passé dans la zone centrale n'est pas différent entre les deux groupes d'animaux. (A). En revanche, la latence à aller se nourrir mesurée dans le NSF, est significativement plus faible chez les animaux shRNA-Cx43 + CORT en comparaison à leur contrôle shRNA-GFP + CORT (B). Encart : courbe de survie de la latence à aller se nourrir. Les résultats sont représentés en moyenne \pm S.E.M. du temps passé dans le compartiment central et de la latence à aller se nourrir. Test t de Student : ## $p < 0,01$: significativement différent du groupe shRNA-GFP.

3.2. Tests de résignation

Dans TST et le FST, un effet de type antidépresseur a été observé suite à l'inactivation des Cx43 dans l'hippocampe (respectivement $p = 0,020$ et $p < 0,001$) (Figure 53A-B).

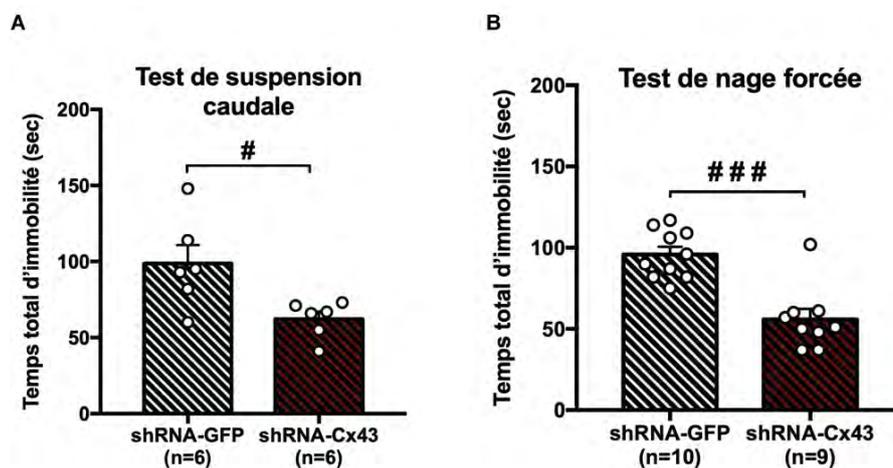


Figure 53 : Effet de l'inactivation intra-hippocampique des Cx43 sur le comportement de résignation dans un modèle de souris déprimées.

Le temps d'immobilité mesuré dans le test de suspension caudale (A) ou le test de nage forcée (B) est significativement réduit chez les animaux shRNA-Cx43. Les résultats sont représentés en moyenne \pm S.E.M. du temps total d'immobilité. Test-t de Student, # $p < 0,05$ et ### $p < 0,001$: significativement différent du groupe shRNA-GFP.

On sait aujourd'hui que la CORT et de manière plus générale le stress chronique, peut avoir des effets négatifs sur les performances mnésiques (Darcet et al 2014, David et al 2009, Mendez-David et al 2017b). Nous avons donc également déterminé l'impact de l'inactivation des Cx43 hippocampiques sur les performances mnésiques de souris soumises à un stress chronique.

3.3. Test de mémoire

Dans le test d'OR (Figure 54), le traitement chronique à la CORT induit une perte de reconnaissance du nouvel objet (ANOVA $F_{(2,21)}=7,994$, $p=0,0026$, test post-hoc de Sidak $p=0,0129$ shRNA-GFP + CORT en comparaison au groupe shRNA-GFP + VEH). Par ailleurs, nous avons remarqué que l'injection de shRNA-Cx43 ne prévient pas des effets délétères de la CORT puisque les animaux shRNA-Cx43 + CORT explorent de la même manière un nouvel objet et un objet connu, en comparaison au groupe shRNA-GFP + CORT. ($p=0,9765$).

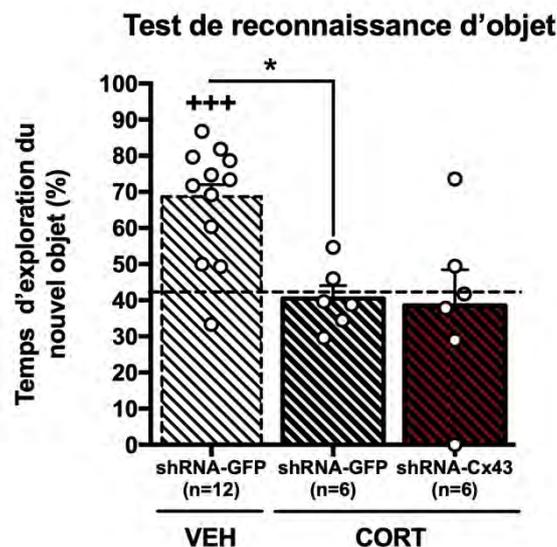


Figure 54 : Effet de l'inactivation intra-hippocampique des Cx43 sur la mémoire dans un modèle de souris déprimées.

Une exposition chronique à la CORT perturbe la mémoire alors que l'inactivation des Cx43 spécifiquement dans l'hippocampe ne permet pas de protéger contre ces effets négatifs. Les résultats sont représentés en moyenne \pm S.E.M. du pourcentage de temps d'exploration du nouvel objet. Test-t de Student, +++ $p<0,001$: significativement différent de la valeur chance fixée à 50%, * $p<0,05$: significativement différent du groupe shRNA-GFP/VEH.

L'ensemble de ces résultats comportementaux révèle un effet protecteur de l'inactivation hippocampique des Cx43 dans des paradigmes générant un niveau de stress élevé comme le test de NSF, le TST ou le FST. Cependant, cette inactivation ne permet pas de protéger face aux effets négatifs d'un traitement chronique à la CORT sur les performances

mnésiques. Ce dernier résultat n'est pas forcément aberrant puisque le test de reconnaissance d'objet n'est pas un test connu pour mobiliser l'hippocampe (pour revue [Cohen & Stackman 2015](#)). Il est possible que des effets du shRNA-Cx43 puissent être observés dans un paradigme de mémoire spatiale dépend de l'hippocampe.

Nous avons par la suite déterminé si cet effet protecteur pouvait être expliqué par des modifications de l'activité neuronale hippocampique. Comme précédemment, nous nous sommes intéressés à l'activité des systèmes sérotoninergique et glutamatergique.

4. Effet de l'inactivation des Cx43 hippocampiques sur l'activité des neurones 5-HT et Glut

Les $[5\text{-HT}]_{\text{ext}}$ basales mesurées dans l'hippocampe, étaient les mêmes entre les groupes shRNA-GFP et shRNA-Cx43 ($0,63 \pm 0,12$ vs. $0,91 \pm 0,31$ pg/15 μL , test-t de Student $p=0,585$). Concernant les cinétiques, l'ANOVA à deux facteurs n'a révélé aucun effet du génotype ($F_{(1,1)}=0,803$, $p=0,535$), du temps ($F_{(4,4)}=2$, $p=0,392$) ou de leur interaction ($F_{(4,4)}=1,392$, $p=0,448$, [Figure 55A](#)). De même, l'analyse des aires sous la courbe montre qu'après l'application d'un stress de nage forcée, les $[5\text{-HT}]_{\text{ext}}$ ne sont pas différentes entre les groupes (test-t de Student $p=0,935$).

Les $[\text{Glut}]_{\text{ext}}$ basales de glutamate étaient les mêmes entre les groupes shRNA-GFP et shRNA-Cx43 ($1,60 \pm 0,18$ vs. $1,40 \pm 0,10$ pg/15 μL , test-t de Student $p=0,385$). Concernant les cinétiques, aucun effet du génotype ($F_{(1,11)}=0,4125$, $p=0,534$), du temps ($F_{(4,44)}=2,343$, $p=0,070$) ou encore de leur interaction ($F_{(4,44)}=0,7484$ $p=0,564$; [Figure 55B](#)) n'a été révélé sur les $[\text{Glut}]_{\text{ext}}$. À l'instar de la 5-HT, l'analyse des aires sous la courbe après un stress de nage ne nous a pas permis de mettre en évidence des différences de $[\text{Glut}]_{\text{ext}}$ entre les groupes expérimentaux ($p=0,674$) en dépit d'une tendance à la baisse dans le groupe shRNA-Cx43.

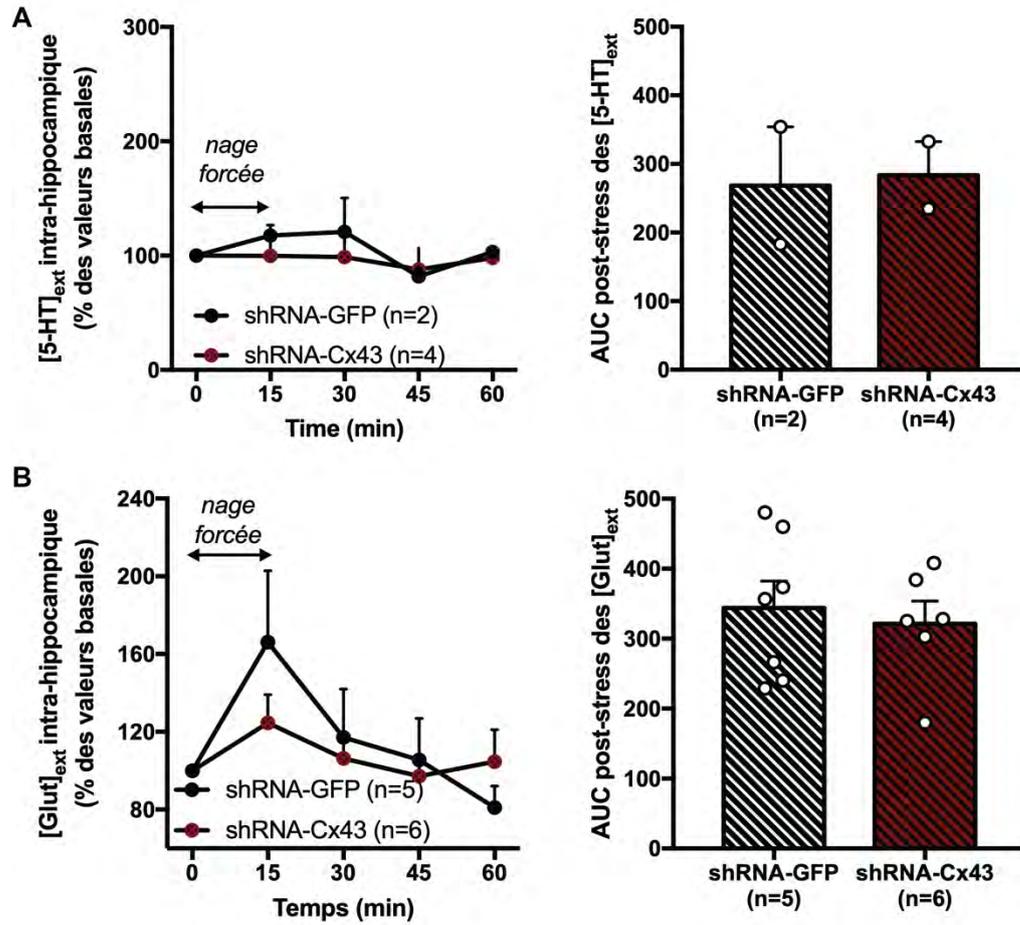


Figure 55 : Effet de l'inactivation intra-hippocampique des Cx43 sur les concentrations extracellulaires de 5-HT et de glutamate dans l'hippocampe dans un modèle de souris déprimées. Alors que les concentrations basales de 5-HT et de glutamate sont les mêmes entre les deux groupes, nous n'observons peu de variations dans des concentrations hippocampiques de 5-HT (A) et de glutamate (B) au cours du temps. Suite à l'application d'un stress de nage, ces concentrations restent stables. Les résultats sont représentés en moyenne \pm S.E.M du pourcentage des [5-HT]_{ext} et des [Glut]_{ext} basales.

Conclusion de l'étude 3

Un des résultats les plus remarquables rapporté dans cette étude est le fait que l'inactivation intra-hippocampique des Cx43 exerce des effets anxiolytiques/antidépresseurs dans le modèle CORT alors qu'en conditions physiologiques cette stratégie est dépourvue d'effets (voir [Chapitre 1](#) :). D'un point de vue mécanistique, une fois de plus il semble que le système sérotoninergique ne soit pas impliqué dans les effets comportementaux observés alors qu'une diminution du tonus glutamatergique pourrait expliquer une meilleure résilience au stress. Ceci a pu être mis en évidence à l'aide de la technique de microdialyse mais aussi au dosage plasmatique des taux de corticostérone en réponse à un stress aigu chez les souris exposées à la CORT. Nous souhaitons désormais approfondir la piste du rôle des HC formés par les Cx43 qui participent à la libération de molécules neuromodulatrices ([Ye et al 2003](#)). Nous anticipons que le stress favorise l'ouverture de ces HC participant ainsi à l'augmentation délétère des $[Glut]_{ext}$ dans l'hippocampe comme précédemment décrits ([Orellana et al 2015](#)). En présence de shRNA-Cx43, l'inhibition de ces HC pourrait donc représenter un processus favorable à l'obtention d'effets antidépresseurs. Dans ce contexte, nos prochains travaux auront pour objectifs de préciser les mécanismes reliant le tonus glutamatergique hippocampe modulé par les Cx43 et l'activité de l'hypothalamus qui contrôle la libération de CORT par les surrénales. En particulier, comme certaines voies glutamatergiques émanant de l'hippocampe régulent l'activité de l'hypothalamus via le noyau du lit de la strie terminale, nous envisageons de déterminer dans quelle mesure le blocage des Cx43 hippocampiques module cette aire cérébrale.

Chapitre 4 : Étude des effets comportementaux de l'inactivation des Cx43 en conditions pathologiques suite à l'injection chronique d'un antidépresseur : la venlafaxine

Dans l'étude 2, nous avons démontré que l'inactivation génétique des Cxs astrocytaires et plus particulièrement les Cx43, exercent un rôle important dans la réponse à un ISRS et notamment celle de la fluoxétine. Dans une perspective thérapeutique, nous avons également montré que l'inactivation pharmacologique systémique des Cxs par la CBX de manière aiguë (mais pas chronique : dix jours), reproduit ces résultats. Bien que ces données soient encourageantes, il est prématuré de généraliser cette conclusion, quant à l'effet bénéfique du blocage des Cxs, à l'ensemble des antidépresseurs et même aux antidépresseurs d'une même classe pharmacologique en raison de leurs effets distincts sur l'expression et les différentes fonctions JC et HC des Cxs (Jeanson et al 2017). De manière intéressante, aucune de ces stratégies génétiques ou pharmacologiques ne renforce les effets anxiogènes de la FLX (données non représentées). Ce résultat est important puisque différentes évidences expérimentales suggèrent que dans les premiers jours de traitement, les antidépresseurs sérotoninergiques favorisent l'anxiété s'opposant ainsi aux effets thérapeutiques sur les symptômes dépressifs et rallongeant leur délai d'action (Hamon 1994).

Profitant d'une collaboration avec l'équipe de médecins psychiatres du Dr Romain Colle et du Pr Emmanuelle Corruble (Hôpital du Kremlin-Bicetre, Paris), nous avons cherché à déterminer dans quelles mesures la modulation des Cxs astrocytaires pouvait impacter la réponse à un traitement prolongé aux antidépresseurs à la fois dans un modèle murin de dépression et chez des patients dépressifs.

Chez la souris, nous avons choisi le modèle CORT en raison de ses bons critères de validité notamment phénoménologique et prédictif (David et al 2009, Gourley et al 2008). Par ailleurs, pour se rapprocher au maximum de la cohorte humaine, nous avons pris le parti dans cette quatrième étude, de changer d'antidépresseur, en utilisant un Inhibiteur mixte de Recapture de la Sérotonine et de la Noradrénaline (IRSN), la venlafaxine (VENLA). Ciblant à la fois le transporteur à la sérotonine (SERT) et le transporteur de la noradrénaline (NET) à la dose utilisée dans ce travail (Bacq et al 2012), plusieurs semaines de traitement avec cet antidépresseur sont nécessaires avant d'exercer des effets bénéfiques chez la souris exposée à la CORT (Mendez-David et al 2017b) comme chez des patients dépressifs (Blier 2003).

Dans ce travail nous avons donc comparé les effets de la VENLA seule ou associée à la CBX chez des souris CORT. Grâce à un suivi longitudinal des animaux, nous avons pu évaluer le comportement des animaux en présence puis à l'arrêt des traitements (étude de la rechute) (Figure 56).

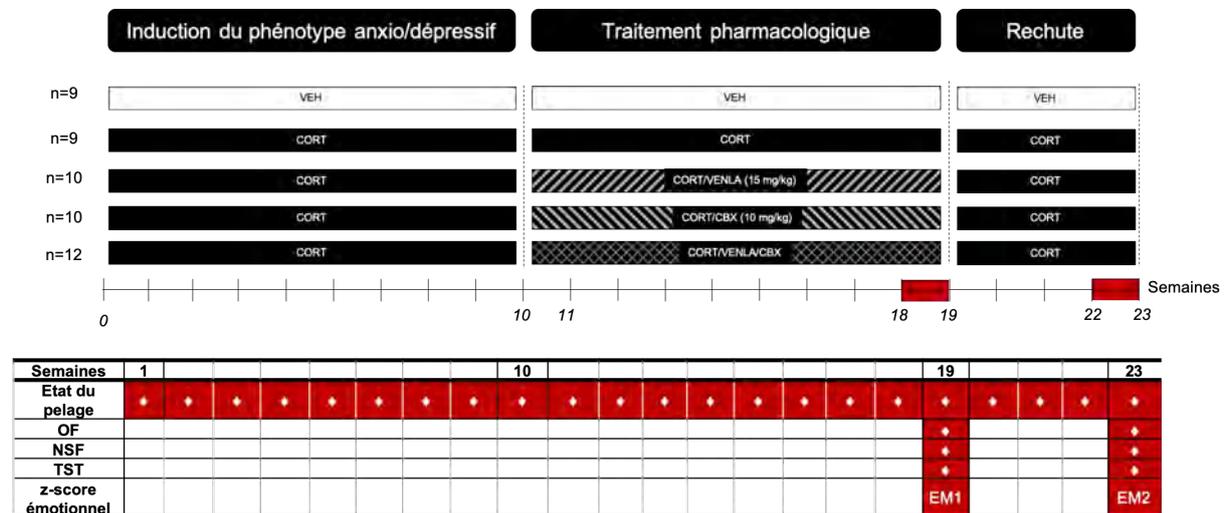


Figure 56 : Protocole expérimental.

L'induction du phénotype antidépresseur a été réalisée pendant dix semaines d'exposition à la CORT. La VENLA (15 mg/kg), la CBX (10 mg/kg) ou la combinaison de ces deux molécules ont été mis en présence de CORT pendant neuf semaines supplémentaires. À la 19^e semaine une évaluation globale du comportement anxio/dépressif des souris a été réalisée avant de stopper tous les traitements pharmacologiques (excepté la CORT). À la 23^e semaine une nouvelle évaluation globale du comportement a été réalisée sur les mêmes animaux : OF, TST, NSF. Deux scores de dépression ont pu être déterminés EM1 et EM2.

Ces travaux collaboratifs font l'objet d'une publication intitulée « *Altered astroglial connexins are associated with low antidepressant response and high relapse rates in major depression : a translational approach* » (Ait Tayeb, A. E. K. † ; Portal, B. † ; Colle, R. † ; El-Asmar, K. ; Mesdom, P. ; Lejards, C. ; Feve, B. ; Becquemont, L. ; Guiard B. P. † ; Verstuyft, C. † ; Corruble, E. †), soumise dans la revue *Science Translational Medicine*.

1. Induction du phénotype anxio/dépressif

Dix semaines de traitement chronique à la CORT ont été nécessaires dans nos conditions expérimentales pour induire les premiers signes d'un phénotype anxio/dépressif évalués à l'aide de la mesure de l'état du pelage. En effet, l'ANOVA à deux facteurs révèle un effet du traitement ($F_{(1,48)}=69,73$, $p<0,0001$), du temps ($F_{(10,480)}=63,35$, $p<0,001$) et de l'interaction entre ces deux facteurs ($F_{(10,480)}=25,41$, $p<0,001$). Les animaux traités à la CORT présentent une dégradation progressive de l'état du pelage qui devient significative

à partir de la 4^e semaine (test de Sidak $p < 0,001$) comparée aux animaux VEH et atteignant un plateau à la 10^e semaine (Figure 57 ; test-t de Student $p < 0,001$).

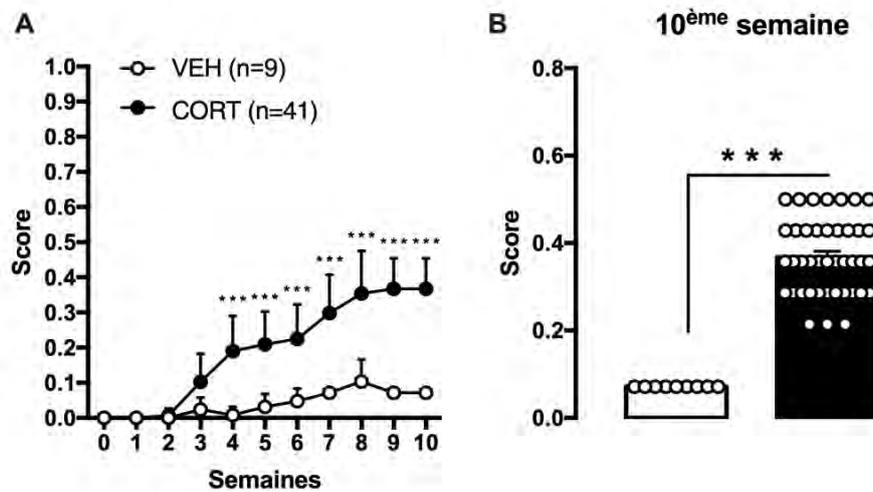


Figure 57 : Étude de l'évolution de l'état du pelage chez la souris après une exposition de dix semaines à la CORT.

La dégradation du pelage est de plus en plus importante à mesure que le traitement à la CORT (5 mg/kg/jour ; p.o.) se prolonge (A). Après dix semaines d'exposition, les souris exposées à la CORT présentent un score plus important que les souris ayant reçu le VEH (B). Les résultats sont représentés en moyenne \pm S.E.M du score attribué à l'état du pelage. *** $p < 0,001$: significativement différent du groupe VEH.

2. Étude de la réponse chronique à la VENLA

Il a été démontré qu'un traitement antidépresseur reversait les effets délétères de la CORT (David et al 2009). Pour renforcer le caractère « translationnel » de cette étude, nous avons choisi de traiter les animaux avec la venlafaxine (VENLA) (Bacq et al 2012, Redrobe et al 1998). Cet IRSN est l'antidépresseur le plus prescrit de la cohorte METADAP (également utilisé à dose mixte ciblant à la fois la recapture de la 5-HT et de la NA)

Afin d'évaluer le phénotype anxio/dépressif, nous avons réalisé une batterie de tests récapitulant différents symptômes de la DM et qui sont classiquement utilisés au laboratoire : le test d'open field (OF, Figure 58), le test d'alimentation supprimée par la nouveauté (NSF, Figure 59) et le test de suspension caudale (TST, Figure 60).

Dans le test d'OF, le nombre d'entrées ainsi que le temps passé dans le centre ont été utilisés comme paramètres reflétant le niveau d'anxiété. L'ANOVA n'a révélé aucune différence du facteur traitement sur le nombre d'entrées ($F_{(4,45)} = 1,605$, $p = 0,190$) mais une différence significative sur le temps passé dans le centre ($F_{(4,45)} = 6,070$, $p = 0,001$). Ainsi, les groupes CORT/VENLA et CORT/CBX montrent une augmentation du temps passé dans le centre ($p = 0,008$ et $p = 0,002$ respectivement) en comparaison au groupe exposé à la

CORT. La combinaison VENLA/CBX ne semble pas affecter ce paramètre ($p=1$). Il est également important de noter que quel que soit le traitement administré, l'activité locomotrice reste inchangée (ANOVA $F_{(4,45)}=1,749$, $p=0,156$).

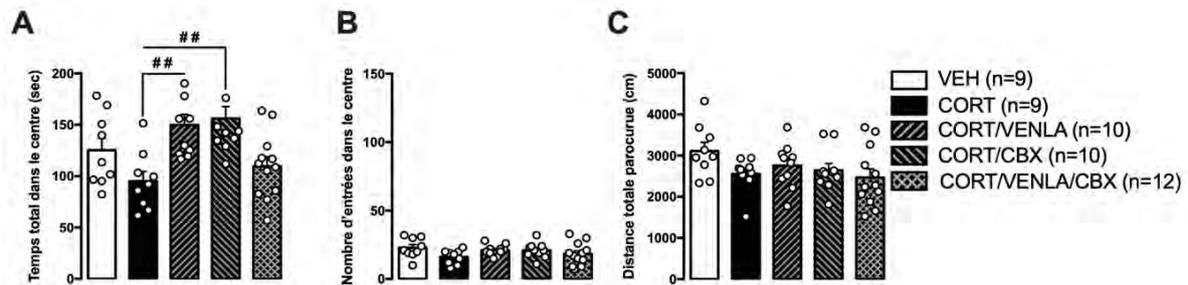


Figure 58 : Anxiété et activité locomotrice mesurées dans le test d'open field, dans un modèle de souris déprimées traitées à la venlafaxine et/ou la CBX.

Un traitement chronique à la venlafaxine (VENLA : 15 mg/kg ; p.o.) ou à la carbenoxolone (CBX : 10 mg/kg ; i.p.) exerce des effets anxiolytiques (A). Le nombre d'entrées dans le centre (B) et l'activité locomotrice (C) ne sont pas modifiés, quel que soit le traitement administré. Les résultats sont représentés en moyenne \pm S.E.M. du temps dans le centre, du nombre d'entrées dans cette zone et de la distance moyenne parcourue $###p<0,01$: significativement différent du groupe CORT/VEH.

Dans le NSF, la latence à aller se nourrir a été utilisée comme un autre marqueur du niveau d'anxiété des animaux. En raison d'un nombre trop important d'animaux n'allant pas se nourrir suite à l'exposition prolongée à la CORT, nous avons appliqué une version non conventionnelle de ce test en évaluant le temps passé dans la zone de nourriture ainsi que le nombre d'entrées dans cette zone. L'ANOVA n'a révélé aucun effet du facteur traitement sur le nombre d'entrée dans la zone de nourriture ($F_{(4,45)}=1,705$, $p=0,165$). En revanche, un effet significatif du facteur traitement a été mis en évidence sur le temps passé dans cette zone ($F_{(4,45)}=8,006$, $p<0,001$). Ainsi, une diminution significative du temps passé dans la zone a été observée chez les souris CORT/VEH ($p<0,001$), CORT/VENLA ($p=0,018$), CORT/CBX ($p=0,010$) et CORT/VENLA/CBX ($p<0,001$) en comparaison aux souris VEH.

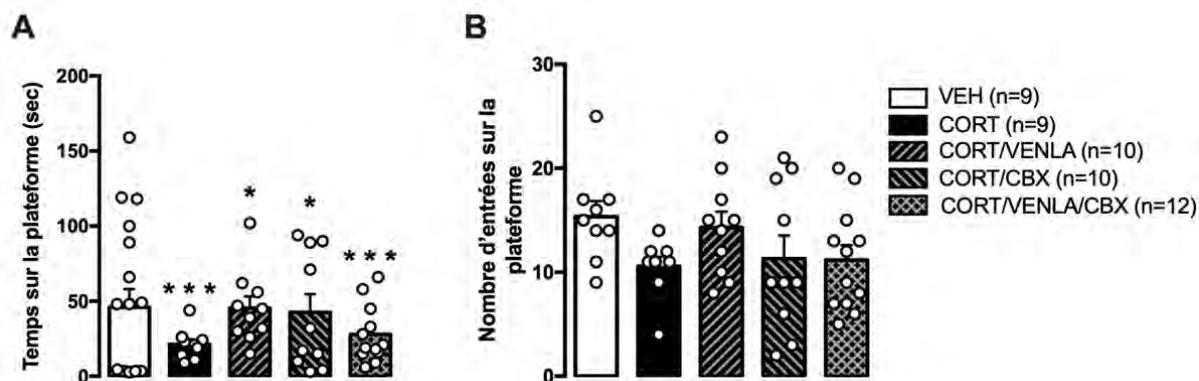


Figure 59 : Anxiété mesurée dans le test d'alimentation supprimée par la nouveauté dans un modèle de souris déprimées traitées à la venlafaxine et/ou la CBX.

Quel que soit le traitement administré, une diminution significative du temps passé dans la zone d'alimentation a été mise en évidence (A), alors que le nombre d'entrées dans cette zone n'est pas modifié (B). Les résultats sont représentés en moyenne \pm S.E.M. du temps passé dans la zone d'alimentation et du nombre d'entrées dans cette zone. * $p < 0,05$ et *** $p < 0,001$: significativement différent du groupe VEH.

Enfin dans le TST, la latence à la première immobilité ainsi que le temps total d'immobilité ont été utilisés comme marqueur de résignation. L'ANOVA souligne un effet du traitement à la fois dans la latence à la première immobilité ($F_{(4,45)}=3,141$, $p=0,023$) et sur le temps total d'immobilité ($F_{(4,45)}=5,331$, $p=0,001$). Les animaux CORT/VENLA présentent une plus grande latence ($p=0,014$) tandis que les groupes CORT/VENLA ($p < 0,001$) et CORT/CBX ($p=0,036$) montrent une diminution significative de l'immobilité totale en comparaison aux animaux CORT/VEH.

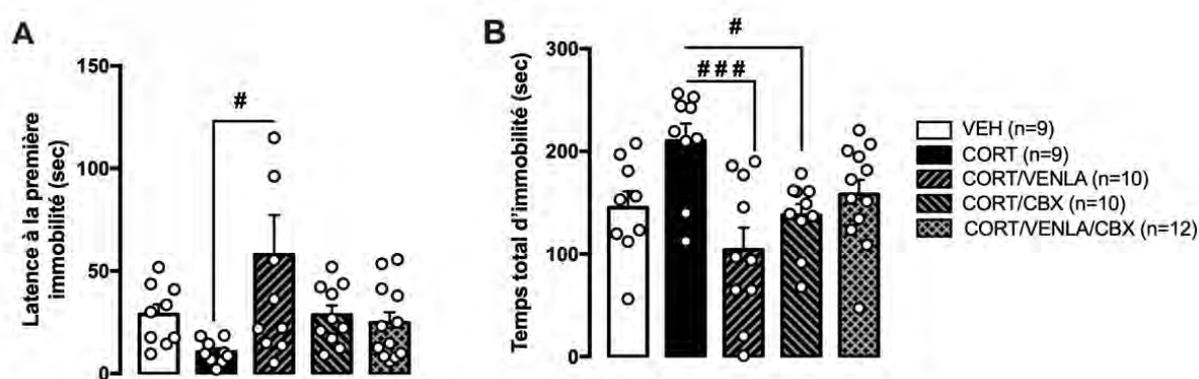


Figure 60 : Comportement de résignation mesuré dans le test de suspension caudale dans un modèle de souris déprimées traitées à la venlafaxine et/ou la CBX.

La latence à la première immobilité (A) est augmentée et le temps total d'immobilité (B) réduit chez les souris CORT/VENLA et CORT/CBX en comparaison aux souris CORT/VEH. Les résultats sont représentés en moyenne \pm S.E.M. de la latence à la première immobilité et au temps total d'immobilité. # $p < 0,05$ et ### $p < 0,005$: significativement différent du groupe CORT.

La DM étant définie comme un syndrome regroupant plusieurs symptômes comportementaux, l'utilisation d'un seul test ne peut expliquer à lui seul les effets d'une

molécule ou d'une stratégie thérapeutique sur le comportement (Söderlund & Lindskog 2018). Ainsi dans ce travail, l'ensemble de nos données ont été intégrées au sein d'un z-score émotionnel (Guilloux et al 2011a). Cela nous permet de nous rapprocher des méthodes de diagnostic utilisées en clinique pour lequel un score de sévérité de dépression est attribué à chaque patient (Figure 61). Brièvement, nous avons établi un z-score propre à chaque comportement et l'intégrer tous les z-scores de tous les tests comportementaux au sein d'un z-score émotionnel global.

L'ANOVA a révélé un effet significatif du traitement ($F_{(4,45)}=13,553$, $p<0,001$). Comme attendu, le groupe CORT/VEH présente une augmentation du z-score émotionnel ($p<0,001$) en comparaison au groupe VEH traduisant un phénotype pro-dépresseur consécutif à l'exposition prolongée à la CORT. De manière intéressante, un traitement chronique à la VENLA seule permet une diminution du z-score ($p<0,001$ en comparaison au groupe CORT/VEH). En revanche, si un traitement chronique à la CBX n'a pas eu d'effet seul comparé au groupe CORT/VEH ($p=0,276$), ce bloqueur des Cxs s'est opposé aux effets bénéfiques de la VENLA puisque la combinaison VENLA/CBX n'induit pas de modification significative du z-score comparé au groupe CORT/VEH ($p=0,8764$).

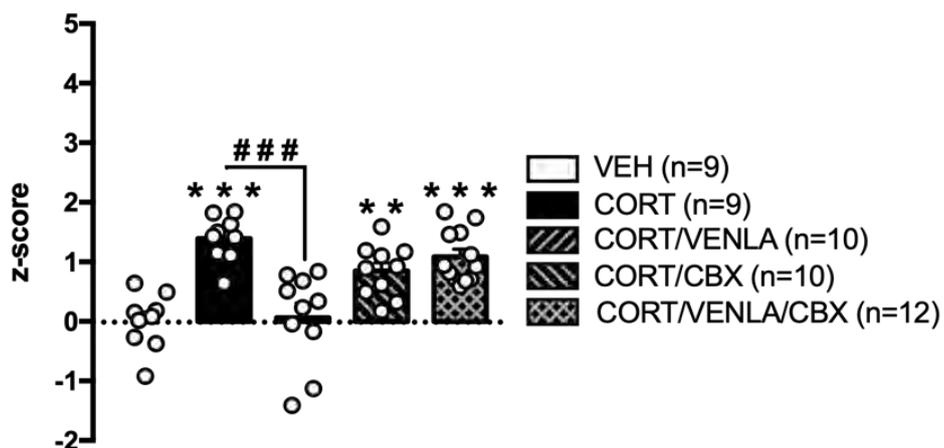


Figure 61 : Z-scores émotionnels dans un modèle de souris déprimées traitées à la venlafaxine et/ou la CBX.

Le z-score émotionnel a été calculé sur la base des performances individuelles mesurées dans l'OF, le NSF et le TST. Les souris ont été exposées à la CORT (CORT) seule ou en présence de venlafaxine (CORT/VENLA : 15 mg/kg/j ; p.o.), de CBX (CORT/CBX : 10 mg/kg ; i.p.) ou la combinaison VENLA/CBX (CORT/VENLA/CBX) pendant quatre semaines. Les résultats sont représentés en moyenne \pm S.E.M du z-score émotionnel calculé à la 18^e semaine (EM1). ** $p<0,01$ et *** $p<0,001$: significativement différent du groupe VEH. ### $p<0,001$: significativement différent du groupe CORT.

Ainsi, ces résultats permettent de conclure que la VENLA exerce des effets de type anxiolytiques/antidépresseurs qui sont prévenus par l'inactivation pharmacologique des Cxs astrocytaires.

3. Étude de la rechute

Après neuf semaines de traitement à la VENLA, CBX ou avec la combinaison VENLA/CBX, ces agents ont été arrêtés tout en continuant l'administration de CORT. Après quatre semaines d'arrêt, nous avons réalisé une nouvelle étude comportementale en utilisant les mêmes tests de manière à avoir un suivi longitudinal des z-scores avant et après le retrait des traitements pharmacologiques.

L'ANOVA pour le test d'OF (Figure 62) ne révèle aucune différence entre les groupes au niveau du nombre d'entrées dans le centre ($F_{(4,45)}=2,547$; $p=0,052$) et du temps passé dans cette zone ($F_{(4,45)}=0,472$; $p=0,756$). Notre analyse a toutefois révélé une différence significative dans la distance totale parcourue dans l'arène ($F_{(4,45)}=3,691$, $p=0,01$). Pourtant, aucune différence n'est à noter chez les animaux CORT ($p=1$), les animaux CORT/VENLA ($p=1$), les animaux CORT/CBX ($p=1$) ou les animaux CORT/VENLA/CBX ($p=0,698$) en comparaison aux animaux VEH. En revanche, les animaux CORT/VENLA/CBX parcourent une distance plus importante en comparaison aux animaux CORT ($p=0,009$).

