Traiter les troubles psychiatriques à l'aide de la stimulation transcrânienne par courant continu : approches comportementale et neurobiologique chez la souris

Solène Pedron

▶ **To cite this version:**

Solène Pedron. Traiter les troubles psychiatriques à l'aide de la stimulation transcrânienne par courant continu : approches comportementale et neurobiologique chez la souris. Psychiatrie et santé mentale. Université de Franche-Comté, 2016. Français. NNT : 2016BESA3007 . tel-01558225

HAL Id: tel-01558225
https://theses.hal.science/tel-01558225

Submitted on 7 Jul 2017

HAL is a multi-disciplinary open access archive for the deposit and dissemination of scientific research documents, whether they are published or not. The documents may come from teaching and research institutions in France or abroad, or from public or private research centers.

L'archive ouverte pluridisciplinaire **HAL**, est destinée au dépôt et à la diffusion de documents scientifiques de niveau recherche, publiés ou non, émanant des établissements d'enseignement et de recherche français ou étrangers, des laboratoires publics ou privés.

ÉCOLE DOCTORALE
PRES I Bourgogne I Franche-Comté
Environnements - Santé

Ville de Besançon

THÈSE

en vue de l'obtention du titre de docteur

Spécialité : Sciences de la Vie et de la Santé

présentée et soutenue publiquement par

Solène PEDRON

le 21 novembre 2016

Traiter les troubles psychiatriques à l'aide de la stimulation transcrânienne par courant continu : approches comportementale et neurobiologique chez la souris

Devant un jury composé de :

Catherine BELZUNG, Professeur des Universités (Tours)	**Rapporteur**
David BELIN, Lecturer in Neuroscience (Cambridge)	**Rapporteur**
Mickaël NAASSILA, Professeur des Universités (Amiens)	**Président du jury**
Vincent VAN WAES, MCU (Besançon)	**Directeur de thèse**
Emmanuel HAFFEN, PU-PH (Besançon)	**Directeur de thèse**
Daniel SECHTER, PU-PH (Besançon)	**Directeur de thèse**

Laboratoire de NEUROSCIENCES de Besançon

EA 481 - Laboratoire de Neurosciences Intégratives et Cliniques
2, place du maréchal Leclerc - 25030 Besançon CEDEX

Remerciements

Je tiens tout d'abord à remercier mes trois directeurs de thèse, et plus spécialement Vincent Van Waes, pour m'avoir accompagnée de mes tous premiers pas dans la Recherche, en Master 1, à mes débuts dans l'après-thèse six ans plus tard. Merci pour m'avoir appris à concilier pratique et théorie, encouragée à faire mes propres choix, et pour m'avoir offert un grand nombre d'opportunités de congrès et stages.

Un grand merci bien sûr à mes deux autres directeurs de thèse Emmanuel Haffen et Daniel Sechter, pour m'avoir accordé leur confiance et donné la possibilité de réaliser ce travail.

Je remercie également très sincèrement Catherine Belzung, David Belin et Mickaël Naassila de m'avoir fait l'honneur d'accepter de constituer mon jury. Merci à Marie-Françoise Suaud-Chagny et Pierre-Yves Risold, membres de mon comité de suivi de thèse, pour avoir évalué mon parcours pendant 4 ans et avoir su me guider et me donner de nouvelles pistes de réflexion.

Je tiens à remercier M. Naassila, ainsi que les Pr. Tseng et Steiner et leurs équipes respectives, pour m'avoir accueillie dans leurs laboratoires au cours des deux stages qu'il m'a été donné de réaliser durant cette thèse.

J'adresse mes chaleureux remerciements à Jean-Louis Millot pour ses conseils et son soutien notamment lors de mes candidatures aux postes d'enseignement.

Merci particulièrement à Patrice qui ne croyait pas en ce "truc qui ne marchera pas" et a par conséquent tout mis en œuvre pour que ça fonctionne encore mieux qu'on ne l'espérait. Merci aussi d'avoir été là quand l'aide logicielle ne suffisait plus...

Ma gratitude va également à mes (ex-)acolytes Pierre-Edouard et Lucie, qui ont rendu si vivant le bureau 213.

Merci à Yvan et Laurence, ainsi qu'à tous les autres MCU qui m'ont fait profiter de leur savoir et de leur expérience que ce soit en recherche ou en enseignement; et plus généralement à tous les autres membres fixes ou de passage de l'équipe EA481, notamment les nombreux étudiants qui m'ont aidée dans mes manips et m'ont appris à encadrer et transmettre.

Merci enfin à ma famille et à mes amis pour leur soutien, et particulièrement à Yoan pour avoir bravement relu ce tapuscrit...

Table des matières

I Introduction **13**

1 L'électrothérapie **15**
1.1 Bref historique 15
1.2 L'électrostimulation moderne 18
1.2.1 La stimulation cérébrale profonde 18
1.2.2 La stimulation du nerf vague 19
1.2.3 L'électroconvulsivothérapie 20
1.2.4 La stimulation magnétique transcrânienne 21
1.2.5 La stimulation électrique transcrânienne 23
1.3 La tDCS : principe et mécanisme d'action 25
1.3.1 Rappels sur le potentiel membranaire 26
1.3.2 Aspects physiologiques de la tDCS 27
1.3.3 Autres mécanismes 32

2 La tDCS : applications chez l'Homme **37**
2.1 Applications de la tDCS 37
2.1.1 Traiter des troubles neurologiques 37
2.1.2 Diminuer la douleur 40
2.1.3 Traiter des troubles psychiatriques 42
2.1.4 Chez le sujet sain 48
2.2 Cibler le CPFDL 53
2.2.1 Importance des réseaux neuronaux 54
2.2.2 Le cortex préfrontal dorsolatéral 54
2.3 Recherche translationnelle 56

3 Les modèles animaux **59**
3.1 Notion de modèle 59
3.2 Les modèles animaux de tDCS 60
3.2.1 Études sur animaux sains 60
3.2.2 Études sur modèles de pathologies 67

4 Intérêt d'un nouveau modèle **75**

II Matériel et méthodes 77

5 Le modèle animal **79**
5.1 Sujets . . . 79
5.2 La tDCS chez la souris . . . 80
5.2.1 Chirurgie . . . 80
5.2.2 Sessions de stimulation . . . 81

6 Tests comportementaux **83**
6.1 Activité locomotrice . . . 83
6.1.1 En milieu familier . . . 83
6.1.2 En réponse à la nouveauté . . . 84
6.2 Comportements associés à l'anxiété . . . 84
6.3 Comportements associés à la dépression . . . 85
6.4 Mémoire . . . 87
6.4.1 La mémoire visuo-spatiale . . . 87
6.4.2 La mémoire de travail . . . 88
6.5 Comportements vis-à-vis des drogues . . . 89
6.5.1 Test de libre choix . . . 89
6.5.2 Propriétés appétitives des drogues d'abus . . . 90
6.5.3 Test d'auto-administration . . . 91
6.5.4 Sensibilisation locomotrice . . . 93

7 Tests neurobiologiques **95**
7.1 Immunohistochimie : étude de la neurogenèse . . . 95
7.1.1 Traitement à la BrdU . . . 95
7.1.2 Fixation et conservation des tissus . . . 95
7.1.3 Immunohistochimie . . . 96
7.1.4 Montage des lames et analyse . . . 97
7.2 Hybridation *in situ* : *Zif268* . . . 98
7.2.1 Obtention et préparation des coupes . . . 98
7.2.2 Marquage des sondes . . . 98
7.2.3 Hybridation *in situ* . . . 99
7.2.4 Révélation et analyse . . . 99

8 Traitement des résultats **101**
8.1 Présentation des données . . . 101
8.2 Statistiques . . . 101

8.2.1 t-tests . . . 101
8.2.2 ANOVAs . . . 102

III Résultats 103

9 Étude 1 105
9.1 Choix du modèle animal . . . 106
9.1.1 La souris Swiss . . . 107
9.1.2 Protocole de stimulation . . . 107
9.1.3 Le cortex frontal de la souris . . . 108
9.2 Effets de la tDCS chez la souris . . . 109
9.2.1 Criblage des effets comportementaux . . . 109
9.2.2 Impact de la polarité et de la position de l'électrode . . . 114
9.3 Discussion . . . 116

10 Étude 2 121
10.1 La neurogenèse à l'âge adulte . . . 121
10.1.1 La néo-neurogenèse . . . 121
10.1.2 Neurogenèse hippocampique et dépression . . . 124
10.1.3 Neurogenèse hippocampique et mémoire . . . 126
10.2 La prolifération cellulaire . . . 128
10.2.1 La tDCS augmente la prolifération cellulaire . . . 128
10.2.2 Impact de l'âge des souris . . . 129
10.3 Discussion . . . 131

11 Étude 3 137
11.1 Mode d'action des drogues . . . 137
11.2 La tDCS et la consommation de drogues . . . 141
11.3 Exposition chronique à la nicotine . . . 142
11.3.1 La tDCS après une prise chronique de nicotine à l'adolescence . . . 143
11.3.2 Discussion . . . 145
11.4 Exposition à l'alcool . . . 146
11.4.1 tDCS et consommation spontanée d'éthanol . . . 146
11.4.2 tDCS et préférence de place conditionnée par l'éthanol 148
11.4.3 tDCS et rechute en auto-administration . . . 149
11.4.4 tDCS et sensibilisation locomotrice à l'éthanol . . . 151
11.4.5 Discussion . . . 154
11.5 Exposition à la cocaïne . . . 157
11.5.1 Les ganglions de la base . . . 157

11.5.2 Cocaïne et *Zif268* 159
11.5.3 tDCS et impact d'une exposition aiguë à la cocaïne . . 160
11.5.4 tDCS et préférence de place conditionnée par la cocaïne 165
11.5.5 Discussion 167
11.6 Conclusion de l'étude 3 169

IV Conclusion générale 171

12 Discussion générale 173
12.1 Limites de notre modèle 174
12.2 Soulager des symptômes psychiatriques 175
12.3 Comprendre les mécanismes de la tDCS 177
12.4 Perspective : stimuler à l'adolescence 178
12.5 Conclusion 180

Annexes 219

A Revue bibliographique - *Transcranial direct current stimulation for memory enhancement : from clinical research to animal models* 221

B Article 1 - *Repeated transcranial direct current stimulation prevents abnormal behaviors associated with abstinence from chronic nicotine consumption* 231

C Article 2 - *Transcranial direct current stimulation produces long-lasting attenuation of cocaine-induced behavioral responses and gene regulation in corticostriatal circuits* 241

D Présentation du stimulateur Open-tES 255

Abréviations 257

Avant-propos

Le cerveau est l'organe le plus complexe et peut-être le plus mystérieux du corps humain. Bien qu'il ne représente que 2 % du poids d'un Homme adulte, il est le centre des fonctions vitales et motrices, et le siège des émotions, du raisonnement, et des pensées en général.

La possibilité d'exercer un contrôle externe sur cet organe, que ce soit pour augmenter ses facultés ou pour traiter ses pathologies, intéresse depuis l'Antiquité. Que ce soit par le suivi de programmes d'entraînement spécifiques (jeux de mémoire, logique...) ou l'administration de drogues, la capacité de modifier l'activité cérébrale et les fonctions qui en découlent fait l'objet de nombreuses études.

Parmi les plus anciennes techniques ayant pour but la modulation cérébrale, se trouve la stimulation par courant électrique ; de nos jours elle constitue une piste sérieuse dans le traitement de pathologies psychiatriques ou neurologiques. Dans ce cadre, la stimulation transcrânienne par courant continu (tDCS) est une technique relativement récente, dont la popularité a augmenté ces dernières années.

Au cours de ma thèse, j'ai eu l'occasion d'étudier cette technique sur un modèle animal, la souris. Beaucoup d'approches auraient pu être réalisées ; nous avons décidé d'acquérir une vue d'ensemble des effets de la stimulation transcrânienne sur de nombreux paramètres comportementaux, plutôt que de nous concentrer sur un critère précis et de l'évaluer en profondeur.

De nombreux partenaires nous ont aidés à réaliser ces travaux. En premier lieu, la ville de Besançon qui a financé mon allocation de thèse pendant trois ans. Parmi nos autres sources de financement, la Fondation pour la Recherche en Alcoologie (FRA) nous a accordé plusieurs bourses nous permettant d'acheter du matériel pour nos études.

L'entreprise Dixi microtechniques, à Besançon, a développé une partie du matériel de stimulation qui nous a été nécessaire pour réaliser la technique sur la souris.

Au niveau technologique, notre ingénieur de recherche Patrice Andrieu a développé notre système de contention et un générateur de courant spécifique à l'animal.

Nous avons également réalisé des études en partenariat avec deux laboratoires. J'ai ainsi effectué un stage au sein de l'équipe du Pr. Naassila, du Groupe de recherche sur l'alcool et les pharmacodépendances (GRAP) à

Amiens (INSERM ERI 24), et un autre dans les équipes du Pr. Steiner et du Pr. Tseng de la Chicago Medical School (Rosalind Franklin University, North Chicago).

Enfin, les travaux de cette thèse sont à replacer dans le cadre d'une recherche translationnelle sur les effets de la tDCS effectuée au laboratoire, avec des équipes travaillant sur modèle animal ou chez le sujet humain. En plus de notre laboratoire, d'autres structures telles que le centre hospitalier universitaire et le Centre d'Investigation Clinique - Innovation Technologique (CIC-IT 808) de Besançon interviennent dans cette recherche, sous la coordination du Pr. Emmanuel Haffen.

Résumé

La stimulation transcrânienne par courant continu (tDCS) est une technique non invasive qui permet de modifier l'excitabilité corticale au moyen d'un faible courant électrique délivré à travers le crâne. Peu coûteuse et bien tolérée, elle est de plus en plus étudiée pour l'élaboration de nouveaux traitements de troubles psychiatriques tels que la dépression et l'addiction. Cependant ses mécanismes d'action sont méconnus, d'où la nécessité de recherches complémentaires sur l'animal.

L'objectif de ma thèse était de mettre en place un modèle animal de tDCS pour 1) caractériser chez la souris les comportements affectés par des sessions répétées de tDCS ; 2) commencer à appréhender les mécanismes neurobiologiques sous-tendant ses effets ; et 3) évaluer le potentiel de la tDCS comme aide au sevrage pour différents psychotropes.

Nous avons stimulé le cortex frontal des souris par un courant anodique de 0.2 mA (2x20 minutes/jour, 5 jours consécutifs).

Nos données indiquent que la tDCS a un effet bénéfique sur les comportements associés à la dépression et à la mémoire (visuo-spatiale et de travail) apparaissant trois semaines après la tDCS. Nous avons ensuite quantifié la prolifération cellulaire au niveau de l'hippocampe et montré qu'elle est plus importante chez les souris stimulées par tDCS. Enfin, la tDCS impacte les effets comportementaux et neurobiologiques de différentes drogues. Notamment, certains effets délétères d'une prise chronique de nicotine pendant l'adolescence (test de la nage forcée, préférence de place conditionnée) sont annulés par la tDCS. Cette technique diminue aussi la valeur hédonique de la nicotine et de la cocaïne (préférence de place conditionnée), ainsi que la rechute de consommation d'alcool (auto-administration par voie orale) après extinction du comportement. Enfin, elle diminue les effets comportementaux (locomotion) et moléculaires (induction de *Zif268* dans les circuits cortico-striataux) d'une exposition aiguë à la cocaïne.

Nos résultats sont cohérents avec les données cliniques recueillies chez l'Homme et soutiennent l'hypothèse que la tDCS pourrait être un traitement complémentaire bénéfique pour diverses pathologies. Ils ouvrent la voie à différentes études complémentaires, pour lesquelles notre modèle animal constitue un outil intéressant.

Première partie

Introduction

1 L'électrothérapie

1.1 Bref historique

La stimulation transcrânienne par courant continu (tDCS) est une technique de neuromodulation qui s'inscrit dans le champ plus général de l'électrothérapie (emploi de l'électricité dans un but thérapeutique).

La possibilité de traiter certaines pathologies par l'électricité n'est pas une idée nouvelle ; les premières traces d'électrothérapie remontent au I^{er} siècle de notre ère. Un médecin romain, Scribonius Largus, décrivait alors l'utilisation de raies électriques vivantes du genre *torpedo* pour soulager les maux de tête et la goutte, par application respectivement sur le front ou sous le pied (Tsoucalas *et al.*, 2014).

Néanmoins, il faudra attendre la fin du XVIII^{ème} siècle et les travaux de Luigi Galvani et d'Alessandro Volta de Palua pour que de premières études, qui seront à l'origine de l'utilisation du courant continu en clinique, soient menées sur l'animal. En 1806, Giovanni Aldini, neveu de Galvani, reporta l'efficacité de l'application d'un courant électrique au niveau du lobe pariétal (figure 1.1, A) pour soulager une dépression sévère (Macdonald, 1993).

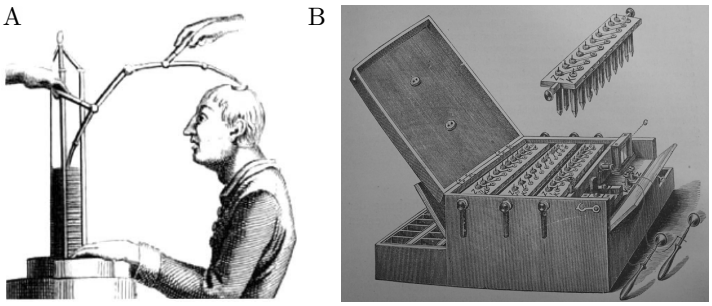


FIGURE 1.1 – A/ Représentation de la stimulation d'un sujet humain par courant galvanique selon Aldini ; tiré de Stagg et Nitsche (2011). B/ Générateur de courant galvanique utilisé par Arndt ; tiré de Steinberg (2013).

Dès la fin du XIX^{ème} siècle, deux psychiatres allemands, Rudolph Gottfried Arndt et Wilhelm Tigges, ont conduit des études sur des groupes de patients dépressifs ou psychotiques. Ils ont utilisé une technique d'électrostimulation appliquée sur la surface de la peau (principalement de la tête) ; les détails du protocole tels que l'intensité de courant et le temps de stimulation sont cependant manquants (figure 1.1 B). Tigges différencia plusieurs groupes de patients en fonction de leurs symptômes et conclut que l'électrothérapie était efficace dans une certaine mesure chez des patients dépressifs, et pourrait même être recommandée comme traitement quand les thérapies conventionnelles ne fonctionnent pas (Steinberg, 2013).

Cette technique de stimulation sera mise de côté dans la première partie du XX^{ème} siècle, du fait notamment de la découverte de l'électroconvulsivothérapie par Bini et Cerletti en 1938. Cette autre méthode d'électrostimulation consiste à provoquer une crise d'épilepsie par administration de trains d'impulsion d'intensité variable, et a fait preuve d'efficacité par exemple dans le traitement de dépressions résistantes aux traitements médicamenteux.