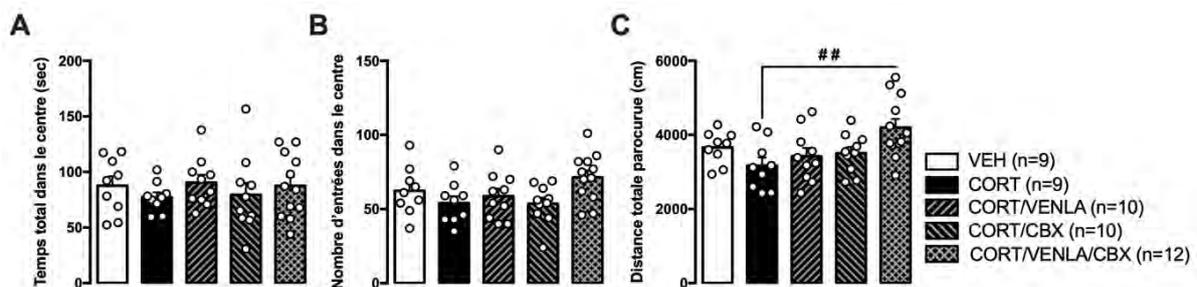


Figure 62 : Anxiété et activité locomotrice mesurées dans le test d'open field, dans un modèle de souris déprimées après arrêt des traitements à la venlafaxine et/ou la CBX.

Le temps passé dans le centre (A) et le nombre d'entrées dans cette zone (B) ne sont pas modifiés quel que soit le traitement. En revanche, les animaux CORT/VENLA/CBX parcourent une distance plus importante (C) en comparaison aux souris CORT/VEH. Les résultats sont représentés en moyenne \pm S.E.M. du temps passé dans le centre, du nombre d'entrées dans cette zone et la distance totale parcourue ## $p<0,01$: significativement différent du groupe CORT.

Pour le NSF, l'ANOVA a révélé une différence entre les différents groupes dans le nombre d'entrée dans la zone ($F_{(4,45)}=5,940$; $p=0,001$) tout comme dans le temps passé dans cette zone ($F_{(4,45)}=5,596$; $p=0,001$) (Figure 63). Une diminution significative a été observée pour ces deux paramètres chez les souris CORT ($p=0,001$ et $p=0,001$ respectivement), les souris CORT/VENLA ($p=0,013$ et $p=0,017$ respectivement), les souris CORT/CBX ($p=0,004$ et $p=0,003$ respectivement) et pour les souris CORT/VENLA/CBX ($p=0,006$ et $p=0,017$ respectivement).

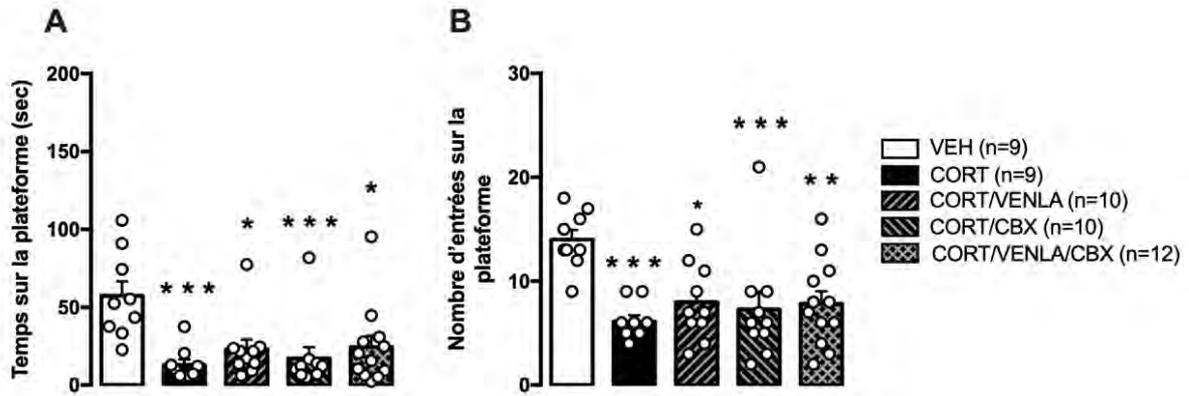


Figure 63 : Anxiété mesurée dans le test d'alimentation supprimée par la nouveauté dans un modèle de souris déprimées après arrêt des traitements à la venlafaxine et/ou la CBX.

Quel que soit le traitement administré, le nombre d'entrées dans la zone d'alimentation est significativement plus faible (A) tout comme le temps passé dans cette zone (B). Les résultats sont représentés en moyenne \pm S.E.M. du temps passé dans la zone d'alimentation et du nombre d'entrée dans cette zone. * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$ et *** $p < 0,001$: significativement différent du groupe VEH.

Enfin dans le TST, l'ANOVA ne montre aucune différence significative sur la latence à la première immobilité (one-way ANOVA $F_{(4,45)} = 0,824$; $p = 0,517$) ou le temps total d'immobilité ($F_{(4,45)} = 0,877$; $p = 0,485$) (Figure 64).

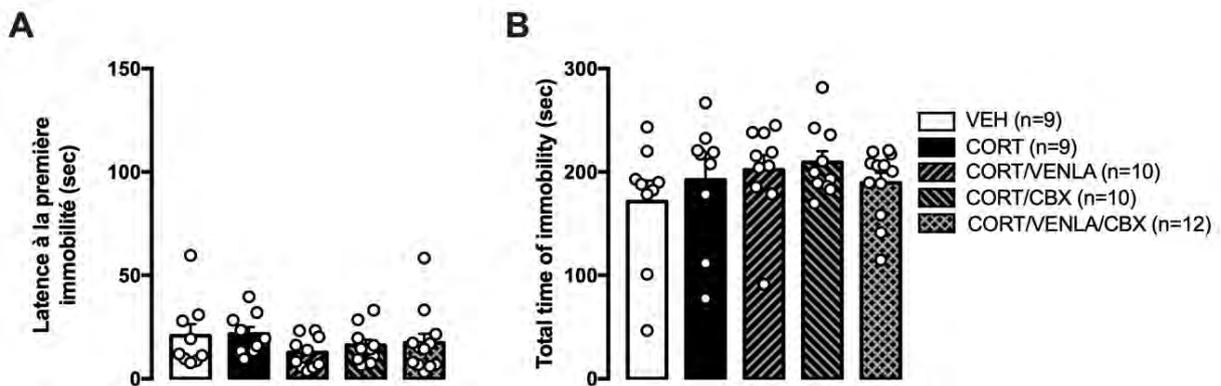


Figure 64 : Comportement de résignation mesuré dans le test de suspension caudale dans un modèle de souris déprimées après arrêt des traitements à la venlafaxine et/ou la CBX.

La latence à la première immobilité (A) ainsi que le temps total d'immobilité (B) sont inchangées quel que soit le groupe CORT, CORT/VENLA, CORT/CBX ou CORT/VENLA/CBX. Les résultats sont représentés en moyenne \pm S.E.M. de la latence à la première immobilité et du temps total d'immobilité.

Comme précédemment, ces résultats ont été intégrés au sein d'un z-score émotionnel (Figure 65). L'ANOVA révèle un effet significatif du traitement ($F_{(4,45)} = 35,768$, $p < 0,001$). Les souris CORT ($p < 0,001$) mais aussi CORT/VENLA ($p < 0,001$), CORT/CBX ($p < 0,001$) et CORT/VENLA/CBX ($p < 0,001$) présentent un z-score émotionnel plus élevé que celui mesuré dans le groupe VEH.

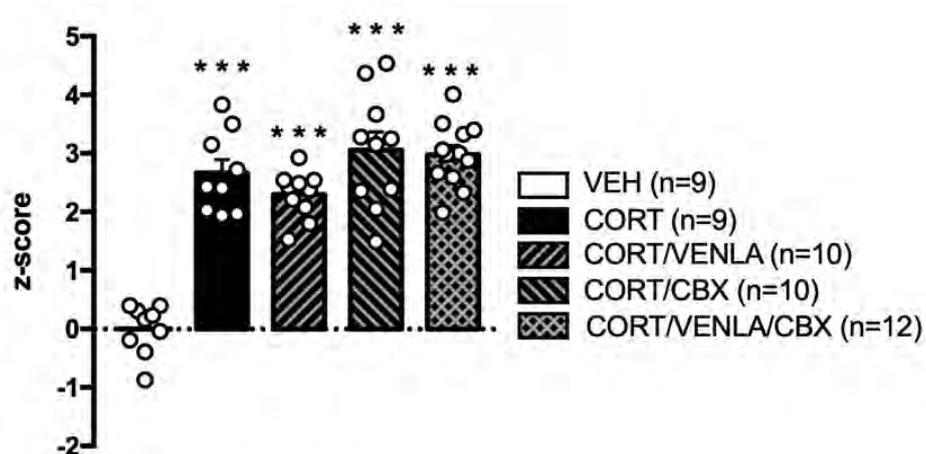


Figure 65 : Z-scores émotionnels dans un modèle de souris déprimées après arrêt des traitements à la venlafaxine et/ou la CBX.

L'exposition prolongée à la CORT induit une augmentation du z-score émotionnel calculé à la 23^e semaine (EM2) alors qu'un arrêt des traitements pharmacologiques restaure un fort état émotionnel. Les résultats sont représentés en moyenne \pm S.E.M. du z-score émotionnel calculé à la 23^e semaine. *** $p < 0,001$: significativement différent du groupe VEH.

Un tel protocole a rendu possible l'étude de l'évolution des performances individuelles avant (EM1) et après (EM2) l'arrêt des traitements pharmacologiques (**Figure 66**).

Notre étude permet de mettre en évidence une augmentation significative du z-score émotionnel EM2 en comparaison au z-score EM1 dans le groupe CORT. Ce résultat démontre un effet dépendant du temps de l'exposition à la CORT sur le phénotype anxio/dépressif. Nous avons alors fixé une valeur seuil correspondant à la moyenne du z-score émotionnel du groupe CORT (EM2 = 2,6) pour définir le niveau d'état pathologique. Ainsi, les animaux des groupes CORT/VENLA et CORT/VENLA/CBX présentant un z-score émotionnel supérieur ou égal à 2,6 ont été considérés en rechute. Un effet significatif des traitements a été mis en évidence (ANOVA $F_{(2,20)}=5,857$, $p=0,010$). En effet, 1 (10% ; $p=1$) et 9 (75% ; $p=0,007$) animaux ont rechuté après quatre semaines d'arrêt respectivement de la VENLA ou de la combinaison VENLA/CBX.

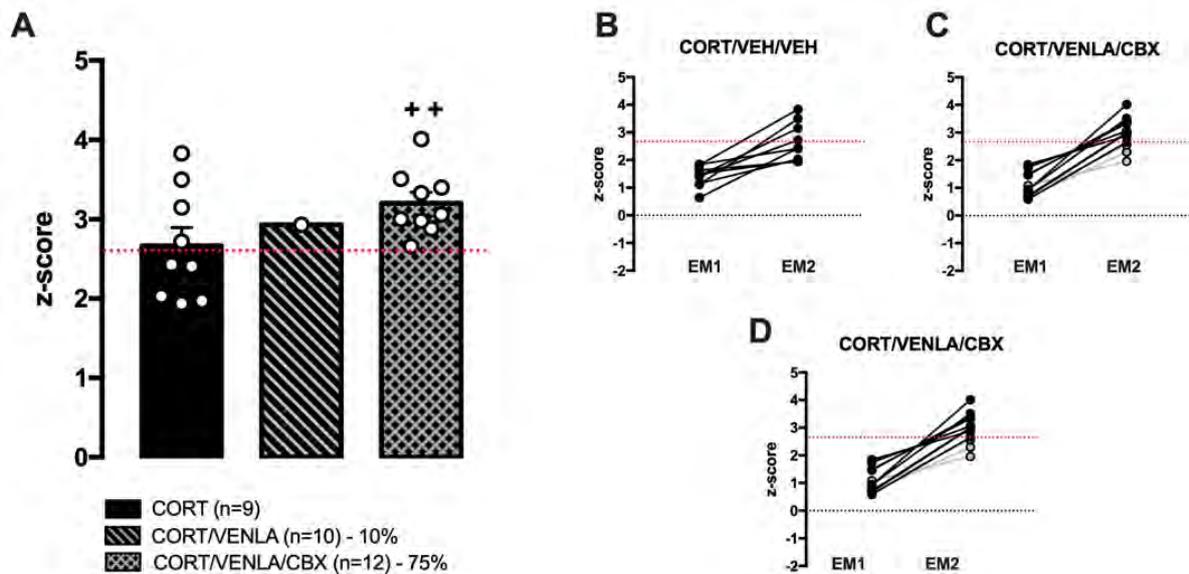


Figure 66 : Taux de rechute dans un modèle de souris déprimées après arrêt des traitements à la venlafaxine et/ou la CBX.

Un traitement chronique à la CORT a été utilisé pour déterminer une valeur pathologique du z-score émotionnel (i.e. 2,6). Pour les groupes CORT/VENLA et CORT/VENLA/CBX, les points blancs représentent les valeurs individuelles supérieures ou égales à cette valeur, ces animaux sont considérés en rechute totale. Les résultats sont représentés en moyenne \pm S.E.M du z-score émotionnel à la 23^e semaine (A) $++p < 0,01$: significativement différent de 2,6. L'évolution individuelle des z-scores émotionnels entre la 18^e semaine (EM1) et la 23^e semaine (EM2) est représentée dans les groupes CORT/VEH (B), CORT/VENLA (C) et CORT/VENLA/CBX (D).

Nos résultats suggèrent fortement que le blocage pharmacologique prolongé des Cxs astrocytaires favorise le taux de rechute observé chez des animaux traités à la VENLA.

Pour vérifier la pertinence de ces données précliniques chez l'Homme, nous avons commencé une collaboration avec l'équipe du Pr Emmanuelle Corruble, chef du service de psychiatrie de l'hôpital du Kremlin-Bicêtre (94). À partir d'une cohorte de patients dépressifs (cohorte METADAP) (Corruble et al 2015), cette équipe a identifié plusieurs polymorphismes dans les gènes codant les Cx30 et Cx43. De manière intéressante les porteurs d'un ou plusieurs de ces variants génétiques présentent une moins bonne réponse aux antidépresseurs après trois et six mois de traitements. Par ailleurs, ces variants sont associés à un taux de rechute significativement plus élevé que chez des patients dépressifs ne portant aucuns variants. Ces résultats cliniques peuvent être consultés dans la partie clinique de l'article « *Altered astroglial connexins are associated with low antidepressant response and high relapse rates in major depression : a translational approach* ».

Conclusion de l'étude 4

Ces expériences suggèrent que le blocage pharmacologique chronique des Cx43 par la CBX s'oppose à l'efficacité thérapeutique d'un traitement prolongé à la venlafaxine dans un modèle animal de dépression. Ils contrastent avec ceux de l'étude précédente montrant que chez des souris naïves non-déprimées, l'administration unique (mais pas chronique) de CBX potentialise les effets de type antidépresseurs de la fluoxétine. De nouvelles investigations sont donc nécessaires afin de comprendre les différences de résultats entre ces deux études utilisant la CBX. Plusieurs hypothèses peuvent être formulées concernant notamment les conditions expérimentales. Il est possible que la durée du blocage des Cxs astrocytaires par la CBX ou son utilisation préventive/curative soient des facteurs déterminants dans la nature des effets de cet agent sur l'efficacité des antidépresseurs. Le modèle de souris (naïves vs déprimées) est un autre paramètre qui pourrait influencer la nature des effets de la CBX puisque différentes études soulignent le fait que l'expression des Cxs est régulée par le stress chronique. Enfin, la classe d'antidépresseurs (ISRS vs IRSN) qui est associée à la CBX pourrait également entrer en ligne de compte. Toutes ces hypothèses devront être vérifiées avant de proposer une nouvelle stratégie thérapeutique antidépressive visant à moduler simultanément la neurotransmission monoaminergique et l'activité des astrocytes via les Cxs. Pour commencer à apporter des éléments de réponse, nous avons exploré dans le dernier chapitre de cette thèse, les effets comportementaux et neurochimiques de l'inactivation des Cx43 dans le modèle CORT.

ARTICLE 3

Altered astroglial connexins are associated with low antidepressant response and high relapse rates in major depression: a translational approach.

Ait Tayeb, A. E. K. [†] ; Portal, B. [†] ; Colle, R. [†] ; El-Asmar, K. ; Mesdom, P. ; Lejards, C. ; Feve, B. ; Becquemont, L. ; Guiard B. P. [‡] ; Verstuyft, C. [‡] ; Corruble, E. [‡]

[†] : Ces auteurs ont contribué de manières égales à cette étude

[‡] : Ces auteurs ont contribué de manières égales à cette étude

Soumis – Science Translational Medicine

Résumé :

La dépression majeure est la seconde cause de mortalité dans le monde. Néanmoins, après un traitement antidépresseur, le taux de réponse et rémission est faible, associé à un taux de rechute important.

Des études récentes suggèrent que les connexines 30 (Cx30) et connexines 43 (Cx43) astrocytaires seraient impliquées dans la dépression majeure. Cependant, leur rôle dans le mécanisme d'action des antidépresseurs reste méconnu.

Dans cette étude, nous explorons pour la première fois le rôle des connexines astrocytaires dans la réponse aux antidépresseurs dans un modèle murin de dépression, le modèle CORT. Les animaux ont été traités de façon chronique à la carbenoxolone (CBX), un inhibiteur pharmacologique des connexines, à la venlafaxine, un inhibiteur mixte de la recapture de sérotonine et de noradrénaline ou la combinaison de ces deux molécules. Nos résultats montrent qu'un traitement à la CBX seul ne reverse pas les effets délétères d'un traitement chronique à la CORT. En revanche, la CBX s'oppose aux effets thérapeutiques de la venlafaxine et augmente le taux de rechute après l'arrêt du traitement antidépresseur.

L'association de variants génétiques pour les Cx30 et Cx43, identifiés par séquençage d'exomes, et la réponse aux antidépresseurs a été étudiée chez 252 patients déprimés et traités. Nos résultats montrent que 11,9% des patients présentant des variants ultra-rares pour les Cx30 et Cx43, ont un taux de rémission plus faible et un taux de rechute plus important en comparaison à des patients ayant des variants déjà connus.

À notre connaissance, aucune étude précédente étudie la rechute chez l'animal, nous proposons ici le premier modèle murin de rechute. Cette étude translationnelle montre pour la première fois la relation entre les connexines astrocytaires et l'efficacité d'un traitement antidépresseur, la rémission et la rechute. Nous proposons enfin que les

connexines astrocytaires constituent une cible thérapeutique potentielle pour le traitement de la dépression majeure.

Contribution personnelle :

Au cours de ce travail

- J'ai assuré le suivi des animaux incluant la préparation et l'administration des différents composés pharmacologiques
- J'ai réalisé l'ensemble des tests comportementaux chez la souris

DISCUSSION

La partie bibliographique de ce mémoire de thèse met en avant plusieurs faisceaux d'arguments aussi bien cliniques (Nagy et al 2017) que précliniques (Banasr et al 2010) laissant entrevoir des dysfonctionnements astrocytaires dans la dépression majeure (DM). L'objectif de ce travail a été d'évaluer le rôle de protéines membranaires astrocytaires dans cette pathologie : les connexines (Cxs). Ces protéines sont connues pour s'organiser en deux entités fonctionnelles : les jonctions communicantes (JC) qui assurent un lien physique entre deux astrocytes voisins pour la diffusion de petites molécules endogènes (IP₃, Ca²⁺, glutamate, acides nucléiques, glucose) et les hémicanaux (HC) qui participent à la libération de substances neuroactives (Glutamate, D-Serine...). L'intérêt des Cxs dans la DM est récent et a été stimulé par quelques études souvent citées dans la littérature. Elles suggèrent d'une part que la fonction JC serait diminuée dans la DM (Sun et al 2012) alors que la fonction HC serait, quant à elle, augmentée (Orellana et al 2015). Afin de mieux comprendre le rôle et les mécanismes d'action des Cxs dans la physiopathologie de la dépression mais aussi dans la réponse aux traitements antidépresseurs, nous avons mis en place un programme de recherche ambitieux reposant sur la mise en œuvre d'une approche pluridisciplinaire, basée sur le dialogue entre spécialistes de différentes disciplines (psychiatrie clinique, neuropharmacologie expérimentale, neurobiologie, neurosciences comportementales) et intégrant des méthodologies issues de différents champs de recherche tels que les neurosciences fondamentales et appliquées, et la psychiatrie clinique.

De nombreuses études viennent étayer l'hypothèse monoaminergique de la DM et proposent que ce trouble de l'humeur résulte d'une diminution de la neurotransmission sérotoninergique, noradrénergique et/ou dopaminergique dans différentes aires cérébrales et notamment dans l'hippocampe (Stahl 2013). La présence de récepteurs aux monoamines mais également de leurs transporteurs à la surface des astrocytes a été un des arguments forts en faveur du rôle de ces cellules gliales dans la régulation de la neurotransmission monoaminergique. Plus récemment, l'identification des Cxs comme des régulateurs de la neurotransmission permet d'envisager un rôle de ces protéines dans la modulation du tonus monoaminergique du SNC. Pourtant, une étude princeps dans ce domaine montre que les concentrations tissulaires de sérotonine, de dopamine ou de leurs métabolites dans différentes aires cérébrales (hippocampe mais aussi striatum, cortex frontal ou amygdale) ne sont pas modifiées chez des souris KO privées des Cx30 (Dere et al 2003). Ces résultats ne présagent pas d'éventuelles modifications des concentrations extracellulaires des monoamines mais ceci n'a jamais été exploré. De même l'impact de l'inactivation des Cx43 n'a jamais été évalué sur les systèmes monoaminergiques. À la lumière des connaissances très limitées sur les liens entre les Cxs astrocytaires et les

monoamines, ces travaux de thèse ont donc été articulés autour de quatre grandes questions :

- 1) Quel est le rôle des Cx43 sur les comportements d'anxiété et de dépression mais aussi sur les circuits neuronaux associés chez des souris naïves ?

En utilisant différentes méthodes d'inactivation génétique et pharmacologique des Cx43 et plus particulièrement des Cx43, nous avons mis en évidence que l'inactivation de ces protéines, et plus particulièrement de leur fonction hémicanal dans l'hippocampe, induit un comportement de type antidépresseur, associé à une diminution locale du tonus glutamatergique.

- 2) Quel est le rôle des Cx43 sur la réponse aiguë aux antidépresseurs chez des souris naïves ?

Chez la souris naïve, non déprimée, nous avons montré que l'inactivation génétique des Cx43 hippocampiques et ainsi que leur blocage pharmacologique par la CBX potentialise la réponse à la fluoxétine (ISRS) évaluée dans le TST.

- 3) Quel est le rôle des Cx43 sur les comportements d'anxiété et de dépression mais aussi sur les circuits neuronaux associés en conditions pathologiques ?

Chez la souris rendue déprimée suite à l'exposition chronique à la corticostérone (CORT), nous apportons des preuves expérimentales suggérant que l'inactivation des Cx43 hippocampiques protège des effets délétères de ce modèle de stress dans plusieurs paradigmes comportementaux mais également sur certains marqueurs biologiques d'activation de l'axe HPA ainsi que sur le tonus glutamatergique hippocampique.

- 4) Quel est le rôle des Cx43 dans la réponse chronique aux antidépresseurs en conditions pathologiques ?

Chez la souris CORT, nous avons montré que l'inactivation pharmacologique des Cxs par la CBX s'oppose à la réponse à la venlafaxine (IRSN) et augmente le taux de rechute. Ces résultats précliniques ont été complétés par une étude clinique réalisée en collaboration avec l'équipe de psychiatres du Pr E. Corruble. Ainsi, il semble que des patients dépressifs porteurs de variants génétiques des Cx30/43 sont plus aptes à rechuter que des patients ne présentant pas de mutations sur les gènes *GJA1* et *GJB6* correspondants.

L'ensemble de ces résultats, pouvant parfois paraître contradictoires, sont discutés dans cette dernière partie de thèse. Enfin, dans un chapitre de perspectives, nous avons réfléchi aux travaux qui pourraient être mis en place pour renforcer nos résultats sur les liens entre les Cxs astrocytaires, la DM et la réponse aux antidépresseurs.

Les Cx43 étant les Cxs astrocytaires les plus fortement exprimées dans le cerveau, nous avons choisi de nous focaliser sur cette isoforme. Ces travaux s'inscrivent dans la continuité d'un premier travail de recherche nous ayant amenés à dévoiler un effet de type antidépresseur chez des souris mutantes présentant une perte partielle des Cx43 (souris Cx43 KD) dans l'organisme (Quesseveur, Portal et al 2015) ([Article 1](#)) mais sans apporter d'éléments mécanistiques.

Afin d'aller plus loin dans la compréhension des mécanismes neurobiologiques sous-jacents, nous avons mesuré les concentrations extracellulaires de sérotonine dans l'hippocampe de souris. Nous n'avons pas mis en évidence de différence entre les souris contrôles sauvages et les souris Cx43 KD suggérant qu'une augmentation de la neurotransmission sérotoninergique ne serait pas un élément clé dans les effets comportementaux observés. En accord avec ce résultat, l'inhibition de synthèse de la sérotonine par la PCPA ne s'oppose pas au comportement de type antidépresseur des souris Cx43 KD. Il était donc vraisemblable que les effets observés reposent sur un mécanisme original. Nous nous sommes alors intéressés à la neurotransmission glutamatergique et nous avons montré que lors d'un stress aigu, les taux extracellulaires de cet acide aminé excitateur étaient augmentés chez les souris sauvages mais pas les souris Cx43 KD. Une telle augmentation de glutamate en réponse à un stress a déjà été décrite dans la littérature. En effet, une libération de glutamate dans l'hippocampe a été observée à l'aide de la technique de microdialyse, trente minutes après un stress aigu (Itoh et al 1993, Moghaddam 1993). De manière intéressante cet effet neurochimique dans l'hippocampe coïncide avec le pic plasmatique de corticostérone (Abrahám et al 1993). Plusieurs hypothèses peuvent être avancées pour tenter d'expliquer l'absence d'effet du stress et d'augmentation des taux extracellulaires de glutamate chez les souris Cx43 KD. En particulier, une sur-stimulation du processus de recapture favorisant sa clairance à l'intérieur de la fente synaptique serait compatible avec les effets obtenus. En accord avec cette hypothèse, il a été montré que la diminution d'expression des Cx43 est associée à une augmentation de l'expression du transporteur GLT-1 (Li et al 2015b). De manière intéressante, il a été montré qu'un traitement chronique à la fluoxétine produit ce même type de réponse sur GLT-1 (Zink et al 2010). Un déficit du processus de libération est un autre mécanisme qui pourrait contribuer aux effets observés. Chez le rat, le stress aigu ou chronique augmente la libération de glutamate via les HC formés des Cx43 (Orellana et al 2015), ce qui entrainerait des effets neurotoxiques (Stout et al 2002, Ye et al 2003) très bien décrits dans l'hippocampe (Abudara et al 2015) et responsables d'effets pro-dépresseurs. Afin de vérifier cette possibilité, nous avons injecté dans l'hippocampe de souris sauvages un bloqueur des HC, le peptide mimétique Gap26. Un des résultats les plus intéressants de ce travail de thèse est l'effet de type antidépresseur du Gap26 dans

le test nage forcée associée à une diminution des concentrations extracellulaires de glutamate dans l'hippocampe. Ces résultats renvoient aux études qui montrent une augmentation des concentrations de glutamate dans le plasma, le liquide céphalo-rachidien et le cerveau de patients déprimés (Sanacora et al 2008). Ils renvoient aussi aux propriétés de la kétamine, un antagoniste des récepteurs NMDA, dont les puissants effets antidépresseurs ont été découverts récemment (Duman 2018). Afin d'aller plus loin dans la description des mécanismes glutamatergiques, nous avons testé les effets du Gap26 en présence d'antagonistes des récepteurs NMDA (kétamine) ou AMPA (NBQX). Nos résultats comportementaux montrent que la combinaison du Gap26 et de la kétamine exerce des effets de type antidépresseurs plus marqués que ceux du Gap26 seul. Cet effet additif pour s'expliquer par deux mécanismes convergeant vers une atténuation de l'activation des récepteurs NMDA. Au contraire, chez les souris ayant reçu une co-administration de Gap26 avec le NBQX, les effets bénéfiques du blocage des HC se sont avérés moins prononcés. À ce jour, il est difficile d'avoir une idée précise des processus cellulaires et moléculaires des effets du Gap26 mais ils confirment l'importance de la neurotransmission glutamatergique hippocampique avec des effets opposés des récepteurs NMDA et AMPA sur la régulation du comportement de résignation. Quelques travaux ont mis en évidence le fait que la kétamine était capable d'augmenter les taux extracellulaires de glutamate (Moghaddam et al 1997). Ainsi en bloquant les récepteurs NMDA tout en augmentant les taux de glutamate, la probabilité d'activation des récepteurs AMPA est fortement augmentée (Aleksandrova et al 2017), ce qui pourrait être une condition favorable à l'obtention d'un effet antidépresseur. D'ailleurs, un espoir récent sur le développement de nouveaux antidépresseurs est porté sur des agonistes des récepteurs AMPA : les ampakines (Alt et al 2006).

Connexines astrocytaires et réponse aux antidépresseurs

Suite à ces observations, nous nous sommes demandé si l'inactivation des Cx43 pouvait modifier les effets de la fluoxétine chez la souris naïve non-stressée (Article 2). À l'aide de la technique de microdialyse intracérébrale et en accord avec des études précédentes (Malagié et al 2002, Zemdegs et al 2019), nous montrons que la fluoxétine augmente les concentrations extracellulaires de sérotonine dans l'hippocampe. Or l'augmentation induite par cet ISRS est plus importante chez les souris présentant une inactivation génétique constitutive des Cxs. Cet effet contraste avec l'absence de modification du tonus sérotoninergique chez les souris Cx43 KD et suggère donc que les Cxs seraient spécifiquement recrutées suite à l'injection des ISRS. Il est important de noter que cet effet potentialisateur du blocage génétique des Cx43 a été retrouvé suite à l'injection bilatérale du shRNA-Cx43 dans l'hippocampe. Un des mécanismes possibles pour tenter d'expliquer cet effet potentialisateur serait une densité plus importante de transporteurs à

la sérotonine chez les animaux privés de Cx43 (de manière constitutive ou spécifique dans l'hippocampe). En effet, il a été montré dans le passé qu'une augmentation de l'expression du transporteur SERT de la sérotonine chez l'Homme favorise la réponse aux ISRS alors que la délétion de ce transporteur est associée à une moins bonne réponse thérapeutique (Basu et al 2015, Serretti et al 2006, Zhu et al 2017). En accord avec ces données cliniques, l'effet de type antidépresseur des ISRS est absent chez la souris SERT^{-/-} mais pas chez les souris sauvages SERT^{+/+} ou hétérozygotes SERT^{+/-} (Mitchell et al 2016). Nous avons signalé plus haut que les astrocytes expriment à leur surface le transporteur SERT (Quesseveur et al 2013b), ce qui pourrait laisser envisager un lien entre les Cx43 et cet élément de régulation de la neurotransmission sérotoninergique directement au sein des cellules gliales. Cette hypothèse peut néanmoins être écartée pour plusieurs raisons. D'une part, les concentrations extracellulaires basales de sérotonine sont similaires entre les souris contrôles WT et Cx43 KD ou les souris shRNA-GFP et shRNA-Cx43 alors qu'une plus forte expression du SERT devrait affecter significativement ce paramètre. D'autre part, des données obtenues au laboratoire (*non présentées*) montrent que la perfusion d'escitalopram à travers la sonde de microdialyse par « reverse dialyse » induit la même augmentation des concentrations extracellulaires de sérotonine chez des souris sauvages et les souris présentant une inactivation génétique des Cx43.

Une autre possibilité serait une modification de l'expression et/ou de la sensibilité des autorécepteurs inhibiteurs 5-HT_{1A} dont le rôle dans la réponse aux ISRS est crucial (Richardson-Jones et al 2010). Ces mécanismes peuvent néanmoins être également exclus puisqu'une désensibilisation des autorécepteurs 5-HT_{1A} connus pour favoriser la réponse neurochimique de la fluoxétine aurait également eu des effets sur les propriétés électrophysiologiques de cet ISRS. Or, nos résultats montrent que l'inhibition de la décharge électrique des neurones sérotoninergiques en réponse à la fluoxétine est la même entre les souris sauvages et Cx43 KD.

Dans une perspective thérapeutique, nous avons cherché à étudier l'effet du blocage pharmacologique des Cxs par la carbénoxolone (CBX) sur la réponse à la fluoxétine. Comme décrit précédemment cet agent ne permet pas de dissocier les Cx30 des Cx43 ou la fonction JC de la fonction HC. Toutefois, en accord avec notre étude chez les souris Cx43 KD ou sauvages injectées avec un shRNA-Cx43 dans l'hippocampe, une potentialisation des effets de la fluoxétine après traitement à la CBX a été observée au cours de ce travail de thèse. Ces résultats font écho à des travaux récents qui montrent que l'injection intracérébrale d'INI-0602, un autre inhibiteur pharmacologique non sélectif des Cxs (Takeuchi et al 2011), atténue les comportements anxio/dépressifs dans un modèle de douleur neuropathique (Zhang et al 2019). En effet, alors que la section du nerf sciatique induit une anhédonie et un état de résignation prononcé dans le TST et le FST, l'injection d'INI-0602 corrige ces comportements. Cependant, nos données contrastent avec des

études précédentes qui rapportent que la CBX (Sun et al 2012) ou la méfloquine (Ni et al 2018) induisent, au contraire, un comportement anxio/dépressif. De manières intéressantes, nous avons observé que l'administration chronique de CBX ne potentialise pas les effets de la fluoxétine, contrairement à son administration aiguë. Il a été montré *in vitro* que ce bloqueur des Cxs diminue l'activité des neurones de l'hippocampe via des mécanismes indépendants du blocage des Cxs astrocytaires (Rouach et al 2003). Par exemple, la CBX diminue le processus de LTP dans l'hippocampe en bloquant l'activité des récepteurs NMDA (Chepkova et al 2008). Or, différentes études montrent que l'induction de LTP dans l'hippocampe est suffisante pour induire des effets de type antidépresseurs (Kanzari et al 2018). Afin de trouver une explication à la différence d'effet de la CBX après son administration unique ou répétée, il faut aussi évoquer sa faible sélectivité. Son interaction avec une cible encore non identifiée pourrait exercer des effets directs ou indirects sur le comportement anxio/dépressif. Par exemple, il a été montré que la CBX pouvait avoir des effets activateurs sur les MR (Stewart et al 1990), dont l'expression est augmentée après l'application d'un stress de nage (Veenema et al 2003). Indéniablement, le développement de molécules plus sélectives est une étape clé pour préciser les mécanismes par lesquels les Cxs modulent l'humeur.

Par ailleurs, une étape incontournable dans l'évaluation des effets du blocage des Cxs est l'utilisation d'un modèle murin de dépression. La troisième partie de cette thèse a été réalisée dans un modèle murin de dépression. L'utilisation de modèles animaux pertinents est importante pour la compréhension des mécanismes neurobiologiques qui sous-tendent la DM. En revanche, l'utilisation d'un unique modèle ne permet pas d'étudier l'ensemble des altérations décrites dans cette pathologie (Söderlund & Lindskog 2018). S'appuyant sur des observations révélant que des stress exogènes sont suffisants pour entraîner des troubles de l'humeur chez l'Homme, plusieurs modèles animaux ont vu le jour (Willner et al 1987). Un des modèles le plus utilisé en laboratoire est le modèle de stress chroniques imprévisibles (UCMS) (Mineur et al 2006). Celui-ci entraîne un phénotype anxio/dépressif stable et durable qui est sensible aux effets des traitements antidépresseurs chroniques. En revanche, la variabilité des protocoles utilisés dans les différents laboratoires rend l'interprétation des résultats parfois complexe (Willner 2016). Aussi, pour des raisons de reproductibilité, nous avons choisi d'utiliser le modèle d'administration chronique à la corticostérone (modèle CORT), dont l'administration dans l'eau de boisson permet de reproduire les altérations neuroendocriniennes d'un stress chronique, et contribue à l'apparition d'un comportement anxio/dépressif chez la souris (David et al 2009). À l'instar du modèle UCMS, le modèle CORT permet l'étude des effets comportementaux d'un traitement chronique aux antidépresseurs dont les tricycliques (Gourley et al 2008), les ISRS (David et al 2009), et plus récemment les IRSN (Mendez-David et al 2017b) et des

antidépresseurs multimodaux tels que l'agomélatine (Hache et al 2012) ou la vortioxétine (Guilloux et al 2013). Par ailleurs, le modèle CORT présente l'avantage d'une mise en œuvre simple et de s'affranchir de la nature du stimulus stressant, pouvant varier d'un animal à l'autre (Sarabdjitsingh et al 2010).

Différentes études rapportent que l'hyper-activation des récepteurs aux glucocorticoïdes hippocampiques dans le modèle CORT était responsable de la diminution d'expression des Cx43 observée dans la dépression (Miguel-Hidalgo et al 2014, Xia et al 2018b). Ces observations semblent correctes puisqu'elles ont été reproduites dans différents modèles dont celui de stress chroniques imprévisibles (Sun et al 2012). Toutefois, elles soulèvent une question fondamentale - renforcée par les premiers résultats de ce travail de thèse - qui est de savoir si cette surexpression est un processus qui contribue à la physiopathologie de la DM ou bien un processus adaptatif visant à prévenir/protéger l'organisme d'effets encore plus délétères du stress ? Cette deuxième hypothèse expliquerait, du moins en partie, pourquoi le blocage génétique ou pharmacologique des Cx43 astrocytaires exerce des effets de type antidépresseur ou potentialiserait la réponse à la fluoxétine lorsque les animaux sont exposés à différents stressseurs. Un mécanisme peut être proposé pour tenter d'expliquer nos résultats en accord avec les données de la littérature sur les liens entre Cx43 et le stress. Il est possible qu'en absence de stress ou en condition de stress modéré (Figure 67A) la faible activation des récepteurs au GR présents dans les astrocytes, entraîne des modifications mineures de l'expression des Cx43. Au contraire, lors d'un stress intense ou prolongé, les récepteurs GR seraient fortement activés, ce qui participerait à l'inhibition significative de l'expression des Cx43. Le faible pool de Cx43 serait transloqué à la membrane sous forme d'hémicanaux au détriment de la fonction JC. L'activation des récepteurs GR permettrait par ailleurs l'augmentation de l'expression de pompes calciques, l'augmentation de l'assimilation de Ca^{2+} et donc l'augmentation des concentrations intracellulaires de Ca^{2+} ($[\text{Ca}^{2+}]_i$) (Karst et al 2002, Reul et al 1987) favorable à l'ouverture des HC et à la libération plus importante de gliotransmetteurs dont le glutamate qui peut s'avérer neurotoxique et dépressiogène (Figure 67B).

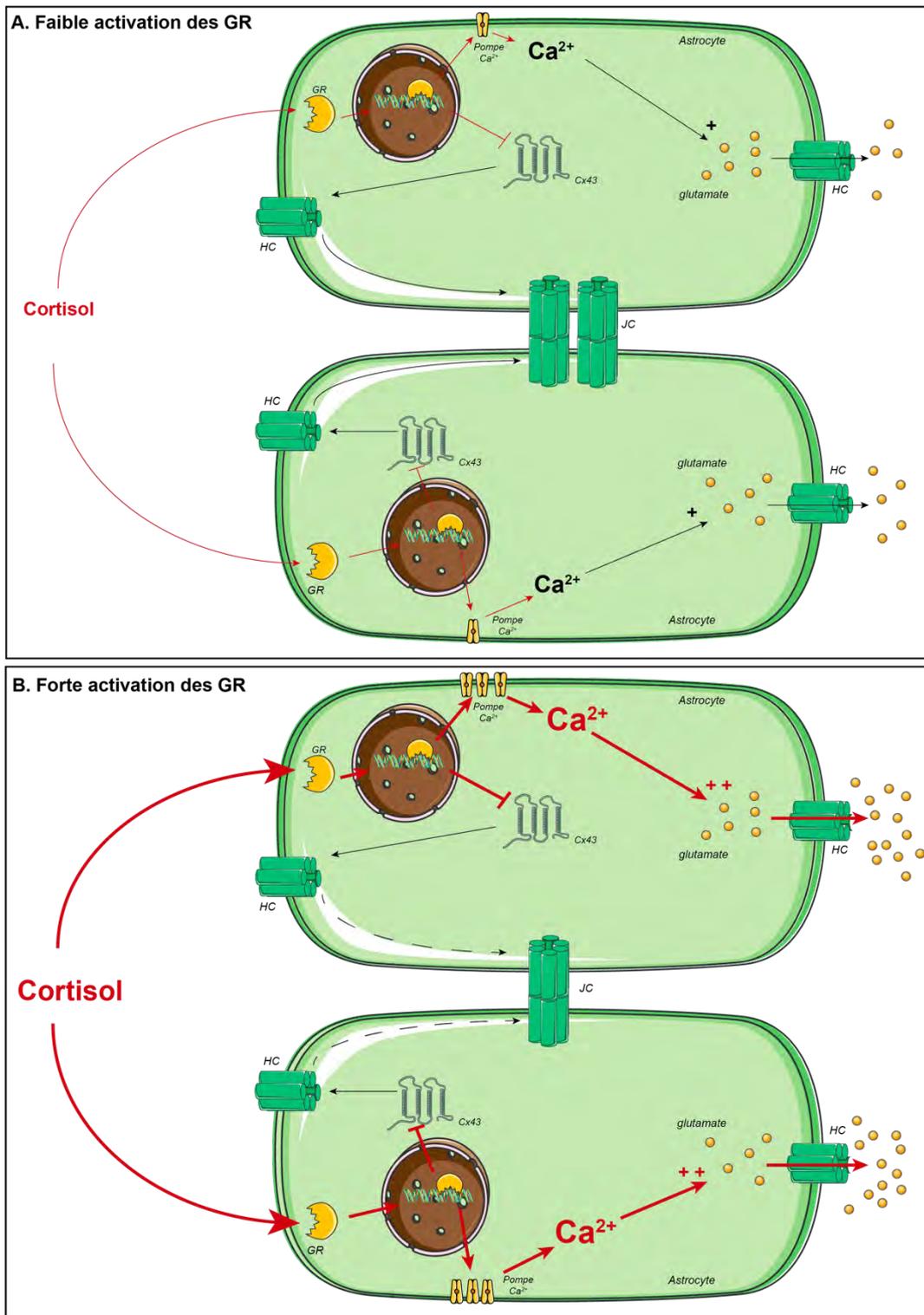


Figure 67 : Hypothèse mécanistique expliquant l'effet d'une sur-activation des GR sur l'expression et la fonction des Cx43 astrocytaires

Le faible niveau d'activation des GR (A) permettrait de diminuer l'expression des Cx43. Cela aurait pour conséquence une diminution de l'appariement en jonction communicante, un processus responsable d'une élévation des $[Ca^{2+}]_i$ favorable à l'ouverture du pore des HC puis à la libération de glutamate par les astrocytes. En conditions de fort niveau d'activation des GR (suite à un stress intense ou prolongé), les récepteurs centraux aux glucocorticoïdes seraient suractivés. Ceci aurait pour conséquences une inhibition plus importante de l'expression des Cx43, une ouverture des HC plus importante et donc une libération accrue de glutamate.

Dans un troisième volet de cette thèse, nous avons étudié les effets de l'inactivation des Cx43 hippocampique dans le modèle de souris CORT. Nos résultats montrent un effet de type antidépresseur de l'inactivation des Cx43 hippocampique à l'aide du shRNA-Cx43 dans le TST et le FST mais également dans le test d'alimentation supprimée par la nouveauté qui évalue l'état anxieux des animaux. Encore une fois, bien que les données méritent d'être confirmées et complétées, une étude de microdialyse intra-hippocampique montre que le blocage des Cx43 hippocampiques chez les souris CORT atténue dans les premières minutes et de manière transitoire l'augmentation des concentrations extracellulaires de glutamate induite par un stress de nage forcée comparée à des souris CORT ayant reçu un shRNA-GFP.

Ces données montrant que l'inactivation des Cx43 hippocampiques exerce des effets de type antidépresseurs peuvent-elles s'expliquer par une modification de l'activité de l'axe HPA ? Pour répondre à cette question, nous nous sommes intéressés à l'activité de cet axe en utilisant notamment le test d'hyperthermie induit par le stress. Nous avons remarqué que l'induction d'un stress aigu chez la souris CORT/shRNA-Cx43 entraîne une hyperthermie moins prononcée que celle observée chez les souris CORT/shRNA-GFP. Ces données suggèrent fortement que l'inactivation des Cx43 dans l'hippocampe est responsable de mécanismes neurobiologiques qui favorisent l'inhibition de l'axe HPA chez des souris CORT lorsqu'elles sont exposées à un nouveau stress aigu. En accord avec cette hypothèse, nous avons montré chez ces souris, que le stress de nage augmente les concentrations plasmatiques de corticostérone chez les souris CORT/shRNA-GFP et CORT/shRNA-Cx43 mais que cette réponse est moins prononcée chez ces dernières. Sur la base de ces résultats, nous proposons que chez des souris stressées de manière chronique, l'application d'un stress supplémentaire (aigu) provoque la libération de glutamate par les HC des Cx43 selon le modèle présenté dans la [Figure 67](#). Cette augmentation de la neurotransmission hippocampique glutamatergique médiée par les récepteurs NMDA lèverait le frein inhibiteur exercé par l'hippocampe sur l'hypothalamus. Au contraire, en conditions d'inactivation des Cx43, le tonus glutamatergique serait réduit limitant l'activation des récepteurs NMDA hippocampiques.

Notre hypothèse, nous l'avons évoquée plus haut, est que l'activation des récepteurs AMPA serait alors favorisée. Concernant les circuits reliant l'hippocampe à l'hypothalamus, différentes observations, notamment anatomiques ([Cullinan et al 1993](#)), montrent l'existence d'un lien entre l'hippocampe et le noyau du lit de la strie terminale (BNST). En combinant l'utilisation de virus rétrogrades et l'électrophysiologie *in vivo*, Cullinan et ses collaborateurs montrent que le BNST est une région riche en neurones GABAergiques projetant sur le noyau paraventriculaire (PVN) de l'hypothalamus. Ainsi, l'hippocampe exercerait un contrôle négatif sur l'axe HPA via l'activation des neurones inhibiteurs du BNST. Nous proposons que les effets bénéfiques de l'inactivation des Cx43 mobilisent ce

circuit. En particulier, nous pensons que l'atténuation de l'activation des récepteurs NMDA hippocampiques chez les souris shRNA-Cx43 serait favorable à une hypersensibilisation/hyper-activation des récepteurs AMPA. Cette forme de plasticité permettrait d'activer des voies excitatrices sur le BNST favorisant ainsi l'activation de neurones GABAergiques projetant sur l'axe HPA (Figure 68).

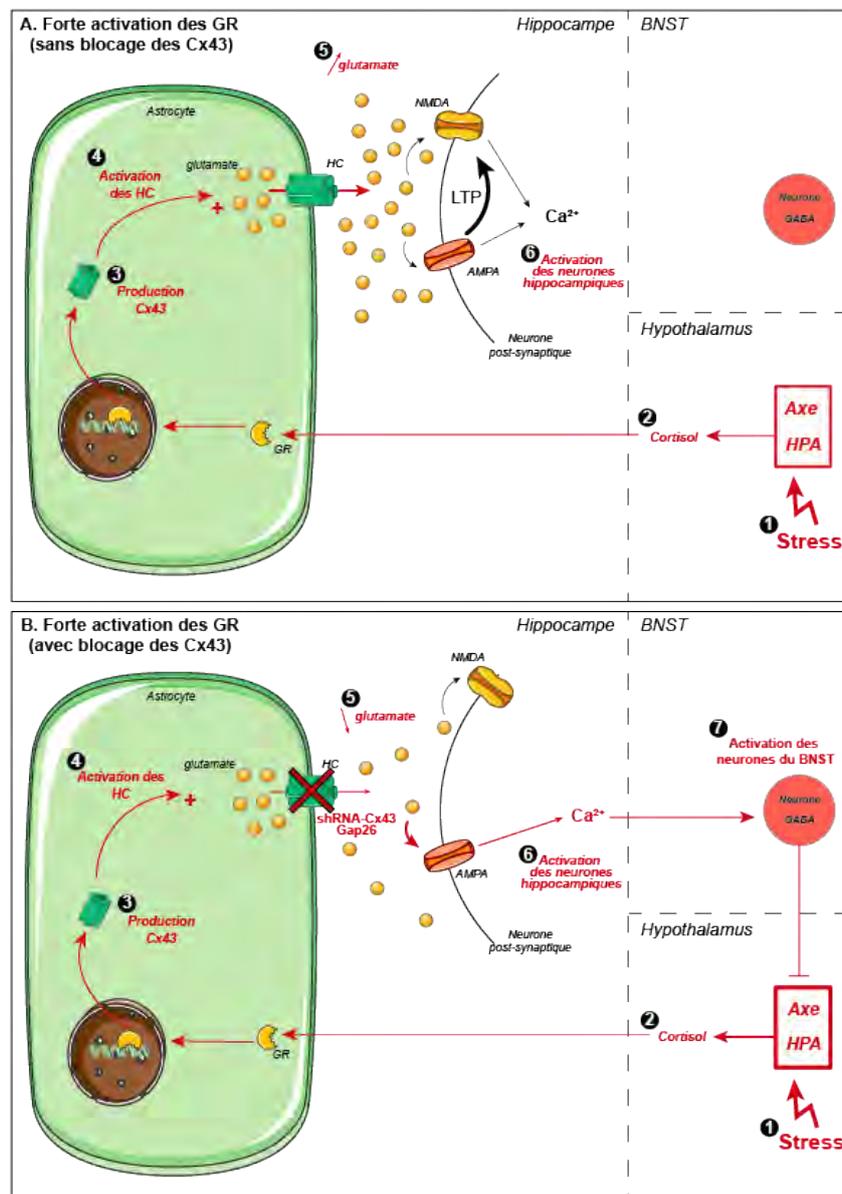


Figure 68 : Hypothèse mécanistique expliquant la dérégulation de l'axe HPA et du rétrocontrôle dans la DM.

L'activation de l'axe HPA par un stress chronique permet une forte libération de cortisol/corticostérone par les surrénales. Le cortisol/la corticostérone très lipophile pénètre alors dans le cerveau pour activer les récepteurs GR de l'hippocampe, favoriser la libération de glutamate par les HC et l'activation des récepteurs AMPA et NMDA post-synaptiques (A). Lorsque les Cx43 sont inhibées, la libération de glutamate induite par l'activation des GR est diminuée favorisant l'hyper-activation/hypersensibilisation des récepteurs AMPA (B). Une voie spécifique de neurones hippocampiques projetant vers les neurones GABAergiques du BNST serait alors recrutée pour inhiber l'activité de l'axe HPA.

De manière intéressante, nous avons montré au laboratoire qu'une exposition chronique à la corticostérone augmente l'état de phosphorylation des Cx43 ([Article 1](#)). Également rapporté sur coupes de cerveaux ([Xia et al 2018b](#)), l'état de phosphorylation des connexines serait associé à leur activation puis à l'ouverture plus importante du pore ([Oshima 2014](#)). Il a par ailleurs été démontré qu'une phosphorylation plus importante permet l'association des Cx43 avec des protéines partenaires ([Thévenin et al 2017](#)) et favorise le recyclage des JC. En accord avec notre hypothèse, il est possible que l'inactivation constitutive des Cx43 atténue le processus de phosphorylation de ces protéines ce qui aurait deux conséquences bénéfiques. La première serait d'empêcher le pore des HC de s'ouvrir et donc de libérer du glutamate. La seconde serait d'empêcher le recyclage des JC de sorte à renforcer leur activité qui semble être un processus clé dans la réponse aux antidépresseurs ([Sun et al 2012](#), [Xia et al 2018b](#)). De plus amples investigations sont tout de même requises afin de démontrer la pertinence de notre modèle. L'étude des mécanismes de régulation du processus de phosphorylation en conditions pathologiques est également intéressante, mais renforce la complexité des liens entre les Cxs astrocytaires, le stress et la DM puisque plusieurs sites de phosphorylation ont été décrits et qu'ils pourraient jouer des rôles différents sur le fonctionnement des Cx43.

Dans un dernier volet de ce travail de thèse et dans le but d'évaluer le potentiel thérapeutique du blocage des Cx43 dans la DM, nous avons testé les effets d'un traitement chronique à la CBX (seule ou associée à un IRSN : la venlafaxine) dans un modèle murin de dépression ([Article 3](#)). Nos résultats montrent qu'un traitement chronique à la CBX (utilisé à la dose de 10 mg/kg) n'exerce aucun effet de type antidépresseur mais atténue les effets bénéfiques de la venlafaxine utilisée à une dose mixte capable de bloquer le SERT et le NET ([Bacq et al 2012](#)). Ces résultats étaient assez inattendus en raison de données précédentes soulignant les effets protecteurs du blocage des Cx43 hippocampiques sur l'activité de l'axe HPA. Plusieurs raisons pourraient rendre compte de l'effet délétère de la CBX. Le problème de faible sélectivité de cet agent pharmacologique a été mentionné dans la partie introductive de ce manuscrit mais aussi dans cette discussion. Il est en effet possible qu'un traitement prolongé de CBX favorise l'activation de cibles non-spécifiques s'opposant aux effets de l'antidépresseur. D'ailleurs, il est intéressant de noter que nous avons montré dans la deuxième étude de cette thèse, que l'administration unique de CBX potentialise la réponse à la fluoxétine alors que son administration chronique ne permet pas d'observer de tels effets. La nature de l'antidépresseur (ISRS vs IRSN) est également un facteur à prendre en compte puisqu'il a été rapporté que les effets de ces agents sur la fonction JC ou HC dépendent de la classe pharmacologique considérée. Or, l'équipe du Dr Christian Giaume révèle que la fluoxétine et la venlafaxine exercent des effets

sensiblement identiques sur l'expression et les fonctions JC/HC des Cxs astrocytaires (Jeanson et al 2017).

L'explication est peut-être à chercher dans le mécanisme d'action des antidépresseurs et des processus à long terme mis en place lors de leur administration chronique. On sait aujourd'hui qu'une partie des effets thérapeutiques des antidépresseurs monoaminergiques reposent sur l'augmentation des concentrations synaptiques de sérotonine (et/ou de noradrénaline) qui participent à la synthèse et la libération de BDNF (Larsen et al 2010, Xu et al 2006) et à la stimulation de la neurogenèse hippocampique adulte (Belovicova et al 2017, Martisova et al 2015). Il est possible que l'atténuation des effets de la venlafaxine par la CBX soit due à des perturbations de ces mécanismes. Sachant que les cellules-souches sous-granulaires expriment les Cx30 et Cx43 (Kunze et al 2009), on peut envisager que la CBX atténue les effets de la venlafaxine en inhibant la libération de BDNF par les neurones ou directement par les astrocytes. A notre connaissance, aucune étude n'évalue les liens entre la CBX et les processus de neurogenèse adulte alors que les astrocytes sont de nouveaux acteurs dans la régulation des différentes étapes de la neurogenèse adulte hippocampique (pour revue Cassé et al 2018). Il a notamment été montré que les astrocytes interagissent avec les cellules-souches sous-granulaires de l'hippocampe, favorisent leur différenciation (Lim & Alvarez-Buylla 1999) et semblent nécessaires pour la formation des synapses pour les nouveaux neurones (Toni et al 2007). Une explication au rôle des astrocytes dans la neurogenèse hippocampique chez l'adulte est le processus de gliotransmission. Une étude révèle que la D-sérine (Sultan et al 2015) ou l'ATP issus des astrocytes (Cao et al 2013a) favorisent *in vitro* la prolifération de cellules-souches. En ce sens, un blocage des Cxs astrocytaires par la CBX, s'opposant à la libération d'ATP par ces cellules gliales, diminuerait l'activité des récepteurs P2Y connus pour activer la prolifération et la migration des nouveaux neurones (Mishra et al 2006, Stafford et al 2007). Des études plus poussées dans cette direction restent néanmoins requises.

Conclusions

Le rôle des connexines apparaît donc complexe et différent en conditions physiologiques et pathologiques notamment selon la fonction JC et HC. Une étude plus approfondie de l'activité HC est requise afin de mieux comprendre leur rôle en conditions pathologiques et envisager le développement de modulateurs des Cx43 astrocytaires dans le traitement de la DM seul ou en combinaison avec les antidépresseurs déjà commercialisés.

Les outils actuels souffrent d'une faible sélectivité vis-à-vis des Cx43 et de la fonction HC ce qui limite, aujourd'hui, la possibilité d'apporter des conclusions définitives sur le rôle de ces protéines dans les maladies mentales. Il est aujourd'hui possible de cibler plus spécifiquement ces protéines et la fonction HC grâce au Gap26 ou au TAT-L2 mais la nature peptidique de ces outils limite aussi leur utilisation *in vivo*. Enfin, comme décrit dans l'introduction de cette thèse, différentes régions sont impliquées dans la DM et la réponse aux antidépresseurs. Nous avons choisi ici de nous focaliser sur l'hippocampe mais il n'est pas exclu que le rôle des Cxs dans la régulation de l'humeur diffère selon la région considérée. La plupart des travaux actuels portent sur le cortex et l'hippocampe mais les liens entre Cx43, dépression et amygdale méritent également notre attention. En effet, on sait aujourd'hui que chez souris exposées au modèle de stress chroniques imprévisibles, que la diminution de l'expression des Cx43 dans l'hippocampe et le cortex préfrontal s'accompagne d'une augmentation de la fréquence des potentiels post-synaptiques excitateurs dans l'amygdale (Huang et al 2019a) renforçant l'idée d'un lien anatomique entre ces trois structures. Par ailleurs, la libération de gliotransmetteurs par les HC participe à la consolidation de la mémoire conditionnée à la peur dépendante de l'amygdale (Stehberg et al 2012), qui est augmentée chez des rats stressés (Hatherall et al 2017). Enfin, une étude récente rapporte la formation de JC entre les astrocytes et les neurones de l'amygdale de rats, suggérant la modulation de l'activité neuronale par un contact physique direct entre ces deux types de cellules via la diffusion de molécules provenant des astrocytes (Zancan et al 2019). Enfin, même si nous l'avons exploré de manière brève, nous avons observé que l'inactivation des Cx43 dans l'amygdale n'affecte pas le comportement spontané d'anxiété ou de résignation des souris mais empêche le diazépam d'exercer un effet anxiolytique dans le labyrinthe en croix surélevé. Il semble également que cet effet soit lié à une diminution du tonus GABAergique observé à l'aide de la technique de microdialyse. Ce dernier résultat s'inscrit dans notre hypothèse générale, mais encore trop peu documentée, que les Cx43 participent à la libération de gliotransmetteurs pour moduler des circuits neuronaux impliqués dans différentes pathologies du SNC.

Perspectives

Les Cx30 sont co-exprimées avec les Cx43 dans les astrocytes. Même si leur expression est plus faible que les Cx43, il aurait été judicieux de s'intéresser à l'effet de l'inactivation des Cx30 sur les comportements anxio/dépressifs.

En outre, l'utilisation d'une double lignée KO pour les Cx30 et Cx43 a permis par le passé l'étude des effets d'une diminution d'expression des deux isoformes des Cxs sur l'activité neuronale dans l'hippocampe de souris (Pannasch et al 2011). À notre connaissance aucune étude ne révèle l'effet d'une double inactivation sur le comportement anxio/dépressif et il est possible que les effets observés dans ce travail de thèse soient plus marqués dans le cas d'une double inactivation. En effet, bien que nous n'ayons pas mis en évidence de processus de compensation par la surexpression de Cx30 chez les souris Cx43 KD ou shRNA-Cx43, nous pensons que l'inactivation conjointe des Cx30/43 pourrait induire un comportement de type antidépresseur en conditions physiologiques ou suite à une exposition chronique à la CORT. Pour vérifier cette hypothèse, nous proposons, en combinant des approches comportementales, de microdialyse et d'électrophysiologie, d'étudier dans le futur l'effet de la double délétion.

Ces travaux de thèse décrivent la possibilité que l'état d'activation des astrocytes est important au regard de la diffusion de la vague calcique et de la libération de gliotransmetteurs. En ce sens, nous proposons de combiner l'utilisation de ces souris mutantes ou de bloqueurs pharmacologiques des connexines tels que la CBX ou la méfloquine avec la technique d'optogénétique afin de déterminer dans quelle mesure l'activation des astrocytes par la lumière impacte la libération de gliotransmetteurs par microdialyse. D'un point de vue technique, nous pensons que la transfection de canaux sensibles à la lumière devrait être sous le contrôle d'un promoteur astrocytaire tel que *ALDH1L1*.

Enfin, nous avons évoqué dans cette introduction l'importance des concentrations intracellulaires de Ca^{2+} dans le processus de gliotransmission (Perea & Araque 2005). Alors qu'une première étude s'intéresse à la libération de D-sérine par les HC dans le cortex préfrontal suite à un clamp des concentrations intracellulaires de Ca^{2+} (Meunier et al 2017), aucune étude ne s'intéresse à ce processus pour les autres gliotransmetteurs et notamment le glutamate. En ce sens, nous pensons que l'utilisation combinée des techniques d'optogénétique décrites précédemment, de l'imagerie calcique et/ou l'utilisation de traceurs fluorescents glutamatergiques (Passlick et al 2017) permettrait d'étudier plus précisément le processus de gliotransmission médié par les connexines chez la souris.

RÉFÉRENCES

- Abbaci M, Barberi-Heyob M, Stines JR, Blondel W, Dumas D, et al. 2007. Gap junctional intercellular communication capacity by gap-FRAP technique: a comparative study. *Biotechnol J* 2: 50-61
- Abrahám I, Juhász G, Kékesi KA, Kovács KJ. 1993. Corticosterone peak is responsible for stress-induced elevation of glutamate in the hippocampus. *Stress* 2: 171-81
- Abudara V, Bechberger J, Freitas-Andrade M, De Bock M, Wang N, et al. 2014. The connexin43 mimetic peptide Gap19 inhibits hemichannels without altering gap junctional communication in astrocytes. *Front Cell Neurosci* 8
- Abudara V, Roux L, Dallérac G, Matias I, Dulong J, et al. 2015. Activated microglia impairs neuroglial interaction by opening Cx43 hemichannels in hippocampal astrocytes. *Glia* 63: 795-811
- Adell A, Artigas F. 1991. Differential effects of clomipramine given locally or systemically on extracellular 5-hydroxytryptamine in raphe nuclei and frontal cortex. An in vivo brain microdialysis study. *Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol* 343: 237-44
- Aghajanian GK, Vandermaelen CP. 1982. Intracellular recording in vivo from serotonergic neurons in the rat dorsal raphe nucleus: methodological considerations. *J Histochem Cytochem* 30: 813-14
- Aguilera G, Kiss A, Liu Y, Kamitakahara A. 2007. Negative regulation of corticotropin releasing factor expression and limitation of stress response. *Stress* 10
- Ahlemeyer B, Beier H, Semkova I, Schaper C, Krieglstein J. 2000. S-100beta protects cultured neurons against glutamate- and staurosporine-induced damage and is involved in the antiapoptotic action of the 5 HT(1A)-receptor agonist, Bay x 3702. *Brain Res* 858: 121-28
- Aimone JB, Li Y, Lee SW, Clemenson GD, W. D, Gage FH. 2018. Regulation and function of adult neurogenesis: from genes to cognition. *Physiol Rev* 94: 991-1026
- Airaksinen MS, Saarma M. 2002. The GDNF family: signalling, biological functions and therapeutic value. *Nat Rev Neurosci.* 3: 383-94
- Airaksinen MS, Titievsky A, Saarma M. 1999. GDNF family neurotrophic factor signaling: four masters, one servant? *Mol Cell Neurosci* 13: 313-25
- Albert PR, Vahid-Ansari F. 2019. The 5-HT1A receptor: Signaling to behavior. *Biochimie* 161

- Aleksandrova LR, Phillips AG, Wang YT. 2017. Antidepressant effects of ketamine and the roles of AMPA glutamate receptors and other mechanisms beyond NMDA receptor antagonism. *J Psychiatry Neurosci* 42: 222-29
- Ali-Sisto T, Tolmunen T, Toffol E, Viinamäki H, Mäntyselkä P, et al. 2016. Purine metabolism is dysregulated in patients with major depressive disorder. *Psychoneuroendocrinology* 70: 25-32
- Allaman I, Fiumelli H, Magistretti PJ, Martin JL. 2011. Fluoxetine regulates the expression of neurotrophic/growth factors and glucose metabolism in astrocytes. *Psychopharmacology* 216: 75-84
- Allaman I, Pellerin L, Magistretti PJ. 2004. Glucocorticoids modulate neurotransmitter-induced glycogen metabolism in cultured cortical astrocytes. *J Neurochem* 88: 900-08
- Allard C, Carneiro L, Grall S, Cline BH, Fioramonti X, et al. 2014. Hypothalamic astroglial connexins are required for brain glucose sensing-induced insulin secretion. *J Cereb Blood Flow Metab* 34: 339-46
- Allen NJ, Barres BA. 2009. Glia — more than just brain glue. *Nature* 457
- Alt A, Nisenbaum ES, Bleakman D, Witkin JM. 2006. A role for AMPA receptors in mood disorders. *Biochem Pharmacol* 71: 1273-88
- Altshuler LL, Abulseoud OA, Foland-Ross L, Bartzokis G, Chang S, et al. 2010. Amygdala astrocyte reduction in subjects with major depressive disorder but not bipolar disorder. *Bipolar Disord* 12: 541-49
- Amat J, Baratta MV, Paul E, Bland ST, Watkins LR, Maier SF. 2005. Medial prefrontal cortex determines how stressor controllability affects behavior and dorsal raphe nucleus. *Nat Neurosci* 8: 365-71
- Ambrosi C, Gassmann O, Pranskevich JN, Boassa D, Smock A, et al. 2010. Pannexin1 and Pannexin2 channels show quaternary similarities to connexons and different oligomerization numbers from each other. *J Biol Chem* 285: 24420-31
- Amiry-Moghaddam M, Williamson A, Palomba M, Eid T, De Lanerolle NC, et al. 2003. Delayed K⁺ clearance associated with aquaporin-4 mislocalization: phenotypic defects in brains of alpha-syntrophin-null mice. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 100: 13615-20

- Anacker C, Luna VM, Stevens GS, Millette A, Shores R, et al. 2018. Hippocampal neurogenesis confers stress resilience by inhibiting the ventral dentate gyrus. *Nature* 559: 98-102
- Angulo M, Kozlov AS, Charpak S, Audinat E. 2004. Glutamate released from glial cells synchronizes neuronal activity in the hippocampus. *J Neurosci*. 24: 6920-27
- APA APA. 2013. *Diagnostic and statistical manual of mental disorders 5th ed*. Washington D.C.
- Apple DM, Fonseca RS, Kokovay E. 2017. The role of adult neurogenesis in psychiatric and cognitive disorders. *Brain Res* 1655: 270-76
- Araque A, Carmignoto G, Haydon PG, Oliet SH, Robitaille R, Volterra A. 2014. Gliotransmitters travel in time and space. *Neuron* 81: 728-39
- Araque A, Li N, Doyle RT, Haydon PG. 2000. SNARE protein-dependent glutamate release from astrocytes. *J Neurosci* 20: 666-73
- Araque A, Parpura V, Sanzgiri RP, Haydon PG. 1999. Tripartite synapses: glia, the unacknowledged partner. *Trends Neurosci*. 22: 208-15
- Aricioglu F, Ozkartal CS, Bastaskin T, Tüzün E, Kandemir C, et al. 2019. Antidepressant-like Effects Induced by Chronic Blockade of the Purinergic 2X7 Receptor through Inhibition of Non-like Receptor Protein 1 Inflammasome in Chronic Unpredictable Mild Stress Model of Depression in Rats. *Clin Psychopharmacol Neurosci* 17: 261-72
- Arnone D, Mumuni AN, Jauhar S, Condon B, Cavanagh J. 2015. Indirect evidence of selective glial involvement in glutamate-based mechanisms of mood regulation in depression: meta-analysis of absolute prefrontal neuro-metabolic concentrations. *Eur Neuropsychopharmacol* 25: 1109-17
- Aston C, Jiang L, Sokolov BP. 2005. Transcriptional profiling reveals evidence for signaling and oligodendroglial abnormalities in the temporal cortex from patients with major depressive disorder. *Mol Psychiatr* 10: 309-22
- Azevedo FA, Carvalho LR, Grinberg LT, Farfel JM, Ferretti RE, et al. 2009. Equal numbers of neuronal and nonneuronal cells make the human brain an isometrically scaled-up primate brain. *J Comp Neurol* 513: 532-41

- Azmitia EC, Gannon PJ, Kheck NM, Whitaker-Azmitia PM. 1996. Cellular localization of the 5-HT_{1A} receptor in primate brain neurons and glial cells. *Neuropsychopharmacology* 14: 35-46
- Azmitia EC, McEwen BS. 1969. Corticosterone regulation of tryptophan hydroxylase in midbrain of the rat. *Science* 166: 1274-76
- Babaev O, Piletti Chatain C, Krueger-Burg D. 2018. Inhibition in the amygdala anxiety circuitry. *Exp Mol Med* 50: 18
- Bacq A, Balasse L, Blala G, Gardier AM, Schinkel A, et al. 2012. Organic cation transporter 2 controls brain norepinephrine and serotonin clearance and antidepressant response. *Molecular Psychiatry* 17: 926-39
- Baker ME, Funder JW, Kattoula SR. 2013. Evolution of hormone selectivity in glucocorticoid and mineralocorticoid receptors. *J Steroid Biochem Mol Biol* 137: 57-70
- Baklaushev VP, Gurina OI, Yusubalieva GM, Grinenko NF, Cytrin EB, et al. 2009. Immunofluorescent analysis of connexin-43 using monoclonal antibodies to its extracellular domain. *Bull Exp Biol Med* 148: 725-30
- Bal N, Figueras G, Vilaró MT, Suñol C, Artigas F. 1997. Antidepressant drugs inhibit a glial 5-hydroxytryptamine transporter in rat brain. *Eur J Neurosci* 9: 1728-38
- Balasingam V, Tejada-Berges T, Wright E, Bouckova R, Yong VW. 1994. Reactive astrogliosis in the neonatal mouse brain and its modulation by cytokines. *J Neurosci* 14: 846-56
- Banasr M, Chowdhury GM, Terwilliger R, Newton SS, Duman RS, et al. 2010. Glial pathology in an animal model of depression: reversal of stress-induced cellular, metabolic and behavioral deficits by the glutamate-modulating drug riluzole. *Mol Psychiatry* 15: 501-11
- Banasr M, Duman RS. 2008. Glial Loss in the Prefrontal Cortex Is Sufficient to Induce Depressive-like Behaviors. *Biol Psychiatry*
- 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 B, Jiang J, Yanase T, Nishi Y, Morgan JR. 2011. Connexon-mediated cell adhesion drives microtissue self-assembly. *FASEB J* 25: 255-64
- Bao L, Locovei S, Dahl G. 2004a. Pannexin membrane channels are mechanosensitive conduits for ATP. *FEBS Lett* 572: 65-68
- Bao L, Sachs F, Dahl G. 2004b. Connexins are mechanosensitive. *Am J Physiol Cell Physiol* 87: 1389-95
- Bao X, Reuss L, Altenberg GA. 2004c. Regulation of purified and reconstituted connexin 43 hemichannels by protein kinase C-mediated phosphorylation of Serine 368. *J Biol Chem* 279: 20058-66
- Baranova A, Ivanov D, Petrash N, Pestova A, Skoblov M, et al. 2004. The mammalian pannexin family is homologous to the invertebrate innexin gap junction proteins. *Genomics* 83: 706-16
- Barnett SC, Linington C. 2013. Myelination: do astrocytes play a role? *Neuroscientist* 19: 442-50
- Barr JL, Forster GL. 2011. Serotonergic neurotransmission in the ventral hippocampus is enhanced by corticosterone and altered by chronic amphetamine treatment. *Neuroscience* 182: 105-14
- Bartolomucci A, Palanza P, Sacerdote P, Ceresini G, Chirieleison A, et al. 2003. Individual housing induces altered immuno-endocrine responses to psychological stress in male mice. *Psychoneuroendocrinology* 28: 540-58
- Bastiaanse EM, Jongsma HJ, Van der Laarse A, Takens-Kwak BR. 1993. Heptanol-induced decrease in cardiac gap junctional conductance is mediated by a decrease in the fluidity of membranous cholesterol-rich domains. *J Membr Biol* 136: 135-45
- Basu A, Chadda RK, Sood M, Kaur H, Kukreti R. 2015. Association of serotonin transporter (SLC6A4) and receptor (5HTR1A, 5HTR2A) polymorphisms with response to treatment with escitalopram in patients with major depressive disorder: A preliminary study. *Indian J Med Res* 142: 40-45
- Batelaan NM, Smit F, De Graaf R, Van Balkom AJ, Vollebergh WA, Beekman AT. 2010. Identifying target groups for the prevention of anxiety disorders in the general population. *Acta Psychiatr Scand* 122: 56-65