La stimulation transcrânienne par courant continu réapparaît dans les années 1960. Les équipes de Creutzfeldt *et al.* (1962), puis de Bindman *et al.* (1964) démontrent que le passage d'un courant continu appliqué à la surface corticale entraîne des modifications de l'activité électrique des cellules nerveuses chez l'animal (respectivement sur l'encéphale isolé de chat et sur le rat anesthésié), et que ces modifications perdurent plusieurs heures après une stimulation de 5 à 10 minutes. En 1964, Lippold et Redfearn étudient l'effet d'un courant continu sur le comportement de sujets humains. Une petite électrode polarisante est placée au-dessus de chaque sourcil, et une électrode de référence au niveau du genou. L'intensité et la durée de la stimulation sont variables (entre 1 et 3 mA, de quelques minutes à plusieurs heures en fonction de la tolérance du sujet), et chaque sujet reçoit une stimulation par un courant de polarité positive et une stimulation par un courant de polarité négative. Les auteurs concluent de leurs observations qu'une stimulation scalp-positive a un effet excitateur notamment sur la vigilance et l'interaction avec l'environnement (volubilité, rire...), tandis qu'une stimulation scalp-négative a un effet opposé (inhibition, retrait observés par l'entourage ; Lippold et Redfearn (1964)).

Plusieurs études cliniques contrôlées ou non sont alors réalisées par différentes équipes sur des patients dépressifs. Les patients sont traités par des stimulations scalp-positives (électrodes placées selon la position décrite précédemment), d'une intensité variant de 0.02 à 0.25 mA en séances répétées de plusieurs heures chacune (Redfearn *et al.*, 1964 ; Costain *et al.*, 1964). Les auteurs font état d'améliorations significatives chez certains de ces patients

(étude de cas avec observations basées sur le ressenti chez Redfearn *et al.* (1964) ; essai contrôlé avec des scores établis par le psychiatre, le personnel soignant, et le patient lui-même chez Costain *et al.* (1964)). Cependant, du fait d'une part de difficultés de reproductibilité des résultats et d'autre part du développement de la psychopharmacologie (apparition des psychotropes pour le traitement de diverses maladies psychiatriques), le traitement par tDCS est de nouveau mis à l'écart.

C'est pourtant à la même époque qu'un neurophysiologiste, José Delgado, devient célèbre pour ses travaux visant à contrôler électriquement le cerveau (y compris humain). Son résultat le plus médiatisé est d'avoir arrêté un taureau en pleine charge lors d'une démonstration dans une arène à Cordoue, en 1963. Delgado avait préalablement placé un implant cérébral, *via* lequel il stimula (au moyen d'une télécommande) le noyau caudé de l'animal pour contrôler ses mouvements. Ses travaux menèrent à de vives critiques, l'obligeant à se tourner vers des études moins controversées ; toujours est-il que lui aussi envisageait l'utilisation de stimulations cérébrales pour un usage thérapeutique (Delgado, 1977).

FIGURE 1.2 – Images d'archive montrant José Delgado lors de sa démonstration dans une arène à Cordoue (1963). Le neurophysiologiste contrôla les mouvements d'un taureau *via* un stimulateur cérébral implanté puis commandé à distance.

C'est à la fin des années 1990 qu'une équipe romaine étudie l'effet de la polarisation cérébrale sur l'excitabilité du cortex moteur chez des sujets humains (Priori *et al.*, 1998). Une électrode est posée sur le cortex moteur gauche, et l'autre sur le menton. Un courant d'une intensité variable (maximum 0.5 mA) est délivré pendant sept secondes et l'amplitude des potentiels évoqués moteurs (c'est-à-dire la réponse musculaire faisant suite à la stimulation magnétique transcrânienne -TMS- du cortex moteur) est mesurée. Cette étude confirme que la stimulation transcrânienne module l'excitabilité

corticale d'une manière dépendante de l'intensité et de la polarité du courant.

Cette publication a entraîné un regain d'intérêt pour cette méthode de stimulation électrique, qui prend le nom de stimulation transcrânienne par courant continu.

1.2 Les différentes techniques modernes d'électrostimulation

L'électrothérapie a commencé à être réellement utilisée en clinique par les neuropsychiatres dès le XIX^{ème} siècle, et renvoyait à l'application directe de courants soit sur la peau, soit sur les nerfs proches de la source de la pathologie ou de l'organe affecté. Les pathologies psychiatriques étant alors considérées comme des maladies du cerveau, l'électricité était appliquée à travers le crâne.

À partir de là, plusieurs techniques d'électrothérapie ont été étudiées, et pour certaines utilisées en clinique pour traiter les troubles neuropsychiatriques. Les deux premières sont dites invasives, car elles impliquent une lésion de l'organisme. Les autres sont actuellement décrites comme faisant partie des stimulations non invasives, bien que certains auteurs contestent l'emploi de ce terme et la définition générale d'une "procédure invasive" (Davis et van Koningsbruggen, 2013).

1.2.1 La stimulation cérébrale profonde

Cette technique a été découverte par hasard en 1987 par le neurochirurgien Alim-Louis Benabid alors qu'il opérait un patient atteint de tremblements. L'opération à l'époque consistait à léser une zone supposée responsable de la pathologie à traiter ; la zone optimale était repérée en observant les effets d'une stimulation des neurones avoisinants. Le professeur Benabid décida de tester l'effet de différentes fréquences de stimulation et remarqua que les tremblements de son patient disparaissaient sous stimulation à haute fréquence ($>$ 100 Hz ; DeLong MR et Benabid A (2014)). De là découla l'idée d'implanter une électrode dans la zone cible et un stimulateur généralement en zone sous-claviculaire du patient, alors éveillé et conscient (figure 1.3). Une stimulation à 130 Hz est réalisée pendant l'opération et les paramètres de stimulation optimaux (permettant d'observer une amélioration des symptômes sans apparition d'effets indésirables) sont progressivement recherchés (Breit *et al.*, 2004). Typiquement ils sont compris entre 1 et 3.5 V, 60 et 210 μs de largeur d'impulsion, et entre 130 et 185 Hz de fréquence (Kuncel et Grill, 2004).

Si cette technique a révélé son efficacité dans le soulagement des symptômes de la maladie de Parkinson, elle est également étudiée pour le traitement d'autres troubles psychiatriques tels que les troubles obsessionnels compulsifs ou encore la dépression (les zones cérébrales traitées variant selon les auteurs ; Kuncel et Grill (2004)). Cela étant, elle reste une technique très invasive, nécessitant une lourde chirurgie consistant à implanter des électrodes profondément dans le cerveau. Aussi encore peu de patients en bénéficient (en 2015, environ 5 à 10 % des patients parkinsoniens en France selon l'INSERM).

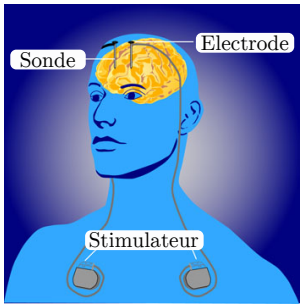


FIGURE 1.3 – Schéma du montage dans le cadre du traitement par stimulation cérébrale profonde. Adapté du site du *National Institute of Mental Health* (www.nimh.nih.gov).

1.2.2 La stimulation du nerf vague

Une autre technique de stimulation électrique nécessitant l'implantation d'un dispositif est la stimulation du nerf vague. Un petit générateur d'impulsions électriques est implanté dans la paroi supérieure gauche du thorax ; il est lié à une électrode placée au niveau du nerf vague gauche dans le cou (figure 1.4). Cette forme de thérapie est invasive car nécessite une chirurgie, mais a des effets secondaires la plupart du temps peu intenses et transitoires (enrouement, sensation d'inconfort dans la gorge, toux). Utilisée pour traitée l'épilepsie résistante, cette technique a montré une efficacité pour améliorer l'humeur des patients épileptiques. Elle est donc, depuis, aussi étudiée comme traitement d'autres troubles psychiatriques tels que les troubles de l'humeur (dépression) ou encore la maladie d'Alzheimer (Vonck *et al.*, 2014). L'efficacité de la stimulation du nerf vague sur la dépression pourrait s'expliquer par une augmentation de la sécrétion de monoamines (sérotonine, noradrénaline), qui augmenterait la plasticité cérébrale au niveau de l'hippocampe. De nouveaux neurones pourraient ainsi intégrer et rétablir les réseaux cortico-limbiques affectés par la dépression (Grimonprez *et al.*, 2015).

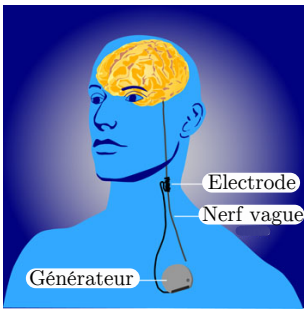


FIGURE 1.4 – Schéma du montage dans le cadre du traitement par stimulation du nerf vague. Adapté du site du *National Institute of Mental Health* (www.nimh.nih.gov).

1.2.3 L'électroconvulsivothérapie

Cette technique de stimulation cérébrale, appelée également sismothérapie (ou plus couramment électrochocs), est historiquement considérée comme invasive, car à ses débuts elle engendrait des traumatismes physiques irréversibles.

Elle a vu le jour dans les années 1930 ; à cette époque, différents médecins s'intéressaient à des traitements par convulsions contre les maladies mentales. Ainsi par exemple, le psychiatre hongrois Meduna émit l'hypothèse d'une relation inverse entre épilepsie et schizophrénie, et chercha à guérir ses patients schizophrènes en leur causant une crise d'épilepsie par injection d'huile de camphre (puis, par la suite, de pentylènetétrazole, un antagoniste GABA). Les effets secondaires de ce traitement étaient extrêmement traumatisants, poussant diverses équipes à rechercher des méthodes alternatives pour induire les convulsions. C'est en 1938 que Cerletti et Bini traitèrent un premier patient souffrant d'hallucinations par électroconvulsivothérapie (ECT) (Payne et Prudic, 2009).

De nos jours, ce traitement est encore réalisé pour traiter divers troubles psychiatriques tels que les dépressions résistantes. Il est réalisé sous anesthésie et myorelaxant ; le placement des électrodes est unilatéral (figure 1.5) ou bilatéral, et le courant délivré peut être sinusoïdal (usage ancien) ou continu à ondes carrées brèves pulsées. Le praticien doit définir le seuil épileptogène du patient (quantité d'énergie nécessaire pour induire une crise convulsive généralisée ; Haute autorité de santé, anciennement Agence nationale d'accréditation et d'évaluation en santé ANAES (1997)). Les paramètres du courant délivré sont de l'ordre de 500 à 800 mA, 20 à 120 Hz, pour une durée d'impulsion de 0.3 à 2 millisecondes et une durée de stimulation ne dépassant pas 8 secondes (Sienaert *et al.*, 2007).

Bien que cette technique ait souffert d'une mauvaise publicité en raison d'un courant anti-psychiatrique dans les années 1960/1970 et de médias relatant des abus médicaux au début de son utilisation - tels que le film *Vol au dessus d'un nid de coucou* (Milos Forman, 1975) -, son efficacité a largement été démontrée dans le cadre du traitement des troubles de l'humeur (par exemple, efficacité allant jusqu'à 90 % chez les patients souffrant de dépression majeure ; ANAES (1997)).

FIGURE 1.5 – Schéma du montage de type unilatéral dans le cadre du traitement par électroconvulsivothérapie. Tiré du site du *National Institute of Mental Health* (www.nimh.nih.gov).

1.2.4 La stimulation magnétique transcrânienne

Parmi les techniques de stimulation cérébrale non invasives, la stimulation magnétique transcrânienne (TMS) est actuellement utilisée dans le traitement de divers troubles psychiatriques et comme outil d'investigation en recherche clinique. Le stimulateur est composé d'une bobine qui produit un champ magnétique pouvant aller jusqu'à 2 Tesla et durer 100 ms (Lefaucheur, 2009). Un courant électrique passant dans la bobine génère un champ magnétique, qui lui-même génère un champ électrique secondaire capable de produire une dépolarisation (excitation) des neurones (figure 1.6).

En fonction de divers paramètres (type de la bobine, orientation par rapport au crâne, intensité du champ magnétique...), les effets de la stimulation varient (Vidailhet *et al.*, 2005).

Plusieurs types de stimulations peuvent être réalisés. Les stimulations de type unique (*single-pulse*) ou double (*paired-pulse*) sont utilisées en recherche comme outil d'investigation des fonctions physiologiques ; une seule ou deux impulsions sont délivrées, par exemple dans le but de générer un potentiel évoqué moteur en réponse à la stimulation du cortex moteur. En revanche, en clinique, afin de moduler durablement l'activité d'une zone corticale d'in-

térêt, la stimulation se fait selon une modalité répétitive, à savoir que des impulsions ou des séries de trains d'impulsion sont délivrées à intervalle régulier ; on parle alors de stimulations magnétiques transcrâniennes répétées (rTMS). En général, une stimulation à basse fréquence (<1 Hz) entraîne une diminution de l'excitabilité corticale tandis qu'une stimulation à haute fréquence (>5 Hz) augmente l'activité des neurones cibles (Burt *et al.*, 2002 ; Lefaucheur, 2009). Ces effets passeraient par une modulation de la plasticité synaptique (modulation de la dépression ou de la potentialisation à long terme ; Lefaucheur (2009)). Généralement bien tolérée, cette technique a peu d'effets secondaires (contractions musculaires, maux de tête dans 10 à 30 % des cas ; Burt *et al.* (2002)). Quelques rares cas de crises d'épilepsie ont été reportés suite à une stimulation, mais datent d'une période antérieure à l'établissement de règles standard de sécurité.

Bien que nécessitant un appareillage spécifique coûteux et non transportable, cette technique apparaît intéressante pour le traitement de divers troubles neurologiques et psychiatriques, notamment la dépression. La durée de ses effets bénéfiques reste cependant méconnue ; elle pourrait augmenter en cumulant les sessions sur une période plus longue que celle habituellement décrite dans les articles (1 à 2 semaines). Enfin, il reste à déterminer les paramètres optimaux de stimulation pour chaque pathologie traitée (Burt *et al.*, 2002).

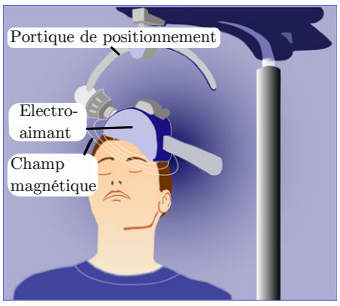


FIGURE 1.6 – Schéma du dispositif de stimulation magnétique transcrânienne (TMS). Adapté du site du *National Institute of Mental Health* (www.nimh.nih.gov).

À noter qu'il existe aussi une alternative magnétique à l'ECT : la MST (pour *Magnetic Seizure Therapy*) consiste à appliquer un champ magnétique de haute fréquence (par exemple, 100 Hz) pour provoquer une crise d'épilepsie. Cette technique combinerait les avantages de l'ECT (efficacité) et de la TMS (sécurité), et est étudiée dans le cadre du traitement des troubles de

l'humeur (Cretaz *et al.*, 2015).

1.2.5 La stimulation électrique transcrânienne

L'activité corticale peut également être modulée par l'application de courants électriques faibles à travers le cuir chevelu des sujets, et ceci de manière non invasive.

Les stimulations transcrâniennes électriques sont de plusieurs types ; la plus étudiée à ce jour est la stimulation transcrânienne par courant continu (tDCS), objet de cette thèse. Le principe de base est simple : une batterie génère un faible courant continu délivré au cerveau par une électrode positionnée sur le cuir chevelu en regard d'une zone cible (figure 1.7). Ce courant parcourt le cerveau, modulant l'activité neuronale, et sort via une seconde électrode qui ferme le circuit. Cette technique est généralement très bien tolérée et on ne lui connaît pas d'effets secondaires sérieux (Kessler *et al.*, 2012). Notons qu'elle a pour caractéristique - souvent décrite comme un de ses avantages - de stimuler une zone assez large du cortex cérébral ; mais il en existe une variante, la tDCS haute définition (HD-tDCS), qui permet une stimulation très focale grâce à de petites électrodes en gel (To *et al.*, 2016).

D'autres formes de stimulation peuvent être réalisées ; notamment, la tDCS peut être pulsée (tPCS, stimulation cyclique par un courant continu). En tDCS, nous sommes en courant continu : le courant s'écoule dans une direction (les électrons circulant de la borne négative à la borne positive d'une batterie). À l'opposé, nous pouvons stimuler en courant alternatif : les électrons circulent alors alternativement dans une direction puis dans l'autre selon un cycle régulier. Ainsi il existe des modalités de stimulation par courants alternatifs et sinusoïdaux (tACS), ou de stimulation transcrânienne par bruit aléatoire (tRNS : le courant varie de façon aléatoire) (Paulus, 2011).

Si la tACS est réalisée avec un décalage en tension (*offset*) suffisant pour polariser le courant, cette technique prend le nom d'otDCS (pour tDCS oscillatoire ; Herrmann *et al.* (2013)) (figure 1.7). La tRNS aussi peut être réalisée avec un *offset* ; l'équipe de Ho *et al.* (2015) a d'ailleurs montré que cette modalité serait plus efficace que la tRNS sans *offset* (courant non polarisé) pour augmenter l'excitabilité corticale.

Notons que si pour la tDCS, le facteur le plus important influençant les effets observés est la polarité du courant, pour la tACS il s'agit de la fréquence du courant.

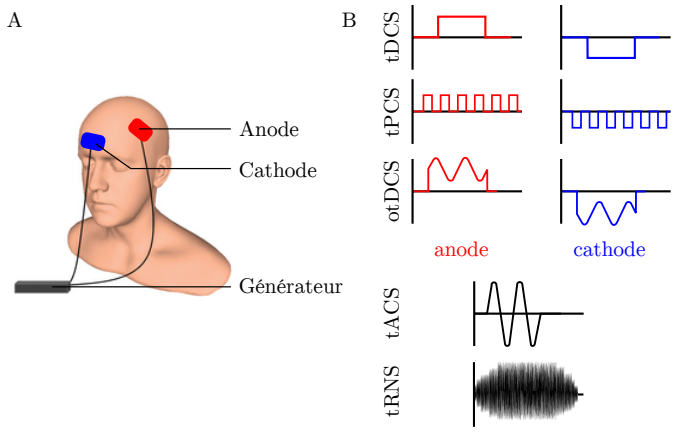


FIGURE 1.7 – A/ Montage pour la stimulation électrique transcrânienne. Ici, l'anode est placée sur le cortex préfrontal dorsolatéral gauche, et la cathode sur l'aire supra-orbitaire controlatérale. Adapté de Dayan *et al.* (2013). B/ Les différentes modalités de stimulation électrique transcrânienne. tDCS : stimulation transcranienne par courant continu ; tPCS : tDCS pulsée ; otDCS : tDCS oscillatoire ; tACS : stimulation transcranienne par courant alternatif ; tRNS : stimulation transcranienne par bruit aléatoire. Adapté de Herrmann *et al.* (2013) et de Saiote *et al.* (2013).

Le cerveau émet des ondes cérébrales à des fréquences définies. Dans le cas de la tPCS, tACS ou tRNS, les fréquences électriques appliquées permettent la modulation des rythmes corticaux intrinsèques (biologiques). Ainsi ces techniques permettraient de rectifier des ondes pathologiques, voire de remplacer un signal absent. Stimuler une zone corticale précise par cette méthode, à une fréquence proche de celle des ondes cérébrales normales, modifie l'excitabilité corticale : par exemple, Moliadze et ses collaborateurs ont montré (*via* l'étude des potentiels évoqués moteurs) que l'application de la tACS à haute fréquence (140 Hz) pendant 10 minutes et à 1 mA permettait d'augmenter l'excitabilité du cortex moteur, et que les effets observés dépendaient de la fréquence appliquée (Moliadze *et al.*, 2010). Ce type de stimulation pourrait se révéler intéressant dans le traitement des troubles du mouvement, et plus généralement des troubles psychiatriques associés à des ondes cérébrales anormales.

La tRNS consiste à appliquer un courant alternatif à des fréquences aléatoires sur une région cible du cortex. Le spectre de fréquences complet va de 0.1 à 640 Hz ; les plus hautes fréquences (à partir de 100 Hz) permettraient d'augmenter l'excitabilité corticale (mesure des potentiels évoqués moteurs après stimulation du cortex moteur) et d'améliorer les performances dans un

test de mémoire implicite aussi bien, voire mieux, que la tDCS, ceci en s'affranchissant de la contrainte liée au choix de la polarité de courant (Terney *et al.*, 2008 ; Fertonani *et al.*, 2011).

Enfin, pour la tACS et la tRNS, l'intensité du courant pourrait déterminer le caractère inhibiteur ou excitateur de la stimulation. L'équipe de Moliadze a pu ainsi prouver que pour une stimulation par tACS aux paramètres cités ci-avant (stimulation du cortex moteur à une fréquence de 140 Hz, 10 minutes) ou pour une stimulation par tRNS (spectre de fréquence complet, soit jusqu'à 640 Hz), un courant de faible intensité (0.4 mA) entraînait une inhibition alors qu'un courant de plus forte intensité (1 mA) entraînait une augmentation de l'excitabilité corticale (Moliadze *et al.*, 2012). Les intensités intermédiaires restaient sans effet sur l'intensité des potentiels évoqués moteurs.

Pour conclure, les techniques de stimulation électrique comprennent désormais un large éventail de paramètres : type de courant, intensité, fréquence d'oscillations... Le choix des modalités de stimulation se base actuellement sur des hypothèses concernant les effets qu'elles provoqueront, les paramètres optimaux restant à déterminer.

Pour ces différentes techniques aucun effet secondaire sérieux n'a encore été rapporté dans les conditions préconisées d'utilisation (Loo *et al.*, 2011), et leur facilité d'exécution (bien que ces stimulations doivent être réalisées par un professionnel formé et sous la supervision d'un médecin, le dispositif nécessaire est peu coûteux et portatif) en font une piste intéressante pour le traitement de diverses pathologies (avec possibilité de le réaliser à domicile).

1.3 La tDCS : principe et mécanisme d'action

Le terme de "stimulation transcrânienne par courant continu" désigne donc une technique de stimulation cérébrale qui utilise un courant continu, de faible intensité, dirigé vers une aire cérébrale spécifique.

L'un des avantages de cette technique, outre son caractère non invasif, consiste en la simplicité de son appareillage, composé d'un générateur de courant et de deux électrodes de polarité différente. Les électrodes sont enduites de gel conducteur et placées sur le scalp du sujet ; le courant circule de la cathode (électrode chargée négativement) vers l'anode (chargée positivement) à travers la boîte crânienne (Nitsche *et al.*, 2008). La position des électrodes, le temps et la fréquence de stimulation varient en fonction de l'effet que l'on souhaite étudier ; le courant est appliqué pendant plusieurs

minutes avec une montée (=*fade in*) et une descente (=*fade out*) progressives (par exemple, chez l'Homme, montée de 0 à 2 mA en 10 secondes, stimulation à 2 mA pendant 20 minutes, puis descente en 10 secondes). Les variations progressives du courant servent à éviter le ressenti de sensations désagréables au moment de l'application du courant.

1.3.1 Rappels sur le potentiel membranaire

Afin d'expliquer les effets générés par le passage d'un courant électrique au niveau d'un neurone, il apparaît important de rappeler quelques notions sur la physiologie des cellules excitables.

Le potentiel de repos

Le neurone est une cellule excitable, qui utilise des signaux électriques pour transmettre une information. Au repos, si l'on introduit une microélectrode dans un neurone et une électrode de référence dans le milieu extracellulaire, on peut mesurer une différence de potentiel de part et d'autre de la membrane : l'intérieur de la cellule est négatif par rapport à l'extérieur. Cette différence, stable, est appelée potentiel de repos. On définit la valeur du potentiel de repos à environ -70 mV.

Le potentiel d'action

Une stimulation arrive sur un neurone, entraînant une ouverture de canaux sodiques voltage-dépendants enchassés dans sa membrane, ce qui provoque une dépolarisation. Si la valeur du seuil d'excitabilité de la cellule est atteinte (environ -50 mV), il y a formation d'un potentiel d'action (figure 1.8) : (1) un maximum de canaux sodiques voltage-dépendants s'ouvre ; les ions Na^+ rentrent alors massivement dans le milieu intracellulaire (phase ascendante : dépolarisation rapide de la membrane). (2) Lorsque la concentration en Na^+ a atteint une certaine valeur (+30 mV), les canaux sodiques s'inactivent. (3) Les canaux potassiques voltage-dépendants s'ouvrent environ 1 ms après que le seuil d'excitabilité ait été atteint, laissant sortir les ions K^+ : phase de repolarisation. (4) Les canaux K^+ mettent plus de temps à se refermer, entraînant une hyperpolarisation. (5) Pour retrouver l'équilibre électrochimique, les pompes Na^+ et K^+ prennent le relais, faisant sortir les ions K^+ et entrer les ions Na^+ pour permettre au potentiel de retrouver sa valeur de repos (Bear *et al.*, 2007).

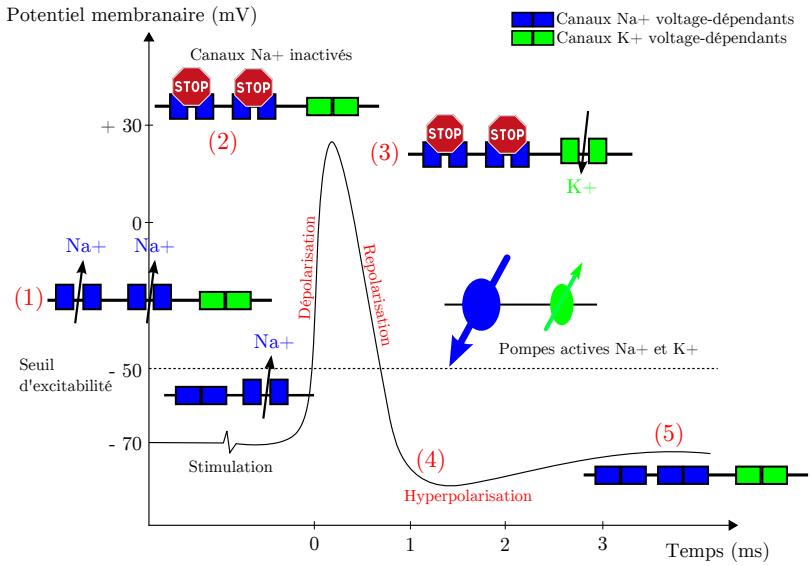


FIGURE 1.8 – Les différentes étapes conduisant au déclenchement d'un potentiel d'action, décrites dans le texte : (1) dépolarisation ; (2) inactivation des canaux sodiques ; (3) repolarisation ; (4) hyperpolarisation ; (5) retour au potentiel de repos.

Notons que contrairement à d'autres techniques de stimulation, telles que la stimulation magnétique transcrânienne (TMS), la tDCS n'entraîne pas directement la formation d'un potentiel d'action, mais modifie l'excitabilité neuronale au niveau du site de stimulation (figure 1.9) ; c'est pourquoi il serait plus judicieux de parler de neuromodulation que de stimulation.

1.3.2 Aspects physiologiques de la tDCS

Apport des études sur la polarisation

Les premières études menées dans les années 1960 ont démontré qu'un faible courant appliqué au niveau cortical modifie l'excitabilité neuronale pendant et après la stimulation (Bindman *et al.*, 1964). Ainsi, dans le cas d'une stimulation par courant continu, l'anode entraîne une dépolarisation membranaire qui, rapprochant les neurones de leur seuil d'activation, augmente les chances de décharge neuronale (formation d'un potentiel d'action ; figure 1.9 A). Au contraire la cathode entraîne une hyperpolarisation qui diminue l'excitabilité neuronale (figure 1.9 B). Néanmoins, cet effet dépend de la position des neurones dans le cortex (l'activation des neurones des couches profondes serait au contraire plutôt facilitée par la cathode et inhibée par

l'anode ; Purpura et McMurtry (1965)).

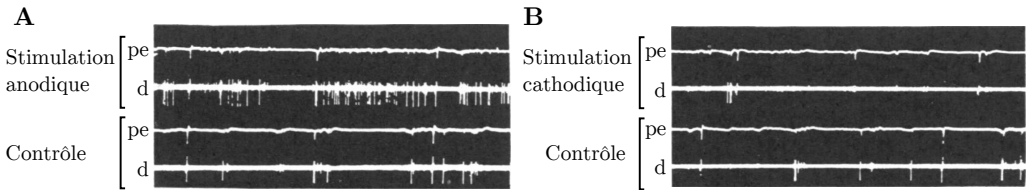


FIGURE 1.9 – Effet d'un courant continu d'une intensité de 0.01 mA sur la décharge neuronale. A/ Polarisation anodique : augmentation du nombre de décharges neuronales (au-dessus) par rapport au contrôle (en dessous). B/ Polarisation cathodique : diminution du nombre de décharges neuronales par rapport au contrôle. pe : tracé correspondant au potentiel évoqué (toutes les 2 secondes) ; d : tracé correspondant à la décharge neuronale. Adapté de Bindman *et al.* (1964).

Apport des potentiels évoqués moteurs : études pharmacologiques

Un potentiel évoqué (PE) est une modification de l'activité électrique du système nerveux en réponse à une stimulation extérieure. Les PE moteurs sont obtenus en stimulant le cortex moteur (la plupart du temps par TMS ; voir 1.2.4) et en enregistrant l'amplitude de réponse par électromyographie (*via* des électrodes cutanées) au niveau du muscle cible.

La mesure des potentiels évoqués permet l'étude du fonctionnement du système nerveux sous diverses conditions (fonctionnement normal, pathologique...). Elle a largement contribué à la caractérisation des effets de la tDCS, comme présenté dans les études ci-dessous.

Ces effets peuvent être différenciés en effets immédiats (pendant) et répercussions (après la stimulation), résumés dans le tableau 1.1.

A/ Effets immédiats : la stimulation anodique implique principalement une modulation des canaux sodiques membranaires. En effet, leur blocage (par la carbamazépine) annule l'augmentation de l'excitabilité normalement observée. De manière plus modérée, un blocage des canaux calciques (flunarizine) diminue l'efficacité de la tDCS ; cet effet moindre du blocage des canaux calciques s'explique par la prédominance des canaux sodiques dans le contrôle des variations de potentiels membranaires (Nitsche *et al.*, 2003a).

En revanche, le blocage de ces canaux ioniques n'a aucun effet sur l'hyperpolarisation induite par une stimulation cathodique. Ceci pourrait s'expliquer par le fait que physiologiquement, l'hyperpolarisation implique déjà une inactivation des canaux sodiques et calciques (Nitsche *et al.*, 2003a).

B/ Répercussions : là encore le blocage des canaux sodiques ou calciques ne supprime les effets que d'une stimulation anodique (et non cathodique).

Les récepteurs N-méthyl-D-aspartate (NMDA) ont été choisis comme cible d'intérêt pour l'étude des mécanismes de la tDCS. Ces récepteurs canaux (perméables aux ions Na^+, K^+ et Ca^{++}) sont en effet impliqués dans les processus de plasticité cérébrale tels que la potentialisation et la dépression à long terme (PLT et DLT, très étudiés notamment pour leur rôle dans plusieurs types de mémoire ; Lüscher et Malenka (2012)).

Dans les conditions normales ces récepteurs sont inactifs. Lorsqu'un neurone présynaptique libère une quantité suffisante de glutamate (principal neurotransmetteur activateur du système nerveux central) pour que le seuil d'activation d'un neurone postsynaptique soit dépassé, les récepteurs NMDA de ce second neurone s'ouvrent et des ions calcium entrent massivement. Ils déclenchent alors une cascade de réactions moléculaires qui aboutit à une modification durable de la synapse (figure 1.10).

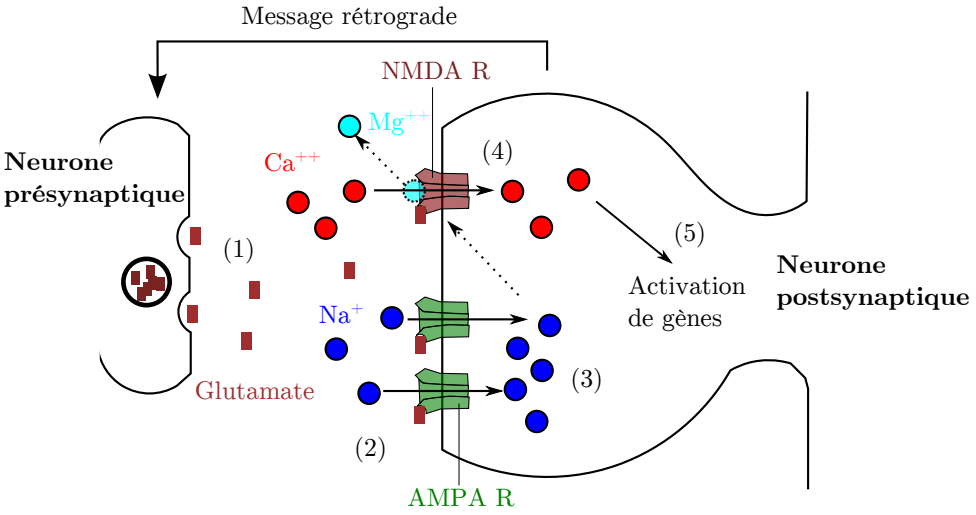


FIGURE 1.10 – Schéma des mécanismes conduisant à la potentialisation à long terme. Après une stimulation à haute fréquence, du glutamate est excrété dans la synapse (1). Il se fixe sur deux types de récepteurs : AMPA et NMDA (2). Les AMPA R s'ouvrent, laissant entrer des ions Na^+ qui provoquent une dépolarisation (3). La dépolarisation provoque le départ de l'ion Mg^{++} qui bloquait le NMDA R (4) ; le récepteur laisse alors entrer préférentiellement les ions Ca^{++}, qui déclenchent une cascade de signalisation (5) aboutissant au renforcement de la synapse. Un message rétrograde serait ensuite envoyé vers l'élément pré-synaptique, permettant le maintien de la PLT.

L'équipe de Liebetanz a bloqué ces récepteurs au moyen d'un antagoniste, le dextrométhorphane (administré à des sujets volontaires 2 h avant une stimulation anodique ou cathodique de 5 minutes), et montré (*via* l'étude des PE moteurs) que cela annulait les effets à la fois d'une stimulation anodique et d'une stimulation cathodique. Ceci suggère que les récepteurs NMDA sont importants dans l'apparition des effets à long terme de la tDCS, quelle que soit la polarité de la stimulation (Liebetanz *et al.*, 2002).

Ces résultats ont été reproduits par la même équipe dans une publication ultérieure : 2 h après l'administration de dextrométhorphane, l'effet d'une stimulation anodique de 11 à 13 minutes ou d'une stimulation cathodique de 9 minutes était complètement aboli (Nitsche *et al.*, 2003a).

Enfin, les effets de la tDCS impliqueraient également la modulation de divers neurotransmetteurs, notamment la sérotonine et la dopamine. Le blocage de la recapture de sérotonine par du citalopram augmente (et prolonge) les effets de la tDCS anodique, et change l'inhibition normalement induite par une tDCS cathodique en facilitation (Nitsche *et al.*, 2009b). Concernant la dopamine, le blocage de ses récepteurs D2 par la sulpiride retarde les effets d'une stimulation anodique et annule ceux d'une stimulation cathodique. L'administration de pergolide, agoniste des récepteurs à la dopamine (D1 et D2), prolonge la diminution d'excitabilité induite par une stimulation cathodique. Quand les récepteurs D2 sont bloqués et les D1 activés (administration conjointe de sulpiride et de pergolide), les effets de la tDCS sont également diminués (Nitsche *et al.*, 2006). Ceci suggère que les récepteurs D2 jouent un rôle prépondérant dans l'induction de plasticité par la tDCS.

L'acide gamma-aminobutyrique (GABA, principal neurotransmetteur inhibiteur du système nerveux) joue aussi un rôle. L'équipe de Nitsche *et al.* (2004) a montré que l'administration d'un agoniste du récepteur du GABA-A (lorazépam) entraîne un retard suivi d'une augmentation et d'une prolongation des effets de la stimulation anodique. En revanche ce traitement ne semble pas influencer les conséquences de la stimulation cathodique (Nitsche *et al.*, 2004). Certains auteurs pensent que les effets de la tDCS pourraient s'expliquer en partie par une modification de la balance excitation/inhibition (ratio glutamate/GABA) (Krause *et al.*, 2013). Ainsi, l'équipe de Stagg a montré qu'une stimulation cathodique résulte en une diminution de la concentration en glutamate associée à une diminution de la concentration en GABA dans une étude de spectroscopie par résonance magnétique (Stagg *et al.*, 2009).

		Effets immédiats		Répercussions	
		Anode	Cathode	Anode	Cathode
	Normaux	Dépolarisation infraliminaire	Hyperpolarisation	Proches des mécanismes de plasticité synaptique ?	
Bloqueur	Canaux Na+	Annule effets	Ø	Annule effets	Ø
	Canaux Ca++	Diminue effets	Ø	Annule effets	Ø
	Récepteurs NMDA (Glutamate)	Ø	Ø	Annule effets	Annule effets
	Récepteurs Dopamine	NT		Retarde effets	Annule effets
	Recapture Sérotonine			Augmente et prolonge la facilitation	Change l'inhibition en facilitation
Agoniste	Récepteur au GABA	Aucun effet significatif (tend à diminuer la facilitation)	Ø	Retarde puis augmente et prolonge la facilitation	Ø

TABLE 1.1 – Résumé des résultats obtenus lors des différentes études pharmacologiques sur les effets immédiats et les répercussions de la tDCS (PE moteurs). ⊘ : pas d'effet observé ; NT : non testé.

Cela étant, les effets de la tDCS ne dépendent pas uniquement de la polarité de l'électrode stimulatrice, mais aussi de l'intensité du courant et de la durée et du délai entre deux stimulations.

Ainsi, Batsikadze *et al.* (2013) ont montré (toujours par l'étude des PE moteurs chez l'Homme) que pour une stimulation cathodique de 1 mA, on observait une diminution de l'excitabilité du cortex moteur, alors qu'à 2 mA, l'effet était inverse : il y avait augmentation de l'excitabilité.