- Batra N, Burra S, Siller-Jackson AJ, Gu S, Xia X, et al. 2012. Mechanical stress-activated integrin $\alpha 5\beta 1$ induces opening of connexin 43 hemichannels. *Proc Natl Acad Sci U S A* 109: 3359-564
- Baulac M, Pitkänen A. 2009. Research priorities in epilepsy for the next decade-A representative view of the European scientific community: Summary of the ILAE Epilepsy Research Workshop. *Epilepsia* 50: 571–78
- Bazzigaluppi P, Weisspapir I, Stefanovic B, Leybaert L, Carlen PL. 2017. Astrocytic gap junction blockade markedly increases extracellular potassium without causing seizures in the mouse neocortex. *Neurobiol Dis* 101
- Beardslee MA, Laing JG, Beyer EC, Saffitz JE. 1998. Rapid turnover of connexin43 in the adult rat heart. *Circ Res* 83: 629-35
- Becker DL, Evans WH, Green CR, Warner A. 1995. Functional analysis of amino acid sequences in connexin43 involved in intercellular communication through gap junctions. *J Cell Sci* 108 1455-67
- Bedner P, Dupper A, Hüttmann K, Müller J, Herde MK, et al. 2015. Astrocyte uncoupling as a cause of human temporal lobe epilepsy. *Brain* 138: 1208-22
- Bellani M, Baiano M, Brambilla P. 2011. Brain anatomy of major depression II. Focus on amygdala. *Epidemiol Psychiatr Sci* 20
- Belovicova K, Bogi E, Koprdova R, Ujhazy E, Mach M, Dubovicky M. 2017. Effects of venlafaxine and chronic unpredictable stress on behavior and hippocampal neurogenesis of rat dams. *Neuro Endocrinol Lett* 38: 19-26
- Belzung C, Turiault M, Griebel G. 2014. Optogenetics to study the circuits of fear- and depression-like behaviors: a critical analysis. *Pharmacol Biochem Behav* 122: 144-57
- Ben Haim L, Rowitch DH. 2017. Functional diversity of astrocytes in neural circuit regulation. *Nat Rev Neurosci*. 18: 31-41
- Bergersen LH, Morland C, Ormel L, Rinholm JE, Larsson M, et al. 2012. Immunogold detection of L-glutamate and D-serine in small synaptic-like microvesicles in adult hippocampal astrocytes. *Cereb Cortex* 22: 1690-97

- Bergner CL, Smolinsky AN, Hart PC, Dufour BD, Egan RJ, et al. 2009. Mouse Models for Studying Depression-Like States and Antidepressant Drugs. *Mouse Models for Drug Discovery* 602
- Berman RM, Cappiello A, Anand A, Oren DA, Heninger GR, et al. 2000. Antidepressant effects of ketamine in depressed patients. *Biol Psychiatry* 47: 351-54
- Bernard R, Kerman IA, Thompson RC, Jones EG, Bunney WE, et al. 2011. Altered expression of glutamate signaling, growth factor, and glia genes in the locus coeruleus of patients with major depression. *Mol Psychiatry* 16: 634-46
- Bernardinelli Y, Magistretti PJ, Chatton JY. 2004. Astrocytes generate Na⁺-mediated metabolic waves. *Proc Natl Acad Sci U S A* 101: 14937-42
- Bernardini G, Peracchia C, Peracchia LL. 1984. Reversible effects of heptanol on gap junction structure and cell-to-cell electrical coupling. *Eur J Cell Biol* 34: 307-12
- Berton O, McClung CA, Dileone RJ, Krishnan V, Renthal W, et al. 2006. Essential role of BDNF in the mesolimbic dopamine pathway in social defeat stress. *Science* 10: 864-64
- Bezzi P, Gundersen V, Galbete JL, Seifert G, Steinhäuser C, et al. 2004. Astrocytes contain a vesicular compartment that is competent for regulated exocytosis of glutamate. *Nat Neurosci* 7: 613-20
- Bhalla-Gehi R, Penuela S, Churko JM, Shao Q, Laird DW. 2010. Pannexin1 and pannexin3 delivery, cell surface dynamics, and cytoskeletal interactions. *J Biol Chem* 285: 9147-60
- Binder DK, Yao X, Zador Z, Sick TJ, Verkman AS, Manley GT. 2006. Increased seizure duration and slowed potassium kinetics in mice lacking aquaporin-4 water channels. *Glia* 53: 631-36
- Binder EB, Salyakina D, Lichtner P, Wochnik GM, Ising M, et al. 2004. Polymorphisms in FKBP5 are associated with increased recurrence of depressive episodes and rapid response to antidepressant treatment. *Nat Genet* 36: 1319-25
- Blier P. 2003. The pharmacology of putative early-onset antidepressant strategies. *European Neuropsychopharmacol* 13: 57-66

- Blier P, Bergeron R, De Montigny C. 1997. Selective activation of postsynaptic 5-HT_{1A} receptors induces rapid antidepressant response. *Neuropsychopharmacology* 16: 333-38
- Blomstrand F, Venance L, Sirén AL, P. E, Hanse E, et al. 2004. Endothelins regulate astrocyte gap junctions in rat hippocampal slices. *Eur J Neurosci* 19: 1005-15
- Bockting CL, Schene AH, Spinhoven P, Koeter MW, Wouters LF, et al. 2005. Preventing relapse/recurrence in recurrent depression with cognitive therapy: a randomized controlled trial. *J Consult Clin Psychol* 73: 647-57
- Bodendiek SB, Raman G. 2010. Connexin modulators and their potential targets under the magnifying glass. *Curr Med Chem* 17: 4191-230
- Boitano S, Dirksen ER, Evans WH. 1998. Sequence-specific antibodies to connexins block intercellular calcium signaling through gap junctions. *Cell Calcium* 23: 1-9
- Boku S, Nakagawa S, Toda H, Hishimoto A. 2017. Neural basis of major depressive disorder: Beyond monoamine hypothesis. *PCN*
- Boldrini M, Fulmore CA, Tartt AN, Simeon LR, Pavlova I, et al. 2018. Human Hippocampal Neurogenesis Persists throughout Aging. *Cell Stem Cell* 22: 589-99
- Bonanno G, Giambelli R, Raiteri L, Tiraboschi E, Zappettini S, et al. 2005. Chronic antidepressants reduce depolarization-evoked glutamate release and protein interactions favoring formation of SNARE complex in hippocampus. *J Neurosci* 25: 3270-79
- Bortolozzi A, Castañé A, Semakova J, Santana N, Alvarado G, et al. 2012. Selective siRNA-mediated suppression of 5-HT_{1A} autoreceptors evokes strong antidepressant-like effects. *Mol Psychiatry* 17: 612-23
- Bouzier-Sore AK, Voisin P, Bouchaud V, Bezancon E, Franconi JM, Pellerin L. 2006. Competition between glucose and lactate as oxidative energy substrates in both neurons and astrocytes: a comparative NMR study. *Eur J Neurosci* 24: 1687-94
- Bowser DN, Khakh BS. 2007. Vesicular ATP is the predominant cause of intercellular calcium waves in astrocytes. *J Gen Physiol* 129: 485-91
- Boyer PA, Skolnick P, Fossom LH. 1998. Chronic administration of imipramine and citalopram alters the expression of NMDA receptor subunit mRNAs in mouse brain. A quantitative in situ hybridization study. *J Mol Neurosci*. 10: 219-33

- Boyle MP, Brewer JA, Funatsu M, Wozniak DF, Tsien JZ, et al. 2005. Acquired deficit of forebrain glucocorticoid receptor produces depression-like changes in adrenal axis regulation and behavior. *PNAS*
- Brachman RA, McGowan JC, Perusini JN, Lim SC, Pham TH, et al. 2016. Ketamine as a Prophylactic Against Stress-Induced Depressive-like Behavior. *Biol Psychiatry* 79: 776-86
- Braet K, Aspeslagh S, Vandamme W, Willecke K, Martin PE, et al. 2003. Pharmacological sensitivity of ATP release triggered by photoliberation of inositol-1,4,5-trisphosphate and zero extracellular calcium in brain endothelial cells. *J Cell Physiol* 197: 205-13
- Brokamp C, Todd J, Montemagno C, Wendell D. 2012. Electrophysiology of single and aggregate Cx43 hemichannels. *PLoS One* 7
- Brown SSG, Rutland JW, Verma G, Feldman RE, Alper J, et al. 2019. Structural MRI at 7T reveals amygdala nuclei and hippocampal subfield volumetric association with Major Depressive Disorder symptom severity. *Sci Rep* 9: 10166
- Bruder GE, Stewart JW, Tenke CE, McGrath PJ, Leite P, et al. 2001. Electroencephalographic and perceptual asymmetry differences between responders and nonresponders to an SSRI antidepressant. *Biol Psychiatry* 49: 416-25
- Bruzzone R, Barbe MT, Jakob NJ, Monyer H. 2005. Pharmacological properties of homomeric and heteromeric pannexin hemichannels expressed in *Xenopus* oocytes. *J Neurochem* 92: 1033-43
- Bunse S, Schmidt M, Prochnow N, Zoidl G, Dermietzel R. 2010. Intracellular cysteine 346 is essentially involved in regulating Panx1 channel activity. *J Biol Chem* 285: 38444-52
- Bymaster FP, Zhang W, Carter PA, Shaw J, Chernet E, et al. 2002. Fluoxetine, but not other selective serotonin uptake inhibitors, increases norepinephrine and dopamine extracellular levels in prefrontal cortex. *Psychopharmacology* 160: 353-61
- Cai W, Xue C, Sakaguchi M, Konishi M, Shirazian A, et al. 2018. Insulin regulates astrocyte gliotransmission and modulates behavior. *J Clin Invest* 128: 2914-26

- Calabrese F, Guidotti G, Molteni R, Racagni G, Mancini M, Riva MA. 2012. Stress-induced changes of hippocampal NMDA receptors: modulation by duloxetine treatment. *PLoS One* 7
- Caldeira MV, Melo CV, Pereira DB, Carvalho RF, Carvalho AL, Duarte CB. 2007. BDNF regulates the expression and traffic of NMDA receptors in cultured hippocampal neurons. *Mol Cell Neurosci* 35: 208-19
- Caldji C, Diorio J, Meaney MJ. 2000. Variations in maternal care in infancy regulate the development of stress reactivity. *Biol Psychiatry* 48: 1164-74
- Calhoun GG, Tye KM. 2015. Resolving the neural circuits of anxiety. *Nat Neurosci* 18: 1394-404
- Cali C, Tauffenberger A, Magistretti P. 2019. The Strategic Location of Glycogen and Lactate: From Body Energy Reserve to Brain Plasticity. *Front Cell Neurosci* 13
- Camargo N, Goudriaan A, Van Deijk AF, Otte WM, Brouwers JF, et al. 2017. Oligodendroglial myelination requires astrocyte-derived lipids. *PLoS Biol* 15
- Cameron HA, Gould E. 1994. Adult neurogenesis is regulated by adrenal steroids in the dentate gyrus. *Neuroscience* 61: 203-09
- Campos AC, Ferreira FR, Guimarães FS, Lemos JI. 2010. Facilitation of endocannabinoid effects in the ventral hippocampus modulates anxiety-like behaviors depending on previous stress experience. *Neuroscience*. 167: 238-46
- Cao X, Li LP, Qin XH, Li SJ, Zhang M, et al. 2013a. Astrocytic adenosine 5'-triphosphate release regulates the proliferation of neural stem cells in the adult hippocampus. *Stem Cells* 31: 1633-43
- Cao X, Li LP, Wang Q, Wu Q, Hu HH, et al. 2013b. Astrocyte-derived ATP modulates depressive-like behaviors. *Nat Med* 19: 773-77
- Carlen PL. 2012. Curious and contradictory roles of glial connexins and pannexins in epilepsy. *Brain Res* 1487: 54-60
- Carobrez AP, Bertoglio LJ. 2005. Ethological and temporal analyses of anxiety-like behavior: the elevated plus-maze model 20 years on. *Neurosci Biobehav Rev* 29: 1193-205

- Carrard A, Elsayed M, Margineanu M, Boury-Jamot B, Fragnière L, et al. 2018. Peripheral administration of lactate produces antidepressant-like effects. *Mol Psychiatry* 23: 392-99
- Carrillo-Roa T, Labermaier C, Weber P, Herzog DP, Lareau C, et al. 2017. Common genes associated with antidepressant response in mouse and man identify key role of glucocorticoid receptor sensitivity. *PLoS Biol* 15
- Cassé F, Richetin K, Toni N. 2018. Astrocytes' Contribution to Adult Neurogenesis in Physiology and Alzheimer's Disease. *Front Cell Neurosci* 12
- Castrén E. 2014. Neurotrophins and psychiatric disorders. *Handb Exp Pharmacol* 220: 461-79
- Catus SL, Gibbs ME, Sato M, Summers RJ, Hutchinson DS. 2011. Role of β -adrenoceptors in glucose uptake in astrocytes using β -adrenoceptor knockout mice. *Br J Pharmacol* 162: 1700-15
- Celada P, Artigas F. 1993. Monoamine oxidase inhibitors increase preferentially extracellular 5-hydroxytryptamine in the midbrain raphe nuclei. A brain microdialysis study in the awake rat. *Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol* 347: 583-90
- Celetti SJ, Cowan KN, Penuela S, Shao Q, Churko J, Laird DW. 2010. Implications of pannexin 1 and pannexin 3 for keratinocyte differentiation. *J Cell Sci* 123: 1363-72
- Chaboub LS, Deneen B. 2012. Developmental origins of astrocyte heterogeneity: the final frontier of CNS development. *Dev Neurosci* 34: 379-88
- Charnay Y, Léger L. 2010. Brain serotonergic circuitries. *Dialogues Clin Neurosci* 12: 471-87
- Charvériat M, Naus CC, Leybaert L, Sáez JC, Giaume C. 2017. Connexin-Dependent Neuroglial Networking as a New Therapeutic Target. *Front in Cell Neuroscience*
- Chen G, Park CK, Xie RG, Berta T, Nedergaard M, Ji RR. 2014a. Connexin-43 induces chemokine release from spinal cord astrocytes to maintain late-phase neuropathic pain in mice. *Brain* 137: 2193-209
- Chen H, Lombès M, Le Menuet D. 2017. Glucocorticoid receptor represses brain-derived neurotrophic factor expression in neuron-like cells. *Mol Brain* 10: 12

- Chen J, Wang Z-Z, Zuo W, Zhang S, Chu S-F, Chen N-H. 2016. Effects of chronic mild stress on behavioral and neurobiological parameters — Role of glucocorticoid. *Hormones and Behavior* 78
- Chen JX, Yao LH, Xu BB, Qian K, Wang HL, et al. 2014b. Glutamate transporter 1-mediated antidepressant-like effect in a rat model of chronic unpredictable stress. *J Huazhong Univ Sci Technolog Med Sci* 34: 838-44
- Chen MJ, Kress B, Han X, Moll K, Peng W, et al. 2012. Astrocytic CX43 hemichannels and gap junctions play a crucial role in development of chronic neuropathic pain following spinal cord injury. *Glia* 60: 1660-70
- Chen MJ, Nguyen TV, Pike CJ, Russo-Neustadt AA. 2007. Norepinephrine induces BDNF and activates the PI-3K and MAPK cascades in embryonic hippocampal neurons. *Cell Signal* 19: 114-28
- Chepkova AN, Sergeeva OA, Haas HL. 2008. Carbenoxolone impairs LTP and blocks NMDA receptors in murine hippocampus. *Neuropharmacology* 55: 139-47
- Cherian PP, Siller-Jackson AJ, Gu S, Wang X, Bonewald LF, et al. 2005. Mechanical strain opens connexin 43 hemichannels in osteocytes: a novel mechanism for the release of prostaglandin. *Mol Biol Cell* 16: 3100-06
- Cheung G, Chever O, Rouach N. 2014. Connexons and pannexons: newcomers in neurophysiology. *Front Cell Neurosci.* 8
- Chever O, Lee CY, Rouach N. 2014. Astroglial connexin43 hemichannels tune basal excitatory synaptic transmission. *J Neurosci.* 34: 11228-32
- Cho W, Brenner M, Peters N, Messing A. 2010. Drug screening to identify suppressors of GFAP expression. *Hum Mol Genet* 19: 3169-78
- Choi SR, Roh DH, Yoon SY, Kwon SG, Choi HS, et al. 2016. Astrocyte sigma-1 receptors modulate connexin 43 expression leading to the induction of below-level mechanical allodynia in spinal cord injured mice. *Neuropharmacology* 111: 34-46
- Choudary PV, Molnar M, Evans SJ, Tomita H, Li JZ, et al. 2005. Altered cortical glutamatergic and GABAergic signal transmission with glial involvement in depression. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 102: 15653-58
- Cipriani A, Koesters M, Furukawa TA, Nosè M, Purgato M, et al. 2012. Duloxetine versus other anti-depressive agents for depression. *Cochrane Database Syst Rev* 10

- Clark RF, Hutton M, Fuldner M, Froelich S, Karran E, et al. 1995. The structure of the presenilin 1 (S182) gene and identification of six novel mutations in early onset AD families. *Nat Genet* 11: 219-22
- Clarke LE, Barres BA. 2013. Emerging roles of astrocytes in neural circuit development. *Nat Rev Neurosci* 14: 311-21
- Cobb JA, O'Neill K, Milner J, Mahajan GJ, Lawrence TJ, et al. 2016. Density of GFAP-immunoreactive astrocytes is decreased in left hippocampi in major depressive disorder. *Neuroscience* 316: 209-20
- Coco S, Calegari F, Pravettoni E, Pozzi D, Taverna E, et al. 2003. Storage and release of ATP from astrocytes in culture. *J Biol Chem* 278: 1354-62
- Cohen SJ, Stackman RWJ. 2015. Assessing rodent hippocampal involvement in the novel object recognition task. A review. *Behav Brain Res* 285: 105-17
- Colin A, Faideau M, Dufour N, Auregan G, Hassig R, et al. 2009. Engineered lentiviral vector targeting astrocytes in vivo. *Glia* 57: 667-79
- Colla M, Kronenberg G, Deuschle M, Meichel K, Hagen T, et al. 2007. Hippocampal volume reduction and HPA-system activity in major depression. *J Psychiatr Res* 41: 553-60
- Collignon F, Wetjen NM, Cohen-Gadol AA, Cascino GD, Parisi J, et al. 2006. Altered expression of connexin subtypes in mesial temporal lobe epilepsy in humans. *J Neurosurg* 105: 77-87
- Colyn L, Venzala E, Marco S, Perez-Otaño I, Tordera RM. 2019. Chronic social defeat stress induces sustained synaptic structural changes in the prefrontal cortex and amygdala. *Behav Brain Res*
- Condorelli DF, Trovato-Salinaro A, Mudò G, Mirone MB, Belluardo N. 2003. Cellular expression of connexins in the rat brain: neuronal localization, effects of kainate-induced seizures and expression in apoptotic neuronal cells. *Eur J Neurosci* 18: 1807-27
- Contreras JE, Sánchez HA, Eugenin EA, Speidel D, Theis M, et al. 2002. Metabolic inhibition induces opening of unapposed connexin 43 gap junction hemichannels and reduces gap junctional communication in cortical astrocytes in culture. *Proc Natl Acad Sci U S A* 99: 495-500

- Cornell-Bell AH, Finkbeiner SM, Cooper MS, Smith SJ. 1990. Glutamate induces calcium waves in cultured astrocytes: long-range glial signaling. *Science* 247: 470-73
- Corruble E, El Asmar K, Trabado S, Verstuyft C, Falissard B, et al. 2015. Treating major depressive episodes with antidepressants can induce or worsen metabolic syndrome: results of the METADAP cohort. *World Psychiatry* 14: 366-67
- Cotrina ML, Lin JH, Alves-Rodrigues A, Liu S, Li J, et al. 1998. Connexins regulate calcium signaling by controlling ATP release. *Proc Natl Acad Sci U S A* 95: 15735-40
- Cotter DR, Pariante CM, Everall IP. 2001. Glial cell abnormalities in major psychiatric disorders: the evidence and implications. *Brain Res Bull* 55: 585-95
- Cruikshank SJ, Hopperstad M, Younger M, Connors BW, Spray DC, Srinivas M. 2004. Potent block of Cx36 and Cx50 gap junction channels by mefloquine. *Proc Natl Acad Sci U S A* 101: 12364-69
- 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
- Cryan JF, Page ME, Lucki I. 2002. Noradrenergic lesions differentially alter the antidepressant-like effects of reboxetine in a modified forced swim test. *European Journal of Pharmacology* 436: 197-205
- Csölle C, Baranyi M, Zsilla G, Kittel A, Göllöncsér F, et al. 2013. Neurochemical Changes in the Mouse Hippocampus Underlying the Antidepressant Effect of Genetic Deletion of P2X7 Receptors. *PLoS One* 8
- Cuadra G, Zurita A, Gioino G, Molina V. 2001. Influence of different antidepressant drugs on the effect of chronic variable stress on restraint-induced dopamine release in frontal cortex. *Neuropsychopharmacology* 25: 384-94
- Cuijpers P, Van Straten A, Warmerdam L, Van Rooy MJ. 2010. Recruiting participants for interventions to prevent the onset of depressive disorders: possible ways to increase participation rates. *BMC Health Serv Res* 10
- Cullinan WE, Herman JP, Watson SJ. 1993. Ventral subicular interaction with the hypothalamic paraventricular nucleus: evidence for a relay in the bed nucleus of the stria terminalis. *J Comp Neurol* 332: 1-20

- Czéh B, Fuchs E, Wiborg O, Simon M. 2016. Animal models of major depression and their clinical implications. *Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry* 64: 293-310
- Czéh B, Müller-Keuker JI, Rygula R, Abumaria N, Hiemke C, et al. 2007. Chronic social stress inhibits cell proliferation in the adult medial prefrontal cortex: hemispheric asymmetry and reversal by fluoxetine treatment. *Neuropsychopharmacology* 32: 1490-503
- Czéh B, Simon M, Schmelting B, Hiemke C, Fuchs E. 2006. Astroglial plasticity in the hippocampus is affected by chronic psychosocial stress and concomitant fluoxetine treatment. *Neuropsychopharmacology* 31: 1616-26
- D'hondt C, Ponsaerts R, De Smedt H, Vinken M, De Vuyst E, et al. 2011. Pannexin channels in ATP release and beyond: an unexpected rendezvous at the endoplasmic reticulum. *Cell Signal* 23: 305-16.
- Daaka Y, Pitcher JA, Richardson M, Stoffel RH, Robishaw JD, Lefkowitz RJ. 1997. Receptor and G betagamma isoform-specific interactions with G protein-coupled receptor kinases. *Proc Natl Acad Sci U S A* 94: 2180-85
- Dahl J, Ormstad H, Aass HC, Malt UF, Bendz LT, et al. 2014. The plasma levels of various cytokines are increased during ongoing depression and are reduced to normal levels after recovery. *Psychoneuroendocrinology* 45
- Dallner C, Woods AG, Deller T, Kirsch M, Hofmann HD. 2002. CNTF and CNTF receptor alpha are constitutively expressed by astrocytes in the mouse brain. *Glia* 37: 374-78
- Daniele S, Zappelli E, Martini C. 2015. Trazodone regulates neurotrophic/growth factors, mitogen-activated protein kinases and lactate release in human primary astrocytes. *J Neuroinflammation* 12
- Dantzer R, O'Connor JC, Freund GG, Johnson RW, Kelley KW. 2008. From inflammation to sickness and depression: when the immune system subjugates the brain. *Nat Rev Neurosci* 9: 46-56
- Dao-Ung P, Skarratt KK, Fuller SJ, Stokes L. 2015. Paroxetine suppresses recombinant human P2X7 responses. *Purinergic Signal* 11: 481-90
- Darcet F, Mendez-David I, Tritschler L, Gardier AM, Guilloux JP, David DJ. 2014. Learning and memory impairments in a neuroendocrine mouse model of anxiety/depression. *Front Behav Neurosci* 8

- David DJ, Gardier AM. 2016. The pharmacological basis of the serotonin system: Application to antidepressant response. *Encephale* 42: 255-63
- David DJ, Samuels BA, Rainer Q, Wang IM, Marsteller D, et al. 2009. Neurogenesis-Dependent and -Independent Effects of Fluoxetine in an Animal Model of Anxiety/Depression. *Neuron*
- Davidson JS, Baumgarten IM. 1988. Glycyrrhetic acid derivatives: a novel class of inhibitors of gap-junctional intercellular communication. Structure-activity relationships. *J Pharmacol Exp Ther* 246: 1104-07
- Davidson JS, Baumgarten IM, Harley EH. 1986. Reversible inhibition of intercellular junctional communication by glycyrrhetic acid. *Biochem Biophys Res Commun* 134: 29-36
- Davidson RJ. 2003. Affective neuroscience and psychophysiology: toward a synthesis. *Psychophysiology* 40: 655-65
- Davidson RJ, Jackson DC, Kalin NH. 2000. Emotion, plasticity, context, and regulation: perspectives from affective neuroscience. *Psychol Bull* 126: 890-909
- Dazzi L, Seu E, Cherchi G, Biggio G. 2005. Chronic administration of the SSRI fluvoxamine markedly and selectively reduces the sensitivity of cortical serotonergic neurons to footshock stress. *Eur Neuropsychopharmacol* 15: 283-90
- De Kloet R, Wallach G, McEwen BS. 1975. Differences in corticosterone and dexamethasone binding to rat brain and pituitary. *Endocrinology* 96: 598-609
- De Vuyst E, Decrock E, Cabooter L, Dubyak GR, Naus CC, et al. 2006. Intracellular calcium changes trigger connexin 32 hemichannel opening. *EMBO J.* 25: 34-44
- De Vuyst E, Wang N, Decrock E, De Bock M, Vinken M, et al. 2009. Ca²⁺ regulation of connexin 43 hemichannels in C6 glioma and glial cells. *Cell Calcium* 46: 176-87
- Deacon RM, Rawlins JN. 2005. Hippocampal lesions, species-typical behaviours and anxiety in mice. *Behav Brain Research* 156: 241-49
- Dean B, Tawadros N, Scarr E, Gibbons AS. 2010. Regionally-specific changes in levels of tumour necrosis factor in the dorsolateral prefrontal cortex obtained postmortem from subjects with major depressive disorder. *J Affect Disord* 120: 245-48

- Decrock E, De Bock N, Wang N, Bultynck G, Giaume C, et al. 2015. Connexin and pannexin signaling pathways, an architectural blueprint for CNS physiology and pathology? *Cell Mol Life Sci* 72: 2823-51
- Delcourte S, Dkhissi-Benyahya O, Cooper H, Haddjeri N. 2017. Stress Models of Depression: A Question of Bad Timing. *eNeuro* 4
- Délèze J, Delage B, Hentati-Ksibi O, Verrecchia F, Hervé JC. 2001. Fluorescence recovery after photobleaching. *Methods Mol Biol* 154: 313-27
- Delvaeye T, Vandenabeele P, Bultynck G, Leybaert L, Krysko DV. 2018. Therapeutic Targeting of Connexin Channels: New Views and Challenges. *Trends Mol Med* 24: 1036-53
- Demuyser T, Bentea E, Deneyer L, Albertini G, Massie A, Smolders I. 2016. Disruption of the HPA-axis through corticosterone-release pellets induces robust depressive-like behavior and reduced BDNF levels in mice. *Neurosci Lett* 626: 119-25
- Dere E, De Souza-Silva MA, Frisch C, Teubner B, Söhl G, et al. 2003. Connexin30-deficient mice show increased emotionality and decreased rearing activity in the open-field along with neurochemical changes. *Eur J Neurosci* 18: 629-38
- Dermietzel R, Traub O, Hwang TK, Beyer E, Bennett MV, et al. 1989. Differential expression of three gap junction proteins in developing and mature brain tissues. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 86: 10148-52
- Deshpande T, Li T, Herde MK, Becker A, Vatter H, et al. 2017. Subcellular reorganization and altered phosphorylation of the astrocytic gap junction protein connexin43 in human and experimental temporal lobe epilepsy. *Glia* 65: 1809-20
- DeWitt DA, Perry G, Cohen M, Doller C, Silver J. 1998. Astrocytes regulate microglial phagocytosis of senile plaque cores of Alzheimer's disease. *Exp Neurol* 149: 329-40
- Dhein S. 2004. Pharmacology of gap junctions in the cardiovascular system. *Cardiovasc Res* 62: 287-98
- Di Benedetto B, Malik VA, Begum S, Jablonowski L, Gómez-González GB, et al. 2016. Fluoxetine Requires the Endfeet Protein Aquaporin-4 to Enhance Plasticity of Astrocyte Processes. *Front Cell Neurosci* 10

- Di Cesare Mannelli L, Marcoli M, Micheli L, Zanardelli M, Maura G, et al. 2015. Oxaliplatin evokes P2X7-dependent glutamate release in the cerebral cortex: A pain mechanism mediated by Pannexin 1. *Neuropharmacology* 97: 133-41
- Dildy-Mayfield JE, Mihic SJ, Liu Y, Deitrich RA, Harris RA. 1996. Actions of long chain alcohols on GABAA and glutamate receptors: relation to in vivo effects. *Br J Pharmacol* 118: 378-84
- Disease GBD, Injury I, Prevalence C. 2017. Global, regional, and national incidence, prevalence, and years lived with disability for 328 diseases and injuries for 195 countries, 1990-2016: a systematic analysis for the Global Burden of Disease Study 2016. *Lancet* 390: 1211-59
- Dorn G, Patel S, Wotherspoon G, Hemmings-Mieszczak M, Barclay J, et al. 2000. siRNA relieves chronic neuropathic pain. *Nucleic Acids Res* 32
- Dossi E, Vasile F, Rouach N. 2018. Human astrocytes in the diseased brain. *Brain Res Bull* 136: 139-56
- Dournes C, Beeské S, Belzung C, Griebel G. 2013. Deep brain stimulation in treatment-resistant depression in mice: comparison with the CRF1 antagonist, SSR125543. *Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry* 40
- Dowlati Y, Herrmann N, Swardfager W, Liu H, Sham L, et al. 2010. A meta-analysis of cytokines in major depression. *Biol Psychiatry* 67: 446-57
- Drevets WC, Price JL, Bardgett ME, Reich T, Todd RD, Raichle ME. 2002. Glucose metabolism in the amygdala in depression: relationship to diagnostic subtype and plasma cortisol levels. *Pharmacol Biochem Behav* 71: 431-47
- Drevets WC, Videen TO, Price JL, Preskorn SH, Carmichael ST, Raichle ME. 1992. A functional anatomical study of unipolar depression. *J Neurosci* 12: 3628-41
- Du Jardin KG, Müller HK, Elfving B, Dale E, Wegener G, Sanchez C. 2016. Potential involvement of serotonergic signaling in ketamine's antidepressant actions: A critical review. *Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry* 71
- Duan S, Anderson CM, Keung EC, Chen Y, Chen Y, Swanson RA. 2003. P2X7 receptor-mediated release of excitatory amino acids from astrocytes. *J Neurosci* 23: 1320-28

- Ducottet C, Belzung C. 2004. Behaviour in the elevated plus-maze predicts coping after subchronic mild stress in mice. *Physiol Behav* 81: 417-26
- Ducottet C, Griebel G, Belzung C. 2003. Effects of the selective nonpeptide corticotropin-releasing factor receptor 1 antagonist antalarmin in the chronic mild stress model of depression in mice. *Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry* 27: 625-31
- Duman RS. 2002. Pathophysiology of depression: the concept of synaptic plasticity. *Eur Psychiatry* 17
- Duman RS. 2018. Ketamine and rapid-acting antidepressants: a new era in the battle against depression and suicide. *F1000Res*. 7
- Duman RS, Heninger GR, Nestler EJ. 1997. A molecular and cellular theory of depression. *Arch Gen Psychiatry* 54: 597-606
- Dunham JS, Deakin JF, Miyajima F, Payton A, Toro CT. 2009. Expression of hippocampal brain-derived neurotrophic factor and its receptors in Stanley consortium brains. *J Psychiatr Res* 43: 1175-84
- Durkee CA, Araque A. 2019. Diversity and Specificity of Astrocyte-neuron Communication. *Neuroscience* 396: 73-78
- Edgar N, Sibille E. 2012. A putative functional role for oligodendrocytes in mood regulation. *Transl Psychiatry* 2
- Edgar NM, Touma C, Palme R, Sibille E. 2011. Resilient emotionality and molecular compensation in mice lacking the oligodendrocyte-specific gene *Cnp1*. *Transl Psychiatry* 1
- El-Fouly MH, Trosko JE, Chang CC. 1987. Scrape-loading and dye transfer. A rapid and simple technique to study gap junctional intercellular communication. *Exp Cell Res* 168: 422-30
- Elekes O, Venema K, Postema F, Dringen R, Hamprecht B, Korf J. 1996. Evidence that stress activates glial lactate formation in vivo assessed with rat hippocampus lactography. *Neurosci Lett* 208: 69-72
- Elisevich K, Rempel SA, Smith BJ, Edvardsen K. 1997. Hippocampal connexin 43 expression in human complex partial seizure disorder. *Exp Neurol* 145: 154-64

- Elsayed M, Magistretti PJ. 2015. A New Outlook on Mental Illnesses: Glial Involvement Beyond the Glue. *Frontiers in Cellular Neuroscience*
- Encinas JM, Hamani C, Lozano AM, Enikolopov G. 2011. Neurogenic hippocampal targets of deep brain stimulation. *J Comp Neurol* 519: 6-20
- Engleman EA, Perry KW, Mayle DA, Wong DT. 1995. Simultaneous increases of extracellular monoamines in microdialysates from hypothalamus of conscious rats by duloxetine, a dual serotonin and norepinephrine uptake inhibitor. *Neuropsychopharmacology* 12: 287-95
- Enkel T, Gholizadeh D, Von Bohlen Und Halbach O, Sanchis-Segura C, Hurlemann R, et al. 2010. Ambiguous-cue interpretation is biased under stress- and depression-like states in rats. *Neuropsychopharmacology* 35: 1008-15
- Ennaceur A, Delacour J. 1988. A new one-trial test for neurobiological studies of memory in rats. 1: Behavioral data. *Behav Brain Res* 31: 47-59
- Ennaceur A, Neave N, Aggleton JP. 1997. Spontaneous object recognition and object location memory in rats: the effects of lesions in the cingulate cortices, the medial prefrontal cortex, the cingulum bundle and the fornix. *Exp Brain Res* 113: 509-19
- Entsuaeh AR, Rudolph RL, Hackett D, Miska S. 1996. Efficacy of venlafaxine and placebo during long-term treatment of depression: a pooled analysis of relapse rates. *Int Clin Psychopharmacol* 11: 137-45
- Eriksen JL, Druse MJ. 2001. Potential involvement of S100B in the protective effects of a serotonin-1a agonist on ethanol-treated astrocytes. *Brain Res Dev Brain Res* 128: 157-64
- Eriksen JL, Gillespie R, Druse MJ. 2002. Effects of ethanol and 5-HT1A agonists on astroglial S100B. *Brain Res Dev Brain Res* 139: 97-105
- Ernst C, Nagy C, Kim S, Yang JP, Deng X, et al. 2011. Dysfunction of Astrocyte Connexins 30 and 43 in Dorsal Lateral Prefrontal Cortex of Suicide Completers. *Biol Psychiatry*
- Eskandari S, Zampighi GA, Leung DW, Wright EM, Loo DD. 2002. Inhibition of gap junction hemichannels by chloride channel blockers. *J Membr Biol* 185: 93-102
- Etiévant A, Lucas G, Dkhissi-Benyahya O, Haddjeri N. 2016. The Role of Astroglia in the Antidepressant Action of Deep Brain Stimulation. *Front Cell Neurosci.* 9

- Etiévant A, Oosterhof C, Bétry C, Abrial E, Novo-Perez M, et al. 2015. Astroglial Control of the Antidepressant-Like Effects of Prefrontal Cortex Deep Brain Stimulation. *EBioMedicine* 2: 898-908
- Eugenín EA, Eckardt D, Theis M, Willecke K, Bennett MV, Saez JC. 2001. Microglia at brain stab wounds express connexin 43 and in vitro form functional gap junctions after treatment with interferon-gamma and tumor necrosis factor-alpha. *Proc Natl Acad Sci U S A* 98: 4190-95
- Evans WH, Boitano S. 2001. Connexin mimetic peptides: specific inhibitors of gap-junctional intercellular communication. *Biochemical Society Transactions* 29
- Falk MM, Bell CL, Kells Andrews RM, Murray SA. 2016. Molecular mechanisms regulating formation, trafficking and processing of annular gap junctions. *BMC Cell Biol* 17
- Fan Y, Chen P, Li Y, Cui K, Noel DM, et al. 2014. Corticosterone administration up-regulated expression of norepinephrine transporter and dopamine β -hydroxylase in rat locus coeruleus and its terminal regions. *J Neurochem* 128: 445-58
- Faqui AE, Memon RI, Hafeez H, Zeshan M, Naveed S. 2019. A Review of Novel Antidepressants: A Guide for Clinicians. *Cureus* 11: 4185
- Farhy-Tselnicker I, Allen NJ. 2018. Astrocytes, neurons, synapses: a tripartite view on cortical circuit development. *Neural Dev* 13
- Farooq RK, Tanti A, Ainouche S, Roger S, Belzung C, Camus V. 2018. A P2X7 receptor antagonist reverses behavioural alterations, microglial activation and neuroendocrine dysregulation in an unpredictable chronic mild stress (UCMS) model of depression in mice. *Psychoneuroendocrinology* 97
- Farrell C, O'Keane V. 2016. Epigenetics and the glucocorticoid receptor: A review of the implications in depression. *Psychiatry Res* 242: 349-56
- Fatemi SH, Folsom TD, Reutiman TJ, Pandian T, Braun NN, Haug K. 2008. Chronic psychotropic drug treatment causes differential expression of connexin 43 and GFAP in frontal cortex of rats. *Schizophr Res* 104: 127-34
- Feldman S, Weidenfeld J. 1995. NEURAL MECHANISMS INVOLVED IN THE CORTICOSTEROID FEEDBACK EFFECTS ON THE HYPOTHALAMO-PITUITARY-ADRENOCORTICAL AXIS. *Progress in Neurobiology* 45: 129-41