Monte-Silva et ses collaborateurs ont quant à eux démontré l'importance de la durée de stimulation et surtout de l'intervalle entre deux stimulations quelle que soit la polarité de la tDCS (Monte-Silva *et al.*, 2010, 2013). Ces effets sont résumés dans la table 1.2.

Effet d'une double stimulation		
Intervalle	Anode	Cathode
Nul	↘ excitabilité (inhibition)	Prolonge l'inhibition (jusqu'à 2 h après la tDCS) et augmente son amplitude pour l'intervalle 20 min
Court (3 ou 20 min)	Prolonge la facilitation (+ de 24 h après la tDCS)	
Long (3 ou 24 h)	Abolit la facilitation après la 2ème tDCS	Retarde (de 1 h) mais prolonge (+ de 2 h) l'inhibition après la 2ème tDCS

TABLE 1.2 – Effets d'une double stimulation anodique (2 x 13 min, Monte-Silva *et al.* (2013)) ou cathodique (2 x 9 min, Monte-Silva *et al.* (2010)).

1.3.3 Autres mécanismes

Les effets physiologiques et cellulaires de la tDCS ont été testés au moyen d'autres méthodes.

A/ Études *in vitro* : plusieurs équipes se sont penchées sur l'étude des effets de l'application d'un courant continu sur des tranches de cerveau.

1. Fritsch *et al.* (2010) : la stimulation par un faible courant continu (0.01 mA, 15 minutes) de polarité anodique couplée à une activation synaptique à basse fréquence (0.1 Hz) induit une PLT (cortex moteur M1, souris).
   — La fréquence de la co-activation synaptique est importante (les effets du courant continu sont maximum pour une fréquence de 0.1 Hz).
   — Une stimulation cathodique n'induit pas de PLT.
   — Cette forme de plasticité est NMDA-dépendante puisqu'un prétraitement par un antagoniste des récepteurs NMDA (le D-acide 2-amino-5-phosphonovalérique) empêche toute induction de PLT (corrobore les études menées chez l'Homme et vues ci-avant).
   — Le facteur neurotrophique dérivé du cerveau (BDNF, dont la sécrétion dépend notamment de l'activation des récepteurs NMDA) est un médiateur essentiel des effets de la tDCS : chez des souris mutantes n'exprimant pas le BDNF, la stimulation électrique n'induit pas de PLT.
2. Ranieri *et al.* (2012) : un courant continu (0.01 mA, 20 minutes) module la PLT (tranches d'hippocampe de rat).
   — L'effet est polarité-dépendant (la stimulation anodique augmente, et la stimulation cathodique diminue l'amplitude de la PLT).
   — Les deux polarités de stimulation induisent une augmentation de *Zif268* (*zinc finger binding protein clone 268*) dans les régions CA1 et CA3 de la corne d'Ammon. Ce facteur de transcription est connu pour son implication dans la plasticité synaptique. Le fait que son induction augmente quelle que soit la polarité laisse à penser qu'il agit en présence d'autres effecteurs qui modulent ses effets.
   — Le taux de BDNF diminue après stimulation cathodique, sans variation après stimulation anodique (ce qui pourrait être expliqué par une haute variabilité due au faible effectif d'animaux et au faible échantillon pouvant être prélevé après isolement de l'hippocampe).

3. Kabakov *et al.* (2012) : les effets du courant (intensité maximum : 0.4 mA, 5 minutes) dépendent de l'orientation des éléments cellulaires (tranches d'hippocampe de rat).
   — L'orientation des axones par rapport au vecteur du champ électrique détermine si le courant est excitateur ou inhibiteur.
   — L'orientation des dendrites affecte la magnitude de ses effets.
   — Ainsi l'activité de tous les neurones situés dans le champ électrique ne serait pas modulée de la même manière. Pour optimiser les effets recherchés d'une stimulation, le placement des électrodes pourrait être guidé par tractographie ou autres techniques d'imagerie permettant de définir l'orientation des axones *in vivo*.
4. Rahman *et al.* (2013) : lors de la tDCS, le courant électrique a des composantes orientées radialement et tangentiellement (avec une dominance des champs tangentiels) par rapport à la surface corticale.
   — Un champ radial, orienté suivant l'axe somato-dendritique des neurones pyramidaux, produit une polarisation somatique (la dépolarisation facilitant l'efficacité synaptique, l'hyperpolarisation la diminuant).
   — Un champ tangentiel, transversal par rapport à cet axe somato-dendritique, polarise les axones orientés horizontalement (l'hyperpolarisation facilitant l'efficacité synaptique, la dépolarisation la diminuant).
   — Durant une stimulation par tDCS, les cibles cellulaires responsables de la modulation de l'efficacité synaptique sont donc à la fois les somas et les axones terminaux, la direction du courant déterminant leur importance relative.

Enfin, des études sur différents types cellulaires en culture ont permis de mettre en évidence que l'application d'un courant continu externe peut avoir un impact sur la migration, l'orientation, la différenciation et le métabolisme cellulaire (figure 1.11), ce qui pourrait être expliqué au moins en partie par des variations locales de concentration intracellulaire en ions calcium, et par la réorganisation de récepteurs membranaires, tels que les récepteurs tyrosine kinase ou NMDA, au niveau des synapses (Pelletier et Cicchetti, 2014).

Pour citer une dernière étude, l'équipe de Pelletier *et al.* (2015) s'est penchée sur l'effet d'un champ électrique continu (d'une intensité variant de 0 à 100 V/m, 100 V/m correspondant à une forte densité (valeur non précisée par les auteurs) de stimulation en A/m^2) *in vitro* sur la réponse de neurones, de cellules de la microglie, et d'astrocytes. Ils ont ainsi montré que :

1. après stimulation, les neurones développent un corps cellulaire plus allongé et s'orientent parallèlement au champ électrique ;

— les neurites (prolongements du corps cellulaire : axones et dendrites) s'allongent et s'orientent vers la cathode
— ceci est associé à une augmentation d'expression de la *Growth Associated Protein 43* (GAP-43), exprimée au niveau des cônes de croissance (formation des neurites) pendant le développement et la régénération axonale

2. les astrocytes et la microglie s'allongent et s'alignent perpendiculairement au champ électrique des corps et saillies cellulaires.

Cette étude montre la capacité des différents types cellulaires à répondre à l'application d'un champ électrique à la fois par des modifications morphologiques et une expression protéique, complétant ainsi les données résumées dans la revue de Pelletier et Cicchetti (2014).

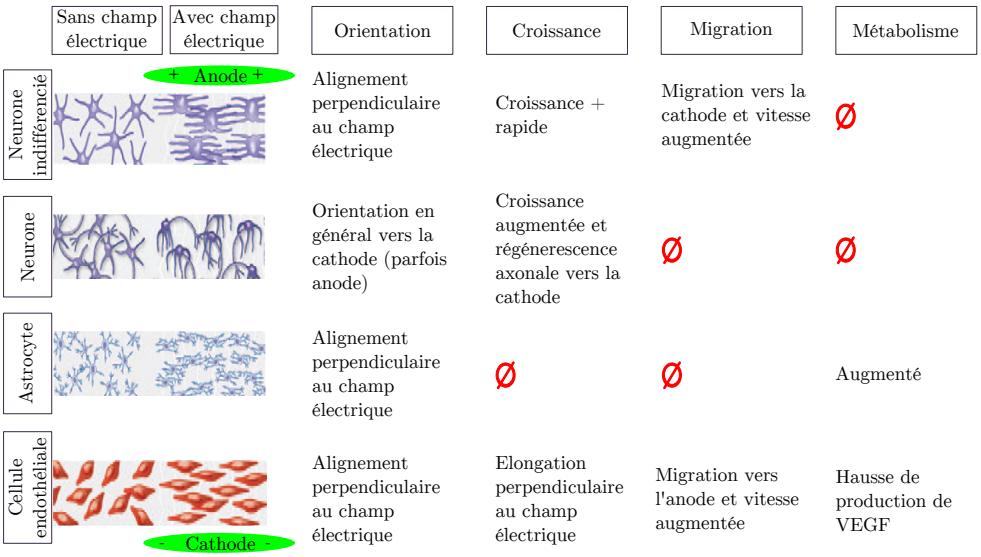


FIGURE 1.11 – Figure adaptée de la revue de Pelletier et Cicchetti (2014). Les effets de courants directs externes sur les cellules du système nerveux central varient en fonction du type cellulaire. ⊘ : aucun effet signalé ; VEGF : facteur de croissance de l'endothélium vasculaire.

B/ Études *in vivo* : d'autres facteurs moléculaires sont impliqués dans l'action neuromodulatrice de la tDCS.

Le BDNF est connu pour son rôle dans la plasticité synaptique corticale. Or, dans la population, son gène peut présenter un polymorphisme (il peut présenter les allèles Val66Val ou Val66Met). Au niveau comportemental, si la tDCS augmente les performances de sujets sains (Homme et souris) dans des

tâches d'apprentissage moteur, chez des sujets porteurs du polymorphisme Val66Met (qui diminue la sécrétion de BDNF et serait associé à une diminution de la survie de nouveaux neurones et de certains types de mémoire, et à une plus grande susceptibilité à certains troubles psychiatriques) cette amélioration est significativement moindre (Fritsch *et al.*, 2010). Cependant, l'équipe de Antal *et al.* (2010) a montré que l'effet facilitateur ou inhibiteur de la tDCS (anodique ou cathodique, respectivement) sur les PE moteurs est présent dans les deux types de populations, mais serait plus important chez des sujets porteurs du polymorphisme Val66Met.

Quoiqu'il en soit, au niveau clinique, Brunoni *et al.* (2013a) ont montré chez des patients dépressifs que le polymorphisme pour le BDNF n'aurait aucun impact sur la réponse à un traitement par tDCS ou par un antidépresseur médicamenteux, la sertraline. En outre, le taux de BDNF sanguin ne varie pas après tDCS, et ne constitue pas non plus un biomarqueur de l'efficacité de la tDCS chez les dépressifs (Brunoni *et al.*, 2014b). En revanche, le système sérotoninergique serait de première importance puisque la réponse à la tDCS varierait en fonction du polymorphisme exprimé au niveau du promoteur du gène de la sérotonine (5-HTTLPR). Les homozygotes long/long (comparés à l'allèle court) présenteraient une réponse plus importante aux effets bénéfiques de la tDCS (Brunoni *et al.*, 2013a).

Néanmoins, hors des considérations génétiques, Podda *et al.* (2016) ont montré chez la souris que l'amélioration de la mémoire visuo-spatiale et l'augmentation de PLT après tDCS anodique est associée à la modulation de l'expression du BDNF (notamment *via* des régulations épigénétiques).

Plusieurs études ont été menées sur la circulation sanguine cérébrale également (dans des régions cérébrales différentes). Chez le rat, Wachter *et al.* (2011) ont montré qu'une stimulation anodique augmente tandis qu'une stimulation cathodique diminue le débit sanguin cérébral (pendant au moins 30 minutes après une stimulation de 15 minutes) de manière dépendante de l'intensité. Le taux d'oxygénation du sang pendant et après stimulation a également été mesuré à plusieurs reprises par imagerie spectroscopique proche infrarouge (fNIRS). Toujours chez le rat, Han *et al.* (2014) ont montré une augmentation du taux d'oxy-hémoglobine pendant une stimulation anodique à 0.2 mA (10 minutes) suivie d'une diminution (retour à la normale, mesure sur les 20 minutes suivantes), ceci uniquement du côté stimulé. Ils ont relevé une forte variabilité interindividuelle quant à la réponse hémodynamique à la tDCS (rapidité de la variation du débit sanguin), suggérant que les paramètres de stimulation devraient être adaptés à chaque individu notamment pour éviter les effets secondaires.

Chez l'Homme, Zheng *et al.* (2011) ont montré qu'une stimulation par

tDCS (environ 7 minutes, différentes intensités) augmente le débit sanguin cérébral pendant la stimulation (avec une plus grande amplitude pour une stimulation anodique que cathodique). Le débit sanguin diminue à la cessation de la tDCS, avec un retour à son niveau de base après une stimulation anodique, et une diminution significative (par rapport au niveau de base) après une stimulation cathodique. De manière intéressante, en répétant les stimulations, le débit sanguin est augmenté à la fin de la deuxième stimulation anodique, tandis qu'il est plus fortement diminué à la fin de la deuxième stimulation cathodique. Ceci pourrait refléter l'augmentation ou la diminution d'excitabilité après stimulation (en fonciton de la polarité).

Enfin, l'équipe de Monai *et al.* (2016) a récemment montré par imagerie transcrânienne (chez des souris mutantes exprimant une protéine fluorescente permettant de mesurer la signalisation calcique) l'importance des astrocytes dans la plasticité induite par la tDCS. En effet, une stimulation anodique du cortex visuel primaire entraîne une augmentation de la concentration en calcium au niveau des astrocytes (dans tout le cortex). Ce phénomène de vagues calciques, qui implique une signalisation via l'inositol triphosphate, est lié à la fonction d'intégration d'informations et de communication des astrocytes (entre eux et avec d'autres types cellulaires, dont les neurones), et joue un rôle considérable dans la plasticité synaptique *in vivo* dans le cortex et l'hippocampe (Monai *et al.*, 2016).

2 La tDCS : applications chez l'Homme

Actuellement la tDCS est utilisée suivant deux grands axes en recherche.

En premier lieu, elle est considérée pour ses potentiels effets bénéfiques dans le traitement - ou du moins le soulagement de symptômes - de divers troubles neurologiques et psychiatriques. Ainsi on retrouve des publications concernant l'étude de la tDCS comme traitement de douleurs, d'acouphènes, de migraines, de l'épilepsie ; elle est également employée dans le but de faciliter la récupération après un accident vasculaire cérébral. Son domaine d'application concerne aussi les troubles psychiatriques, notamment avec le traitement de la dépression, de la schizophrénie, ou encore des addictions.

D'autre part, certaines équipes s'en servent d'outil d'investigation du fonctionnement du système nerveux central chez le sujet sain. Elle permet ainsi d'explorer les comportements de prise de risque, ou les performances cognitives telles que l'attention et la mémorisation.

2.1 Applications de la tDCS

2.1.1 Traiter des troubles neurologiques

Dans cette section, je m'intéresserai à différentes études cliniques portant sur l'efficacité de la tDCS dans le traitement d'altérations du système nerveux central.

Les accidents vasculaires cérébraux (AVC)

Une attaque cérébrale est une défaillance de la circulation sanguine (obstruction ou rupture d'un vaisseau) qui affecte une région plus ou moins étendue du cerveau, provoquant la mort de cellules nerveuses. Elle représente la première cause de handicap, et la troisième cause de mortalité chez l'Homme dans les pays occidentaux (Haute Autorité de Santé).

Une récupération spontanée peut avoir lieu après l'attaque, par régénération axonale et dendritique et/ou réorganisation fonctionnelle (les fonctions atteintes par les aires lésées sont prises en charge par d'autres). Les techniques d'imagerie cérébrale ont permis de montrer une augmentation de l'activité cérébrale du côté controlésionnel (non affecté) quand un patient (après AVC) effectue des tâches motrices ; mais on ignore s'il s'agit d'un mécanisme adaptatif impliqué dans la récupération, ou au contraire d'un mécanisme maladaptatif qui pourrait la freiner. Différentes études se basent donc sur un modèle de traitement par tDCS anodique sur l'hémisphère lésé ou cathodique sur l'hémisphère sain.

Chez l'Homme, plusieurs études ont montré une amélioration des fonctions motrices du côté lésé chez des patients recevant une stimulation anodique du cortex M1 affecté par l'attaque ou une stimulation cathodique du cortex M1 controlésionnel (Fregni *et al.*, 2005a ; Schlaug G *et al.*, 2008 ; Edwardson *et al.*, 2012). Au vu de ces résultats, un montage bihémisphérique (anode sur le cortex moteur lésé, cathode sur le cortex controlésionnel) a également été testé à plusieurs reprises, et s'est aussi révélé efficace sur l'amélioration des fonctions motrices (Lindenberg *et al.*, 2010 ; Mahmoudi *et al.*, 2011). Dans la plupart des cas une stimulation unique (de l'ordre de 1 à 2 mA, 20 à 30 minutes) a été réalisée, certaines études allant jusqu'à 10 sessions de stimulation. Des effets bénéfiques ont été montrés jusqu'à une semaine après la fin du traitement chez des sujets ayant reçu 5 stimulations cathodiques du cortex moteur controlésionnel (Nair *et al.*, 2011) ou 5 stimulations bihémisphériques (Lindenberg *et al.*, 2010).

Si les améliorations fonctionnelles restent modestes, ces effets bénéfiques de la tDCS sont encourageants et tendent à faire penser que cette méthode de stimulation, aux effets secondaires peu importants, est une piste prometteuse dans le domaine de la récupération après une attaque cérébrale.

Les maladies neuro-dégénératives

En France, les maladies neurodégératives les plus fréquentes sont la maladie d'Alzheimer et la maladie de Parkinson, dont les traitements pharmacologiques actuels ont une efficacité limitée et ne permettent pas de rémission.

- Alzheimer et mémoire : La maladie d'Alzheimer est une forme de dégénérescence du tissu cérébral entraînant un déclin progressif des facultés cognitives et de la mémoire. Plusieurs études ont été menées chez des patients considérés comme souffrant probablement de cette maladie. Une stimulation bilatérale des aires temporo-pariétales - dont on retrouve un hypo-activation

dans cette maladie (Ferrucci *et al.*, 2008 ; Boggio *et al.*, 2009a) - ou une stimulation anodique du cortex préfrontal dorsolatéral (CPFDL) gauche (Boggio *et al.*, 2009a) ont entraîné une amélioration de la mémoire épisodique dans différentes tâches (de mémoire de reconnaissance, d'attention visuelle...) immédiatement après la stimulation (Nardone *et al.*, 2012, 2015). L'équipe de Boggio a également montré que ces effets persistaient pendant au moins 4 semaines après des sessions répétées de tDCS (2 mA, 30 min/jour pendant 5 jours consécutifs ; Boggio *et al.* (2012)).

- Parkinson et motricité : La maladie de Parkinson est caractérisée par une perte progressive des neurones dopaminergiques de la voie nigro-striée, à l'origine d'un déséquilibre fonctionnel du système moteur. Plusieurs auteurs s'intéressent à la possibilité d'entraîner une libération de dopamine dans les zones sous-corticales par stimulation transcrânienne non invasive. Fregni et ses collaborateurs ont montré qu'une stimulation anodique du cortex M1 gauche (1 mA, 20 min) résultait en une amélioration immédiate des scores moteurs chez des patients parkinsoniens dans l'échelle UPDRS (*Unified Parkinson Disease Rating Scale* ; Fregni *et al.* (2006c)), tandis qu'une stimulation anodique du CPFDL gauche (2 mA, 20 min) entraînait une amélioration de la mémoire de travail (pouvant être altérée chez ces patients ; Boggio *et al.* (2006)). Benninger et ses collaborateurs ont montré que des sessions répétées de tDCS anodique (2 mA, 8 sessions de 20 min tous les 2 à 3 jours) au niveau du cortex frontal ou moteur résultaient en une amélioration de certains scores moteurs (bradykinésie et marche) jusqu'à 3 mois après la fin des stimulations (Benninger *et al.*, 2010). Ainsi la tDCS semble être un traitement intéressant - en complément de la pharmacologie actuelle - pour améliorer la qualité de vie des patients parkinsoniens.