- Fellin T, Pascual O, Gobbo S, Pozzan T, Haydon PG, Carmignoto G. 2004. Neuronal synchrony mediated by astrocytic glutamate through activation of extrasynaptic NMDA receptors. *Neuron* 43: 729-43
- Fellin T, Pascual O, Haydon PG. 2006. Astrocytes coordinate synaptic networks: balanced excitation and inhibition. *Physiology (Bethesda)* 21: 208-15.
- Fernandez-Fernandez S, Almeida A, Bolaños JP. 2012. Antioxidant and bioenergetic coupling between neurons and astrocytes. *Biochem J.* 443: 3-11
- Ferrés-Coy A, Santana N, Castañé A, Cortés R, Carmona MC, et al. 2013. Acute 5-HT_{1A} autoreceptor knockdown increases antidepressant responses and serotonin release in stressful conditions. *Psychopharmacology* 225: 61-67
- Finkbeiner S. 1992. Calcium waves in astrocytes-filling in the gaps. *Neuron* 8: 1101-08
- Fischette CT, Komisaruk BR, Edinger HM, Feder HH, Siegel A. 1980. Differential fornix ablations and the circadian rhythmicity of adrenal corticosteroid secretion. *Brain Res* 195: 373-87
- Forte A, Baldessarini RJ, Tondo L, Vázquez GH, Pompili M, Girardi P. 2015. Long-term morbidity in bipolar-I, bipolar-II, and unipolar major depressive disorders. *J Affect Disord* 178: 71-78
- Francis D, Diorio J, LaPlante P, Weaver S, Seckl JR, Meaney MJ. 1996. The role of early environmental events in regulating neuroendocrine development. Moms, pups, stress, and glucocorticoid receptors. *Ann N Y Acad Sci* 794: 136-52
- Francis PT, Poynton A, Lowe SL, Najlerahim A, Bridges PK, et al. 1989. Brain amino acid concentrations and Ca²⁺-dependent release in intractable depression assessed antemortem. *Brain Res* 494: 315-24
- Frank E, Prien RF, Jarrett RB, Keller MB, Kupfer DJ, et al. 1991. Conceptualization and rationale for consensus definitions of terms in major depressive disorder. Remission, recovery, relapse, and recurrence. *Arch Gen Psychiatry* 48: 851-55
- Franklin KBG, Paxinos G. 2000. *The Mouse Brain in Stereotaxic Coordinates* pp. 256. USA.
- Frisch C, Theis M, De Souza Silva MA, Dere E, Söhl G, et al. 2003. Mice with astrocyte-directed inactivation of connexin43 exhibit increased exploratory behaviour,

- impaired motor capacities, and changes in brain acetylcholine levels. *Eur J Neurosci* 18: 2313-18
- Frodl T, Meisenzahl EM, Zetzsche T, Born C, Jäger M, et al. 2003. Larger amygdala volumes in first depressive episode as compared to recurrent major depression and healthy control subjects. *Biol Psychiatry* 53: 338-44.
- Fujii Y, Maekawa S, Morita M. 2018. Astrocyte calcium waves propagate proximally by gap junction and distally by extracellular diffusion of ATP released from volume-regulated anion channels. *Sci Rep* 7
- Furr A, Lapiz-Bluhm MD, Morilak DA. 2012. 5-HT_{2A} receptors in the orbitofrontal cortex facilitate reversal learning and contribute to the beneficial cognitive effects of chronic citalopram treatment in rats. *Int J Neuropsychopharmacol* 15: 1295-305
- Gajardo-Gómez R, Labra VC, Maturana CJ, Shoji KF, Santibañez CA, et al. 2017. Cannabinoids prevent the amyloid β -induced activation of astroglial hemichannels: A neuroprotective mechanism. *Glia* 65: 122-37
- García-Cáceres C, Quarta C, Varela L, Gao Y, Gruber T, et al. 2016. Astrocytic Insulin Signaling Couples Brain Glucose Uptake with Nutrient Availability. *Cell* 166: 867-80
- Gardner-Medwin AR. 1983a. Analysis of potassium dynamics in mammalian brain tissue. *J Physiol* 335: 393-426
- Gardner-Medwin AR. 1983b. A study of the mechanisms by which potassium moves through brain tissue in the rat. *J Physiol* 335: 353-74
- Gardner-Medwin AR, Nicholson C. 1983. Changes of extracellular potassium activity induced by electric current through brain tissue in the rat. *J Physiol* 335: 375-92
- Gareri P, Condorelli D, Belluardo N, Russo E, Loiacono A, et al. 2004. Anticonvulsant effects of carbenoxolone in genetically epilepsy prone rats (GEPRs). *Neuropharmacology* 47: 1205-16
- Garré JM, Yang G, Bukauskas FF, Bennett MV. 2016. FGF-1 Triggers Pannexin-1 Hemichannel Opening in Spinal Astrocytes of Rodents and Promotes Inflammatory Responses in Acute Spinal Cord Slices. *J Neurosci* 36: 4785-801

- Ge WP, Duan S. 2007. Persistent enhancement of neuron-glia signaling mediated by increased extracellular K⁺ accompanying long-term synaptic potentiation. *J Neurophysiol* 97: 2564-69
- Georgotas A. 1985. Affective disorders: pharmacotherapy. *Compr Psychiatry* 4: 821–33
- Gerhard DM, Wohleb ES, Duman RS. 2015. Emerging treatment mechanisms for depression: focus on glutamate and synaptic plasticity. *Drug Discov Today* 21: 454-64
- Gerlai R, McNamara A, Choi-Lundberg DL, Armanini M, Ross J, et al. 2001. Impaired water maze learning performance without altered dopaminergic function in mice heterozygous for the GDNF mutation. *Eur J Neurosci* 14: 1153-63
- Gesing A, Bilanz-Bleuel A, Droste SK, Linthorst AC, Holsboer F, Reul JM. 2001. Psychological stress increases hippocampal mineralocorticoid receptor levels: involvement of corticotropin-releasing hormone. *J Neurosci* 21: 4822-29
- Ghaemi A, Alizadeh L, Babaei S, Jafarian M, Khaleghi Ghadiri M, et al. 2018. Astrocyte-mediated inflammation in cortical spreading depression. *Cephalalgia* 38: 626-38
- Giaume C, Fromaget C, El Aoumari A, Cordier J, Glowinski J, Gros D. 1991a. Gap junctions in cultured astrocytes: single-channel currents and characterization of channel-forming protein. *Neuron* 6: 133-43
- Giaume C, Koulakoff A, Roux L, Holcman D, Rouach N. 2001. Astroglial networks: a step further in neuroglial and gliovascular interactions. *Nature Rev* 2
- Giaume C, Leybaert L, Naus CC, Sáez JC. 2013. Connexin and pannexin hemichannels in brain glial cells: properties, pharmacology, and roles. *Front Pharmacol* 4: 88
- Giaume C, Liu X. 2012. From a glial syncytium to a more restricted and specific glial networking. *J Physiol Paris* 06: 34-39
- Giaume C, Marin P, Cordier J, Glowinski J, Premont J. 1991b. Adrenergic regulation of intercellular communications between cultured striatal astrocytes from the mouse. *Proc Natl Acad Sci U S A* 88: 5577-781
- Giaume C, Theis M. 2010. Pharmacological and genetic approaches to study connexin-mediated channels in glial cells of the central nervous system. *Brain Research Reviews* 63: 160-76

- Gilabert-Juan J, Castillo-Gomez E, Pérez-Rando M, Moltó MD, Nacher J. 2011. Chronic stress induces changes in the structure of interneurons and in the expression of molecules related to neuronal structural plasticity and inhibitory neurotransmission in the amygdala of adult mice. *Exp Neurol* 232: 33-40
- Glaser R, Kiecolt-Glaser JK. 2005. Stress-induced immune dysfunction: implications for health. *Nat Rev Immunol* 5: 243-51
- Godfrin KA, Van Heeringen C. 2010. The effects of mindfulness-based cognitive therapy on recurrence of depressive episodes, mental health and quality of life: A randomized controlled study. *Behav Res Ther* 48: 738-46
- Gold PW. 2015. The organization of the stress system and its dysregulation in depressive illness. *Mol Psychiatry* 20: 32-47
- Goldberg D, Privett M, Ustun B, Simon G, Linden M. 1998. The effects of detection and treatment on the outcome of major depression in primary care: a naturalistic study in 15 cities. *Br J Gen Pract* 48: 1840-44
- Goldberg GS, Moreno AP, Bechberger JF, Hearn SS, Shivers RR, et al. 1996. Evidence that disruption of connexon particle arrangements in gap junction plaques is associated with inhibition of gap junctional communication by a glycyrrhetic acid derivative. *Exp Cell Res*. 222: 48-53
- Goldberg GS, Moreno AP, Lampe PD. 2002. Gap junctions between cells expressing connexin 43 or 32 show inverse permselectivity to adenosine and ATP. *J Biol Chem* 277: 36725-30
- Golden SA, Covington HE, Berton O, J. RS. 2011. A standardized protocol for repeated social defeat stress in mice. *Nat Protoc* 6: 1183-91
- Gómez-Galán M, De Bundel D, Van Eeckhaut A, Smolders I, Lindskog M. 2013. Dysfunctional astrocytic regulation of glutamate transmission in a rat model of depression. *Mol Psychiatry* 18: 582-94
- Gonçalves FM, Neis VB, Rieger DK, Lopes MW, Heinrich IA, et al. 2017. Signaling pathways underlying the antidepressant-like effect of inosine in mice. *Purinergic Signal* 13: 203-14
- Gong Y, Sun XL, Wu FF, Su CJ, Ding JH, Hu G. 2012. Female early adult depression results in detrimental impacts on the behavioral performance and brain development in offspring. *CNS Neurosci Ther* 18: 461-70

- Goodman T, Trouche S, Massou I, Verret L, Zerwas M, et al. 2010. Young hippocampal neurons are critical for recent and remote spatial memory in adult mice. *Neuroscience* 171: 769-78
- Gordon GR, Baimoukhametova DV, Hewitt SA, Rajapaksha WR, Fisher TE, Bains JS. 2005. Norepinephrine triggers release of glial ATP to increase postsynaptic efficacy. *Nat Neurosci* 8: 1078-86
- Gorman JM, Docherty JP. 2010. A hypothesized role for dendritic remodeling in the etiology of mood and anxiety disorders. *J Neuropsychiatry Clin Neurosci* 22: 256-64
- Gourley SL, Espitia JW, Sanacora G, Taylor JR. 2012. Antidepressant-like properties of oral riluzole and utility of incentive disengagement models of depression in mice. *Psychopharmacology* 219: 805-14
- Gourley SL, Kiraly DD, Howell JL, Olausson P, Taylor JR. 2008. Acute hippocampal brain-derived neurotrophic factor restores motivational and forced swim performance after corticosterone. *Biol Psychiatry* 64: 884-90
- Granvil CP, Krausz KW, Gelboin HV, Idle JR, Gonzalez FJ. 2002. 4-Hydroxylation of debrisoquine by human CYP1A1 and its inhibition by quinidine and quinine. *J Pharmacol Exp Ther* 301: 1025-32
- Griebel G, Belzung C, Misslin R, Vogel E. 1993. The free-exploratory paradigm: an effective method for measuring neophobic behaviour in mice and testing potential neophobia-reducing drugs. *Behav Pharmacol* 4: 637-44
- Guan X, Wilson S, Schlender KK, Ruch RJ. 1996. Gap-junction disassembly and connexin 43 dephosphorylation induced by 18 beta-glycyrrhetic acid. *Mol Carcinog* 16: 157-64
- Guiard BP, Chenu F, El Mansari M, Blier P. 2011. Characterization of the electrophysiological properties of triple reuptake inhibitors on monoaminergic neurons. *Int J Neuropsychopharmacol* 14: 211-23
- Guiard BP, El Mansari M, Blier P. 2009. Prospect of a dopamine contribution in the next generation of antidepressant drugs: the triple reuptake inhibitors. *Curr Drug Targets* 10: 1069-184
- Guiard BP, Lanfumey L, Gardier AM. 2006. Microdialysis approach to study serotonin outflow in mice following selective serotonin reuptake inhibitors and substance P

(neurokinin 1) receptor antagonist administration: a review. *Curr Drug Targets* 7: 187-201

Guilloux J-P, Seney M, Edgar N, Sibille E. 2011a. Integrated behavioral z-scoring increases the sensitivity and reliability of behavioral phenotyping in mice: Relevance to emotionality and sex. *Journal of Neuroscience Methods* 197: 21-31

Guilloux JP, David DJ, Guiard BP, Chenu F, Repérant C, et al. 2006. Blockade of 5-HT_{1A} receptors by (+/-)-pindolol potentiates cortical 5-HT outflow, but not antidepressant-like activity of paroxetine: microdialysis and behavioral approaches in 5-HT_{1A} receptor knockout mice. *Neuropsychopharmacology* 31: 2162-72

Guilloux JP, Douillard-Guilloux G, Kota R, Wang X, Gardier AM, et al. 2012. Molecular evidence for BDNF- and GABA-related dysfunctions in the amygdala of female subjects with major depression. *Mol Psychiatry* 17: 1130-42

Guilloux JP, Mendez-David I, Pehrson A, Guiard BP, Repérant C, et al. 2013. Antidepressant and anxiolytic potential of the multimodal antidepressant vortioxetine (LuAA21004) assessed by behavioural and neurogenesis outcomes in mice. *Neuropharmacology* 73

Guilloux JP, Seney M, Edgar N, Sibille E. 2011b. Integrated behavioral z-scoring increases the sensitivity and reliability of behavioral phenotyping in mice: relevance to emotionality and sex. *J Neurosci Methods* 197

Guthrie PB, Knappenberger J, Segal M, Bennett MV, Charles AC, Kater SB. 1999. ATP released from astrocytes mediates glial calcium waves. *J Neurosci* 19: 520-28

Haapakoski R, Mathieu J, Ebmeier KP, Alenius H, Kivimäki M. 2015. Cumulative meta-analysis of interleukins 6 and 1 β , tumour necrosis factor α and C-reactive protein in patients with major depressive disorder. *Brain Behav Immun* 49: 206-15

Hache G, Guiard BP, Le Dantec Y, Orvoën S, David DJ, et al. 2012. Antinociceptive effects of fluoxetine in a mouse model of anxiety/depression. *Neuroreport* 23

Haddjeri N, Ortemann C, De Montigny C, Blier P. 1999. Effect of sustained administration of the 5-HT_{1A} receptor agonist flesinoxan on rat 5-HT neurotransmission. *Eur Neuropsychopharmacol* 9: 427-40

- Haghighi M, Ludyga S, Rahimi B, Jahangard L, Ahmadpanah M, et al. 2017. In patients suffering from major depressive disorders, quantitative EEG showed favorable changes in left and right prefrontal cortex. *Psychiatry Res* 251: 137-41
- Haj-Yasein NN, Vindedal GF, Eilert-Olsen M, Gundersen GA, Skare Ø, et al. 2011. Glial-conditional deletion of aquaporin-4 (Aqp4) reduces blood-brain water uptake and confers barrier function on perivascular astrocyte endfeet. *Proc Natl Acad Sci U S A* 108: 17815-20
- Hamidi M, Drevets WC, Price JL. 2004. Glial reduction in amygdala in major depressive disorder is due to oligodendrocytes. *Biol Psychiatry* 55: 563-69
- Hamon M. 1994. Neuropharmacology of anxiety: perspectives and prospects. *Trends Pharmacol Sci* 15: 36-39
- Hamon M, Blier P. 2013. Monoamine neurocircuitry in depression and strategies for new treatments. *Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry* 45
- Hansson E, Eriksson P, Nilsson M. 1985. Amino acid and monoamine transport in primary astroglial cultures from defined brain regions. *Neurochem Res* 10: 1335-41
- Harada K, Yamaji T, Matsuoka N. 2008. Activation of the serotonin 5-HT_{2C} receptor is involved in the enhanced anxiety in rats after single-prolonged stress. *Pharmacol Biochem Behav* 89: 11-16
- Harks EG, De Roos AD, Peters PH, De Haan LH, Brouwer A, et al. 2001. Fenamates: a novel class of reversible gap junction blockers. *J Pharmacol Exp Ther* 298: 1033-41
- Haroon E, Raison CL, Miller AH. 2012. Psychoneuroimmunology meets neuropsychopharmacology: translational implications of the impact of inflammation on behavior. *Neuropsychopharmacology* 37: 137-62
- Hasegawa H, Ma T, Skach W, Matthay MA, Verkman AS. 1994. Molecular cloning of a mercurial-insensitive water channel expressed in selected water-transporting tissues. *J Biol Chem* 269: 5497-500
- Hashimoto K, Sawa A, Iyo M. 2007. Increased levels of glutamate in brains from patients with mood disorders. *Biol Psychiatry* 62: 1310-16

- Hatherall L, Sánchez C, Morilak DA. 2017. Chronic Vortioxetine Treatment Reduces Exaggerated Expression of Conditioned Fear Memory and Restores Active Coping Behavior in Chronically Stressed Rats. *Int J Neuropsychopharmacol* 20: 316-23
- He Z, Lu F, Sheng W, Han S, Long Z, et al. 2019. Functional dysconnectivity within the emotion-regulating system is associated with affective symptoms in major depressive disorder: A resting-state fMRI study. *Aust N Z J Psychiatry* 53: 528-39
- Heine VM, Maslam S, Zareno J, Joëls M, Lucassen PJ. 2004. Suppressed proliferation and apoptotic changes in the rat dentate gyrus after acute and chronic stress are reversible. *Eur J Neurosci*
- Hejjas K, Szekely A, Domotor E, Halmai Z, Balogh G, et al. 2009. Association between depression and the Gln460Arg polymorphism of P2RX7 gene: a dimensional approach. *Am J Med Genet B Neuropsychiatr Genet* 150B: 295-99
- Heller JP, Rusakov DA. 2015. Morphological plasticity of astroglia: Understanding synaptic microenvironment. *Glia* 63: 2133-51
- Henderson CE, Phillips HS, Pollock RA, Davies AM, Lemeulle C, et al. 1994. GDNF: a potent survival factor for motoneurons present in peripheral nerve and muscle. *Science* 266: 1062-64
- Henneberger C, Papouin T, Oliet SH, Rusakov DA. 2010. Long-term potentiation depends on release of D-serine from astrocytes. *Nature* 463: 232-36
- Herculano-Houzel S. 2014. The glia/neuron ratio: how it varies uniformly across brain structures and species and what that means for brain physiology and evolution. *Glia* 62: 1377-91
- Herman JP, Cullinan WE. 1997. Neurocircuitry of stress: central control of the hypothalamo-pituitary-adrenocortical axis. *Trends Neurosci* 20: 78-84
- Herman JP, Dolgas CM, Carlson SL. 1998. Ventral subiculum regulates hypothalamo-pituitary-adrenocortical and behavioural responses to cognitive stressors. *Neuroscience* 86: 449-59
- Herman JP, Figueiredo H, Mueller NK, Ulrich-Lai Y, Ostrander MM, et al. 2003. Central mechanisms of stress integration: hierarchical circuitry controlling hypothalamo-pituitary-adrenocortical responsiveness. *Front Neuroendocrinol* 24: 151-80

- Herrero-González S, Valle-Casuso JC, Sánchez-Alvarez R, Giaume C, Medina JM, Tabernero A. 2009. Connexin43 Is Involved in the Effect of Endothelin-1 on Astrocyte Proliferation and Glucose Uptake. *Glia* 57: 222-33
- Hertz L. 1965. Possible role of neuroglia: a potassium-mediated neuronal-neuroglial-neuronal impulse transmission system. *Nature* 206: 1091-94
- Hervás I, Artigas F. 1998. Effect of fluoxetine on extracellular 5-hydroxytryptamine in rat brain. Role of 5-HT autoreceptors. *Eur J Pharmacol* 358: 9-18
- Hervé JC, Derangeon M, Sarrouilhe D, Giepmans BN, Bourmeyster N. 2012. Gap junctional channels are parts of multiprotein complexes. *Biochim Biophys Acta*. 1818: 1844-65
- Hervé JC, Sarrouilhe D. 2005. Connexin-made channels as pharmacological targets. *Curr Pharm Des* 11: 1941-58
- Higashi Y, Segawa S, Matsuo T, Nakamura S, Kikkawa Y, et al. 2011. Microglial zinc uptake via zinc transporters induces ATP release and the activation of microglia. *Glia* 59: 1933-45
- Hill MN, Brotto LA, Lee TT, Gorzalka BB. 2003. Corticosterone attenuates the antidepressant-like effects elicited by melatonin in the forced swim test in both male and female rats. *Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry* 27
- Hines DJ, Schmitt LI, Hines RM, Moss SJ, Haydon PG. 2013. Antidepressant effects of sleep deprivation require astrocyte-dependent adenosine mediated signaling. *Transl Psychiatry*. 3
- Hisaoka K, M. T, Tsuchioka M, Maeda N, Nakata Y, Yamawaki S. 2007. Antidepressants increase glial cell line-derived neurotrophic factor production through monoamine-independent activation of protein tyrosine kinase and extracellular signal-regulated kinase in glial cells. *J Pharmacol Exp Ther* 321: 148-57
- Hisaoka K, Nishida A, Takebayashi M, Koda T, Yamawaki S, Nakata Y. 2004. Serotonin increases glial cell line-derived neurotrophic factor release in rat C6 glioblastoma cells. *Brain Res* 1002: 167-70
- Hodes GE, Pfau ML, Leboeuf M, Golden SA, Christoffel DJ, et al. 2014. Individual differences in the peripheral immune system promote resilience versus susceptibility to social stress. *Proc Natl Acad Sci U S A* 111: 16136-41

- Hofer A, Dermietzel R. 1998. Visualization and functional blocking of gap junction hemichannels (connexons) with antibodies against external loop domains in astrocytes. *Glia* 24: 141-54
- Höfer T, Venance L, Giaume C. 2002. Control and plasticity of intercellular calcium waves in astrocytes: a modeling approach. *J Neurosci* 22: 4850-59
- Holmes A. 2003. Mouse behavioral models of anxiety and depression. In *Mouse behavioral phenotyping*, ed. C JN, pp. 43–47. Washington: Society for Neuroscience
- Holsboer F. 2000. The stress hormone system is back on the map. *Curr Psychiatry Rep* 2: 454-56
- Holsboer F. 2001. Stress, hypercortisolism and corticosteroid receptors in depression: implications for therapy. *J Affect Disord.* 62
- Holtzheimer PE, Mayberg HS. 2011. Stuck in a rut: rethinking depression and its treatment. *Trends Neurosci* 34: 1-9
- Horch HW. 2004. Local effects of BDNF on dendritic growth. *Rev Neurosci* 15: 117-29
- Hösli E, Hösli L. 1995. Autoradiographic studies on the uptake of 3H-noradrenaline and 3H-serotonin by neurones and astrocytes in explant and primary cultures of rat CNS: effects of antidepressants. *Int J Dev Neurosci* 13: 897-908
- Huang D, Li C, Qin J, Hu C, Jiang W. 2019a. Dysfunction of astrocytic connexins 30 and 43 in the medial prefrontal cortex and hippocampus mediates depressive-like behaviours. *Behav Brain Research*
- Huang J, Gadotti VM, Chen L, Souza IA, Huang S, et al. 2019b. A neuronal circuit for activating descending modulation of neuropathic pain. *Nat Neurosci.*
- Hyder F, Patel AB, Gjedde A, Rothman DL, Behar KL, Shulman RG. 2006. Neuronal-glia glucose oxidation and glutamatergic-GABAergic function. *J Cereb Blood Flow Metab* 26: 865-77
- Hyman SE, Nestler EJ. 1996. Initiation and adaptation: a paradigm for understanding psychotropic drug action. *Am J Psychiatry.* 153

- Iacobas DA, Iacobas S, Urban-Maldonado M, Scemes E, Spray DC. 2008. Similar transcriptomic alterations in Cx43 knockdown and knockout astrocytes. *Cell Commun Adhes* 15: 195-206
- Ibrahim L, Diazgranados N, Franco-Chaves J, Brutsche N, Henter ID, et al. 2012. Course of improvement in depressive symptoms to a single intravenous infusion of ketamine vs add-on riluzole: results from a 4-week, double-blind, placebo-controlled study. *Neuropsychopharmacology* 37: 1526-33
- Inazu M, Takeda H, Ikoshi H, Sugisawa M, Uchida Y, Matsumiya T. 2001. Pharmacological characterization and visualization of the glial serotonin transporter. *Neurochem Int* 39: 39-49
- Inazu M, Takeda H, Matsumiya T. 2003. Functional expression of the norepinephrine transporter in cultured rat astrocytes. *J Neurochem* 84: 136-44
- Ishikawa M, Iwamoto T, Nakamura T, Doyle A, Fukumoto S, Yamada Y. 2011. Pannexin 3 functions as an ER Ca(2+) channel, hemichannel, and gap junction to promote osteoblast differentiation. *J Cell Biol* 193: 1257-74
- Isingrini E, Camus V, Le Guisquet AM, Pingaud M, Devers S, Belzung C. 2010. Association between repeated unpredictable chronic mild stress (UCMS) procedures with a high fat diet: a model of fluoxetine resistance in mice. *PLoS One* 5
- Itoh T, Saito T, Fujimura M, Watanabe S, Saito K. 1993. Restraint stress-induced changes in endogenous zinc release from the rat hippocampus. *Brain Res* 618: 318-22
- Iwamoto T, Nakamura T, Doyle A, Ishikawa M, De Vega S, et al. 2010. Pannexin 3 regulates intracellular ATP/cAMP levels and promotes chondrocyte differentiation. *J Biol Chem* 285: 18948-58
- Jacobsen JP, Mørk A. 2006. Chronic corticosterone decreases brain-derived neurotrophic factor (BDNF) mRNA and protein in the hippocampus, but not in the frontal cortex, of the rat. *Brain Res* 1110: 221-25
- Jakoby P, Schmidt E, Ruminot I, Gutiérrez R, Barros LF, Deitmer JW. 2014. Higher transport and metabolism of glucose in astrocytes compared with neurons: a multiphoton study of hippocampal and cerebellar tissue slices. *Cereb Cortex* 24: 222-31

- Jayatissa MN, Bisgaard C, Tingström A, Papp M, Wiborg O. 2006. Hippocampal cytogenesis correlates to escitalopram-mediated recovery in a chronic mild stress rat model of depression. *Neuropsychopharmacology* 31: 2395-404
- Jeanson T, Duchêne A, Richard D, Bourgoin S, Picoli C, et al. 2016. Potentiation of Amitriptyline Anti-Hyperalgesic-Like Action By Astroglial Connexin 43 Inhibition in Neuropathic Rats. *Sci Rep* 12: 38766
- Jeanson T, Pondaven A, Ezan P, Mouthon F, Charvériat M, Giaume C. 2017. Antidepressants Impact Connexin 43 Channel Functions in Astrocytes. *Front Cell Neurosci* 9
- Jha MK, Jo M, Kim JH, Suk K. 2019. Microglia-Astrocyte Crosstalk: An Intimate Molecular Conversation. *Neuroscientist* 25: 227-40
- Ji RR, Berta T, Nedergaard M. 2013. Glia and pain: is chronic pain a gliopathy? *Pain* 154: 10-28
- Jia L, Sun Z, Shi D, Wang M, Jia J, et al. 2019. Effects of different patterns of electric stimulation of the ventromedial prefrontal cortex on hippocampal-prefrontal coherence in a rat model of depression. *Behav Brain Res* 356: 179-88
- Jiang S, Yuan H, Duan L, Cao R, Gao B, et al. 2011. Glutamate release through connexin 43 by cultured astrocytes in a stimulated hypertonicity model. *Brain Res.* 1392: 8-15
- Jimenez JC, Su K, Goldberg AR, Luna VM, Biane JS, et al. 2018. Anxiety Cells in a Hippocampal-Hypothalamic Circuit. *Neuron* 97: 670-83
- Jin ZL, Chen XF, Ran YH, Li XR, Xiong J, et al. 2017. Mouse strain differences in SSRI sensitivity correlate with serotonin transporter binding and function. *Sci Rep* 7
- Joëls M, De Kloet ER. 1994. Mineralocorticoid and glucocorticoid receptors in the brain. Implications for ion permeability and transmitter systems. *Prog Neurobiol* 43: 1-36
- Jollé C, Déglon N, Pythoud C, Bouzier-Sore AK, Pellerin L. 2019. Development of Efficient AAV2/DJ-Based Viral Vectors to Selectively Downregulate the Expression of Neuronal or Astrocytic Target Proteins in the Rat Central Nervous System. *Front. Mol. Neurosci*

- Jung JS, Bhat RV, Preston GM, Guggino WB, Baraban JM, Agre P. 1994. Molecular characterization of an aquaporin cDNA from brain: candidate osmoreceptor and regulator of water balance. *Proc Natl Acad Sci U S A* 91: 13052-56
- Junker V, Becker A, Hühne R, Zembatov M, Ravati A, et al. 2002. Stimulation of beta-adrenoceptors activates astrocytes and provides neuroprotection. *Eur J Pharmacol* 446: 25-36
- Juric DM, Loncar D, Carman-Krzan M. 2008. Noradrenergic stimulation of BDNF synthesis in astrocytes: mediation via alpha1- and beta1/beta2-adrenergic receptors. *Neurochem Int* 52: 297-306
- Juszczak GR, Swiergiel AH. 2009. Properties of gap junction blockers and their behavioural, cognitive and electrophysiological effects: animal and human studies. *Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry* 33: 181-98
- Kacem K, Lacombe P, Seylaz J, Bonvento G. 1998. Structural organization of the perivascular astrocyte endfeet and their relationship with the endothelial glucose transporter: a confocal microscopy study. *Glia* 23: 1-10
- Kajitani N, Hisaoka-Nakashima K, Morioka N, Okada-Tsuchioka M, Kaneko M, et al. 2012. Antidepressant acts on astrocytes leading to an increase in the expression of neurotrophic/growth factors: differential regulation of FGF-2 by noradrenaline. *PLoS One* 7
- Kajiwara Y, Wang E, Wang M, Sin WC, Brennand KJ, et al. 2018. GJA1 (connexin43) is a key regulator of Alzheimer's disease pathogenesis. *Acta Neuropathol Commun* 6: 144
- Kang J, Kang N, Lovatt D, Torres A, Zhao Z, et al. 2008. Connexin 43 hemichannels are permeable to ATP. *J Neurosci* 28: 4702-11
- Kanno Y, Loewenstein WR. 1964. Intercellular diffusion. *Science* 143: 959-60
- Kanzari A, Bourcier-Lucas C, Freysson A, Abrous DN, Haddjeri N, Lucas G. 2018. Inducing a long-term potentiation in the dentate gyrus is sufficient to produce rapid antidepressant-like effects. *Mol Psychiatry* 23: 587-96
- Karakaya S, Kipp M, Beyer C. 2007. Oestrogen regulates the expression and function of dopamine transporters in astrocytes of the nigrostriatal system. *J Neuroendocrinol* 19: 682-90

- Karege F, Vaudan G, Schwald M, Perroud N, La Harpe R. 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
- Karst H, Berger S, Turiault M, Tronche F, Schütz G, Joëls M. 2005. Mineralocorticoid receptors are indispensable for nongenomic modulation of hippocampal glutamate transmission by corticosterone. *Proc Natl Acad Sci U S A* 102: 19204-07
- Karst H, Nair S, Velzing E, Rumpff-van Essen L, Slagter E, et al. 2002. Glucocorticoids alter calcium conductances and calcium channel subunit expression in basolateral amygdala neurons. *Eur J Neurosci* 16: 1083-89
- Kaster MP, Budni J, Gazal M, Cunha MP, Santos AR, Rodrigues AL. 2013. The antidepressant-like effect of inosine in the FST is associated with both adenosine A1 and A2A receptors. *Purinergic Signal* 9: 481-86
- Katona C, Hansen T, Olsen CK. 2012. A randomized, double-blind, placebo-controlled, duloxetine-referenced, fixed-dose study comparing the efficacy and safety of Lu AA21004 in elderly patients with major depressive disorder. *Int Clin Psychopharmacol* 27: 215-23
- Katz DM, Kimelberg HK. 1985. Kinetics and autoradiography of high affinity uptake of serotonin by primary astrocyte cultures. *J Neurosci* 5: 1901-08
- Katz RJ, Roth KA, Carroll BJ. 1981. Acute and chronic stress effects on open field activity in the rat: implications for a model of depression. *Neurosci Biobehav Rev* 5: 247-51
- Kéri S, Szabó C, Kelemen O. 2014. Expression of Toll-Like Receptors in peripheral blood mononuclear cells and response to cognitive-behavioral therapy in major depressive disorder. *Brain Behav Immun* 40: 235-43
- Kessler RC, Berglund P, Demler O, Jin R, Merikangas KR, Walters EE. 2005. Lifetime prevalence and age-of-onset distributions of DSM-IV disorders in the National Comorbidity Survey Replication. *Arch Gen Psychiatry* 62: 593-602
- Kessler RC, Sampson NA, Berglund P, Gruber MJ, Al-Hamzawi A, et al. 2015. Anxious and non-anxious major depressive disorder in the World Health Organization World Mental Health Surveys. *Epidemiol Psychiatr Sci* 24: 210-26
- Kettenmann H, Kettenmann H, Ransom BR. 2013. *Neuroglia*. pp. 864.