L'épilepsie

L'épilepsie est une maladie chronique caractérisée par des crises comitiales récidivantes dues à une altération fonctionnelle transitoire au sein d'une population de neurones. Entre 20 et 40 % des patients épileptiques seraient réfractaires aux traitements, leur médication n'empêchant pas la survenue de crises. Dans ce cas, les patients peuvent être amenés à subir une chirurgie visant à retirer leur foyer épileptogène ; mais quand cette solution n'est pas réalisable, il se pose l'intérêt de développer de nouvelles méthodes de contrôle des crises *via* la neurostimulation.

Au niveau méthodologique, les études cliniques dans le cadre de l'épilepsie sont difficiles du fait de l'impossibilité d'arrêter le traitement du patient (qui pourrait pourtant interférer avec l'effet de la tDCS) et de la nécessité de

réaliser des études à long terme (sur plusieurs mois voire années). Fregni et ses collaborateurs ont néanmoins montré qu'une session de tDCS cathodique (en regard du foyer épileptogène) entraîne une réduction des décharges épileptiformes (vues sous enregistrement encéphalographique) immédiatement et jusqu'à 30 jours après la tDCS chez des patients réfractaires à leur traitement (mais le poursuivant durant l'étude). Ils ont également observé une tendance à une réduction plus importante du nombre de crises survenues (-44 %) chez les patients ayant reçu la stimulation cathodique comparé au groupe contrôle (Fregni *et al.*, 2006d).

2.1.2 Diminuer la douleur

La prise en charge de la douleur chronique réfractaire, cause possible de handicap et d'altération conséquente de la qualité de vie, est l'un des domaines où la tDCS est envisagée comme traitement. La tDCS pourrait permettre de moduler le seuil de perception de la douleur au niveau central. L'équipe de Boggio a montré qu'une stimulation anodique à 2 mA du cortex moteur (M1) ou du CPFDL gauche augmentait les seuils de perception tactile (pendant la stimulation du M1 seulement) et algique (pendant la stimulation du M1 ou du CPFDL) chez des volontaires sains (Boggio *et al.*, 2008d). Les auteurs supposent que ce résultat s'explique par une inhibition du thalamus (dont l'activité est anormalement élevée chez certains patients souffrant de douleurs chroniques) après stimulation des zones corticales sus-citées (*via* l'action de fibres inhibitrices cortico-thalamiques), voire par une modulation de l'aspect émotionnel de la douleur lors de la stimulation du CPFDL. Les études cliniques sont menées chez des patients souffrant de douleurs d'origines diverses.

- Lésions de la moelle épinière : l'équipe de Fregni a montré un effet antalgique transitoire d'un protocole de stimulation anodique répétée (1 séance de 20 minutes à 2 mA par jour pendant 5 jours consécutifs) du cortex M1 (hémisphère controlatéral aux douleurs si douleur asymétrique, ou hémisphère dominant en cas de douleur symétrique). Dès le deuxième jour, les auteurs ont montré une diminution de l'intensité de la douleur (auto-évaluation avec l'échelle visuelle analogique, et évaluation par un clinicien) dans le groupe stimulé. Cet effet bénéfique s'est estompé avec le temps, passant d'une réduction moyenne de 58 % (par rapport au niveau de base mesuré dans les 2 semaines précédant l'étude) à seulement 36 % lors de la visite de suivi (16 jours après). L'étude portait sur 17 patients souffrant de lésions de la moelle d'origine et de localisation diverses, et restant sous des médications variées (Fregni *et al.*, 2006a).

- Fibromyalgie : l'emploi de la tDCS pour soulager les douleurs liées à cette pathologie, qui correspond à un état de douleur chronique, entraîne des résultats variables, probablement du fait de protocoles de stimulation non définis. Une étude d'optimisation de la dose de tDCS haute définition a été réalisée récemment ; les auteurs cherchaient à déterminer le nombre de séances nécessaires pour obtenir une réduction de 50 % de l'intensité douloureuse chez leurs patients (mesurée notamment par l'échelle visuelle analogique). L'anode était placée sur le cortex M1 gauche (la cathode étant radialement répartie en quatre électrodes autour de cette zone), et le courant était délivré 20 minutes à une intensité de 2 mA. Ils ont ainsi pu estimer à 15 le nombre médian de séances de stimulation requises pour atteindre l'effet désiré (Castillo-Saavedra *et al.*, 2016).

- Migraine : cette pathologie à forte prévalence (environ 12 % de la population générale) peut se révéler très handicapante à la fois individuellement et socio-économiquement. La migraine peut apparaître avec ou sans aura (signe avant-coureur), l'aura étant due à un dysfonctionnement temporaire de certaines régions cérébrales. Les techniques de stimulation non-invasives sont utilisées d'une part pour essayer de comprendre la physiopathologie, mais aussi comme approches thérapeutiques potentielles des migraines et autres céphalées (Brighina *et al.*, 2013). En se basant sur l'idée de diminuer l'excitabilité corticale (considérée comme plus élevée en cas de migraine), l'équipe de Paulus a montré que des patients traités par tDCS cathodique au niveau du cortex visuel (3 sessions de 15 minutes par semaine pendant 3 semaines, 1 mA) rapportaient une réduction de l'intensité de la douleur pendant les crises dans les 8 semaines suivant le traitement (Antal *et al.*, 2011).

- Acouphènes : Les acouphènes sont des perceptions sonores sans source extérieure identifiable et inaudibles par l'entourage. Ils peuvent être temporaires, intermittents ou permanents ; les cas les plus graves peuvent par ailleurs être vécus comme des douleurs chroniques. Différentes techniques de neuromodulation ont été testées pour traiter ces acouphènes ; parmi elles, la tDCS s'est révélée particulièrement intéressante car outre ses nombreux avantages, ses effets bénéfiques (inhibition des acouphènes) durent plus longtemps que ceux obtenus par d'autres techniques, telles que la TMS. Une méta-analyse de 2012 recense 40 % de patients répondant à ce traitement avec une moyenne de 13.5 % de réduction d'intensité des acouphènes sous stimulation anodique du lobe temporal gauche ou stimulation bifrontale du CPFDL (intensité de 1 à 1.5 mA, 3 à 20 minutes) (Song *et al.*, 2012).

2.1.3 Traiter des troubles psychiatriques

La dépression

La dépression est un trouble mental qui se caractérise par divers symptômes définis par l'Organisation Mondiale de la Santé (OMS) et l'Association Américaine de Psychiatrie, tels qu'un sentiment de désespoir, une perte de plaisir, de motivation et des facultés de décision. Un certain nombre de traitements médicamenteux existent mais se révèlent inefficaces chez certains patients ; ils sont en outre accompagnés d'effets indésirables parfois importants. De nombreuses études ont porté sur l'efficacité de la stimulation cérébrale, notamment de la tDCS, en tant que traitement antidépresseur.

La méta-analyse de Meron *et al.* (2015) recense 10 études en double aveugle s'intéressant au traitement d'épisodes dépressifs majeurs (principalement dans le cadre de troubles unipolaires, ou "dépression" à proprement parler ; incluant également quelques patients souffrant de troubles bipolaires, anciennement appelés maniaco-dépression, dans deux publications) par des sessions répétées de tDCS (5 à 15 séances de 20 à 30 minutes) dont l'intensité était fixée à 2 mA sauf pour 3 études (1 mA). L'électrode active, en l'occurrence l'anode, était toujours placée en F3 selon le système international 10/20 de positionnement des électrodes pour électroencéphalographie (soit le CPFDL gauche, dont il a été montré que l'activité est diminuée chez les patients dépressifs ; figure 2.1). La cathode était quant à elle positionnée en Fp2 ou F8 (niveau supra-orbitaire controlatéral), ou en F4 (CPFDL droit ; figure 2.1).

Quatre de ces études ont mis en évidence une amélioration des scores de dépression (sur les échelles de dépression de Hamilton ou de Montgomery et Åsberg) chez les patients ayant reçu des sessions de tDCS active (Fregni *et al.*, 2006b ; Boggio *et al.*, 2008a ; Loo *et al.*, 2012 ; Brunoni *et al.*, 2013b). L'échec à reproduire ces résultats dans les autres études pourrait s'expliquer par les différences liées au protocole (telles que l'intensité de stimulation, la dose à 2 mA semblant plus efficace que celle à 1 mA, ou encore le nombre et la fréquence des sessions) ou liées aux sujets (degré de résistance aux traitements antidépresseurs, prise de médication concomittente, âge...) (Loo *et al.*, 2010 ; Palm *et al.*, 2012 ; Blumberger *et al.*, 2012 ; Bennabi *et al.*, 2015 ; Segrave *et al.*, 2014 ; Brunoni *et al.*, 2014a).

En résumé, si l'efficacité de la tDCS comme traitement antidépresseur n'a pas pu être montrée systématiquement, certains résultats laissent entrevoir la possibilité d'améliorer l'humeur des patients dépressifs par cette technique de neuromodulation (en tant que traitement concomitant à une médication

antidépressive, ou en tant que nouvelle tentative thérapeutique chez des patients résistants aux traitements médicamenteux). Notons par ailleurs que c'est dans le cadre du traitement de la dépression que la première étude clinique de phase III portant sur la tDCS a été lancée (Brunoni *et al.*, 2015).

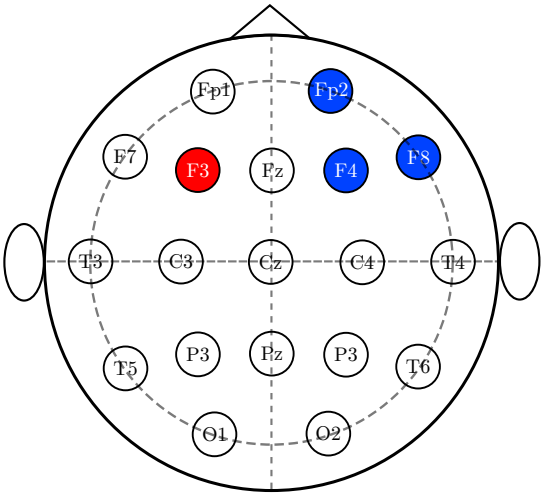


FIGURE 2.1 – Schéma du positionnement des électrodes en fonction du système international 10/20. Adapté du *10/20 System Positioning Manual* ; le cercle rouge représente la position de l'anode, et les cercles bleus la position de la cathode, lors des études sur l'effet antidépresseur de la tDCS.

La schizophrénie

La schizophrénie est un trouble psychotique sévère et chronique se manifestant par une perte de contact avec la réalité, et pouvant s'accompagner d'autres symptômes tels que des hallucinations (notamment auditives), des troubles de l'émotion ou des capacités cognitives (par exemple, capacité à planifier des tâches). Le traitement (neuroleptiques, psychothérapie) est symptomatique, et dans la majorité des cas ne permet pas de rémission pour tous les symptômes. Les signes résiduels altèrent la qualité de vie des patients ; c'est pourquoi des traitements complémentaires par stimulation non invasive sont envisagés.

Les études sur les effets de la tDCS dans le traitement des symptômes de la schizophrénie sont encore récentes et peu nombreuses, la première datant de 2011. Plusieurs études de cas et notamment une étude randomisée, en double aveugle, ont rapporté une diminution des symptômes mesurés par l'échelle des symptômes positifs (qui apparaissent chez les patients, tels que les hallucinations) et négatifs (traits qui diminuent, tels que la motivation),

et ce pour une durée d'au moins 3 mois après le traitement (2 mA, 2 sessions de 20 min/jour pendant 5 jours consécutifs ; Brunelin *et al.* (2012)). La stimulation était réalisée avec la cathode (inhibitrice) placée au niveau du cortex temporo-pariétal gauche (pour traiter les hallucinations), et l'anode (excitatrice) au niveau du CPFDL gauche (pour traiter les symptômes négatifs). D'autres auteurs ont montré une amélioration des performances cognitives, notamment sur la mémoire de travail, chez des patients schizophrènes traités par une stimulation anodique du CPFDL gauche à 2 mA (20 minutes ; cathode placée au niveau de l'aire supra-orbitaire controlatérale ; Hoy *et al.* (2014)) ou par une stimulation bilatérale du CPFDL (électrodes stimulatrices placées sur F3 et F4) oscillant entre 0 et 0.3 mA (5 blocs de 5 minutes séparés de 1 minute) pendant le sommeil des sujets (ceci pour tester l'impact de la tDCS sur la consolidation de la mémoire déclarative liée au sommeil ; Göder *et al.* (2013)). Étant donnée la bonne tolérance des traitements par tDCS, cette technique semble prometteuse pour venir compléter les médications anti-psychotiques et améliorer la qualité de vie des patients schizophrènes en diminuant leurs symptômes résiduels.

Les conduites addictives

L'addiction est une pathologie psychiatrique impliquant à la fois des modifications biologiques (notamment au niveau cérébral) et des atteintes psychologiques. À ce jour aucun traitement (sevrage assisté par des traitements de substitution, thérapie comportementale...) n'a démontré de totale efficacité, et certains s'accompagnent d'effets secondaires ne favorisant pas la rémission. C'est pourquoi d'éventuels effets bénéfiques de la tDCS ont été recherchés dans le cadre du traitement de diverses addictions à des substances.

- Tabagisme : l'équipe de Fregni *et al.* (2008a) a stimulé le CPFDL droit ou gauche (anode d'un côté, cathode de l'autre ; 2 mA, 20 minutes) de fumeurs (plus de 15 cigarettes/jour depuis au moins un an). Le *craving* (envie irrépressible de consommer) induit par la manipulation de cigarettes ou le visionnage de vidéos incitant à la consommation était réduit au moins temporairement (pendant et jusqu'à une dizaine de minutes après la tDCS). De plus, en répétant les sessions de stimulation (1/jour pendant 5 jours consécutifs, anode sur le CPFDL gauche et cathode sur le droit), cet effet devient de plus en plus important, et les sujets consomment moins de cigarettes au cours de l'étude (diminution de 30 % du nombre de cigarettes fumées ; Boggio *et al.* (2009b)), ce jusqu'à 4 jours après la fin des stimulations (Fecteau *et al.*, 2014).

L'effet sur le *craving* n'a pas été retrouvé par l'équipe de Xu *et al.* (2013)

après une stimulation anodique (2 mA, 20 minutes) du CPFDL gauche (cathode sur l'aire supra-orbitaire droite) ; mais les auteurs reportent que contrairement aux études précédentes, les sujets étudiés étaient abstinents depuis la veille (les autres étant abstinents depuis environ 1 h 30). Ces auteurs ont en revanche pu mettre en évidence une réduction des affects négatifs après la tDCS, ceci plus particulièrement chez les sujets les plus dépendants.

L'équipe de Falcone *et al.* (2015) a montré à son tour une augmentation de la latence avant de consommer une cigarette, et une diminution du nombre de cigarettes fumées dans les 30 minutes suivant une unique session de tDCS (anode au dessus du CPFDL gauche, 1 mA pendant 20 minutes) chez des fumeurs abstinents depuis la veille.

- Alcoolo-dépendance : l'équipe de Fregni a montré qu'une stimulation bilatérale du CPFDL (anode à droite, cathode à gauche, ou l'inverse ; 2 mA pendant 20 minutes) réduisait le *craving* pour l'alcool (induit par le visionnage de vidéos incitatives) chez des patients alcoolo-dépendants abstinents depuis au moins 10 jours (en moyenne 41 jours ; Boggio *et al.* (2008c)). Cet effet de la tDCS a été reproduit par den Uyl *et al.* (2015) chez des étudiants grands buveurs après une stimulation unilatérale du CPFDL gauche (anodique ; cathode placée au-dessus de l'aire supra-orbitaire opposée) à une intensité de 1 mA pendant 10 minutes. La localisation de la zone de stimulation semble déterminante puisqu'ils n'ont en revanche obtenu aucun effet après stimulation anodique du gyrus frontal inférieur droit (den Uyl *et al.*, 2015).

Des sessions hebdomadaires de 20 minutes de stimulation, répétées sur 5 semaines (anode sur le CPFDL gauche, 2 mA), réduisaient le *craving* ainsi que la symptomatologie dépressive (échelle de Hamilton) chez des sujets dépendants (entre 1 et 34 jours d'abstinence), bien qu'une tendance à la rechute ait été relevée (da Silva *et al.*, 2013).

Une autre étude avec des paramètres de stimulation différents (2 mA, 2 sessions quotidiennes de 13 minutes à un intervalle de 20 minutes pendant 5 jours, anode sur le CPFDL droit et cathode sur le gauche) n'a pas retrouvé ces effets sur le *craving* et les scores de dépression. En revanche une proportion plus importante de patients (qui étaient, ici, abstinents depuis en moyenne 21 jours) étaient toujours abstinents au bout de 6 mois chez les stimulés (50 %) par rapport aux sham (groupe témoin, non stimulé ; 11 %) ; une amélioration de perception de leur qualité de vie chez les stimulés était aussi notée (Klauss *et al.*, 2014).

- Cannabis : Boggio *et al.* (2010) ont montré que la stimulation bilatérale

du CPFDL (anode à droite, cathode à gauche ; 2 mA pendant 15 minutes) résultait en une diminution du *craving* pour la marijuana.

- Cocaïne : Batista *et al.* (2015) ont étudié l'effet de la répétition de stimulations bilatérales du CPFDL (anode à droite, cathode à gauche) chez des consommateurs dépendants à la cocaïne. Les sujets (abstinents depuis environ 1 mois) recevaient 5 sessions de tDCS (tous les deux jours, 20 minutes à 2 mA) ; les sessions actives ont entraîné une réduction du *craving*, de l'anxiété, et une amélioration de la qualité de vie perçue.

Conti et Nakamura-Palacios (2014) ont observé la réactivité de sujets dépendants face à des images associées à la cocaïne *via* l'étude des potentiels évoqués dans le cortex cingulaire antérieur (qui serait impliqué dans le biais d'attention envers les drogues) par électroencéphalographie (EEG). Après stimulation bilatérale du CPFDL (anode à droite, cathode à gauche ; 2 mA pendant 20 minutes), ils ont montré que l'exposition à des images liées à la prise de cocaïne entraînait une augmentation d'activité dans le cortex cingulaire antérieur chez les cocaïnomanes du groupe sham. Une diminution d'activité dans cette zone cérébrale étaient en revanche relevée chez les sujets traités par tDCS active. Ceci confirme que la neuromodulation pourrait être un outil efficace dans l'aide au sevrage et à la lutte contre la rechute chez les patients dépendants.

Ces auteurs ont également montré un effet de cette stimulation bilatérale du CPFDL (mêmes paramètres) sur l'onde P3, qui est un potentiel évoqué représentant l'activité de diverses aires cérébrales en réponse à un stimulus (tel que la vue d'une image). L'exposition à la cocaïne entraîne des modifications d'activité dans des structures subcorticales telles que le noyau accumbens et les ganglions de la base, qui entraînent une diminution de l'activité du cortex préfrontal. Cette diminution peut expliquer le phénomène d'addiction et l'impact de la drogue sur les fonctions cognitives. Des sessions de tDCS journalières (5 jours consécutifs) augmentent l'activation (relative au visionnage d'indices liés à la drogue) de l'onde P3 dans diverses aires préfrontales dont le CPFDL et les cortex frontopolaire, orbitofrontal et cingulaire antérieur. Cela pourrait représenter une restauration de processus préfrontaux préalablement altérés par l'exposition chronique à la drogue (Conti *et al.*, 2014).

- Addictions alimentaires : Fregni et ses collaborateurs ont été les premiers à montrer qu'une stimulation bilatérale du CPFDL (20 minutes à 2 mA) diminuait significativement le *craving* pour la nourriture (de différents types, choix basé sur les préférences locales : brésiliennes) et la quantité de

nourriture consommée à la fin de la stimulation (Fregni *et al.*, 2008b). Ils ont complété ces résultats par une étude d'EEG montrant une diminution de l'amplitude de la composante N2 (qui pourrait se traduire par une diminution du conflit conduisant à l'inhibition d'un comportement au niveau subcortical) et une augmentation de celle de la composante P3 (traduite par un plus large contrôle inhibiteur au niveau cortical) suite à la stimulation du CPFDL (anode à droite, cathode à gauche, mêmes paramètres). Les sujets inclus n'étaient en revanche pas des patients souffrant de troubles de l'alimentation au sens du DSM-IV mais rapportaient de forts et fréquents (plus de trois fois par jour) *craving* pour la nourriture (Lapenta *et al.*, 2014).

De manière intéressante, Montenegro *et al.* (2012) ont montré chez des patients en surpoids que la stimulation anodique du CPFDL gauche (cathode sur l'aire supra-orbitaire controlatérale) associée à de l'exercice aérobique diminuait la faim et augmentait la satiété des sujets (de manière plus importante que la tDCS ou l'exercice seuls).

Pour finir, Khedr *et al.* (2014) se sont intéressés à sept patients atteints d'anorexie mentale, résistants aux traitements, et leur ont administré 10 sessions de stimulation anodique du CPFDL gauche (1 session de 25 minutes par jour, à 2 mA). Le score de six patients sur l'inventaire de dépression de Beck (troubles dépressifs) s'est trouvé amélioré, avec pour cinq d'entre eux une amélioration également sur deux échelles évaluant le comportement alimentaire (EAT : *Eating Attitude Test* et EDI : *Eating Disorder Inventory*) à la fin du traitement et jusqu'à un mois après.

L'ensemble de ces résultats suggère que la tDCS permettrait de réguler divers types de troubles alimentaires en complément d'autres traitements (pour revue, voir Sauvaget *et al.* (2015)).

Schéma récapitulatif

Pour résumer, trois principaux montages entraînent une amélioration significative des symptomatologies dépressive et addictive - les deux pathologies psychiatriques auxquelles nous nous intéresserons dans cette thèse - : la stimulation unilatérale du CPFDL gauche, et la stimulation bilatérale du CPFDL (figure 2.2).

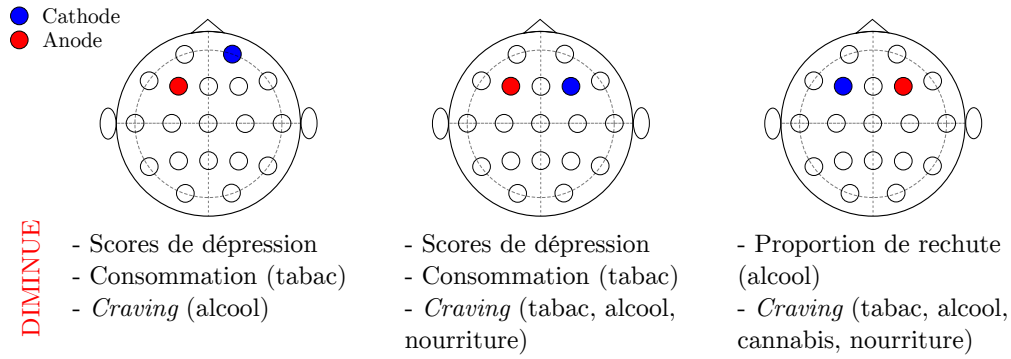


FIGURE 2.2 – Schéma des principaux positionnements d'électrodes étudiés dans le cadre du traitement de la dépression ou de l'addiction. Les cercles rouges représentent l'anode, et les cercles bleus la cathode.

2.1.4 Chez le sujet sain

Comme vu ci-avant, la tDCS est parfois employée comme un outil d'étude des fonctions des aires cérébrales sur le plan comportemental, moteur ou cognitif (Kuo et Nitsche, 2015). Ceci permet de comprendre les mécanismes et d'ouvrir des pistes pour le traitement des pathologies dans lesquelles les fonctions étudiées sont altérées.

tDCS et prise de risque

Plusieurs auteurs se sont intéressés à la modulation des comportements de prise de risque par la tDCS. Certains protocoles (souvent regroupés sous le terme de *risk task*) chez l'Homme permettent de les tester, en faisant une distinction entre l'attrait de la récompense et le contrôle que l'on est capable de s'imposer dans une situation de risque. En 2007, l'équipe de Fecteau a publié une étude montrant qu'une stimulation bilatérale (anode sur le CPFDL droit, cathode sur le gauche) par tDCS (2 mA, de 5 minutes avant jusqu'à la fin du test comportemental, qui durait moins de 10 minutes) résultait, chez des sujets sains volontaires, en une diminution des choix risqués dans le test de *risk task*. Le montage inverse n'avait pas d'effet dans ce test (Fecteau *et al.*, 2007).

tDCS et motricité

Il existe une riche littérature répertoriant les effets bénéfiques des stimulations cérébrales non invasives sur les fonctions motrices :

— Amélioration de la précision motrice (dessin d'un cercle) immédiatement et 30 minutes après la stimulation anodique (20 minutes à 1 mA) du cortex moteur primaire (M1) droit (Matsuo *et al.*, 2011) ;
— Amélioration des performances en matière d'acquisition et de consolidation d'un apprentissage moteur de type temps de réaction pendant la stimulation anodique du cortex moteur gauche (env. 15 minutes, 1 mA) (Nitsche *et al.*, 2003b) ;
— Augmentation du temps d'endurance sur la contraction musculaire (fléchisseur du coude gauche) après stimulation anodique (10 minutes à 1.5 mA) du cortex M1 droit (Cogiamanian *et al.*, 2007) ;
— Augmentation de la force musculaire de la jambe (pendant au moins 30 minutes) après stimulation de l'aire cérébrale correspondante au niveau du M1 droit (aire localisée par un stimulus par TMS ; tDCS 10 minutes à 2 mA) (Tanaka *et al.*, 2009).

Ainsi, la tDCS anodique appliquée au niveau du M1 peut améliorer les performances dans divers aspects de tâches motrices tels que la précision, l'apprentissage, ou encore la force.

tDCS et cognition

Un des principaux domaines d'utilisation de la tDCS, oscillant entre étude de mécanismes et amélioration de capacités, est celui de la cognition.

À ce jour, la plupart des études sur sujet sain évaluent l'effet d'une session de tDCS (anode sur le CPFDL gauche, cathode la plupart du temps sur l'aire supra-orbitaire controlatérale) sur l'apprentissage et la mémoire de travail. En général les paramètres de stimulation sont une intensité de 1 à 2 mA et une durée de 10 à 20 minutes (pour revue, voir article en annexe A, Bennabi *et al.* (2014)).

Après une stimulation anodique du CPFDL, une amélioration de l'apprentissage implicite (qui consiste à développer inconsciemment des connaissances, sans pouvoir les verbaliser) a été mise en évidence dans une tâche de classification probabiliste (Kincses *et al.*, 2004). L'apprentissage explicite (apprentissage cette fois volontaire, conscient) peut aussi être facilité par cette technique (Hammer *et al.*, 2011)).

La mémoire de travail est souvent évaluée par la tâche de *n-back*, où l'on présente des stimuli successifs à un sujet qui doit réagir quand un stimulus a été présenté n positions auparavant. Ainsi, de manière non exhaustive, plusieurs auteurs ont pu montrer une amélioration des performances suite à une stimulation anodique du CPFDL gauche, avec un plus grand nombre de

réponses correctes (Fregni *et al.*, 2005b) jusqu'à 30 minutes après la stimulation (Ohn *et al.*, 2008) ou une diminution du temps de réaction (Teo *et al.*, 2011).

D'autres auteurs ont également reporté qu'une stimulation anodique du CPFDL permet d'améliorer la mémoire épisodique, processus permettant le souvenir d'évènements vécus dans un certain contexte (Manenti *et al.*, 2013).

Enfin, l'équipe de Brunyé *et al.* (2014) a montré qu'une stimulation anodique du cortex temporal droit à 2 mA (pendant une tâche de navigation spatiale virtuelle) augmente l'efficacité en terme de navigation et améliore la mémoire spatiale chez des sujets ayant un faible sens de l'orientation.

tDCS, dopage et dérives

Ces résultats semblent clamer la possibilité d'améliorer les performances cognitives de l'être humain, ouvrant la voie à diverses dérives.

- Grand public : de nombreux tutoriels sur la fabrication d'un dispositif de stimulation, ainsi que des stimulateurs commercialisés, sont disponibles sur Internet. Un casque de stimulation transcrânienne (tDCS, tACS, tRNS) nommé *foc.us* est ainsi actuellement proposé à la vente aux particuliers, avec des arguments tels que la supposée possibilité d'améliorer les capacités physiques (endurance), cognitives, en jeu vidéo, ou même de faire des rêves lucides (figure 2.3, partie A).

Puisque les stimulateurs marqués CE (conforme aux exigences, ce qui implique le respect de certaines normes) utilisés pour la recherche clinique ont effectivement des effets bénéfiques sur la mémoire de travail, Steenbergen *et al.* (2015) ont réalisé une étude comparant les effets du stimulateur commercial à un groupe sham dans la tâche de *n-back*. Ils ont ainsi montré que la stimulation active (20 minutes, en positionnant le casque de la manière spécifiée par le vendeur ; figure 2.3, partie B) diminuait les performances dans ce test, se révélant ainsi préjudiciable et ne constituant en aucun cas une alternative aux générateurs de courant vendus pour la clinique. Les effets sur le long terme de stimulations par cet appareil restent à déterminer, mais il convient d'être prudent face à la possibilité de se procurer - ou de fabriquer - ce genre de stimulateurs.

FIGURE 2.3 – L'appareillage *foc.us*. A) Photos tirées du site promotionnel de l'appareil, www.foc.us. B) Schéma du montage des électrodes pour le stimulateur *foc.us*, selon les spécifications fournies à l'achat ; adapté de Steenbergen *et al.* (2015).

Par ailleurs, un sondage international parmi les chercheurs ayant publié dans le champ de la tDCS révèle que l'utilisation de cette technique pour améliorer les performances pose plus de préoccupations aux chercheurs que son utilisation en recherche ou en clinique. Ces soucis sont principalement ceux concernant l'innocuité et le risque d'effets secondaires, la stimulation pouvant être appliquée de manière inappropriée par des personnes non formées à cette technique. S'ajoutent les soucis éthiques, soulignés par le risque inhérent à la mise à disposition d'une technique "d'amélioration des performances" sans que ses effets et mécanismes aient été clairement établis ; par ailleurs la preuve d'un rapport bénéfice-risque favorable reste à apporter (Riggall *et al.*, 2015). Notons enfin que les effets à long terme de la tDCS, notamment sans contrôle médical ni indication thérapeutique, restent incertains. Il apparaît donc nécessaire de se montrer prudents face à l'emploi de cette technique de stimulation cérébrale.

- Armée et personnel de sécurité : l'équipe de Levasseur-Moreau *et al.* (2013) s'est posé la question de la possibilité - et de l'intérêt - d'utiliser les stimulations transcrâniennes non invasives pour améliorer les performances motrices et cognitives des personnels de l'armée, ou des services de sécurité publics ou privés. Ils soulignent que des programmes d'entraînement de certaines fonctions motrices et cognitives - pouvant être améliorées par ces techniques de stimulation - existent déjà pour ces personnels : entraînements à l'habileté au combat pour les militaires, ou encore des compétences attentionnelles pour le personnel de sécurité des aéroports.

Les techniques de stimulation transcrâniennes, dans cette optique, seraient un outil pour l'"amélioration" des personnels de sécurité ; mais il reste à déterminer si leurs effets bénéfiques peuvent être transférés à des situations réelles, la grande majorité des données présentées jusqu'à présent ayant été collectée en laboratoire. Enfin, la question de l'intérêt de ces techniques dans ce cadre se pose aussi : leurs effets sont-ils assez puissants (en terme d'amplitude et de durée) pour provoquer des améliorations suffisantes ? Les auteurs précisent l'importance de discuter du caractère éthique de l'utilisation de ces techniques pour améliorer les performances, et surtout du contrôle de sa réelle innocuité (Levasseur-Moreau *et al.*, 2013).

Sehm et Ragert (2013) répondent d'ailleurs à cet article en opposant d'importants doutes quant aux effets à long-terme, à la spécificité de la modulation des fonctions cérébrales, et à la possibilité de mettre en application la stimulation transcrânienne hors des conditions contrôlées de laboratoire. En effet, dans des situations complexes (avec de possibles interactions environnementales, émotionnelles ou de diverses natures), il est actuellement impossible de savoir comment la modulation de facteurs tels que l'attention ou la prise de décision pourrait se répercuter, et s'il n'y a pas un risque d'aboutir à des comportements négatifs voire dangereux pour les tiers.

En réponse à ces critiques, la première équipe a publié un nouvel article précisant qu'avant tout usage des techniques de stimulation non-invasive comme outil d'amélioration de sujets sains il restait à évaluer le rapport bénéfice-risque, et que tout protocole de stimulation devrait être révisé par des institutions indépendantes. Les stimulations devraient par ailleurs être réalisées par un personnel habilité dans un environnement contrôlé, avec de stricts critères d'inclusion et d'exclusion pour les participants (Brunelin *et al.*, 2013).

Le débat reste donc ouvert, certains auteurs défendant l'intérêt des méthodes de stimulation cérébrale pour l'amélioration de l'espèce humaine ; ils placent alors les techniques telles que la tDCS au même titre que d'autres améliorations - telles que la fabrication de vêtements ou la littérature - rendant possible la survie et le développement dans de bonnes conditions (qualité de vie) de l'Homme (Clark, 2014).

2.2 Pourquoi cibler le cortex préfrontal dorsolatéral ?

Chez l'Homme, la plupart des études réalisées se basent sur une stimulation anodique du CPFDL et montrent des effets positifs sur des symptômes de dépression, d'addiction, et dans des tests cognitifs (Cf. chapitre 2). La majorité des études visant d'autres zones cérébrales s'intéressent par ailleurs à des lésions ou des pathologies très spécifiques (par exemple, stimulation de la zone lésée après une attaque cérébrale, ou inhibition du foyer épileptogène chez des patients épileptiques) ; nous nous intéresserons donc dans cette section au CPFDL.

Le cortex frontal humain est délimité par le sillon central (scissure de Rolando), qui le sépare du lobe pariétal, et le sillon latéral (scissure de Sylvius), qui le sépare du lobe temporal. On le subdivise en trois grandes structures (figure 2.4) :

— Le cortex moteur ;
— Le cortex prémoteur en avant du précédent ;
— Et la zone qui nous intéressera par la suite, le cortex préfrontal.

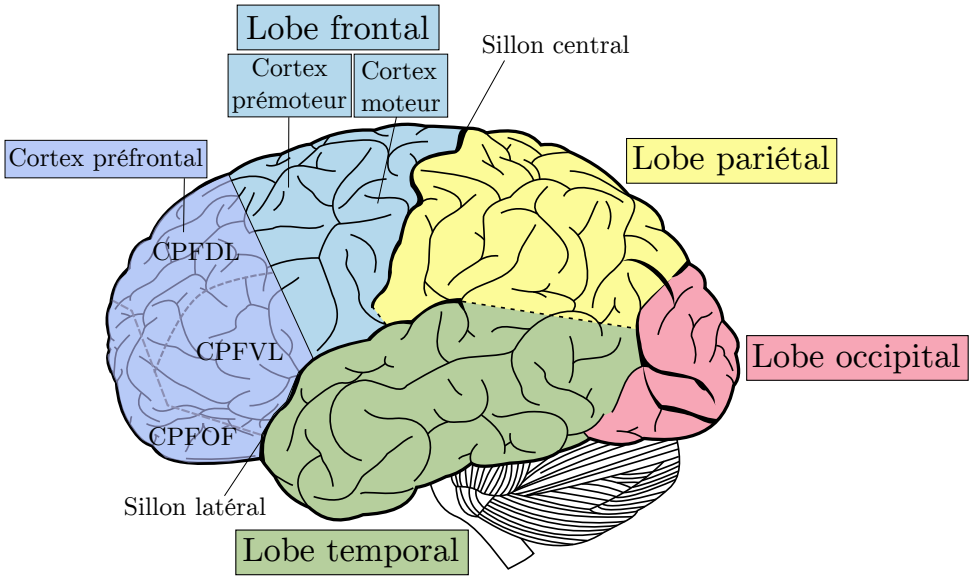


FIGURE 2.4 – Schéma de l'organisation du cortex cérébral chez l'Homme. CPF : cortex préfrontal ; DL : dorsolatéral, VL : ventrolatéral, OF : orbitofrontal. Adapté du manuel d'anatomie de Gray (1918).

2.2.1 Importance des réseaux neuronaux

Le cortex frontal est impliqué dans diverses fonctions cognitives et comportementales (planification, exécution et contrôle des mouvements volontaires...). La zone préfrontale plus particulièrement est connectée à de nombreuses régions corticales et sous-corticales, assurant un rôle d'intégrateur central au sein du système nerveux. En effet, cette zone peut être considérée comme le cortex associatif du lobe frontal, et ses fonctions ne peuvent être étudiées si elles ne sont pas remises dans le contexte du réseau formé avec les autres aires cérébrales.

Le cortex frontal est connecté (de manière topographique et, la plupart du temps, réciproquement) avec le tronc cérébral, le thalamus, le système limbique et les ganglions de la base. Il intègre des informations externes (environnementales) et internes (dont la motivation), et fournit une réponse comportementale adaptée (Fuster, 2001).

Enfin, il présente également des connexions inter-hémisphériques assurant un transfert d'informations, particulièrement par l'intermédiaire du corps calleux.

2.2.2 Le cortex préfrontal dorsolatéral

Le CPFDL, impliqué notamment dans les fonctions exécutives telles que la mémoire de travail, la planification, la prise de décision ou encore la flexibilité mentale (Miller et Cummings, 2007), est une région définie d'un point de vue fonctionnel plutôt qu'anatomique (figure 2.4). Il est connecté à de nombreuses autres régions dont le cortex orbitofrontal (engagé dans la prise de décision), le thalamus (relais de signaux sensoriels et moteurs, contrôle de l'état de conscience), les ganglions de la base (mouvements volontaires, diverses fonctions cognitives, comportement social), l'hippocampe (différents types de mémoire), et des aires associatives des lobes temporaux, pariétaux, et occipitaux (intégration et traitement des informations sensorielles et motrices).