- Kettenmann H, Verkhratsky A. 2011. Neuroglia-living nerve glue. *Fortschr Neurol Psychiatr* 79: 588-97
- Khakh BS, Sofroniew MV. 2015. Diversity of astrocyte functions and phenotypes in neural circuits. *Nat Neurosci* 18: 942-52
- Khan A, Fabre LF, Rudolph R. 1991. Venlafaxine in depressed outpatients. *Psychopharmacol Bull* 27: 141-44
- Kheirbek MA, Drew LJ, Burghardt NS, Costantini DO, Tannenholz L, et al. 2013. Differential control of learning and anxiety along the dorsoventral axis of the dentate gyrus. *Neuron* 77: 955-68
- Kheirbek MA, Hen R. 2011. Dorsal vs ventral hippocampal neurogenesis: implications for cognition and mood. *Neuropsychopharmacology* 36: 373-4
- Kihara T, Ikeda M. 1995. Effects of duloxetine, a new serotonin and norepinephrine uptake inhibitor, on extracellular monoamine levels in rat frontal cortex. *J Pharmacol Exp Ther* 272: 177-83
- Kim JJ, Diamond DM. 2002. The stressed hippocampus, synaptic plasticity and lost memories. *Nat Rev Neurosci* 3: 453-62
- Kimelberg HK. 2007. Supportive or information-processing functions of the mature protoplasmic astrocyte in the mammalian CNS? A critical appraisal. *Neuron Glia Biol* 3: 181-89
- Kimelberg HK, Goderie SK, Higman S, Pang S, Waniewski RA. 1990. Swelling-induced release of glutamate, aspartate, and taurine from astrocyte cultures. *J Neurosci* 10: 1583-91
- Kimelberg HK, Katz DM. 1986. Regional differences in 5-hydroxytryptamine and catecholamine uptake in primary astrocyte cultures. *J Neurochem* 47: 1647-52
- Kinoshita M, Hirayama Y, Fujishita K, Shibata K, Shinozaki Y, et al. 2018. Anti-Depressant Fluoxetine Reveals its Therapeutic Effect Via Astrocytes. *EBioMedicine* 32
- Kittel-Schneider S, Kenis G, Schek J, Van den Hove D, Prickaerts J, et al. 2012. Expression of monoamine transporters, nitric oxide synthase 3, and neurotrophin genes in antidepressant-stimulated astrocytes. *Front Psychiatry* 3

- Kleopa KA, Orthmann JL, Enriquez A, Paul DL, Scherer SS. 2004. Unique distributions of the gap junction proteins connexin29, connexin32, and connexin47 in oligodendrocytes. *Glia* 47: 346-57
- Koch S, Hemrick-Luecke SK, Thompson LK, Evans DC, Threlkeld PG, et al. 2003. Comparison of effects of dual transporter inhibitors on monoamine transporters and extracellular levels in rats. *Neuropharmacology* 45: 935-44
- Kofuji P, Newman EA. 2004. Potassium buffering in the central nervous system. *Neuroscience* 129: 1045-56
- Koizumi S. 2010. Synchronization of Ca²⁺ oscillations: involvement of ATP release in astrocytes. *FEBS J* 277: 286-92
- Kondo DG, Hellem TL, Sung YH, Kim N, Jeong EK, et al. 2011. Review: magnetic resonance spectroscopy studies of pediatric major depressive disorder. *Depress Res Treat* 2011
- Kong H, Sha LL, Fan Y, Xiao M, Ding JH, et al. 2009. Requirement of AQP4 for antidepressive efficiency of fluoxetine: implication in adult hippocampal neurogenesis. *Neuropsychopharmacology* 34: 1263-76
- Kong H, Zeng XN, Fan Y, Yuan ST, Ge S, et al. 2014. Aquaporin-4 knockout exacerbates corticosterone-induced depression by inhibiting astrocyte function and hippocampal neurogenesis. *CNS Neurosci Ther* 20: 391-402
- Koolschijn PC, Van Haren NE, Lensvelt-Mulders GJ, Hulshoff Pol HE, Kahn RS. 2009. Brain volume abnormalities in major depressive disorder: a meta-analysis of magnetic resonance imaging studies. *Hum Brain Mapp* 30: 3719-35.
- Krishnan V, Nestler EJ. 2008. The molecular neurobiology of depression. *Nature* 455: 894-902
- Kuhn M, Höger N, Feige B, Blechert J, Normann C, Nissen C. 2014. Fear extinction as a model for synaptic plasticity in major depressive disorder. *PLoS One* 9
- Kulkarni SK, Dhir A. 2007. Effect of various classes of antidepressants in behavioral paradigms of despair. *Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry* 31: 1248-54
- Kunze A, Congreso MR, Hartmann C, Wallraff-Beck A, Hüttmann K, et al. 2009. Connexin expression by radial glia-like cells is required for neurogenesis in the adult dentate gyrus. *Proc Natl Acad Sci U S A* 106: 11336-41

- Kunzelmann P, Schröder W, Traub O, Steinhäuser C, Dermietzel R, Willecke K. 1999. Late onset and increasing expression of the gap junction protein connexin30 in adult murine brain and long-term cultured astrocytes. *Glia* 25: 111-19
- Kupfer DJ, Frank E, Phillips ML. 2012. Major depressive disorder: new clinical, neurobiological, and treatment perspectives. *Lancet* 379: 1045-55
- Kvetnansky R, Mikulaj L. 1970. Adrenal and urinary catecholamines in rats during adaptation to repeated immobilization stress. *Endocrinology* 87: 738-43
- Laaris N, Haj-Dahmane S, Hamon M, Lanfumey L. 1995. Glucocorticoid receptor-mediated inhibition by corticosterone of 5-HT1A autoreceptor functioning in the rat dorsal raphe nucleus. *Neuropharmacology* 34: 1201-10
- Ladd CO, Huot RL, Thiruvikraman KV, Nemeroff CB, Meaney MJ, Plotsky PM. 2000. Long-term behavioral and neuroendocrine adaptations to adverse early experience. *Prog Brain Res* 122: 81-103
- Lai M, Horsburgh K, Bae SE, Carter RN, Stenvers DJ, et al. 2007. Forebrain mineralocorticoid receptor overexpression enhances memory, reduces anxiety and attenuates neuronal loss in cerebral ischaemia. *Eur J Neurosci* 25: 1832-42
- Laird DW. 2006. Life cycle of connexins in health and disease. *Biochem J* 394: 527-43.
- Laird DW. 2014. Syndromic and non-syndromic disease-linked Cx43 mutations. *FEBS Lett* 588: 1339-48
- Laird DW, Puranam KL, Revel JP. 1991. Turnover and phosphorylation dynamics of connexin43 gap junction protein in cultured cardiac myocytes. *Biochem J* 273: 67-72
- Laird DW, Revel JP. 1990. Biochemical and immunochemical analysis of the arrangement of connexin43 in rat heart gap junction membranes. *J Cell Sci* 97: 109-17
- Lalo U, Palygin O, Rasooli-Nejad S, Andrew J, Haydon PG, Pankratov Y. 2014. Exocytosis of ATP from astrocytes modulates phasic and tonic inhibition in the neocortex. *PLoS Biol* 12
- Lampe PD, TenBroek EM, Burt JM, Kurata WE, Johnson RG, Lau AF. 2000. Phosphorylation of connexin43 on serine368 by protein kinase C regulates gap junctional communication. *J Cell Biol* 149: 1503-12

- Lan MJ, McLoughlin GA, Griffin JL, Tsang TM, Huang JT, et al. 2009. Metabonomic analysis identifies molecular changes associated with the pathophysiology and drug treatment of bipolar disorder. *Mol Psychiatry* 14: 269-79
- Lanfumeey L, Pardon MC, Laaris N, Joubert C, Hanoun N, et al. 1999. 5-HT_{1A} autoreceptor desensitization by chronic ultramild stress in mice. *Neuroreport* 10: 3369-74
- Larsen BR, Assentoft M, Cotrina ML, Hua SZ, Nedergaard M, et al. 2014. Contributions of the Na⁺/K⁺-ATPase, NKCC1, and Kir4.1 to hippocampal K⁺ clearance and volume responses. *Glia* 62: 608-22
- Larsen MH, Mikkelsen JD, Hay-Schmidt A, Sandi C. 2010. Regulation of brain-derived neurotrophic factor (BDNF) in the chronic unpredictable stress rat model and the effects of chronic antidepressant treatment. *J Psychiatr Res* 44: 808-16
- Lauf U, Giepmans BN, Lopez P, Braconnot S, Chen SC, Falk MM. 2002. Dynamic trafficking and delivery of connexons to the plasma membrane and accretion to gap junctions in living cells. *Proc Natl Acad Sci USA* 16
- Lazutkaite G, Soldà A, Lossow K, Meyerhof W, Dale N. 2017. Amino acid sensing in hypothalamic tanycytes via umami taste receptors. *Mol Metab* 6: 1480-92
- Le Dantec Y, Hache G, Guilloux JP, Guiard BP, David DJ, et al. 2014. NREM sleep hypersomnia and reduced sleep/wake continuity in a neuroendocrine mouse model of anxiety/depression based on chronic corticosterone administration. *Neuroscience* 274: 357-68
- Le Menuet D, Lombès M. 2014. The neuronal mineralocorticoid receptor: from cell survival to neurogenesis. *Steroids* 91
- Lee IH, Lindqvist E, Kiehn O, Widenfalk J, Olson L. 2005. Glial and neuronal connexin expression patterns in the rat spinal cord during development and following injury. *J Comp Neurol* 489: 1-10
- Lee J, Duan W, Mattson MP. 2002. Evidence that brain-derived neurotrophic factor is required for basal neurogenesis and mediates, in part, the enhancement of neurogenesis by dietary restriction in the hippocampus of adult mice. *J Neurochem* 82: 1367-75

- Lee KJ, Kim SJ, Kim SW, Choi SH, Shin YC, et al. 2006. Chronic mild stress decreases survival, but not proliferation, of new-born cells in adult rat hippocampus. *Exp Mol Med* 38: 44-54
- Leon AC, Blier P, Culpepper L, Gorman JM, Hirschfeld RM, et al. 2000. An Ideal Trial to Test Differential Onset of Antidepressant Effect. *J Clin Psychiatry* 62
- Levine ES, Kolb JE. 2000. Brain-derived neurotrophic factor increases activity of NR2B-containing N-methyl-D-aspartate receptors in excised patches from hippocampal neurons. *J Neurosci Res* 62: 357-62
- Levine J, Panchalingam K, Rapoport A, Gershon S, McClure RJ, Pettegrew JW. 2000. Increased cerebrospinal fluid glutamine levels in depressed patients. *Biol Psychiatry* 47: 586-93
- Levit NA, Sellitto C, Wang HZ, Li L, Srinivas M, et al. 2015. Aberrant connexin26 hemichannels underlying keratitis-ichthyosis-deafness syndrome are potently inhibited by mefloquine. *J Invest Dermatol* 135: 1033-42
- Li CT, Su TP, Wang SJ, Tu PC, Hsieh JC. 2015a. Prefrontal glucose metabolism in medication-resistant major depression. *Br J Psychiatry* 206: 316-23
- Li J, Xie X, Li Y, Liu X, Liao X, et al. 2017. Differential Behavioral and Neurobiological Effects of Chronic Corticosterone Treatment in Adolescent and Adult Rats. *Front Mol Neurosci* 10
- Li N, Liu RJ, Dwyer JM, Banasr M, Lee B, et al. 2011. Glutamate N-methyl-D-aspartate receptor antagonists rapidly reverse behavioral and synaptic deficits caused by chronic stress exposure. *Biol Psychiatry* 69: 754-61
- Li Y, Luikart BW, Birnbaum S, Chen J, Kwon CH, et al. 2008. TrkB regulates hippocampal neurogenesis and governs sensitivity to antidepressive treatment. *Neuron* 59: 399-412
- Li YH, Zhang CL, Zhang XY, Zhou HX, Meng LL. 2015b. Effects of mild induced hypothermia on hippocampal connexin 43 and glutamate transporter 1 expression following traumatic brain injury in rats. *Mol Med Rep* 11: 1991-96
- Lieb K, Biersack L, Waschbisch A, Orlikowski S, Akundi RS, et al. 2005. Serotonin via 5-HT7 receptors activates p38 mitogen-activated protein kinase and protein kinase C epsilon resulting in interleukin-6 synthesis in human U373 MG astrocytoma cells. *J Neurochem* 93: 549-59

- Liebmann M, Stahr A, Guenther M, Witte OW, Frahm C. 2013. Astrocytic Cx43 and Cx30 differentially modulate adult neurogenesis in mice. *Neurosci Lett* 545: 40-45
- Liedtke W, Edelmann W, Bieri PL, Chiu FC, Cowan NJ, et al. 1996. GFAP is necessary for the integrity of CNS white matter architecture and long-term maintenance of myelination. *Neuron* 17: 607-15
- Lim DA, Alvarez-Buylla A. 1999. Interaction between astrocytes and adult subventricular zone precursors stimulates neurogenesis. *Proc Natl Acad Sci U S A* 96: 7526-31
- Lindqvist D, Mueller S, Mellon SH, Su Y, Epel ES, et al. 2014. Peripheral antioxidant markers are associated with total hippocampal and CA3/dentate gyrus volume in MDD and healthy controls-preliminary findings. *Psychiatry Res* 224: 168-74
- Lippincott-Schwartz J, Snapp E, Kenworthy A. 2001. Studying protein dynamics in living cells. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2: 444-56
- Little A. 2009. Treatment-resistant depression. *Am Fam Physician* 80: 167-72
- Liu Q, Li B, Zhu HY, Wang YQ, Yu J, Wu GC. 2009. Clomipramine treatment reversed the glial pathology in a chronic unpredictable stress-induced rat model of depression. *Eur Neuropsychopharmacol* 19: 796-805
- Liu Q, Zhu HY, Li B, Wang YQ, Yu J, Wu GC. 2012. Chronic clomipramine treatment restores hippocampal expression of glial cell line-derived neurotrophic factor in a rat model of depression. *J Affect Disord* 141: 367-72
- Liu QS, Xu Q, Arcuino G, Kang J, Nedergaard M. 2004a. Astrocyte-mediated activation of neuronal kainate receptors. *Proc Natl Acad Sci U S A* 101: 3172-77
- Liu QS, Xu Q, Kang J, Nedergaard M. 2004b. Astrocyte activation of presynaptic metabotropic glutamate receptors modulates hippocampal inhibitory synaptic transmission. *Neuron Glia Biol* 1: 307-136
- Liu T, Sun L, Xiong Y, Shang S, Guo N, et al. 2011. Calcium triggers exocytosis from two types of organelles in a single astrocyte. *J Neurosci* 31: 10593-601
- Liu W, Ge T, Leng Y, Pan Z, Fan J, et al. 2017. The Role of Neural Plasticity in Depression: From Hippocampus to Prefrontal Cortex. *Neural Plast.*

- Liu X, Gangoso E, Yi C, Jeanson T, Kandelman S, et al. 2016. General anesthetics have differential inhibitory effects on gap junction channels and hemichannels in astrocytes and neurons. *Glia* 64: 524-36
- Locovei S, Bao L, Dahl G. 2006. Pannexin 1 in erythrocytes: function without a gap. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 103: 7655-59
- Lohman AW, Weaver JL, Billaud M, Sandilos JK, Griffiths R, et al. 2012. S-nitrosylation inhibits pannexin 1 channel function. *J Biol Chem* 287: 39602-12
- Long AC, Bomser JA, Grzybowski DM, Chandler HL. 2010. All-trans retinoic Acid regulates cx43 expression, gap junction communication and differentiation in primary lens epithelial cells. *Curr Eye Res* 35: 670-79
- Longuemare MC, Swanson RA. 1995. Excitatory amino acid release from astrocytes during energy failure by reversal of sodium-dependent uptake. *J Neurosci Res* 40: 379-86
- Lorenc-Koci E, Wójcikowski J, Kot M, Haduch A, Boksa J, Daniel WA. 2004. Disposition of 1,2,3,4,-tetrahydroisoquinoline in the brain of male Wistar and Dark Agouti rats. *Brain Res* 996: 168-79
- Lucae S, Salyakina D, Barden N, Harvey M, Gagné B, et al. 2006. P2RX7, a gene coding for a purinergic ligand-gated ion channel, is associated with major depressive disorder. *Hum Mol Genet* 15: 2438-45
- Lucassen PJ, Fuchs E, Czéh B. 2004. Antidepressant treatment with tianeptine reduces apoptosis in the hippocampal dentate gyrus and temporal cortex. *Biol Psychiatry*
- Lucassen PJ, Heine VM, Muller MB, Van der Beek EM, Wiegant VM, et al. 2006. Stress, depression and hippocampal apoptosis. *CNS Neurol Disord Drug Targets* 5
- Luykx JJ, Laban KG, Van Den Heuvel MP, Boks MP, Mandl RC, et al. 2012. Region and state specific glutamate downregulation in major depressive disorder: a meta-analysis of (1)H-MRS findings. *Neurosci Biobehav Rev* 36: 198-205
- Lynn BD, Tress O, May D, Willecke K, Nagy JI. 2011. Ablation of connexin30 in transgenic mice alters expression patterns of connexin26 and connexin32 in glial cells and leptomeninges. *Eur J Neurosci* 34: 1783-93
- Ma B, Xu G, Wang W, Enyeart JJ, Zhou M. 2014. Dual patch voltage clamp study of low membrane resistance astrocytes in situ. *Mol Brain* 7

- Ma M, Ren Q, Fujita Y, Yang C, Dong C, et al. 2017. Alterations in amino acid levels in mouse brain regions after adjunctive treatment of brexpiprazole with fluoxetine: comparison with (R)-ketamine. *Psychopharmacology* 234: 3165-73
- MacKay MB, Kravtzenyuk M, Thomas R, Mitchell ND, Dursun SM, Baker GB. 2019. D-Serine: Potential Therapeutic Agent and/or Biomarker in Schizophrenia and Depression? *Front Psychiatry* 10
- Maeng S, Zarate CA, Du J, Schloesser RJ, McCammon J, et al. 2008. Cellular mechanisms underlying the antidepressant effects of ketamine: role of alpha-amino-3-hydroxy-5-methylisoxazole-4-propionic acid receptors. *Biol Psychiatry* 63: 349-52
- Magariños AM, Deslandes A, McEwen BS. 1999. Effects of antidepressants and benzodiazepine treatments on the dendritic structure of CA3 pyramidal neurons after chronic stress. *Eur J Pharmacol* 371: 113-22
- Maienschein V, Marxen M, Volkhardt W, Zimmermann H. 1999. A plethora of presynaptic proteins associated with ATP-storing organelles in cultured astrocytes. *Glia* 26: 233-44
- Malagié I, David DJ, Jolliet P, Hen R, Bourin M, Gardier AM. 2002. Improved efficacy of fluoxetine in increasing hippocampal 5-hydroxytryptamine outflow in 5-HT(1B) receptor knock-out mice. *Eur J Pharmacol* 443: 99-104
- Malarkey EB, Parpura V. 2008. Mechanisms of glutamate release from astrocytes. *Neurochem Int* 52: 142-54
- Malberg JE, Eisch AJ, Nestler EJ, Duman RS. 2000. Chronic antidepressant treatment increases neurogenesis in adult rat hippocampus. *J Neurosci* 20: 9104-10
- Malhi GS, Mann JJ. 2018. Depression. *Lancet* 392: 2299-312
- Malkesman O, Austin DR, Tragon T, Wang G, Rompala G, et al. 2012. Acute D-serine treatment produces antidepressant-like effects in rodents. *Int J Neuropsychopharmacol* 15: 1135-48
- Mandelli L, Serretti A. 2013. Gene environment interaction studies in depression and suicidal behavior: An update. *Neurosci Biobehav Rev* 37: 2375-97
- Manosso LM, Neis VB, Moretti M, Daufenbach JF, Freitas AE, et al. 2013. Antidepressant-like effect of α -tocopherol in a mouse model of depressive-like behavior induced by TNF- α . *Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry* 46

- Mantz J, Cordier J, Giaume C. 1993. Effects of general anesthetics on intercellular communications mediated by gap junctions between astrocytes in primary culture. *Anesthesiology* 78: 892-901
- Marcaggi P, Attwell D. 2004. Role of glial amino acid transporters in synaptic transmission and brain energetics. *Glia* 47: 217-25
- Margineanu MB, Mahmood H, Fiumelli H, Magistretti PJ. 2018. L-Lactate Regulates the Expression of Synaptic Plasticity and Neuroprotection Genes in Cortical Neurons: A Transcriptome Analysis. *Front Mol Neurosci* 11
- Martin JL, Finsterwald C. 2011. Cooperation between BDNF and glutamate in the regulation of synaptic transmission and neuronal development. *Commun Integr Biol* 4: 14-16
- Martin JL, Magistretti PJ, Allaman I. 2013. Regulation of neurotrophic factors and energy metabolism by antidepressants in astrocytes. *Curr Drug Targets* 14: 1308-21
- Martin PE, Wall C, Griffith TM. 2005. Effects of connexin-mimetic peptides on gap junction functionality and connexin expression in cultured vascular cells. *Br J Pharmacol*. 144: 617-27
- Martin V, Allaili N, Euvrard M, Marday T, Riffaud A, et al. 2017. Effect of agomelatine on memory deficits and hippocampal gene expression induced by chronic social defeat stress in mice. *Sci Rep* 8
- Martineau M, Shi T, Puyal J, Knolhoff AM, Dulong J, et al. 2013. Storage and uptake of D-serine into astrocytic synaptic-like vesicles specify gliotransmission. *J Neurosci*. 33: 3413-23
- Martinez AD, Hayrapetyan V, Moreno AP, Beyer EC. 2002. Connexin43 and connexin45 form heteromeric gap junction channels in which individual components determine permeability and regulation. *Circ Res* 90: 1100-07
- Martisova E, Aisa B, Tordera RM, Puerta E, Solas M, Ramirez MJ. 2015. Venlafaxine reverses decreased proliferation in the subventricular zone in a rat model of early life stress. *Behav Brain Res* 292: 79-82
- Maruyama W, Nitta A, Shamoto-Nagai M, Hirata Y, Akao Y, et al. 2004. N-Propargyl-1 (R)-aminoindan, rasagiline, increases glial cell line-derived neurotrophic factor (GDNF) in neuroblastoma SH-SY5Y cells through activation of NF-kappaB transcription factor. *Neurochem Int* 44: 393-400

- Maswood S, Barter JE, Watkins LR, Maier SF. 1998. Exposure to inescapable but not escapable shock increases extracellular levels of 5-HT in the dorsal raphe nucleus of the rat. *Brain Res* 783: 115-20
- Matchkov VV, Rahman A, Bakker LM, Griffith TM, Nilsson H, Aalkjaer C. 2006. Analysis of effects of connexin-mimetic peptides in rat mesenteric small arteries. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 291: 357-67
- Mauri MC, Ferrara A, Boscati L, Bravin S, Zamberlan F, et al. 1998. Plasma and platelet amino acid concentrations in patients affected by major depression and under fluvoxamine treatment. *Neuropsychobiology* 37: 124-29
- Mayberg HS, Brannan SK, Tekell JL, Silva JA, Mahurin RK, et al. 2000. Regional Metabolic Effects of Fluoxetine in Major Depression: Serial Changes and Relationship to Clinical Response. *Biol Psychiatry* 48
- Mayberg HS, Lozano AM, Voon V, McNeely HE, Seminowicz D, et al. 2005. Deep brain stimulation for treatment-resistant depression. *Neuron* 45: 651-60
- McAllister AK, Katz LC, Lo DC. 1996. Neurotrophin regulation of cortical dendritic growth requires activity. *Neuron* 17: 1057-64
- McEwen BS. 2007. Physiology and Neurobiology of Stress and Adaptation: Central Role of the Brain. *Physiol rev* 87
- McEwen BS, Weiss JM, Schwartz LS. 1968. Selective retention of corticosterone by limbic structures in rat brain. *Nature* 220: 911-12
- McIntyre RS, Florea I, Tonnoir B, Loft H, Lam RW, Christensen MC. 2017. Efficacy of Vortioxetine on Cognitive Functioning in Working Patients With Major Depressive Disorder. *J Clin Psychiatry* 78: 115-21
- McIntyre RS, Lophaven S, Olsen CK. 2014. A randomized, double-blind, placebo-controlled study of vortioxetine on cognitive function in depressed adults. *Int J Neuropsychopharmacol* 17: 1557-67
- McKinnon MC, Yucel K, Nazarov A, MacQueen GM. 2009. A meta-analysis examining clinical predictors of hippocampal volume in patients with major depressive disorder. *J Psychiatry Neurosci* 34: 41-54

- Medina M, Watson SJ, Bunney WJ, Myers RM, Schatzberg A, et al. 2016. Evidence for alterations of the glial syncytial function in major depressive disorder. *J Psychiatric Res*
- Mehtonen OP, Søggaard J, Roponen P, Behnke K. 2000. Randomized, double-blind comparison of venlafaxine and sertraline in outpatients with major depressive disorder. Venlafaxine 631 Study Group. *J Clin Psychiatry* 61: 95-100
- Mei X, Ezan P, Giaume C, Koulakoff A. 2010. Astroglial connexin immunoreactivity is specifically altered at β -amyloid plaques in β -amyloid precursor protein/presenilin1 mice. *Neuroscience* 171: 92-105
- Meier CR, Wilcock K, Jick SS. 2004. The risk of severe depression, psychosis or panic attacks with prophylactic antimalarials. *Drug Saf* 27: 203-13
- Même W, Calvo CF, Froger N, Ezan P, Amigou E, et al. 2006. Proinflammatory cytokines released from microglia inhibit gap junctions in astrocytes: potentiation by beta-amyloid. *FASEB J* 20: 494-96
- Mendez-David I, Boursier C, Domergue V, Colle R, Falissard B, et al. 2017a. Differential Peripheral Proteomic Biosignature of Fluoxetine Response in a Mouse Model of Anxiety/Depression. *Front Cell Neurosci* 11
- Mendez-David I, Guilloux J-P, Papp M, Tritschler L, Mocaer E, et al. 2017b. S 47445 Produces Antidepressant- and Anxiolytic-Like Effects through Neurogenesis Dependent and Independent Mechanisms. *Frontiers in Pharmacology*
- Mendez-David I, Tritschler L, Ali ZE, Damiens MH, Pallardy M, et al. 2015. Nrf2-signaling and BDNF: A new target for the antidepressant-like activity of chronic fluoxetine treatment in a mouse model of anxiety/depression. *Neurosci Lett* 597: 121-26
- Mercier G, Lennon AM, Renouf B, Dessouroux A, Ramaugé M, et al. 2004. MAP kinase activation by fluoxetine and its relation to gene expression in cultured rat astrocytes. *J Mol Neurosci* 24: 207-16
- Merienne N, Delzor A, Viret A, Dufour N, Rey M, et al. 2015. Gene transfer engineering for astrocyte-specific silencing in the CNS. *Gene Ther* 22: 830-9
- Metzger MW, Walser SM, Dedic N, Aprile-Garcia F, Jakubcakova V, et al. 2017. Heterozygosity for the Mood Disorder-Associated Variant Gln460Arg Alters P2X7 Receptor Function and Sleep Quality. *J Neurosci* 37: 11688-700

- Meunier C, Wang N, Yi C, Dallerac G, Ezan P, et al. 2017. Contribution of Astroglial Cx43 Hemichannels to the Modulation of Glutamatergic Currents by D-Serine in the Mouse Prefrontal Cortex. *J Neurosci* 37: 9064-75
- Meyer RA, Laird DW, Revel JP, Johnson RG. 1992. Inhibition of gap junction and adherens junction assembly by connexin and A-CAM antibodies. *J Cell Biol* 119: 179-89
- Micevych PE, Abelson L. 1991. Distribution of mRNAs coding for liver and heart gap junction proteins in the rat central nervous system. *J Comp Neurol* 305: 96-118
- Michael-Titus AT, Bains S, Jeetle J, Whelpton R. 2000. Imipramine and phenelzine decrease glutamate overflow in the prefrontal cortex--a possible mechanism of neuroprotection in major depression? *Neuroscience* 100: 681-84
- Michel TM, Frangou S, Camara S, Thiemeyer D, Jecel J, et al. 2008. Altered glial cell line-derived neurotrophic factor (GDNF) concentrations in the brain of patients with depressive disorder: a comparative post-mortem study. *Eur Psychiatry* 23: 413-20
- Micheli L, Ceccarelli M, D'Andrea G, Tirone F. 2018. Depression and adult neurogenesis: Positive effects of the antidepressant fluoxetine and of physical exercise. *Brain Res Bull* 143: 181-93
- Middeldorp J, Hol EM. 2011. GFAP in health and disease. *Prog Neurobiol.* 93: 421-43
- Mifsud KR, Reul JM. 2016. Acute stress enhances heterodimerization and binding of corticosteroid receptors at glucocorticoid target genes in the hippocampus. *Proc Natl Acad Sci U S A* 113: 11336-41
- Miguel-Hidalgo JJ, Baucom C, Dille G, Overholser JC, Meltzer HY, et al. 2000. Glial fibrillary acidic protein immunoreactivity in the prefrontal cortex distinguishes younger from older adults in major depressive disorder. *Biol Psychiatry* 48: 861-73
- Miguel-Hidalgo JJ, Carter K, Deloach PH, Sanders L, Pang Y. 2019. Glucocorticoid-Induced Reductions of Myelination and Connexin 43 in Mixed Central Nervous System Cell Cultures Are Prevented by Mifepristone. *Neuroscience* 411: 255-69
- Miguel-Hidalgo JJ, Moulana M, Deloach PH, Rajkowska G. 2018. Chronic Unpredictable Stress Reduces Immunostaining for Connexins 43 and 30 and Myelin Basic Protein in the Rat Prelimbic and Orbitofrontal Cortices. *Chronic Stress* 2

- Miguel-Hidalgo JJ, Wilson BA, Hussain S, Meshram A, Rajkowska G, Stockmeier CA. 2014. Reduced connexin 43 immunolabeling in the orbitofrontal cortex in alcohol dependence and depression. *J Psychiatric Res* 55: 101-09
- Mika J, Zychowska M, Popiolek-Barczyk K, Rojewska E, Przewlocka B. 2013. Importance of glial activation in neuropathic pain. *Eur J Pharmacol* 716: 106-19
- Milanovic SM, Erjavec K, Poljicanin T, Vrabec B, Brecic P. 2015. Prevalence of depression symptoms and associated socio-demographic factors in primary health care patients. *Psychiatr Danub* 27: 31-7
- Miller BR, Hen R. 2015. The current state of the neurogenic theory of depression and anxiety. *Curr Opin Neurobiol* 30: 51-58
- Mineur YS, Belzung C, Crusio WE. 2006. Effects of unpredictable chronic mild stress on anxiety and depression-like behavior in mice. *Behav Brain Research* 175: 43-50
- Mishra SK, Braun N, Shukla V, Füllgrabe M, Schomerus C, et al. 2006. Extracellular nucleotide signaling in adult neural stem cells: synergism with growth factor-mediated cellular proliferation. *Development* 133: 675-84
- Mitani H, Shirayama Y, Yamada T, Maeda K, Ashby CR, Kawahara R. 2006. Correlation between plasma levels of glutamate, alanine and serine with severity of depression. *Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry* 30: 1155-58
- Mitchell NC, Gould GG, Koek W, Daws LC. 2016. Ontogeny of SERT Expression and Antidepressant-like Response to Escitalopram in Wild-Type and SERT Mutant Mice. *J Pharmacol Exp Ther* 358: 271-81
- Mitra R, Sapolsky RM. 2008. Acute corticosterone treatment is sufficient to induce anxiety and amygdaloid dendritic hypertrophy. *Proc Natl Acad Sci U S A* 105: 5573-78
- Mizuta I, Ohta M, Ohta K, Nishimura M, Mizuta E, et al. 2000. Selegiline and desmethylselegiline stimulate NGF, BDNF, and GDNF synthesis in cultured mouse astrocytes. *Biochem Biophys Res Commun* 279: 751-55
- Moghaddam B. 1993. Stress preferentially increases extraneuronal levels of excitatory amino acids in the prefrontal cortex: comparison to hippocampus and basal ganglia. *J Neurochem* 60: 1650-57

- Moghaddam B, Adams B, Verma A, Daly D. 1997. Activation of glutamatergic neurotransmission by ketamine: a novel step in the pathway from NMDA receptor blockade to dopaminergic and cognitive disruptions associated with the prefrontal cortex. *J Neurosci* 17: 2921-27
- Montana V, Ni Y, Sunjara V, Hua X, Parpura V. 2004. Vesicular glutamate transporter-dependent glutamate release from astrocytes. *J Neurosci* 24: 2633-42
- Morais M, Santos PA, Mateus-Pinheiro A, Patrício P, Pinto L, et al. 2014. The effects of chronic stress on hippocampal adult neurogenesis and dendritic plasticity are reversed by selective MAO-A inhibition. *J Psychopharmacol* 28: 1178-83
- Morioka N, Fujii S, Kondo S, Zhang FF, Miyauchi K, et al. 2018. Downregulation of spinal astrocytic connexin43 leads to upregulation of interleukin-6 and cyclooxygenase-2 and mechanical hypersensitivity in mice. *Glia* 66: 428-44
- Morioka N, Suekama K, Zhang F, Kajitani N, Hisaoka-Nakashima K, et al. 2014. Amitriptyline up-regulates connexin43-gap junction in rat cultured cortical astrocytes via activation of the p38 and c-Fos/AP-1 signalling pathway. *Br J Pharmacol* 171: 2854-67
- Morioka N, Zhang FF, Nakamura Y, Kitamura T, Hisaoka-Nakashima K, Nakata Y. 2015. Tumor necrosis factor-mediated downregulation of spinal astrocytic connexin43 leads to increased glutamatergic neurotransmission and neuropathic pain in mice. *Brain Behav Immun* 49: 293-310
- Moser MB, Moser EI. 1998. Functional differentiation in the hippocampus. *Hippocampus* 8: 608-19
- Mostafavi H, Khaksarian M, Joghataei MT, Hassanzadeh G, Soleimani M, et al. 2014. Fluoxetine Upregulates Connexin 43 Expression in Astrocyte. *Basic and Clinical Neuroscience*
- Mumby DG, Gaskin S, Glenn MJ, Schramek TE, Lehmann H. 2002. Hippocampal damage and exploratory preferences in rats: memory for objects, places, and contexts. *Learn Mem* 9: 49-57
- Murray F, Smith DW, Hutson PH. 2008. Chronic low dose corticosterone exposure decreased hippocampal cell proliferation, volume and induced anxiety and depression like behaviours in mice. *Eur J Pharmacol* 583

- Musazzi L, Milanese M, Farisello P, Zappettini S, Tardito D, et al. 2010. Acute stress increases depolarization-evoked glutamate release in the rat prefrontal/frontal cortex: the dampening action of antidepressants. *PLoS One* 5
- Musazzi L, Racagni G, Popoli M. 2011. Stress, glucocorticoids and glutamate release: effects of antidepressant drugs. *Neurochem Int* 59: 138-49
- Muscat R, Papp M, Willner P. 1992. Reversal of stress-induced anhedonia by the atypical antidepressants, fluoxetine and maprotiline. *Psychopharmacology* 109: 433-38
- Muto J, Lee H, Lee H, Uwaya A, Park J, et al. 2014. Oral administration of inosine produces antidepressant-like effects in mice. *Sci Rep* 4
- Nagaraja AS, Sadaoui NC, Dorniak PL, Lutgendorf SK, Sood AK. 2016. SnapShot: Stress and Disease. *Cell Metab* 23: 388
- Nagelhus EA, Horio Y, Inanobe A, Fujita A, Haug FM, et al. 1999. Immunogold evidence suggests that coupling of K⁺ siphoning and water transport in rat retinal Müller cells is mediated by a coenrichment of Kir4.1 and AQP4 in specific membrane domains. *Glia* 26: 47-54
- Nagelhus EA, Veruki ML, Torp R, Haug FM, Laake JH, et al. 1998. Aquaporin-4 water channel protein in the rat retina and optic nerve: polarized expression in Müller cells and fibrous astrocytes. *J Neurosci* 18: 2506-19
- Nagy C, Suderman M, Yang J, Szyf M, Mechawar N, et al. 2015. Astrocytic abnormalities and global DNA methylation patterns in depression and suicide. *Mol Psychiatry* 20: 320-8
- Nagy C, Torres-Platas SG, Mechawar N, Turecki G. 2017. Repression of Astrocytic Connexins in Cortical and Subcortical Brain Regions and Prefrontal Enrichment of H3K9me3 in Depression and Suicide. *Int J Neuropsychopharmacol* 20: 50-57
- Nagy JI, Dudek FE, Rash JE. 2004. Update on connexins and gap junctions in neurons and glia in the mammalian nervous system. *Brain Res Brain Res Rev* 47: 191-215
- Nagy JI, Ionescu AV, Lynn BD, Rash JE. 2003. Coupling of astrocyte connexins Cx26, Cx30, Cx43 to oligodendrocyte Cx29, Cx32, Cx47: Implications from normal and connexin32 knockout mice. *Glia* 44: 205-18
- Nagy JI, Li W, Hertzberg EL, Marotta CA. 1996. Elevated connexin43 immunoreactivity at sites of amyloid plaques in Alzheimer's disease. *Brain Res* 717: 173-78

- Nagy JI, Patel D, Ochalski PA, Stelmack GL. 1999. Connexin30 in rodent, cat and human brain: selective expression in gray matter astrocytes, co-localization with connexin43 at gap junctions and late developmental appearance. *Neuroscience* 88: 447-68
- Najjar S, Pearlman DM, Alper K, Najjar A, Devinsky O. 2013. Neuroinflammation and psychiatric illness. *J Neuroinflammation* 10
- Nakagawa S, Kim JE, Lee R, Malberg JE, Chen J, et al. 2002. Regulation of neurogenesis in adult mouse hippocampus by cAMP and the cAMP response element-binding protein. *J Neurosci* 22: 3673-82
- Nakano M, Matsuo K, Nakashima M, Matsubara T, Harada K, et al. 2014. Gray matter volume and rapid decision-making in major depressive disorder. *Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry* 48: 51-56
- Nakano N, Kanekiyo K, Nakagawa T, Asahi M, Ide C. 2016. NTAK/neuregulin-2 secreted by astrocytes promotes survival and neurite outgrowth of neurons via ErbB3. *Neurosci Lett* 622: 88-94
- Nakashima S, Matsuyama Y, Yu Y, Kiuchi K, Ishiguro N. 2004. Suppression of GDNF production by MPSS treatment following spinal cord injury in the rat. *Neuroreport* 15: 2337-40
- Naus CC, Bechberger JF, Paul DL. 1991. Gap junction gene expression in human seizure disorder. *Exp Neurol* 111: 198-203
- Naus CC, Bechberger JF, Zhang Y, Venance L, Yamasaki H, et al. 1997. Altered gap junctional communication, intercellular signaling, and growth in cultured astrocytes deficient in connexin43. *J Neurosci Res* 49: 528-40
- Nedergaard M. 1994. Direct signaling from astrocytes to neurons in cultures of mammalian brain cells. *Science* 263: 1768-71
- Nestler EJ, Gould E, Manji H, Bunacan M, Duman RS, et al. 2002. Preclinical models: status of basic research in depression. *Biol Psychiatry* 52: 503-28
- Nevin RL. 2012. Mefloquine blockade of connexin 36 and connexin 43 gap junctions and risk of suicide. *Biol Psychiatry* 71: 1-2
- Nguyen HT, Guiard BP, Bacq A, David DJ, David I, et al. 2012. Blockade of the high-affinity noradrenaline transporter (NET) by the selective 5-HT reuptake inhibitor