Des relations entre des lésions ou des dysfonctionnements du CPFDL et diverses pathologies psychiatriques ont été établies. Voyons brièvement l'implication de cette zone cérébrale dans les trois aspects qui nous intéresseront au cours de cette thèse.

CPFDL et dépression

Parmi les différentes zones cérébrales affectées dans la dépression, une attention particulière a été portée au CPFDL. Diverses études en imagerie

fonctionnelle ont montré son recrutement lors de tâches de régulation des émotions négatives (Koenigs et Grafman, 2009). Une altération de la régulation des affects négatifs due à un dysfonctionnement du CPFDL représente un des mécanismes pouvant expliquer la symptomatologie dépressive.

Plus précisément, preuve a été faite d'un déséquilibre entre les hémisphères gauche et droit chez les dépressifs, et ceci notamment au niveau du CPFDL. En effet, des études en imagerie cérébrale (par exemple, imagerie par résonnance magnétique fonctionnelle : IRMf) mettent en évidence une hypoactivité du CPFDL gauche, associé au jugement émotionnel négatif, et une hyperactivité du CPFDL droit, associé à la modulation de l'attention portée au jugement émotionnel (Grimm *et al.*, 2008).

Ainsi, le choix de stimuler le CPFDL gauche (par des sessions de tDCS anodique, ou d'autres méthodes de neuromodulation telles que la TMS) vise à augmenter l'excitabilité neuronale, et restaurer une réponse normale de cette région. Plus particulièrement, faciliter l'activation du CPFDL gauche tout en diminuant l'activité du CPFDL droit (tDCS bilatérale) est une piste intéressante pour rétablir l'équilibre entre ces deux zones affectées dans les troubles dépressifs (Nitsche *et al.*, 2009a).

CPFDL et troubles de la mémoire

La mémoire fait partie des fonctions assurées par le cortex préfrontal (en association avec d'autres aires cérébrales). Il augmente l'efficacité de l'encodage (acquisition d'informations à partir de stimuli), par exemple en orientant l'attention vers les éléments importants (Buckner *et al.*, 1999).

Le CPFDL est particulièrement important pour la mémoire de travail (Brunoni et Vanderhasselt, 2014). Suite à l'étude de la mémoire de travail chez des sujets atteints de lésions du CPFDL gauche et/ou droit, il a été montré que le CPFDL gauche est nécessaire à la manipulation d'informations verbales et spatiales, tandis que le CPFDL droit est impliqué dans ce qui a trait au raisonnement (Barbey *et al.*, 2013).

Une baisse de performance en matière de mémoire de travail est souvent reportée dans diverses pathologies psychiatriques et neurologiques, sans qu'un traitement efficace n'ait été établi (Andrews *et al.*, 2011). Puisqu'il a été montré qu'une stimulation anodique du CPFDL gauche augmente les performances cognitives, à la fois chez des sujets sains (voir section 2.1.4) et des sujets parkinsoniens (Boggio *et al.*, 2006), il est permis de penser que la tDCS pourrait être un traitement à combiner à une médication ou à des exercices de remédiation cognitive .

CPFDL et addiction

La consommation abusive de drogues et la dépendance entraînent une dérégulation de processus émotionnels et cognitifs contrôlés par le cortex, incluant le CPFDL. Cette zone est impliquée dans des fonctions telles que la prise de décision et le contrôle des impulsions ; aussi les modifications neurobiologiques - notamment une diminution de son activité - sont à l'origine d'une réponse inadaptée aux effets des drogues. C'est ainsi qu'on voit apparaître une diminution des comportements d'inhibition, ou encore des phénomènes de rechute après exposition à des indices liés à la drogue (Garavan et Hester, 2007 ; Koob et Volkow, 2010).

L'abstinence de consommation de cigarettes chez des fumeurs dépendants entraîne une variété de symptômes dont des déficits cognitifs associés au sevrage qui auraient par ailleurs, avec la diminution d'activité dans le CPFDL gauche, une forte validité prédictive pour la rechute (Loughead *et al.*, 2015 ; Patterson *et al.*, 2010). Ces déficits seraient annulés après une administration de nicotine ou d'un traitement (tel que le bupropion) favorisant l'arrêt de consommation (Ashare *et al.*, 2014). La tDCS pourrait améliorer les fonctions cognitives (diminuées chez le sujet dépendant) et le contrôle cognitif, réduisant ainsi la probabilité d'une rechute.

L'exposition de sujets dépendants à des stimuli associés à leur drogue d'abus entraîne une activation du CPFDL mise en évidence dans des études d'imagerie cérébrale fonctionnelle (tomographie par émission de positons, qui permet de mesurer le métabolisme cellulaire, ou IRMf, qui permet de mesurer les variations de flux sanguin et donc l'activité des régions cérébrales). Ceci a été réalisé pour différentes drogues telles que la cigarette (Brody *et al.*, 2002 ; Due *et al.*, 2002), l'alcool (Wrase *et al.*, 2002 ; Olbrich *et al.*, 2006) et la cocaïne (Grant *et al.*, 1996 ; Maas *et al.*, 1998). L'activation du CPFDL refléterait le *craving* ressenti par ces sujets ainsi que la génération et la maintenance d'objectifs comportementaux visant à obtenir la drogue (Wilson *et al.*, 2004).

Appliquée sur le CPFDL, la tDCS semble capable de modifier au moins transitoirement les comportements liés à la prise de décision et de risque ainsi qu'à l'impulsivité tout en diminuant le *craving*.

2.3 Recherche translationnelle

Le concept de recherche translationnelle désigne le transfert des observations réalisées en recherche fondamentale (travaux expérimentaux, notamment sur des cultures de cellules ou sur des modèles animaux) à la recherche

clinique (dont l'objet est le développement de nouveaux traitements médicaux efficaces), et inversement. Le but est, *via* la recherche fondamentale, d'apporter à la clinique des innovations thérapeutiques (développement de nouveaux traitements, compréhension de leurs mécanismes...) tout en ayant le retour d'observations faites chez l'Homme sur l'efficacité réelle du traitement, ses effets secondaires, l'évolution des pathologies traitées...

En ce qui concerne la tDCS, si elle apparaît intéressante comme traitement (ou traitement complémentaire) de divers troubles neurologiques et psychiatriques, elle n'a pas encore gagné le titre d'intervention prescriptible. Avant de pouvoir être mis sur le marché avec une indication thérapeutique, tout nouveau traitement doit passer par plusieurs phases d'étude au sein d'un essai clinique.

Les différentes phases d'étude clinique

Après des études précliniques (chez l'animal) visant à déterminer les effets du traitement et les doses auxquelles les effets bénéfiques et les effets toxiques apparaissent, le traitement entre en phase clinique. La phase I consiste à étudier la tolérance et la cinétique du traitement chez l'être humain (sujets volontaires, sains ou atteints de pathologies spécifiques) ; elle est suivie de la phase II, dont le but est de déterminer la dose optimale du traitement ainsi que ses effets indésirables.

Actuellement une seule étude concernant la tDCS entre dans la phase III, qui étudie l'efficacité du traitement en comparaison à un placebo et/ou à un traitement de référence. Cette étude, ELECT-TDCS, est dirigée par Andre Brunoni, de l'université de Sao Paulo, et s'intéresse à l'efficacité de la tDCS comme traitement antidépresseur (Brunoni *et al.*, 2015) en comparaison à un traitement de référence (Escitalopram oxalate, traitement antidépresseur de la classe des inhibiteurs sélectifs de recapture de la sérotonine) et à un placebo (médicament placebo et traitement sham, c'est-à-dire tDCS inactive). Elle se base sur une publication précédente du groupe de Brunoni, qui mettait en évidence qu'un traitement par des sessions répétées de tDCS (1 session à 2 mA/jour pendant 10 jours, puis 2 sessions/semaine les 4 semaines suivantes) était aussi efficace qu'un antidépresseur de référence, la sertraline (également de la classe des inhibiteurs sélectifs de recapture de la sérotonine), et que l'effet bénéfique des deux combinés était plus important que l'effet de chaque traitement donné séparément (Brunoni *et al.*, 2013b). En cas de résultats satisfaisants, cette étude constituera un grand pas en avant vers la validation de l'utilisation de la tDCS comme nouveau traitement antidépresseur, potentiellement aussi efficace et avec moins d'effets secondaires

que les traitements de référence actuels.

Notons qu'en cas de validation de ce traitement, il y aura alors une phase IV d'essai clinique, consistant à étudier sur le long terme (après sa mise sur le marché) ses effets secondaires.

La recherche fondamentale

En parallèle des données recueillies chez l'Homme, des études sur l'animal s'avèrent nécessaires à plusieurs niveaux avant de valider l'emploi de la tDCS pour un usage clinique : comprendre son mécanisme d'action et mesurer son efficacité dans des modèles expérimentaux (animaux "sains" ou modèles de maladie) ; décrire le trajet parcouru par le courant électrique et la façon dont il est absorbé par les tissus (notamment *via* des études computationnelles) ; rechercher les paramètres de stimulation optimaux et vérifier l'innocuité de la méthode.

C'est pourquoi le développement d'un modèle animal permettant l'étude de chacun de ces points a soulevé notre intérêt. Je décrirai la notion de "modèle" dans le chapitre 3, présenterai ceux actuellement existants (pour la tDCS), et discuterai de l'intérêt d'un nouveau modèle. Je justifierai de manière plus détaillée les choix méthodologiques que nous avons fait lors du développement de notre modèle murin de tDCS dans le chapitre 9.

3 Les modèles animaux

Les modèles animaux sont essentiels à la recherche biomédicale. Ils permettent l'étude du fonctionnement normal et pathologique des organismes, et le développement de médications et autres interventions (chirurgicales ou non invasives). Le comité du Conseil National Américain de Recherche sur les Modèles Animaux définit ainsi cette notion : un modèle dans lequel la biologie ou le comportement normatifs, ou bien un processus pathologique (spontané ou induit) peuvent être étudiés, et partageant un ou plusieurs aspects communs avec un phénomène équivalent chez l'Homme ou d'autres espèces animales (*National Research Council Committee on Animal Models for Research and Aging*).

3.1 Notion de modèle

Avant de continuer, il m'apparaît important de préciser la notion de modèle, puisque j'emploierai ce terme au cours de ma thèse.

Un modèle animal à proprement parler peut être naturel (condition naturelle, pathologie spontanée), expérimentalement induit (modification génétique, traitement spécifique...), ou naturellement résistant à une affection spécifique. Dans tous les cas, il doit répondre à une liste de critères dont le but est de le rendre le plus pertinent possible pour extrapoler à l'Homme les observations réalisées.

Il existe ainsi trois principaux critères de validité à considérer (Nestler et Hyman, 2010 ; Belzung et Lemoine, 2011) :

— Critère d'homologie (ou validité de construction) : les mécanismes de construction du modèle sont similaires à ceux impliqués dans la pathologie chez l'Homme ;
— Critère isomorphique (ou validité d'apparence) : le modèle animal reproduit de la manière la plus fidèle possible les lésions, symptômes ou mécanismes d'une pathologie humaine ;
— Critère prédictif (validité de prédiction) : l'effet d'un traitement et les mécanismes expliquant cet effet doivent être similaires à ceux observés

chez l'Homme.

Ainsi un bon modèle animal de pathologie (y compris pathologie psychiatrique) se doit de répondre à ces trois critères. Cependant, il est important de rappeler les limites de la modélisation. L'analogie entre deux espèces animales ne peut jamais être considérée comme parfaite (notamment en terme de symptômes de pathologies et réponse aux traitements). Si les observations réalisées sur modèle animal peuvent toujours apporter des éléments intéressants pour la recherche sur l'Homme, il convient de ne pas tirer de conclusions hâtives et de rester prudents lors des comparaisons.

Dans le cadre de ma thèse, nous ne cherchons pas à valider ou utiliser un modèle animal de pathologie ; nous utilisons la souris de souche Swiss pour étudier le traitement par tDCS. Nous emploierons parfois le terme de "modèle" puisque nous cherchons à mimer chez l'animal les effets de la tDCS retrouvés chez l'Homme, mais ce terme est à ne pas confondre avec la notion précise de "modèle animal de pathologie".

3.2 Les modèles animaux de tDCS

Il existe actuellement plusieurs modèles animaux de tDCS, notamment chez le rat. Je présenterai dans cette section ceux chez lesquels ont été mis en place la tDCS *in vivo*, et exclurai ceux pour lesquels une chirurgie particulièrement invasive (par exemple, implantation d'électrodes dans l'os du crâne et non en surface (Islam *et al.*, 1994, 1995)) a été réalisée, éloignant le modèle de ce qui est pratiqué chez l'Homme. J'exclurai aussi les études s'intéressant à des techniques dérivées de la tDCS (telle que la tDCS oscillatoire, étudiée par exemple par Binder *et al.* (2014a,b), ou encore la tDCS pulsée, comme chez Ben Taib et Manto (2009)).

Par conséquent, je ne citerai pas non plus ici les études *in vitro*, qui sont extrêmement intéressantes pour comprendre des mécanismes cellulaires mais concernent l'application de courants de faible densité directement sur des tranches de cerveau. Ces études ont été présentées dans la section 1.3.3.

3.2.1 Études sur animaux sains

La tDCS chez l'animal a été mise en place de différentes manières en fonction des équipes.

Rongeurs : modèles avec chirurgie légère

Un des principaux modèles existants, mis en place chez le rat, est celui de l'équipe de Liebetanz, Fregni et Nitsche. Une embase (cylindre en plastique)

pour l'électrode (surface de contact avec l'os : 3.5 mm^2) est fixée au moyen de ciment dentaire sur le crâne de l'animal.

Lors des stimulations, le rat est éveillé afin d'éviter toute interaction entre un anesthésiant et la stimulation. Une contre-électrode (10.5 cm^2) est maintenue contre son thorax par un corset le temps de la stimulation (figure 3.1). L'asymétrie entre les deux électrodes a été décidée dans le but de créer un gradient de densité de courant (la densité la plus importante étant celle au niveau de l'aire cérébrale stimulée). Leur éloignement (contrairement à ce qui est pratiqué chez l'Homme, où les deux électrodes sont le plus souvent céphaliques) permet d'éviter le passage de courant directement de l'une à l'autre (shunt).

L'intensité de courant augmente graduellement (*fade-in* de 10 secondes), reste constante pendant le temps désiré (par exemple 20 minutes), puis diminue (*fade-out* de 10 secondes) afin d'éviter la sensation due à une brusque variation de courant.

Plusieurs études ont été menées sur ce modèle ; cette équipe s'est notamment penchée sur les limites de sûreté concernant les stimulations cathodiques chez 62 rats Wistar des deux sexes. Un courant cathodique a été appliqué sur le cortex frontal (2 mm en avant et 1.5 mm sur la droite du Bregma, qui est le point de jonction entre suture coronale et suture sagittale sur l'os du crâne) des animaux via l'électrode épicrâniale. Diverses intensités de courant ont été testées (0.001 ; 0.01 ; 0.05 ; 0.1 ; 0.5 et 1 mA) pendant 15, 30, 90 ou 270 minutes. Un groupe de 4 rats a également reçu 5 stimulations consécutives de 10 minutes à 0.4 mA (intensité juste en dessous de celle à laquelle apparaissaient les lésions après une stimulation unique). Les auteurs ont ainsi montré qu'en dessous d'une densité de courant de 143 A/m^2, aucune lésion cérébrale n'était détectée. Les lésions apparaissaient pour une stimulation à partir de 0.5 mA pendant 10 minutes et plus. Sous ce seuil, même les stimulations de longue durée ou répétées 5 fois n'entraînaient aucun dommage (Liebetanz *et al.*, 2009).

De même, cette équipe a montré que la tDCS modulait le débit sanguin cérébral de manière polarité- et intensité-dépendante (rat mâle Sprague-Dawley ; électrode stimulatrice sur le territoire de l'artère cérébrale moyenne, intensité de 0.025, 0.05 ou 0.1 mA, durée de 15 minutes) : augmentation du débit sanguin après une stimulation anodique, et diminution après une stimulation cathodique (Wachter *et al.*, 2011). À noter que dans ce cas, les rats étaient anesthésiés pendant la stimulation et la mesure du débit sanguin. Le même type de protocole a été appliqué par Han *et al.* (2014), qui a étudié la réponse hémodynamique du cerveau de rat (par fNIRS, résultats présentés

dans la section 1.3.3) sous tDCS : rat anesthésiés de la chirurgie à la tDCS (0.2 mA, 10 minutes), stimulation anodique (2 mm en arrière du Bregma, 5 mm à droite).

Ce modèle de tDCS a également servi dans une étude sur l'apprentissage et la mémoire de travail visuo-spatiale. Les auteurs ont testé des rats (Long Evans mâles) sham, stimulés par l'anode, ou stimulés par la cathode au niveau du cortex frontal par un courant de 0.2 mA pendant 30 minutes. Les rats ont subi 3 séances de stimulation juste avant un test d'évitement de place, sur 3 jours ; au bout de 21 jours, ils ont subi de nouveau le test (sans stimulation préalable). Aucune polarité de courant n'induisait d'effet à court terme dans leur test, mais après 21 jours, les rats stimulés par la cathode avaient de meilleures performances (en apprentissage et en mémoire de travail spatiale) comparés aux sham (Dockery *et al.*, 2011).

Rueger et ses collaborateurs se sont intéressés à la réponse cellulaire au niveau du cortex frontal après plusieurs sessions de stimulation par tDCS (5 ou 10 séances de 15 minutes à 0.5 mA, rats anesthésiés). Ils ont montré que les stimulations par les deux polarités induisaient une réponse pro-inflammatoire, mais que seules les stimulations cathodiques provoquaient le recrutement de cellules souches neuronales (marquées à la Bromodésoxyuridine) au niveau du cortex stimulé, et ce plus fortement après 10 stimulations. Ceci pourrait par exemple participer à la régénération des zones cérébrales atteintes par un accident ischémique (Rueger *et al.*, 2012).

Enfin, récemment, ce modèle a été utilisé par Podda *et al.* (2016) chez la souris. Les animaux ont subi une chirurgie visant à implanter l'électrode stimulatrice (sous anesthésie), et après 5 jours de repos ont été stimulés éveillés (et libres de leurs mouvements) pendant 20 minutes à 0.35 mA au niveau de la formation hippocampique gauche (1 mm en arrière du Bregma, 1 mm à gauche). Ils ont ainsi montré que la stimulation anodique entraînait une amélioration de l'apprentissage et de la mémoire (piscine de Morris et test de reconnaissance d'objet) et une augmentation de la potentialisation à long terme dans l'hippocampe, ceci associé à une augmentation de l'expression du BDNF. Ces effets duraient pendant au moins une semaine après la tDCS.