- escitalopram: an in vivo microdialysis study in mice. *British Journal of Pharmacology* 168: 103-16
- Ni M, He JG, Zhou HY, Lu XJ, Hu YL, et al. 2018. Pannexin-1 channel dysfunction in the medial prefrontal cortex mediates depressive-like behaviors induced by chronic social defeat stress and administration of mefloquine in mice. *Neuropharmacology* 137: 256-67
- Nibuya M, Morinobu S, Duman RS. 1995. Regulation of BDNF and trkB mRNA in rat brain by chronic electroconvulsive seizure and antidepressant drug treatments. *J Neurosci* 15: 7539-47
- Nibuya M, Nestler EJ, Duman RS. 1996. Chronic antidepressant administration increases the expression of cAMP response element binding protein (CREB) in rat hippocampus. *J Neurosci* 16: 2365-72
- Nielsen BS, Hansen DB, Ransom BR, Nielsen MS, MacAulay N. 2017. Connexin Hemichannels in Astrocytes: An Assessment of Controversies Regarding Their Functional Characteristics. *Neurochem Res* 42: 2537-50
- Nielsen S, Nagelhus EA, Amiry-Moghaddam M, Bourque C, Agre P, Ottersen OP. 1997. Specialized membrane domains for water transport in glial cells: high-resolution immunogold cytochemistry of aquaporin-4 in rat brain. *J Neurosci* 17: 171-80
- Nollet M, Le Guisquet AM, Belzung C. 2013. Models of depression: unpredictable chronic mild stress in mice. *Curr Protoc Pharmacol* 5
- Norden DM, Trojanowski PJ, Villanueva E, Navarro E, Godbout JP. 2016. Sequential activation of microglia and astrocyte cytokine expression precedes increased Iba-1 or GFAP immunoreactivity following systemic immune challenge. *Glia* 64: 300-16
- Nowak G, Trullas R, Layer RT, Skolnick P, Paul IA. 1993. Adaptive changes in the N-methyl-D-aspartate receptor complex after chronic treatment with imipramine and 1-aminocyclopropanecarboxylic acid. *J Pharmacol Exp Ther* 265: 1380-86
- Nuriya M, Morita A, Shinotsuka T, Yamada T, Yasui M. 2018. Norepinephrine induces rapid and long-lasting phosphorylation and redistribution of connexin 43 in cortical astrocytes. *Biochem Biophys Res Commun* 504: 690-97
- O'Carroll SJ, Becker DL, Davidson JO, Gunn AJ, Nicholson LF, Green CR. 2013a. The use of connexin-based therapeutic approaches to target inflammatory diseases. *Methods Mol Biol* 1037: 519-46

- O'Carroll SJ, Gorrie CA, Velamoor S, Green CR, Nicholson LF. 2013b. Connexin43 mimetic peptide is neuroprotective and improves function following spinal cord injury. *Neurosci Res* 75: 256-67
- O'Donnell J, Zeppenfeld D, McConnell E, Pena S, Nedergaard M. 2012. Norepinephrine: a neuromodulator that boosts the function of multiple cell types to optimize CNS performance. *Neurochem Res* 37: 2496-512
- O'Dowd BS, Barrington J, Ng KT, Hertz E, Hertz L. 1995. Glycogenolytic response of primary chick and mouse cultures of astrocytes to noradrenaline across development. *Brain Res Dev Brain Res* 88: 220-23
- O'Leary OF, Bechtholt AJ, Crowley JJ, Hill TE, Page ME, Lucki I. 2007. Depletion of serotonin and catecholamines block the acute behavioral response to different classes of antidepressant drugs in the mouse tail suspension test. *Psychopharmacology* 192: 357-71
- Oberheim NA, Goldman SA, Nedergaard M. 2012. Heterogeneity of astrocytic form and function. *Methods Mol Biol.* 814: 23-45
- Ohshima Y, Tsukimoto M, Harada H, Kojima S. 2012. Involvement of connexin43 hemichannel in ATP release after γ -irradiation. *J Radiat Res* 53: 551-57
- Oka T. 2018. Stress-induced hyperthermia and hypothermia. *Handb Clin Neurol* 157: 599-621
- Okada M, Nutt DJ, Murakami T, Zhu G, Kamata A, et al. 2001. Adenosine receptor subtypes modulate two major functional pathways for hippocampal serotonin release. *J Neurosci* 21: 628-40
- Olk S, Turchinovich A, Grzendowski M, Stühler K, Meyer HE, et al. 2010. Proteomic Analysis of Astroglial Connexin43 Silencing Uncovers a Cytoskeletal Platform Involved in Process Formation and Migration. *Glia* 58: 494-505
- Öngür D, Drevets WC, Price JL. 1998. Glial reduction in the subgenual prefrontal cortex in mood disorders. *Proc Natl Acad Sci U S A* 95: 13290-95
- Orellana JA, Díaz E, Schalper KA, Vargas AA, Bennett MV, Sáez JC. 2011a. Cation permeation through connexin 43 hemichannels is cooperative, competitive and saturable with parameters depending on the permeant species. *Biochem Biophys Res Commun* 409: 603-09

- Orellana JA, Froger N, Ezan P, Jiang JX, Bennett MV, et al. 2011b. ATP and glutamate released via astroglial connexin 43 hemichannels mediate neuronal death through activation of pannexin 1 hemichannels. *J Neurochem* 118: 826-40
- Orellana JA, Montero TD, Von Bernhardi R. 2013. Astrocytes inhibit nitric oxide-dependent Ca(2+) dynamics in activated microglia: involvement of ATP released via pannexin 1 channels. *Glia* 61: 2023-37
- Orellana JA, Moraga-Amaro R, Diaz-Galarce R, Rojas S, Maturana CJ, et al. 2015. Restraint stress increases hemichannel activity in hippocampal glial cells and neurons. *Front Cell Neurosci* 9: 102
- Orellana JA, Sáez PJ, Cortés-Campos C, Elizondo RJ, Shoji KF, et al. 2012. Glucose increases intracellular free Ca(2+) in tanycytes via ATP released through connexin 43 hemichannels. *Glia* 60: 53-68
- Orellana JA, Shoji KF, Abudara V, Ezan P, Amigou E, et al. 2011c. Amyloid β -induced death in neurons involves glial and neuronal hemichannels. *J Neurosci* 31: 4962-77
- Orkand RK, Nicholls JG, Kuffler SW. 1966. Effect of nerve impulses on the membrane potential of glial cells in the central nervous system of amphibia. *J Neurophysiol* 29: 788-806
- Ortega JE, Gonzalez-Lira V, Horrillo I, Herrera-Marschitz M, Callado LF, Meana JJ. 2013. Additive effect of rimonabant and citalopram on extracellular serotonin levels monitored with in vivo microdialysis in rat brain. *Eur J Pharmacol* 709: 13-19
- Orthmann-Murphy JL, Abrams CK, Scherer SS. 2008. Gap junctions couple astrocytes and oligodendrocytes. *J Mol Neurosci* 35: 101-16
- Oshima A. 2014. Structure and closure of connexin gap junction channels. *FEBS Lett* 588: 1230-37
- Otsuki K, Uchida S, Watanuki T, Wakabayashi Y, Fujimoto M, et al. 2008. Altered expression of neurotrophic factors in patients with major depression. *J Psychiatr Res* 42: 1145-53
- Otte DM, Barcena de Arellano ML, Bilkei-Gorzo A, Albayram O, Imbeault S, et al. 2013. Effects of Chronic D-Serine Elevation on Animal Models of Depression and Anxiety-Related Behavior. *PLoS One* 8: e67131

- Oyamada M, Oyamada Y, Takamatsu T. 2005. Regulation of connexin expression. *Biochim Biophys Acta* 1719: 6-23
- Oyamada M, Takebe K, Oyamada Y. 2013. Regulation of connexin expression by transcription factors and epigenetic mechanisms. *Biochim Biophys Acta*. 1828: 118-33
- Pacak K, Palkovits M, Kvetnansky R, Matern P, Hart C, et al. 1995. Catecholaminergic inhibition by hypercortisolemia in the paraventricular nucleus of conscious rats. *Endocrinology* 136: 4814-19
- Pacak K, Tjurmina O, Palkovits M, Goldstein DS, Koch CA, et al. 2002. Chronic hypercortisolemia inhibits dopamine synthesis and turnover in the nucleus accumbens: an in vivo microdialysis study. *Neuroendocrinology* 76: 148-57
- Padovan CM, Guimarães FS. 2000. Restraint-induced hypoactivity in an elevated plus-maze. *Braz J Med Biol Res* 33: 79-83
- Page ME, Lucki I. 2002. Effects of acute and chronic reboxetine treatment on stress-induced monoamine efflux in the rat frontal cortex. *Neuropsychopharmacology* 27: 237-47
- Pałucha-Poniewiera A, Podkowa K, Lenda T, Pilc A. 2017. The involvement of monoaminergic neurotransmission in the antidepressant-like action of scopolamine in the tail suspension test. *Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry* 79: 155-61
- Pan HC, Chou YC, Sun SH. 2015. P2X7 R-mediated Ca(2+) -independent d-serine release via pannexin-1 of the P2X7 R-pannexin-1 complex in astrocytes. *Glia* 63: 877-93
- Panatier A, Theodosis DT, Mothet JP, Touquet B, Pollegioni L, et al. 2006. Glia-derived D-serine controls NMDA receptor activity and synaptic memory. *Cell* 125: 775-84
- Panatier A, Vallée J, Haber M, Murai KK, Lacaille JC, Robitaille R. 2011. Astrocytes are endogenous regulators of basal transmission at central synapses. *Cell* 46: 785-98
- Panchin Y, Kelmanson I, Matz M, Lukyanov K, Usman N, Lukyanov S. 2000. A ubiquitous family of putative gap junction molecules. *Curr Biol* 10
- Panchin YV. 2005. Evolution of gap junction proteins--the pannexin alternative. *J Exp Biol* 208: 1415-519

- Pandey GN, Rizavi HS, Ren X, Fareed J, Hoppensteadt DA, et al. 2012. Proinflammatory cytokines in the prefrontal cortex of teenage suicide victims. *J Psychiatr Res* 46: 57-63
- Pannasch U, Vargová L, Reingruber J, Ezan P, Holcman D, et al. 2011. Astroglial networks scale synaptic activity and plasticity. *Proc Natl Acad Sci U S A* 108: 8467-72
- Papouin T, Henneberger C, Rusakov DA, Oliet SHR. 2017. Astroglial versus Neuronal D-Serine: Fact Checking. *Trends Neurosci* 40: 517-20
- Paratcha G, Ledda F. 2008. GDNF and GFRalpha: a versatile molecular complex for developing neurons. *Trends Neurosci* 31: 384-91
- Paredes D, Granholm AC, Bickford PC. 2007. Effects of NGF and BDNF on baseline glutamate and dopamine release in the hippocampal formation of the adult rat. *Brain Res* 1141: 56-64
- Park DH, Paivarinta H, Joh TH. 1989. Tryptophan hydroxylase activity in hypothalamus and brainstem of neonatal and adult rats treated with hydrocortisone or parachlorophenylalanine. *Neurosci Res* 7: 76-80
- Parpura V, Verkhratsky A. 2012. The astrocyte excitability brief: from receptors to gliotransmission. *Neurochem Int* 61: 610-24
- Pascual O, Casper KB, Kubera C, Zhang J, Revilla-Sanchez R, et al. 2005. Astrocytic purinergic signaling coordinates synaptic networks. *Science* 310: 113-16
- Passlick S, Kramer PF, Richers MT, Williams JT, Ellis-Davies GCR. 2017. Two-color, one-photon uncaging of glutamate and GABA. *PLoS One* 12
- Paterson IA, Hertz L. 1989. Sodium-independent transport of noradrenaline in mouse and rat astrocytes in primary culture. *J Neurosci Res* 23: 71-77
- Paul IA, Nowak G, Layer RT, Popik P, Skolnick P. 1994. Adaptation of the N-methyl-D-aspartate receptor complex following chronic antidepressant treatments. *J Pharmacol Exp Ther* 269: 95-102
- Pavlidis C, McEwen BS. 1999. Effects of mineralocorticoid and glucocorticoid receptors on long-term potentiation in the CA3 hippocampal field. *Brain Res* 851: 204-14

- Pavlidis C, Ogawa S, Kimura A, McEwen BS. 1996. Role of adrenal steroid mineralocorticoid and glucocorticoid receptors in long-term potentiation in the CA1 field of hippocampal slices. *Brain Res* 738: 229-35
- Pekny M, Nilsson M. 2005. Astrocyte activation and reactive gliosis. *Glia* 50: 427-34
- Pekny M, Pekna M, Messing A, Steinhäuser C, Lee JM, et al. 2016. Astrocytes: a central element in neurological diseases. *Acta Neuropathol* 131: 323-45
- Pelegri P, Surprenant A. 2006. Pannexin-1 mediates large pore formation and interleukin-1beta release by the ATP-gated P2X7 receptor. *EMBO J* 25: 5071-82
- Pellerin L, Magistretti PJ. 1994. Glutamate uptake into astrocytes stimulates aerobic glycolysis: a mechanism coupling neuronal activity to glucose utilization. *Proc Natl Acad Sci U S A* 91: 10625-29
- Penuela S, Bhalla R, Gong XQ, Cowan KN, Celetti SJ, et al. 2007. Pannexin 1 and pannexin 3 are glycoproteins that exhibit many distinct characteristics from the connexin family of gap junction proteins. *J Cell Sci* 120: 3772-83
- Penuela S, Bhalla R, Nag K, Laird DW. 2009. Glycosylation regulates pannexin intermixing and cellular localization. *Mol Biol Cell* 20: 4313-23
- Penuela S, Gehi R, Laird DW. 2013. The biochemistry and function of pannexin channels. *Biochim Biophys Acta* 1828: 15-22
- Penuela S, Simek J, Thompson RJ. 2014. Regulation of pannexin channels by post-translational modifications. *FEBS Lett* 588: 1411-15
- Perea G, Araque A. 2005. Properties of synaptically evoked astrocyte calcium signal reveal synaptic information processing by astrocytes. *J Neurosci*. 25: 2192-203
- Perea G, Navarrete M, Araque A. 2009. Tripartite synapses: astrocytes process and control synaptic information. *Trends Neurosci*. 32: 421-31
- Perez Velazquez JL, Frantseva M, Naus CC, Bechberger JF, Juneja SC, et al. 1996. Development of astrocytes and neurons in cultured brain slices from mice lacking connexin43. *Brain Res Dev Brain Res* 97: 293-96
- Pérez-Alvarez A, Araque A. 2013. Astrocyte-neuron interaction at tripartite synapses. *Curr Drug Targets* 14: 1220-24

- Phelan P, Bacon JP, Davies JA, Stebbings LA, Todman MG, et al. 1998. Innexins: a family of invertebrate gap-junction proteins. *Trends Genet* 14: 348-49
- Picoli C, Nouvel V, Aubry F, Reboul M, Duchêne A, et al. 2012. Human connexin channel specificity of classical and new gap junction inhibitors. *J Biomol Screen* 17: 1339-47
- Picoli C, Soleilhac E, Journet A, Barette C, Comte M, et al. 2019. High-Content Screening Identifies New Inhibitors of Connexin 43 Gap Junctions. *Assay Drug Dev Technol* 17: 240-48
- Pino A, Fumagalli G, Bifari F, Decimo I. 2017. New neurons in adult brain: distribution, molecular mechanisms and therapies. *Biochem Pharmacol* 141: :4-22.
- Pittaluga A, Raiteri L, Longordo F, Luccini E, Barbiero VS, et al. 2007. Antidepressant treatments and function of glutamate ionotropic receptors mediating amine release in hippocampus. *Neuropharmacology* 53: 27-36
- Pittenger C, Duman RS. 2008. Stress, depression, and neuroplasticity: a convergence of mechanisms. *Neuropsychopharmacology* 33: 88-109
- Ponsaerts R, De Vuyst E, Retamal M, D'hondt C, Vermeire D, et al. 2010. Intramolecular loop/tail interactions are essential for connexin 43-hemichannel activity. *FASEB J* 24: 4378-95
- Porsolt RD, Anton G, Blavet N, Jalfre M. 1978. Behavioural despair in rats: a new model sensitive to antidepressant treatments. *Eur J Pharmacol* 47: 379-91
- Porter JT, McCarthy KD. 1997. Astrocytic neurotransmitter receptors in situ and in vivo. *Prog Neurobiol* 51: 439-55
- Querfurth HW, LaFerla FM. 2010. Alzheimer's disease. *N Engl J Med* 362: 329-44
- Quesseveur G, David DJ, Gaillard MC, Pla P, Wu MV, et al. 2013a. BDNF overexpression in mouse hippocampal astrocytes promotes local neurogenesis and elicits anxiolytic-like activities. *Transl Psychiatry* 3
- Quesseveur G, Gardier AM, Guiard BP. 2013b. The monoaminergic tripartite synapse: a putative target for currently available antidepressant drugs. *Curr Drug Targets* 14: 1277-94

- Quesseveur G, Portal B, Basile JA, Ezan P, Mathou A, et al. 2015. Attenuated Levels of Hippocampal Connexin 43 and its Phosphorylation Correlate with Antidepressant- and Anxiolytic-Like Activities in Mice. *Front Cell Neurosci* 9: 490
- Rackauskas M, Neverauskas V, Skeberdis VA. 2010. Diversity and properties of connexin gap junction channels. *Medicina (Kaunas)* 46: 1-12
- Rainer Q, Nguyen HT, Quesseveur G, Gardier AM, David DJ, Guiard BP. 2011. Functional Status of Somatodendritic Serotonin 1A Autoreceptor after Long-Term Treatment with Fluoxetine in a Mouse Model of Anxiety/Depression Based on Repeated Corticosterone Administration. *Mol Pharm*
- Rajkowska G. 2000. Postmortem studies in mood disorders indicate altered numbers of neurons and glial cells. *Biol Psychiatry* 48: 766-77
- Rajkowska G, Hughes J, Stockmeier CA, Miguel-Hidalgo JJ, Maciag D. 2013. Coverage of blood vessels by astrocytic endfeet is reduced in major depressive disorder. *Biol Psychiatry* 73: 613-21
- Rajkowska G, Legutko B, Moulana M, Syed M, Romero DG, et al. 2018. Astrocyte pathology in the ventral prefrontal white matter in depression. *J Psychiatr Res* 102: 150-58
- Rajkowska G, Miguel-Hidalgo JJ. 2007. Gliogenesis and glial pathology in depression. *CNS Neurol Disord Drug Targets* 6: 219-33
- Rajkowska G, Stockmeier CA. 2013. Astrocyte pathology in major depressive disorder: insights from human postmortem brain tissue. *Curr Drug Targets* 14: 1225-36.
- Ramaker MJ, Dulawa SC. 2017. Identifying fast-onset antidepressants using rodent models. *Mol Psychiatry* 22: 656-65
- Rana S, Dringen R. 2007. Gap junction hemichannel-mediated release of glutathione from cultured rat astrocytes. 415 1
- Raone A, Cassanelli A, Scheggi S, Rauggi R, Danielli B, De Montis MG. 2007. Hypothalamus-pituitary-adrenal modifications consequent to chronic stress exposure in an experimental model of depression in rats. *Neuroscience* 146: 1734-42

- Raptis L, Vultur A, Brownell HL, Tomai E, Anagnostopoulou A, et al. 2008. Electroporation of adherent cells in situ for the study of signal transduction and gap junctional communication. *Methods Mol Biol* 423: 173-89
- Raptis LH, Brownell HL, Firth KL, Mackenzie LW. 1994. A novel technique for the study of intercellular, junctional communication: electroporation of adherent cells on a partly conductive slide. *DNA Cell Bio* 13: 963-75
- Rassendren F, Audinat E. 2016. Purinergic signaling in epilepsy. *J Neurosci Res* 94: 781-93
- Reagan LP, Reznikov LR, Evans AN, Gabriel C, Mocaër E, Fadel JR. 2012. The antidepressant agomelatine inhibits stress-mediated changes in amino acid efflux in the rat hippocampus and amygdala. *Brain Res* 1466: 91-98
- Reaume AG, De Sousa PA, Kulkarni S, Langille BL, Zhu D, et al. 1996. Cardiac malformation in neonatal mice lacking connexin43. *Science* 267: 1831-34
- Recabal A, Elizondo-Vega R, Philippot C, Salgado M, López S, et al. 2018. Connexin-43 Gap Junctions Are Responsible for the Hypothalamic Tanycyte-Coupled Network. *Front Cell Neurosci* 2
- Redrobe JP, Bourin M, Colombel MC, Baker GB. 1998. Dose-dependent noradrenergic and serotonergic properties of venlafaxine in animal models indicative of antidepressant activity. *Psychopharmacology* 138: 1-8
- Regenold WT, Phatak P, Marano CM, Gearhart L, Viens CH, Hisley KC. 2007. Myelin staining of deep white matter in the dorsolateral prefrontal cortex in schizophrenia, bipolar disorder, and unipolar major depression. *Psychiatry Res* 151: 179-88
- Ren R, Zhang L, Wang M. 2018. Specific deletion connexin43 in astrocyte ameliorates cognitive dysfunction in APP/PS1 mice. *Life Sci* 208: 175-91
- Reul JM, De Kloet ER. 1985. Two receptor systems for corticosterone in rat brain: microdistribution and differential occupation. *Endocrinology* 117: 2505-11
- Reul JM, Gesing A, Droste S, Stec IS, Weber A, et al. 2000. The brain mineralocorticoid receptor: greedy for ligand, mysterious in function. *Eur J Pharmacol* 405: 235-49

- Reul JM, Van Den Bosch FR, De Kloet ER. 1987. Relative occupation of type-I and type-II corticosteroid receptors in rat brain following stress and dexamethasone treatment: functional implications. *J Endocrinol* 115: 459-67
- Reznikov LR, Grillo CA, Piroli GG, Pasumarthi RK, Reagan LP, Fadel J. 2007. Acute stress-mediated increases in extracellular glutamate levels in the rat amygdala: differential effects of antidepressant treatment. *Eur J Neurosci* 25: 3109-14
- Ribeiro DE, Stanquini LA, Biojone C, Casarotto PC, Elfving B, et al. 2019. P2X7 receptors are involved in stress-related behaviours and antidepressant effect. *Eur. Neuropsychopharmacol. Eur. Neuropsychopharmacol* 29
- Richardson-Jones JW, Craige CP, Guiard BP, Stephen A, Metzger KL, et al. 2010. 5-HT1A autoreceptor levels determine vulnerability to stress and response to antidepressants. *Neuron* 65: 40-52
- Richetin K, Leclerc C, Toni N, Gallopin T, Pech S, et al. 2015. Genetic manipulation of adult-born hippocampal neurons rescues memory in a mouse model of Alzheimer's disease. *Brain* 138: 440-55
- Richter SH, Schick A, Hoyer C, Lankisch K, Gass P, Vollmayr B. 2012. A glass full of optimism: enrichment effects on cognitive bias in a rat model of depression. *Cogn Affect Behav Neurosci* 12: 527-42
- Ripps H, Qian H, Zakevicius J. 2002. Pharmacological enhancement of hemi-gap-junctional currents in *Xenopus* oocytes. *J Neurosci Methods* 121: 81-92
- Ripps H, Qian H, Zakevicius J. 2004. Properties of connexin26 hemichannels expressed in *Xenopus* oocytes. *Cell Mol Neurobiol* 24: 647-65
- Rohlmann A, Laskawi R, Hofer A, Dermietzel R, Wolff JR. 1994. Astrocytes as rapid sensors of peripheral axotomy in the facial nucleus of rats. *Neuroreport* 5: 409-12
- Rohlmann A, Laskawi R, Hofer A, Dobo E, Dermietzel R, Wolff JR. 1993. Facial nerve lesions lead to increased immunostaining of the astrocytic gap junction protein (connexin 43) in the corresponding facial nucleus of rats. *Neurosci Lett* 154: 206-08
- Romero L, Hervás I, Artigas F. 1996. The 5-HT1A antagonist WAY-100635 selectively potentiates the presynaptic effects of serotonergic antidepressants in rat brain. *Neurosci Lett* 219: 123-26

- Rook GA. 1999. Glucocorticoids and immune function. *Baillieres Best Pract Res Clin Endocrinol Metab* 13: 567-81
- Rosa AR, Frey BN, Andreazza AC, Ceresér K, Cunha AB, et al. 2006. Increased serum glial cell line-derived neurotrophic factor immunocontent during manic and depressive episodes in individuals with bipolar disorder. *Neurosci Lett* 407: 146-50
- Rose CR, Ranson BR. 1997. Gap junctions equalize intracellular Na⁺ concentration in astrocytes. *Glia* 20: 299-307
- Rosenfeld P, Van Eekelen JA, Levine S, De Kloet ER. 1993. Ontogeny of corticosteroid receptors in the brain. *Cell Mol Neurobiol* 13: 295-319
- Rossi D, Volterra A. 2009. Astrocytic dysfunction: insights on the role in neurodegeneration. *Brain Res Bull* 80: 224-32
- Rouach N, Koulakoff A, Abudara V, Willecke K, Giaume C. 2008. Astroglial metabolic networks sustain hippocampal synaptic transmission. *Science* 322: 1551-55
- Rouach N, Segal M, Koulakoff A, Giaume C, Avignone E. 2003. Carbenoxolone blockade of neuronal network activity in culture is not mediated by an action on gap junctions. *J Physiol* 553: 729-24
- Rowitch DH, Kriegstein AR. 2010. Developmental genetics of vertebrate glial-cell specification. *Nature* 468: 214-22
- Rubinos C, Sánchez HA, Verselis VK, Srinivas M. 2012. Mechanism of inhibition of connexin channels by the quinine derivative N-benzylquininium. *J Gen Physiol* 139: 69-82
- Rush AJ, Trivedi MH, Wisniewski SR, Nierenberg AA, Stewart JW, et al. 2006. Acute and longer-term outcomes in depressed outpatients requiring one or several treatment steps: a STAR*D report. *Am J Psychiatry* 163: 1905-17
- Rush AJ, Zimmerman M, Wisniewski SR, Fava M, Hollon SD, et al. 2005. Comorbid psychiatric disorders in depressed outpatients: demographic and clinical features. *J Affect Disord* 87: 43-55
- Ryan B, Musazzi L, Mallei A, Tardito D, Gruber SH, et al. 2009. Remodelling by early-life stress of NMDA receptor-dependent synaptic plasticity in a gene-environment rat model of depression. *Int J Neuropsychopharmacol* 2: 553-59

- Rycroft-Malone J, Anderson R, Crane RS, Gibson A, Gradinger F, et al. 2014. Accessibility and implementation in UK services of an effective depression relapse prevention programme - mindfulness-based cognitive therapy (MBCT): ASPIRE study protocol. *Implement Sci* 9
- Samuels BA, Hen R. 2011. Neurogenesis and affective disorders. *Eur J Neurosci* 33: 1152-9
- Samuels BA, Leonardo ED, Dranovsky A, Williams A, Wong E, et al. 2014. Global state measures of the dentate gyrus gene expression system predict antidepressant-sensitive behaviors. *PLoS One* 9
- Sanacora G, Banasr M. 2013. From pathophysiology to novel antidepressant drugs: glial contributions to the pathology and treatment of mood disorders. *Biol Psychiatry* 73: 1172-79
- Sanacora G, Zarate CA, Krystal JH, Manji HK. 2008. Targeting the glutamatergic system to develop novel, improved therapeutics for mood disorders. *Nat Rev Drug Discov* 7: 426-37
- Sanderson MJ. 1995. Intercellular calcium waves mediated by inositol trisphosphate. *Ciba Found Symp* 188: 175-89
- Santarelli L, Gobbi G, Debs PC, Sibille ET, Blier P, et al. 2001. Genetic and pharmacological disruption of neurokinin 1 receptor function decreases anxiety-related behaviors and increases serotonergic function. *Proc Natl Acad Sci U S A* 98: 1912-17
- Santarelli L, Saxe M, Gross C, Surget A, Battaglia F, et al. 2003. Requirement of hippocampal neurogenesis for the behavioral effects of antidepressants. *Science* 301: 805-09
- Santello M, Cali C, Bezzi P. 2012. Gliotransmission and the tripartite synapse. *Adv Exp Med Biol* 970
- Sarabdjitsingh RA, Isenia S, Polman A, Mijalkovic J, Lachize S, et al. 2010. Disrupted corticosterone pulsatile patterns attenuate responsiveness to glucocorticoid signaling in rat brain. *Endocrinology* 151: 1177-86
- Sarrouilhe D, Mesnil M, Dejean C. 2018. Targeting Gap Junctions: New Insights in the Treatment of Major Depressive Disorder. *Curr Med Chem*

- Sauvet F, Erblang M, Gomez-Merino D, Rabat A, Guillard M, et al. 2019. Efficacy of THN102 (a combination of modafinil and flecainide) on vigilance and cognition during 40-hour total sleep deprivation in healthy subjects: Glial Connexins as a therapeutic target. *Br J Clin Pharmacol*.
- Scemes E, Dermietzel R, Spray DC. 1998. Calcium waves between astrocytes from Cx43 knockout mice. *Glia* 24: 65-73
- Schalper KA, Palacios-Prado N, Orellana JA, Sáez JC. 2008. Currently used methods for identification and characterization of hemichannels. *Cell Commun Adhes* 15: 207-18
- Schell MJ, Molliver ME, Snyder SH. 1995. D-serine, an endogenous synaptic modulator: localization to astrocytes and glutamate-stimulated release. *Proc Natl Acad Sci U S A* 92: 3948-52
- Schipke CG, Boucsein C, Ohlemeyer C, Kirchhoff F, Kettenmann H. 2002. Astrocyte Ca²⁺ waves trigger responses in microglial cells in brain slices. *FASEB J* 16: 255-57
- Schmidt HD, Duman RS. 2010. Peripheral BDNF produces antidepressant-like effects in cellular and behavioral models. *Neuropsychopharmacology* 35: 2378-91
- Schroeter ML, Sacher J, Steiner J, Schoenknecht P, Mueller K. 2013. Serum S100B represents a new biomarker for mood disorders. *Curr Drug Targets* 14: 1237-48
- Schulz K, Kroner A, David S. 2012. Iron efflux from astrocytes plays a role in remyelination. *J Neurosci* 32: 4841-47
- Schweizer E, Weise C, Clary C, Fox I, Rickels K. 1991. Placebo-controlled trial of venlafaxine for the treatment of major depression. *J Clin Psychopharmacol* 11: 233-36
- Seib LM, Wellman CL. 2003. Daily injections alter spine density in rat medial prefrontal cortex. *Neurosci Lett* 337: 29-32
- Seki A, Coombs W, Taffet SM, Delmar M. 2004. Loss of electrical communication, but not plaque formation, after mutations in the cytoplasmic loop of connexin43. *Heart Rhythm* 1: 227-33
- Seligman ME, Maier SF. 1967. Failure to escape traumatic shock. *J Exp Psychol* 74: 1-9

- Serchov T, Clement HW, Schwarz MK, Iasevoli F, Tosh DK, et al. 2015. Increased Signaling via Adenosine A1 Receptors, Sleep Deprivation, Imipramine, and Ketamine Inhibit Depressive-like Behavior via Induction of Homer1a. *Neuron* 87: 549-62
- Serretti A, Calati R, Mandelli L, De Ronchi D. 2006. Serotonin transporter gene variants and behavior: a comprehensive review. *Curr Drug Targets* 7: 1659-69
- Shao Y, Sutin J. 1992. Expression of adrenergic receptors in individual astrocytes and motor neurons isolated from the adult rat brain. *Glia* 6: 108-17
- Sharma S, Sharma N, Saini A, Nehru B. 2019. Carbenoxolone Reverses the Amyloid Beta 1-42 Oligomer-Induced Oxidative Damage and Anxiety-Related Behavior in Rats. *Neurotox Res* 35: 654-67
- Sher L. 2006. Combined dexamethasone suppression-corticotropin-releasing hormone stimulation test in studies of depression, alcoholism, and suicidal behavior. *ScientificWorldJournal* 6: 1398-404
- Sherman AD, Sacquitne JL, Petty F. 1982. Specificity of the learned helplessness model of depression. *Pharmacol Biochem Behav* 16: 449-54
- Sherrington R, Rogaeve EI, Liang Y, Rogaeve EA, Levesque G, et al. 1995. Cloning of a gene bearing missense mutations in early-onset familial Alzheimer's disease. *Nature* 375: 754-60
- Sibille J, Pannasch U, Rouach N. 2014. Astroglial potassium clearance contributes to short-term plasticity of synaptically evoked currents at the tripartite synapse. *J Physiol* 592: 87-102
- Sillaber I, Panhuysen M, Henniger MS, Ohl F, Kühne C, et al. 2008. Profiling of behavioral changes and hippocampal gene expression in mice chronically treated with the SSRI paroxetine. *Psychopharmacology* 200: 557-72
- Siller-Jackson AJ, Burra S, Gu S, Xia X, Bonewald LF, et al. 2008. Adaptation of connexin 43-hemichannel prostaglandin release to mechanical loading. *J Biol Chem* 283: 26374-82
- Silverstone PH, Ravindran A. 1999. Once-daily venlafaxine extended release (XR) compared with fluoxetine in outpatients with depression and anxiety. Venlafaxine XR 360 Study Group. *J Clin Psychiatry* 60: 22-28

- Simard M, Arcuino G, Takano T, Liu QS, Nedergaard M. 2003. Signaling at the gliovascular interface. *J Neurosci* 22: 9254-62
- Sinyuk M, Alvarado AG, Nesmiyanov P, Shaw J, Mulkearns-Hubert EE, et al. 2015. Cx25 contributes to leukemia cell communication and chemosensitivity. *Oncotarget* 6: 31508-21
- Skolnick P. 1999. Antidepressants for the new millennium. *Eur J Pharmacol* 375: 31-40
- Skolnick P, Layer RT, Popik P, Nowak G, Paul IA, Trullas R. 1996. Adaptation of N-methyl-D-aspartate (NMDA) receptors following antidepressant treatment: implications for the pharmacotherapy of depression. *Pharmacopsychiatry* 29: 23-26
- Söderlund J, Lindskog M. 2018. Relevance of Rodent Models of Depression in Clinical Practice: Can We Overcome the Obstacles in Translational Neuropsychiatry? *International J of Neuropsychopharmacology* 21: 668-76
- Soe R, Macaulay N, Klaerke DA. 2009. Modulation of Kir4.1 and Kir4.1-Kir5.1 channels by small changes in cell volume. *Neurosci Lett* 457: 80-84
- Sofroniew MV, Vinters HV. 2010. Astrocytes: biology and pathology. *Acta Neuropathol* 119: 7-35
- Söhl G, Guldénagel M, Beck H, Teubner B, Traub O, et al. 2000. Expression of connexin genes in hippocampus of kainate-treated and kindled rats under conditions of experimental epilepsy. *Brain Res Mol Brain Res* 83: 44-51
- Solan JL, Lampe PD. 2005. Connexin phosphorylation as a regulatory event linked to gap junction channel assembly. *Biochim Biophys Acta* 1711: 154-63
- Solan JL, Lampe PD. 2009. Connexin43 phosphorylation: structural changes and biological effects. *Biochem J* 419: 261-72
- Somjen GG. 1979. Extracellular potassium in the mammalian central nervous system. *Annu Rev Physiol* 41: 159-77
- Son H, Banasr M, Choi M, Chae SY, Licznarski P, et al. 2012. Neuritin produces antidepressant actions and blocks the neuronal and behavioral deficits caused by chronic stress. *Proc Natl Acad Sci U S A* 109: 11378-83

- Sorg O, Magistretti PJ. 1991. Characterization of the glycogenolysis elicited by vasoactive intestinal peptide, noradrenaline and adenosine in primary cultures of mouse cerebral cortical astrocytes. *Brain Res* 563: 227-33
- Sorrells SF, Paredes MF, Cebrian-Silla A, Sandoval K, Qi D, et al. 2018. Human hippocampal neurogenesis drops sharply in children to undetectable levels in adults. *Nature* 555: 377-81
- Sosunov AA, Wu X, Tsankova NM, Guilfoyle E, McKhann GM, Goldman JE. 2014. Phenotypic heterogeneity and plasticity of isocortical and hippocampal astrocytes in the human brain. *J Neurosci* 34: 2285-98
- Souness GW, Morris DJ. 1989. The antinatriuretic and kaliuretic effects of the glucocorticoids corticosterone and cortisol following pretreatment with carbenoxolone sodium (a liquorice derivative) in the adrenalectomized rat. *Endocrinology* 124: 1588-90
- Souness GW, Morris DJ. 1991. The "mineralocorticoid-like" actions conferred on corticosterone by carbenoxolone are inhibited by the mineralocorticoid receptor (type I) antagonist RU28318. *Endocrinology* 129: 2451-56
- Sousa N, Lukoyanov NV, Madeira MD, Almeida OF, Paula-Barbosa MM. 2000. Reorganization of the morphology of hippocampal neurites and synapses after stress-induced damage correlates with behavioral improvement. *Neuroscience* 97: 253-66
- Sousa N, Madeira MD, Paula-Barbosa MM. 1998. Effects of corticosterone treatment and rehabilitation on the hippocampal formation of neonatal and adult rats. An unbiased stereological study. *Brain Res* 794: 199-210
- Southwick SM, Vythilingam M, Charney DS. 2005. The psychobiology of depression and resilience to stress: implications for prevention and treatment. *Annu Rev Clin Psychol* 1: 255-91
- Spalding KL, Bergmann O, Alkass K, Bernard S, Salehpour M, et al. 2013. Dynamics of hippocampal neurogenesis in adult humans. *Cell* 153: 1219-27
- Spalding KL, Bhardwaj RD, Buchholz BA, Druid H, Frisén J. 2005. Retrospective birth dating of cells in humans. *Cell* 122: 133-43
- Sramek JJ, Murphy MF, Cutler NR. 2016. Sex differences in the psychopharmacological treatment of depression. *Dialogues Clin Neurosci*. 18: 447-57

- Srinivas M, Hopperstad MG, Spray DC. 2001. Quinine blocks specific gap junction channel subtypes. *Proc Natl Acad Sci U S A* 98: 10942-47
- Srinivas M, Kronengold J, Bukauskas FF, Bargiello TA, Verselis VK. 2005. Correlative studies of gating in Cx46 and Cx50 hemichannels and gap junction channels. *Biophys J* 88: 1725-39
- Stafford MR, Bartlett PF, Adams DJ. 2007. Purinergic receptor activation inhibits mitogen-stimulated proliferation in primary neurospheres from the adult mouse subventricular zone. *Mol Cell Neurosci* 35: 535-48
- Stahl SM. 1998. Mechanism of action of serotonin selective reuptake inhibitors. Serotonin receptors and pathways mediate therapeutic effects and side effects. *J Affect Disord* 51
- Stahl SM. 2013. *Essential Psychopharmacology : Neuroscientific Basis and Practical Applications*. San Diego, CA.
- Stankoff B, Aigrot MS, Noël F, Wattilliaux A, Zalc B, Lubetzki C. 2002. Ciliary neurotrophic factor (CNTF) enhances myelin formation: a novel role for CNTF and CNTF-related molecules. *J Neurosci* 22: 9221-27
- Stehberg J, Moraga-Amaro R, Salazar C, Becerra A, Echeverria C, et al. 2012. Release of gliotransmitters through astroglial connexin 43 hemichannels is necessary for fear memory consolidation in the basolateral amygdala. *FASEB J* 26: 3649-57
- Steru L, Chermat R, Thierry B, Simon P. 1985. The tail suspension test: a new method for screening antidepressants in mice. *Psychopharmacology* 85: 367-70
- Stewart JW, McGrath PJ, Blondeau C, Deliyannides DA, Hellerstein D, et al. 2014. Combination antidepressant therapy for major depressive disorder: Speed and probability of remission. *J Psychiatr Res* 52: 7-14
- Stewart PM, Wallace AM, Atherden SM, Shearing CH, Edwards CR. 1990. Mineralocorticoid activity of carbenoxolone: contrasting effects of carbenoxolone and liquorice on 11 beta-hydroxysteroid dehydrogenase activity in man. *Clin Sci* 78: 49-54
- Sticozzi C, Belmonte G, Meini A, Carbotti P, Grasso G, Palmi M. 2013. IL-1 β induces GFAP expression in vitro and in vivo and protects neurons from traumatic injury-associated apoptosis in rat brain striatum via NF κ B/Ca²⁺-calmodulin/ERK mitogen-activated protein kinase signaling pathway. *Neuroscience* 12: 367-83

- Stöckli KA, Lillien LE, Näher-Noé M, Breitfeld G, Hughes RA, et al. 1991. Regional distribution, developmental changes, and cellular localization of CNTF-mRNA and protein in the rat brain. *J Cell Biol* 115: 447-59
- Stoletov K, Strnadel J, Zardouzian E, Momiyama M, Park FD, et al. 2013. Role of connexins in metastatic breast cancer and melanoma brain colonization. *J Cell Sci* 126: 904-13
- Stout CE, Costantin JL, Naus CC, Charles AC. 2002. Intercellular calcium signaling in astrocytes via ATP release through connexin hemichannels. *J Biol Chem* 277: 10482-88
- Ströhle A, Scheel M, Modell S, Holsboer F. 2008. Blunted ACTH response to dexamethasone suppression-CRH stimulation in posttraumatic stress disorder. *J Psychiatr Res* 42: 1185-88
- Strokin M, Sergeeva M, Reiser G. 2011. Proinflammatory treatment of astrocytes with lipopolysaccharide results in augmented Ca²⁺ signaling through increased expression of via phospholipase A2 (iPLA2). *Am J Physiol Cell Physiol* 300: 542-49
- Su M, Tong XX. 2010. Astrocytic gap junction in the hippocampus of rats with lithium pilocarpine-induced epilepsy. *Nan Fang Yi Ke Da Xue Xue Bao* 30
- Su WJ, Zhang T, Jiang CL, Wang W. 2018. Clemastine Alleviates Depressive-Like Behavior Through Reversing the Imbalance of Microglia-Related Pro-inflammatory State in Mouse Hippocampus. *Front Cell Neurosci* 12
- Suadicaní SO, Brosnan CF, Scemes E. 2006. P2X7 receptors mediate ATP release and amplification of astrocytic intercellular Ca²⁺ signaling. *J Neurosci* 26: 1378-85
- Suadicaní SO, Iglesias R, Wang J, Dahl G, Spray DC, Scemes E. 2012. ATP signaling is deficient in cultured Pannexin1-null mouse astrocytes. *Glia* 60: 1106-16
- Sultan S, Li L, Moss J, Petrelli F, Casse F, et al. 2015. Synaptic Integration of Adult-Born Hippocampal Neurons Is Locally Controlled by Astrocytes. *Neuron* 88: 957-72
- Sun J, Ahmad S, Chen S, Tang W, Zhang Y, et al. 2005. Cochlear gap junctions coassembled from Cx26 and 30 show faster intercellular Ca²⁺ signaling than homomeric counterparts. *Am J Physiol Cell Physiol* 288: C613-C23

- Sun JD, Liu Y, Yuan YH, Li J, Chen NH. 2012. Gap junction dysfunction in the prefrontal cortex induces depressive-like behaviors in rats. *Neuropsychopharmacology* 37: 1305-20
- Sun MK, Alkon DL. 2003. Open space swimming test to index antidepressant activity. *J Neurosci Methods* 126: 35-40
- Sun P, Wang F, Wang L, Zhang Y, Yamamoto R, et al. 2011. Increase in cortical pyramidal cell excitability accompanies depression-like behavior in mice: a transcranial magnetic stimulation study. *J Neurosci* 31: 16464-72
- Sun P, Zhang Q, Zhang Y, Wang F, Chen R, et al. 2015. Homer1a-dependent recovery from depression-like behavior by photic stimulation in mice. *Physiol Behav* 147: 334-41
- Sun W, McConnell E, Pare JF, Xu Q, Chen M, et al. 2013. Glutamate-dependent neuroglial calcium signaling differs between young and adult brain. *Science* 339: 197-200
- Swanson CJ, Perry KW, Koch-Krueger S, Katner J, Svensson KA, Bymaster FP. 2006. Effect of the attention deficit/hyperactivity disorder drug atomoxetine on extracellular concentrations of norepinephrine and dopamine in several brain regions of the rat. *Neuropharmacology* 50: 755-60
- Syková E, Nicholson C. 2008. Diffusion in brain extracellular space. *Physiol Rev* 88: 1277-340
- Taberner A, Giaume C, Medina JM. 1996. Endothelin-1 regulates glucose utilization in cultured astrocytes by controlling intercellular communication through gap junctions. *Glia* 16: 187-95
- Takahashi DK, Vargas JR, Wilcox KS. 2010. Increased coupling and altered glutamate transport currents in astrocytes following kainic-acid-induced status epilepticus. *Neurobiol Dis* 40: 573-85
- Takano K, Ogawa M, Kawabe K, Moriyama M, Nakamura Y. 2018. Inhibition of Gap Junction Elevates Glutamate Uptake in Cultured Astrocytes. *Neurochem Res* 43: 59-65
- Takata N, Mishima T, Hisatsune C, Nagai T, Ebisui E, et al. 2011. Astrocyte calcium signaling transforms cholinergic modulation to cortical plasticity in vivo. *J Neurosci* 31: 18155-65

- Takeda H, Inazu M, Matsumiya T. 2002. Astroglial dopamine transport is mediated by norepinephrine transporter. *Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol* 366: 620-23
- Takei N, Numakawa T, Kozaki S, Sakai N, Endo Y, et al. 1998. Brain-derived neurotrophic factor induces rapid and transient release of glutamate through the non-exocytotic pathway from cortical neurons. *J Biol Chem* 273: 27620-24
- Takeuchi H, Jin S, Wang J, Zhang G, Kawanokuchi J, et al. 2006. Tumor necrosis factor- α induces neurotoxicity via glutamate release from hemichannels of activated microglia in an autocrine manner. *J Biol Chem* 281: 21362-68
- Takeuchi H, Mizoguchi H, Doi Y, Jin S, Noda M, et al. 2011. Blockade of gap junction hemichannel suppresses disease progression in mouse models of amyotrophic lateral sclerosis and Alzheimer's disease. *PLoS One* 6
- Tan S, Wang Y, Chen K, Long Z, Zou J. 2017a. Ketamine Alleviates Depressive-Like Behaviors via Down-Regulating Inflammatory Cytokines Induced by Chronic Restraint Stress in Mice. *Biol Pharm Bull* 40: 1260-67
- Tan Z, Liu Y, Xi W, Lou HF, Zhu L, et al. 2017b. Glia-derived ATP inversely regulates excitability of pyramidal and CCK-positive neurons. *Nat Commun* 8
- Tanaka M, Yamaguchi K, Tatsukawa T, Nishioka C, Nishiyama H, et al. 2008. Lack of Connexin43-mediated bergmann glial gap junctional coupling does not affect cerebellar long-term depression, motor coordination, or eyeblink conditioning. *Front Behav Neurosci* 2
- Tanda G, Frau R, Di Chiara G. 1996. Chronic desipramine and fluoxetine differentially affect extracellular dopamine in the rat prefrontal cortex. *Psychopharmacology* 127: 83-87
- Tata DA, Marciano VA, Anderson BJ. 2006. Synapse loss from chronically elevated glucocorticoids: relationship to neuropil volume and cell number in hippocampal area CA3. *J Comp Neurol* 498: 363-74
- Tham MW, Woon PS, Sum MY, Lee TS, Sim K. 2011. White matter abnormalities in major depression: evidence from post-mortem, neuroimaging and genetic studies. *J Affect Disord* 132: 26-36
- Thase ME. 1999. Redefining antidepressant efficacy toward long-term recovery. *J Clin Psychiatry* 60: 15-19

- Theis M, Jauch R, Zhuo L, Speidel D, Wallraff A, et al. 2003. Accelerated hippocampal spreading depression and enhanced locomotory activity in mice with astrocyte-directed inactivation of connexin43. *J Neurosci* 23: 766-76
- Theis M, Mas C, Döring B, Krüger O, Herrera P, et al. 2001. General and conditional replacement of connexin43-coding DNA by a lacZ reporter gene for cell-autonomous analysis of expression. *Cell Commun Adhes.* 8: 383-86
- Theis M, Söhl G, Eiberger J, Willecke K. 2005. Emerging complexities in identity and function of glial connexins. *Trends Neurosci* 28: 188-95
- Then CK, Liu KH, Liao MH, Chung KH, Wang JY, Shen SC. 2017. Antidepressants, sertraline and paroxetine, increase calcium influx and induce mitochondrial damage-mediated apoptosis of astrocytes. *Oncotarget* 8: 115490-502
- Thévenin AF, Kowal TJ, Fong JT, Kells RM, Fisher C, G., Falk MM. 2013. Proteins and mechanisms regulating gap-junction assembly, internalization, and degradation. *Physiology* 28: 93-116
- Thévenin AF, Margraf RA, Fisher CG, Kells Andrews RM, Falk MM. 2017. Phosphorylation regulates connexin43/ZO-1 binding and release, an important step in gap junction turnover. *Mol Biol Cell* 28: 3595-608
- Tian GF, Azmi H, Takano T, Xu Q, Peng W, et al. 2005. An astrocytic basis of epilepsy. *Nat Med* 11: 973-81
- Tonelli LH, Stiller J, Rujescu D, Giegling I, Schneider B, et al. 2008. Elevated cytokine expression in the orbitofrontal cortex of victims of suicide. *Acta Psychiatr Scand* 117: 198-206
- Toni N, Teng EM, Bushong EA, Aimone JB, Zhao C, et al. 2007. Synapse formation on neurons born in the adult hippocampus. *Nat Neurosci* 10: 727-34
- Tonkin RS, Bowles C, Perera CJ, Keating BA, Makker PGS, et al. 2018. Attenuation of mechanical pain hypersensitivity by treatment with Peptide5, a connexin-43 mimetic peptide, involves inhibition of NLRP3 inflammasome in nerve-injured mice. *Exp Neurol* 300: 1-12
- Torres-Platas SG, Nagy C, Wakid M, Turecki G, Mechawar N. 2015. Glial fibrillary acidic protein is differentially expressed across cortical and subcortical regions in healthy brains and downregulated in the thalamus and caudate nucleus of depressed suicides. *Mol Psychiatry* 21: 509-155

- Travis S, Coupland NJ, Silversone PH, Huang Y, Fujiwara E, et al. 2015. Dentate gyrus volume and memory performance in major depressive disorder. *J Affect Disord* 172: 159-64
- Trillat AC, Malagie I, Scarce K, Pons D, Anmella MC, et al. 1997. Regulation of serotonin release in the frontal cortex and ventral hippocampus of homozygous mice lacking 5-HT1B receptors: in vivo microdialysis studies. *J Neurochem* 69: 2019-25
- Tripp A, Oh H, Guilloux JP, Martinowich K, Lewis DA, Sibille E. 2012. Brain-derived neurotrophic factor signaling and subgenual anterior cingulate cortex dysfunction in major depressive disorder. *Am J Psychiatry* 169: 1194-202
- Trivedi MH, Greer TL. 2014. Cognitive dysfunction in unipolar depression: implications for treatment. *J Affect Disord* 152-154: 19-27
- Tsuchioka M, Takebayashi M, Hisaoka K, Maeda N, Nakata Y. 2008. Serotonin (5-HT) induces glial cell line-derived neurotrophic factor (GDNF) mRNA expression via the transactivation of fibroblast growth factor receptor 2 (FGFR2) in rat C6 glioma cells. *J Neurochem* 106: 244-57
- Tsybko AS, Ilchibaeva TV, Popova NK. 2017. Role of glial cell line-derived neurotrophic factor in the pathogenesis and treatment of mood disorders. *Rev Neurosci* 28: 219-33
- Tunc-Ozcan E, Peng CY, Zhu Y, Dunlop SR, Contractor A, Kessler JA. 2019. Activating newborn neurons suppresses depression and anxiety-like behaviors. *Nat Commun* 10
- Tynan RJ, Beynon SB, Hinwood M, Johnson SJ, Nilsson M, et al. 2013. Chronic stress-induced disruption of the astrocyte network is driven by structural atrophy and not loss of astrocytes. *Acta Neuropathol* 126: 75-91
- Uchida S, Hara K, Kobayashi A, Otsuki K, Yamagata H, et al. 2011. Epigenetic status of Gdnf in the ventral striatum determines susceptibility and adaptation to daily stressful events. *Neuron* 69: 359-72
- Unuma K, Shintani-Ishida K, Tsushima K, Shimosawa T, Ueyama T, et al. 2010. Connexin-43 redistribution and gap junction activation during forced restraint protects against sudden arrhythmic death in rats. *Circ J* 74: 1087-95

- Uranova NA, Vostrikov VM, Orlovskaya DD, Rachmanova VI. 2004. Oligodendroglial density in the prefrontal cortex in schizophrenia and mood disorders: a study from the Stanley Neuropathology Consortium. *Schizophr Res* 67: 269-75
- Uwechue NM, Marx MC, Chevy Q, Billups B. 2012. Activation of glutamate transport evokes rapid glutamine release from perisynaptic astrocytes. *J Physiol* 590: 2317-31
- Vaarmann A, Gandhi S, Abramov AY. 2010. Dopamine induces Ca²⁺ signaling in astrocytes through reactive oxygen species generated by monoamine oxidase. *J Biol Chem* 285: 25018-23
- Vallejo R, Tilley DM, Vogel L, Benyamin R. 2010. The role of glia and the immune system in the development and maintenance of neuropathic pain. *Pain Pract* 10: 167-84
- Van Bokhoven P, Oomen CA, Hoogendijk WJ, Smit AB, Lucassen PJ, Spijker S. 2011. Reduction in hippocampal neurogenesis after social defeat is long-lasting and responsive to late antidepressant treatment. *Eur J Neurosci* 33: 1833-40
- Van Eijndhoven P, Van Wingen G, Van Oijen K, Rijpkema M, Goraj B, et al. 2009. Amygdala volume marks the acute state in the early course of depression. *Biol Psychiatry* 65: 812-18
- Van Horn MR, Strasser A, Miraucourt LS, Pollegioni L, Ruthazer ES. 2017. The Gliotransmitter d-Serine Promotes Synapse Maturation and Axonal Stabilization In Vivo. *J Neurosci* 37: 6277-88
- Van Weert LTCM, Buurstede JC, Sips HCM, Vettorazzi S, Mol IM, et al. 2019. Identification of mineralocorticoid receptor target genes in the mouse hippocampus. *J Neuroendocrinol*
- Veenema AH, Meijer OC, De Kloet ER, Koolhaas JM, Bohus BG. 2003. Differences in basal and stress-induced HPA regulation of wild house mice selected for high and low aggression. *Horm Behav* 43: 197-204
- Verity AN, Wyatt TL, Lee W, Hajos B, Baecker PA, et al. 1999. Differential regulation of glial cell line-derived neurotrophic factor (GDNF) expression in human neuroblastoma and glioblastoma cell lines. *J Neurosci Res* 55: 187-97
- Vernerey J, Macchi M, Magalon K, Cayre M, Durbec P. 2013. Ciliary neurotrophic factor controls progenitor migration during remyelination in the adult rodent brain. *J Neurosci* 33: 3240-50

- Vialou V, Bagot RC, Cahill ME, Ferguson D, Robison AJ, et al. 2014. Prefrontal cortical circuit for depression- and anxiety-related behaviors mediated by cholecystokinin: role of Δ FosB. *J Neurosci* 34: 3878-87
- Videbech P. 2000. PET measurements of brain glucose metabolism and blood flow in major depressive disorder: a critical review. *Acta Psychiatr Scand* 101: 11-20
- Vinken M. 2016. Regulation of connexin signaling by the epigenetic machinery. *Biochim Biophys Acta*. 1859: 262-68
- Vodovar D, Duchêne A, Wimberley C, Leroy C, Pottier G, et al. 2018. Cortico-Amygdala-Striatal Activation by Modafinil/Flecainide Combination. *Int J Neuropsychopharmacol* 21: 687-96
- Vollmayr B, Gass P. 2013. Learned helplessness: unique features and translational value of a cognitive depression model. *Cell Tissue Res* 354: 171-78
- Volterra A, Meldolesi J. 2005. Astrocytes, from brain glue to communication elements: the revolution continues. *Nat Rev Neurosci* 6
- Vultur A, Tomai E, Peebles K, Malkinson AM, Grammatikakis N, et al. 2003. Gap junctional intercellular communication in cells isolated from urethane-induced tumors in A/J mice. *DNA Cell Biol* 22: 33-40
- 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: 6810-18
- Walker DG, Kim SU, McGeer PL. 1998. Expression of complement C4 and C9 genes by human astrocytes. *Brain Res* 809: 31-38
- Wallraff A, Köhling R, Heinemann U, Theis M, Willecke K, Steinhäuser C. 2006. The impact of astrocytic gap junctional coupling on potassium buffering in the hippocampus. *J Neurosci*. 26: 5438-47
- Walrave L, Pierre A, Albertini G, Aourz N, De Bundel D, et al. 2018. Inhibition of astroglial connexin43 hemichannels with TAT-Gap19 exerts anticonvulsant effects in rodents. *Glia* 66: 1788-804
- Walrave L, Vinken M, Albertini G, De Bundel D, Leybaert L, Smolders IJ. 2016. Inhibition of Connexin43 Hemichannels Impairs Spatial Short-Term Memory without Affecting Spatial Working Memory. *Front Cell Neurosci* 10: 288

- Walsh RN, Cummins RA. 1976. The Open-Field Test: A Critical Review. *Psychological Bulletin* 83: 482-504
- Walz W. 2000. Role of astrocytes in the clearance of excess extracellular potassium. *Neurochem Int* 36: 291-300
- Wang CH, Gu JY, Zhang XL, Dong J, Yang J, et al. 2016a. Venlafaxine ameliorates the depression-like behaviors and hippocampal S100B expression in a rat depression model. *Behav Brain Funct* 12
- Wang J, Zhang K, Chen X, Liu X, Teng H, et al. 2017. Epigenetic Activation of ASCT2 in the Hippocampus Contributes to Depression-Like Behavior by Regulating D-Serine in Mice. *Front Mol Neurosci* 10
- Wang N, De Bock M, Antoons G, Gadicherla AK, Bol M, et al. 2012. Connexin mimetic peptides inhibit Cx43 hemichannel opening triggered by voltage and intracellular Ca²⁺ elevation. *Basic Res Cardiol* 107: 304
- Wang N, De Vuyst E, Ponsaerts R, Boengler K, Palacios-Prado N, et al. 2013. Selective inhibition of Cx43 hemichannels by Gap19 and its impact on myocardial ischemia/reperfusion injury. *Basic Res Cardiol* 108: 309
- Wang W, Xiang ZH, Jiang CL, Liu WZ, Shang ZL. 2016b. Effects of antidepressants on P2X7 receptors. *Psychiatry Res* 242: 281-87
- Wang Z, Tymianski M, Jones OT, Nedergaard M. 1997. Impact of cytoplasmic calcium buffering on the spatial and temporal characteristics of intercellular calcium signals in astrocytes. *J Neurosci* 17: 7359-71
- Warner A, Clements DK, Parikh S, Evans WH, DeHaan RL. 1995. Specific motifs in the external loops of connexin proteins can determine gap junction formation between chick heart myocytes. *J Physiol* 488: 721-28
- Weeden CS, Roberts JM, Kamm AM, Kesner RP. 2015. The role of the ventral dentate gyrus in anxiety-based behaviors. *Neurobiol Learn Mem* 118: 143-9
- Wei IH, Chen KT, Tsai MH, Wu CH, Lane HY, Huang CC. 2017. Acute Amino Acid d-Serine Administration, Similar to Ketamine, Produces Antidepressant-like Effects through Identical Mechanisms. *J Agric Food Chem* 65: 10792-803
- Wei L, Sheng H, Chen L, Hao B, Shi X, Chen Y. 2016. Effect of pannexin-1 on the release of glutamate and cytokines in astrocytes. *J Clin Neurosci* 23: 135-41

- Weissman MM, Bland R, Joyce PR, Newman S, Wells JE, Wittchen HU. 1993. Sex differences in rates of depression: cross-national perspectives. *J Affect Disord.* 29: 77-84
- Weissman MM, Klerman GL. 1977. Sex differences and the epidemiology of depression. *Arch Gen Psychiatry* 34: 98-111
- Wellman CL. 2001. Dendritic reorganization in pyramidal neurons in medial prefrontal cortex after chronic corticosterone administration. *J Neurobiol* 49: 245-53
- Wentlandt K, Samoilova M, Carlen PL, El Beheiry H. 2006. General anesthetics inhibit gap junction communication in cultured organotypic hippocampal slices. *Anesth Analg* 102: 1692-98
- Whitaker-Azmitia PM, Murphy R, Azmitia EC. 1990. Stimulation of astroglial 5-HT_{1A} receptors releases the serotonergic growth factor, protein S-100, and alters astroglial morphology. *Brain Res* 528: 155-58
- Wilders R, Jongsma HJ. 1992. Limitations of the dual voltage clamp method in assaying conductance and kinetics of gap junction channels. *Biophys J* 63: 942-53
- Wilkinson ST, Sanacora G. 2019. A new generation of antidepressants: an update on the pharmaceutical pipeline for novel and rapid-acting therapeutics in mood disorders based on glutamate/GABA neurotransmitter systems. *Drug Discov Today* 24: 606-15
- Willebrords J, Maes M, Crespo Yanguas S, Vinken M. 2017. Inhibitors of connexin and pannexin channels as potential therapeutics. *Pharmacol Ther* 180: 144-60
- Willner P. 1984. The validity of animal models of depression. *Psychopharmacology* 83: 1-16
- Willner P. 1991. Animal models as simulations of depression. *Trends Pharmacol Sci* 12: 131-36
- Willner P. 2016. The chronic mild stress (CMS) model of depression: History, evaluation and usage. *Neurobiol Stress* 6: 78-93
- Willner P, Belzung C. 2015. Treatment-resistant depression: are animal models of depression fit for purpose? *Psychopharmacology* 232: 3473-95

- Willner P, Scheel-Krüger J, Belzung C. 2013. The neurobiology of depression and antidepressant action. *Neurosci Biobehav Rev* 37: 2331-71
- 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* 93: 358-64
- Xia CY, Chu SF, Zhang S, Gao Y, Ren Q, et al. 2017. Ginsenoside Rg1 alleviates corticosterone-induced dysfunction of gap junctions in astrocytes. *J Ethnopharmacol* 208: 207-13
- Xia CY, Wang ZZ, Yamakuni T, Chen NH. 2018a. A novel mechanism of depression: role for connexins. *Eur Neuropsychopharmacol*. 28: 483-98
- Xia CY, Wang ZZ, Zhang Z, Chen J, Wang YY, et al. 2018b. Corticosterone impairs gap junctions in the prefrontal cortical and hippocampal astrocytes via different mechanisms. *Neuropharmacology* 131: 20-30
- Xu H, Chen Z, He J, Haimanot S, Li X, et al. 2006. Synergetic effects of quetiapine and venlafaxine in preventing the chronic restraint stress-induced decrease in cell proliferation and BDNF expression in rat hippocampus. *Hippocampus* 16: 551-59
- Xu L, Anwyl R, Rowan MJ. 1997. Behavioural stress facilitates the induction of long-term depression in the hippocampus. *Nature* 387: 497-500
- Yalcin I, Aksu F, Belzung C. 2005. Effects of desipramine and tramadol in a chronic mild stress model in mice are altered by yohimbine but not by pindolol. *Eur J Pharmacol* 514: 165-74
- Yalcin I, Belzung C, Surget A. 2008. Mouse strain differences in the unpredictable chronic mild stress: a four-antidepressant survey. *Behav Brain Res* 193: 140-43
- Yamamoto Y, Suzuki H. 2008. Blockade by mefloquine of intercellular electrical coupling between vascular endothelial cells in the guinea-pig mesenteric arteries. *J Smooth Muscle Res* 44: 209-15
- Yan R, Tao S, Liu H, Chen Y, Shi J, et al. 2019. Abnormal Alterations of Regional Spontaneous Neuronal Activity in Inferior Frontal Orbital Gyrus and Corresponding Brain Circuit Alterations: A Resting-State fMRI Study in Somatic Depression. *Front Psychiatry* 10

- Yang H, Yan H, Li X, Liu J, Cao S, et al. 2018. Inhibition of Connexin 43 and Phosphorylated NR2B in Spinal Astrocytes Attenuates Bone Cancer Pain in Mice. *Front Cell Neurosci* 12
- Yang Y, Ge W, Chen Y, Zhang Z, Shen W, et al. 2003. Contribution of astrocytes to hippocampal long-term potentiation through release of D-serine. *Proc Natl Acad Sci U S A* 100: 15194-99
- Yao X, Hrabetová S, Nicholson C, Manley GT. 2008. Aquaporin-4-deficient mice have increased extracellular space without tortuosity change. *J Neurosci* 28: 5460-64
- Yao Z, Fu Y, Wu J, Zhang W, Yu Y, et al. 2018. Morphological changes in subregions of hippocampus and amygdala in major depressive disorder patients. *Brain Imaging Behav*
- Ye B, Shen H, Zhang J, Zhu YG, Ransom BR, et al. 2015. Dual pathways mediate β -amyloid stimulated glutathione release from astrocytes. *Glia* 63: 2208-19
- Ye ZC, Wyeth MS, Baltan-Tekkok S, Ransom BR. 2003. Functional hemichannels in astrocytes: a novel mechanism of glutamate release. *J Neurosci* 23: 3588-96
- Yen MR, Saier MHJ. 2007. Gap junctional proteins of animals: the innexin/pannexin superfamily. *Prog Biophys Mol Biol* 94: 5-14
- Yi C, Ezan P, Fernández P, Schmitt J, Sáez JC, et al. 2017. Inhibition of glial hemichannels by boldine treatment reduces neuronal suffering in a murine model of Alzheimer's disease. *Glia* 65: 1607-25
- Yi C, Mei X, Ezan P, Mato S, Matias I, et al. 2016. Astroglial connexin43 contributes to neuronal suffering in a mouse model of Alzheimer's disease. *Cell Death Differ* 23: 1691-701
- Yoon SY, Robinson CR, Zhang H, Dougherty PM. 2013. Spinal astrocyte gap junctions contribute to oxaliplatin-induced mechanical hypersensitivity. *J Pain* 14: 205-14
- Yoshida M, Saito H, Katsuki H. 1995. Neurotrophic effects of conditioned media of astrocytes isolated from different brain regions on hippocampal and cortical neurons. *Experientia* 51: 133-36
- Yuan S, Jiang X, Zhou X, Zhang Y, Teng T, Xie P. 2018. Inosine alleviates depression-like behavior and increases the activity of the ERK-CREB signaling in adolescent male rats. *Neuroreport* 29: 1223-29

- Yüksel C, Öngür D. 2010. Magnetic resonance spectroscopy studies of glutamate-related abnormalities in mood disorders. *Biol Psychiatry* 68: 785-94
- Yun S, Reynolds RP, Masiulis I, Eisch AJ. 2017. Re-evaluating the link between neuropsychiatric disorders and dysregulated adult neurogenesis. *Nat Med* 22: 1239-47
- Zancan M, Malysz T, Moura DJ, Morás AM, Steffens L, Rasia-Filho AA. 2019. Gap junctions and expression of Cx36, Cx43 and Cx45 in the posterodorsal medial amygdala of adult rats. *Histol Histopathol* 18160
- Zemdegs J, Martin H, Pintana H, Bullich S, Manta S, et al. 2019. Metformin Promotes Anxiolytic and Antidepressant-Like Responses in Insulin-Resistant Mice by Decreasing Circulating Branched-Chain Amino Acids. *J Neurosci* 39: 5935-48
- Zhang FF, Morioka N, Kitamura T, Hisaoka-Nakashima K, Nakata Y. 2015a. Proinflammatory cytokines downregulate connexin 43-gap junctions via the ubiquitin-proteasome system in rat spinal astrocytes. *Biochem Biophys Res Commun* 464: 1202-08
- Zhang H, Zhao Y, Wang Z. 2015b. Chronic corticosterone exposure reduces hippocampal astrocyte structural plasticity and induces hippocampal atrophy in mice. *Neuroscience Letters* 592: 76-81
- Zhang HY, Zhao YN, Wang ZL, Huang YF. 2015c. Chronic corticosterone exposure reduces hippocampal glycogen level and induces depression-like behavior in mice. *J Zhejiang Univ Sci B* 16: 62-69
- Zhang J, Griemsmann S, Wu Z, Dobrowolski R, Willecke K, et al. 2018. Connexin43, but not connexin30, contributes to adult neurogenesis in the dentate gyrus. *Brain Res Bull* 136
- Zhang JM, Wang HK, Ye CQ, Ge W, Chen Y, et al. 2003. ATP released by astrocytes mediates glutamatergic activity-dependent heterosynaptic suppression. *Neuron* 40: 971-82
- Zhang Q, Fukuda M, Van Bockstaele E, Pascual O, Haydon PG. 2004. Synaptotagmin IV regulates glial glutamate release. *Proc Natl Acad Sci U S A* 101: 9441-46
- Zhang S, Li B, Lovatt D, Xu J, Song D, et al. 2010a. 5-HT_{2B} receptors are expressed on astrocytes from brain and in culture and are a chronic target for all five conventional 'serotonin-specific reuptake inhibitors'. *Neuron Glia Biol.* 6: 113-25

- Zhang X, Zhang Z, Sha W, Xie C, Xi G, et al. 2010b. Effect of treatment on serum glial cell line-derived neurotrophic factor in bipolar patients. *J Affect Disord* 126: 326-29
- Zhang XM, Wang LZ, He B, Xiang YK, Fan LX, et al. 2019. The gap junction inhibitor INI-0602 attenuates mechanical allodynia and depression-like behaviors induced by spared nerve injury in rats. *Neuroreport* 30: 369-77
- Zhang Y, Barres BA. 2010. Astrocyte heterogeneity: an underappreciated topic in neurobiology. *Curr Opin Neurobiol* 20: 588-94
- Zhou M, Xu G, Xie M, Zhang X, Schools GP, et al. 2009. TWIK-1 and TREK-1 are potassium channels contributing significantly to astrocyte passive conductance in rat hippocampal slices. *J Neurosci* 29: 8551-64
- Zhu J, Klein-Fedyshin M, Stevenson JM. 2017. Serotonin Transporter Gene Polymorphisms and Selective Serotonin Reuptake Inhibitor Tolerability: Review of Pharmacogenetic Evidence. *Pharmacotherapy* 37: 1089-104
- Zhu S, Shi R, Wang J, Wang JF, Li XM. 2014. Unpredictable chronic mild stress not chronic restraint stress induces depressive behaviours in mice. *Neuroreport* 25: 1151-55
- Zhu ZH, Yang R, Fu X, Wang YQ, Wu GC. 2006. Astrocyte-conditioned medium protecting hippocampal neurons in primary cultures against corticosterone-induced damages via PI3-K/Akt signal pathway. *Brain Res* 1114: 1-10
- Zimmer DB, Cornwall EH, Landar A, Song W. 1995. The S100 protein family: history, function, and expression. *Brain Res Bull* 37: 417-29
- Zink M, Vollmayr B, Gebicke-Haerter PJ, Henn FA. 2010. Reduced expression of glutamate transporters vGluT1, EAAT2 and EAAT4 in learned helpless rats, an animal model of depression. *Neuropharmacology* 58: 465-73

Rôle des connexines 43 astrocytaires : une étude fonctionnelle dans un modèle murin de dépression basé sur le stress chronique.

Auteur : Benjamin Portal

Directeur de thèse : Pr. Bruno Guiard

Discipline : 69 – Neurosciences

Les cellules gliales dont les astrocytes – au moins aussi nombreux que les neurones dans le cerveau – joueraient un rôle important dans l'anxiété, la dépression et probablement dans la réponse aux antidépresseurs. Plusieurs études menées chez l'Homme et l'animal vont dans ce sens puisqu'elles mettent en évidence une association entre des changements d'expression de différents marqueurs astrocytaires et la sévérité de ces troubles psychiatriques. C'est notamment le cas de la connexine 43 (Cx43), une protéine transmembranaire impliquée dans la formation de deux unités fonctionnelles distinctes : les jonctions communicantes (JC) qui assurent la communication entre deux astrocytes voisins et les hémicanaux (HC) dont le rôle est de libérer des molécules neuro-actives (gliotransmetteurs i.e. glutamate, ATP, D-sérine) dans la fente synaptique. En effet, une diminution de l'expression des Cx43 a été rapportée dans différentes régions cérébrales de patients dépressifs et dans des modèles murins de dépression. En revanche, d'un point de vue fonctionnel, l'induction d'un phénotype anxio/dépressif serait associée à une diminution de l'activité des JC et à une augmentation de l'activité des HC.

Face à ces effets opposés, l'objectif de cette thèse était de caractériser plus finement le rôle des Cx43 dans les comportements anxio/dépressifs et la réponse aux psychotropes en utilisant des approches d'inactivation génétiques et pharmacologiques de ces protéines.

Nos résultats montrent que l'inactivation génétique des Cx43 dans l'hippocampe n'entraîne aucun effet neuro-comportemental. En revanche, dans un modèle de dépression basé sur l'exposition chronique des souris à la corticostérone (modèle CORT), l'inactivation génétique des Cx43 exerce des effets de type anxiolytiques/antidépresseurs. D'un point de vue mécanistique, ces effets seraient liés à une diminution de la libération hippocampique de glutamate par les HC et à une atténuation de la réactivité de l'axe hypothalamo-hypophysaire (HPA).

Concernant l'inactivation pharmacologique des Cx43, nos travaux apportent des évidences expérimentales sur le fait que l'administration systémique de carbenoxolone, un bloqueur des connexines, potentialise la réponse aiguë d'un inhibiteur de recapture de la sérotonine en conditions basales, mais s'oppose à ses effets bénéfiques chroniques dans un modèle de dépression. Le microenvironnement cellulaire semble donc essentiel dans la manière dont les Cx43 influencent la réponse aux antidépresseurs.

L'ensemble de ces résultats de thèse laissent entrevoir un rôle des Cx43 astrocytaires dans la régulation de l'humeur via la modulation de circuits neuronaux convergeant vers l'axe HPA. Ils soulignent également l'intérêt de moduler les Cx43 pour renforcer l'activité thérapeutique des antidépresseurs actuellement disponible. Les futures recherches devront préciser les modalités de ces nouvelles stratégies combinant des agents pharmacologiques à tropisme astrocytaire et neuronal.

Mots-clés

Astrocytes, Connexine 43, Hippocampe, Hémicanaux, Stress chronique, Antidépresseur

Centre de Recherches sur la Cognition Animale (UMR CNRS 5169)

Centre de Biologie Intégrative

Université Toulouse III – Paul Sabatier

118, Route de Narbonne

31062 Toulouse Cedex 9