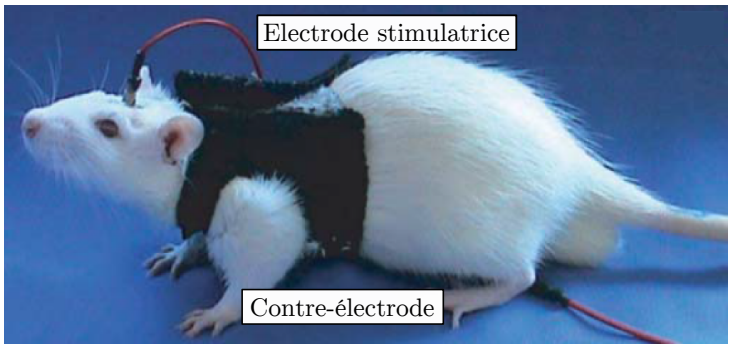


FIGURE 3.1 – Position des électrodes sur le rat dans le modèle de Liebetanz ; l'anode est fixée au moyen d'une chirurgie légère à une position donnée sur le crâne de l'animal, et la cathode est maintenue contre son thorax ventral au moyen d'un corset. Dans la plupart des études, l'animal est stimulé éveillé. Adapté de Liebetanz *et al.* (2006b).

Pour finir, plusieurs études sur modèle animal portent sur l'électrophysiologie ; les animaux sont alors anesthésiés profondément et placés dans un cadre de stéréotaxie pendant la stimulation.

L'équipe de Cambiaghi et Leocani s'est intéressée au modèle murin (souris femelles, souche C57BL/6), réalisant un montage similaire à celui décrit par Liebetanz. Une embase en plastique (surface interne 4.5 mm^2) était posée et maintenue par du ciment dentaire sur le crâne des animaux au niveau du cortex moteur M1 droit. Après un repos de 3 à 6 jours, les animaux étaient anesthésiés, une contre-électrode (5.2 cm^2) placée contre leur thorax au moyen d'un corset, et la stimulation (anodique ou cathodique) était appliquée 10 minutes à 0.25 mA (densité de courant de 5.55 mA/cm^2). L'équipe étudiait alors l'amplitude des PE moteurs (Cambiaghi *et al.*, 2010) ou visuels (Cambiaghi *et al.*, 2011) avant et après une stimulation anodique, cathodique, ou sham. Leurs résultats sont cohérents avec ceux obtenus chez l'Homme (augmentation de l'amplitude des PE sous stimulation anodique, et diminution sous stimulation cathodique), confirmant que la souris est un modèle intéressant pour l'étude des effets de la tDCS.

Toujours sur modèle murin, Monai *et al.* (2016) ont récemment montré que la stimulation par tDCS augmente la concentration en ions calcium dans les astrocytes, jouant très probablement un rôle dans la plasticité synaptique associée aux récepteurs NMDA (puisque le taux de calcium astrocytaire est positivement corrélé au taux extracellulaire de D-sérine, co-agoniste des récepteurs NMDA). Ils ont pour ceci appliqué un courant de 0.1 mA pendant 10 minutes sur le cortex visuel primaire de souris mutantes dont les astrocytes

exprimaient une protéine fluorescente (permettant de réaliser une technique d'imagerie transcrânienne *in vivo*) (Monai *et al.*, 2016).

Nous pouvons également citer l'article de Bolzoni *et al.* (2013), qui a étudié chez le rat anesthésié les effets de la stimulation du cortex moteur (1 à 2 mm à droite du Bregma) à une intensité de 0.2 mA pendant 5 à 7 périodes de 5 minutes. La cathode et l'anode entraînaient respectivement une facilitation ou une diminution des réponses musculaires évoquées suite à la stimulation de zones du tronc cérébral (le faisceau longitudinal médial et le noyau rouge) durant au moins 1 h. Bien que ces effets semblent contradictoires avec les études précédentes sur la polarité, ceci démontre un impact à long terme de la tDCS sur les neurones sous-corticaux (Bolzoni *et al.*, 2013).

Rohan et ses collaborateurs ont stimulé 34 rats Sprague-Dawley mâles pour réaliser ensuite une étude sur tranches de cerveau. Après la pose d'une électrode sur l'os du crâne, 2.5 mm en arrière du Bregma et en position centrale, les animaux bénéficiaient d'une semaine de repos. Une électrode de référence était ensuite placée entre leurs épaules, et ils étaient placés dans un environnement nouveau pour une stimulation de 30 minutes à des courants de 0.1 ou 0.25 mA tout en restant libres de leurs mouvements. Ils étaient alors replacés dans leur cage et euthanasiés 30 minutes ou 24 h après pour récupération de leur cerveau (Rohan *et al.*, 2015). Les auteurs ont ainsi montré qu'une stimulation par tDCS (*in vivo*) renforce la plasticité synaptique (LTP) au niveau de l'hippocampe de manière dose-dépendante, ceci encore 24 h après une stimulation à 0.25 mA.

Rongeurs : modèles sans chirurgie

- Avec anesthésie : toujours chez le rat (Sprague-Dawley mâles), Takano *et al.* (2011) ont fixé une électrode en fibres de carbone (5 mm x 5 mm) au niveau du cortex frontal et une au niveau du cou (20 mm de diamètre ; figure 3.2). Les rats étaient stimulés sous anesthésie (stimulation anodique à 0.4 ou 0.04 mA, 10 minutes) et l'activité cérébrale a été mesurée par IRM fonctionnelle. Les auteurs ont ainsi montré qu'une stimulation anodique du cortex frontal à une intensité de 0.4 mA augmente l'intensité de signal au niveau du cortex frontal et du noyau accumbens, une région sous-corticale connectée à la première et impliquée dans des fonctions liées au circuit de la récompense (Takano *et al.*, 2011). Sur le même modèle, les auteurs ont montré qu'une stimulation du cortex frontal de 10 minutes à 0.8 mA par la cathode (mais pas par l'anode) faisait varier les taux extracellulaires de dopamine dans le striatum. Notons que malgré la forte intensité de courant, une étude histologique avec deux types de coloration (crésyl violet et hématoxyline-

éosine) n'a pas révélé de lésion tissulaire.

Ceci suggère un effet de la tDCS sur le système dopaminergique au niveau des ganglions de la base, qui participent à des réseaux neuronaux impliqués dans diverses fonctions, dont des fonctions motrices, cognitives et limbiques (Tanaka *et al.*, 2013).

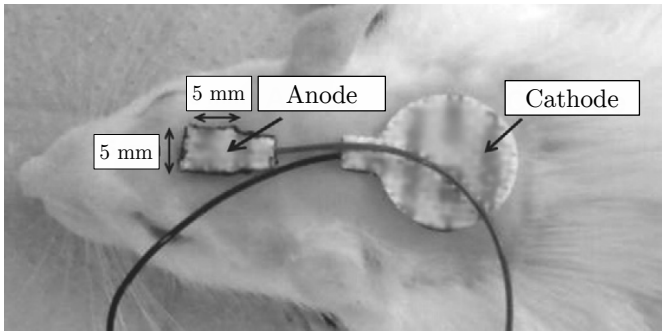


FIGURE 3.2 – Position des électrodes sur le rat dans le modèle de Takano. Une électrode est posée au niveau du cortex frontal, l'autre au niveau du cou. Le rat est stimulé sous anesthésie. Adapté de Takano *et al.* (2011).

- Sans anesthésie : Macedo *et al.* (2016) ont réussi à mettre en place chez le rat un protocole de stimulation bilatérale du CPFDL (anode à droite, cathode à gauche). Pour ceci, ils ont collé des électrodes adhésives sur le crâne rasé des rats (fixées au moyen de sparadrap) et les ont stimulés pendant 20 minutes à 0.5 mA. De manière intéressante, ils ont utilisé deux groupes témoins : un groupe contrôle sans stimulation et un groupe sham similaire à ce qui est pratiqué chez l'Homme, avec 30 secondes de stimulation avant que le courant ne soit arrêté. Ce type de contrôle est réalisé chez l'Homme pour que les sujets aient la sensation d'échauffement ou picotement parfois ressentie au début de la stimulation, quand le courant commence à être appliqué ; chez l'animal, la plupart du temps, les animaux sham subissent le même traitement que les stimulés mais ne se voient administrer aucune stimulation.

Ils ont ainsi montré que la tDCS, comme chez l'Homme, réduisait chez le rat le *craving* pour une nourriture palatable (céréales sucrées) 24 h après la stimulation.

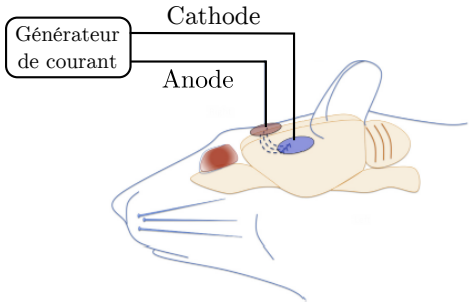


FIGURE 3.3 – Position des électrodes sur le rat dans le modèle de Macedo ; les électrodes stimulatrices sont posées sans anesthésie ni chirurgie au niveau du cortex préfrontal, et le rat est stimulé éveillé. Adapté de Macedo *et al.* (2016).

Autres modèles animaux

Enfin, la tDCS a également été testée sur le chat et le lapin. Une équipe s'est intéressée aux performances visuo-spatiales de trois chats domestiques mâles pendant et après stimulation cathodique du cortex visuo-pariétal. Les électrodes (4 cm^2) ont été posées sur la tête rasée et nettoyée à l'alcool des chats, la cathode au-dessus du cortex visuo-spatial droit et l'anode sur le front gauche (figure 3.4 A). Les auteurs ont ainsi montré qu'une stimulation cathodique de 20 minutes à 2 mA de cette aire cérébrale entraînait une baisse des performances à détecter et localiser des stimuli dans le champ visuel controlatéral, ceci jusqu'à 1 h après la fin de la stimulation (Schweid *et al.*, 2008).

Márquez-Ruiz *et al.* (2012) se sont intéressés à la modulation, par tDCS, de la perception sensorielle nécessaire à l'établissement d'un apprentissage associatif chez le lapin. Quatre électrodes stimulatrices en argent étaient placées chirurgicalement sur le crâne des lapins au-dessus du cortex somatosensoriel droit ; une éponge remplie de solution saline et placée sur l'oreille controlatérale servait de contre-électrode (figure 3.4 B). Les animaux, éveillés, ont reçu une stimulation anodique ou cathodique à différentes intensités (0.5, 1, 1.5 ou 2 mA ; densité de courant maximum reçue : 3.7 A/m^2) pendant 20 minutes. La tDCS anodique augmentait et la tDCS cathodique diminuait l'acquisition du conditionnement de clignement des yeux en réponse à un stimulus conditionné (stimulation des babines).

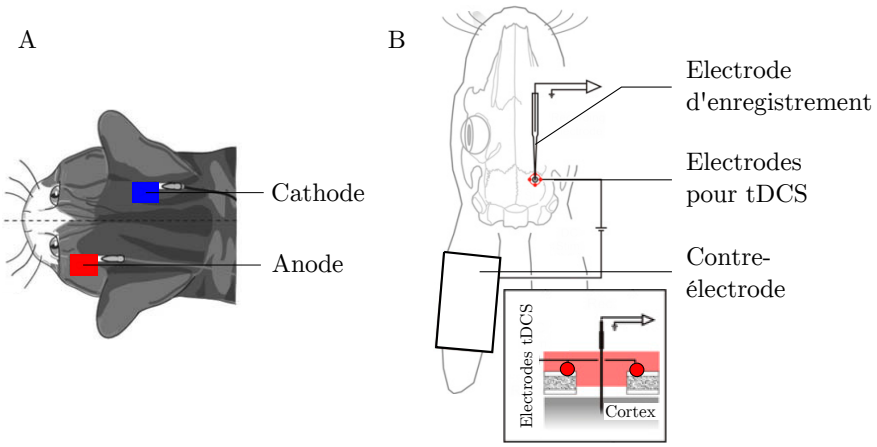


FIGURE 3.4 – Position des électrodes sur les modèles animaux non rongeurs. A/ Chez le chat, les électrodes sont positionnées sans chirurgie sur le crâne de l'animal, qui est stimulé éveillé. B/ Chez le lapin, une électrode d'enregistrement est insérée dans le cerveau. 4 billes d'argent (en rouge) servant d'électrodes actives pour la tDCS sont placées autour (à 3 mm du centre de la fenêtre d'insertion) ; la contre-électrode est attachée à l'oreille du lapin. Adapté de Schweid *et al.* (2008) et de Márquez-Ruiz *et al.* (2012).

3.2.2 Études sur modèles de pathologies

Il y a également eu quelques études de tDCS chez des animaux présentant des désordres neurologiques.

- Épilepsie : chez le rat, des crises d'épilepsie ont été induites soit par des stimulations électriques, soit par une injection de substances spécifiques (combinaison lithium-pilocarpine, un cholino-mimétique, ou pentylenetetrazol, un antagoniste du récepteur $GABA_A$).

Liebetanz et ses collaborateurs ont testé sur un modèle de rat épileptique l'effet anticonvulsivant de la tDCS. La tDCS a été réalisée sur l'animal comme décrit ci-avant, l'embase étant fixée ici au niveau du cortex frontal droit (3 mm en avant du Bregma, 3 mm sur la droite). Ils ont montré qu'en fonction de la durée et de l'intensité du traitement (30 minutes de stimulation à 0.2 mA ou 60 minutes de stimulation à 0.1 mA), une stimulation cathodique (mais pas anodique) permettait d'augmenter le seuil épileptogène (donc de diminuer le risque de survenue d'une crise d'épilepsie ; Liebetanz *et al.* (2006b)).

Kamida s'est basé sur le modèle de Liebetanz : les rats, des mâles Wistar, ont subi une opération consistant en l'implantation d'une embase (2 mm en avant et 1.5 mm à droite du Bregma) procurant une aire de contact de

3.5 mm^2, suivie d'une journée de récupération avant la stimulation (cathodique ; 0.2 mA, 30 minutes/jour pendant 2 semaines). La contre-électrode était ici une électrode-aiguille insérée à l'arrière du cou des rats. Les auteurs ont ainsi montré que ce protocole réduisait les convulsions et avait des effets neuroprotecteurs sur l'hippocampe des rats jeunes (âgés de 21 jours lors de l'induction du mal épileptique ; Kamida *et al.* (2011)).

Dhamne *et al.* (2015) ont également réalisé un modèle de tDCS chez le rat (Long Evans, mâle). L'électrode stimulatrice était alors une électrode disque d'électroencéphalographie placée sur le scalp après rasage ; l'électrode de référence était une éponge de 9 cm^2 mouillée de NaCl et placée contre le thorax (figure 3.5). Les rats étaient en contention (restant éveillés avec possibilité de ne bouger que la tête, les membres et la queue) et ont reçu une stimulation cathodique de 20 minutes à 0.1 ou 1 mA, ou une stimulation sham. Les auteurs ont ainsi confirmé qu'une session de tDCS cathodique à 1 mA réduisait les crises d'épilepsie et ont montré que cela passait par une inhibition GABAergique intracorticale (ceci au moyen de l'étude des PE moteurs provoqués par TMS ; Dhamne *et al.* (2015)).

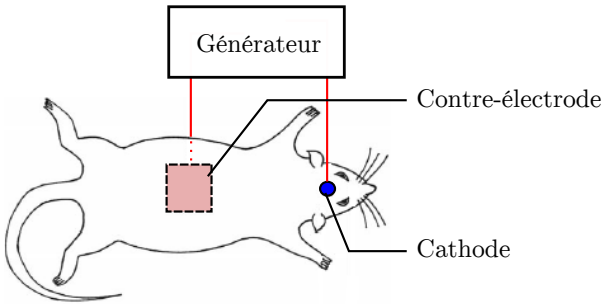


FIGURE 3.5 – Position des électrodes sur le modèle de rat épileptique de Dhamne ; les électrodes sont positionnées sans chirurgie, et la stimulation se fait sur animal éveillé en contention. Adapté de Dhamne *et al.* (2015).

- Dépression corticale envahissante : les effets de la tDCS ont été testés sur la dépression corticale envahissante, dysfonctionnement transitoire du cortex qui débute par une brève dépolarisation neuronale (excitation) locale et est suivie d'une hyperpolarisation (inhibition) qui se propage à la surface du cortex suivant une vague lente (Bouhassira et Calvino, 2009). Ce phénomène serait responsable des auras dans les crises de migraine et pourrait être associé également aux crises d'épilepsie. Les auteurs ont émis l'hypothèse que la modification de l'excitabilité corticale due à la tDCS pourrait altérer la propagation de cette dépression corticale (initiée, chez le rat, par application de KCl). Ils ont ainsi administré à des rats Wistar mâles un traitement par

tDCS anodique, cathodique ou sham de 20 minutes à 0.2 mA, ceci sur le cortex pariétal droit. À noter qu'ici, les rats sham recevaient une stimulation de 10 secondes. La tDCS anodique entraînait une augmentation de la vitesse de propagation de la dépression corticale envahissante ; la stimulation cathodique n'avait aucun effet (ce qui pourrait être dû à une interaction avec l'anesthésiant utilisé pendant les stimulations) (Liebetanz *et al.*, 2006a). Cet effet est augmenté quand combiné à une stimulation électrique répétitive (stimulation de 20 minutes par pulses de 5 secondes, à 0.6 mA, à une fréquence de 1 Hz ; Fregni *et al.* (2007)).

- AVC : Kim et ses collaborateurs ont étudié l'effet de la tDCS (anodique et cathodique) dans un modèle d'ischémie permanente (par occlusion de l'artère cérébrale moyenne chez des rats Sprague-Dawley des deux sexes). Ces rats ont été répartis en 4 groupes : traités par exercice (30 min/jour pendant 2 semaines), tDCS anodique ou cathodique (électrode active sur l'hémisphère lésé ; 0.1 mA, 30 min/jour pendant 2 semaines), ou rien. L'électrode crâniale (0.79 cm^2) était attachée directement sur la tête de l'animal (2 mm en avant de la ligne interaurale, 3 mm sur la gauche) juste avant la stimulation et maintenue par une coupe en plastique. La contre-électrode était placée contre le tronc et maintenue par de la gaze (figure 3.6). Les animaux étaient anesthésiés le temps des stimulations. Les rats recevant la tDCS anodique ont vu leurs performances motrices améliorées et une réduction de la détérioration axonale, suggérant que la stimulation anodique de l'hémisphère lésé pourrait avoir un effet neuroprotecteur et aider à la récupération après un accident vasculaire cérébral (Kim *et al.*, 2010). Cette équipe a ensuite montré que la tDCS anodique (0.2 mA, anode au-dessus du cortex M1, 20 min/jour pendant 5 jours consécutifs) appliquée tôt (le lendemain) ou tard (7 jours) après l'accident ischémique résultait en une amélioration des performances motrices et cognitives (test de mémoire spatiale : labyrinthe de Barnes) comparé aux rats sham. Ceci était accompagné d'une augmentation de l'expression de protéines impliquées dans la croissance et le remodelage dendritique (*Microtubule-associated protein 2*, MAP-2) et dans la régénérescence axonale (*Growth Associated Protein 43*, GAP-43) dans les aires périlésionnelles ou controlatérales en fonction du caractère précoce ou tardif de la tDCS (Yoon *et al.*, 2012). Se basant sur ce même modèle de tDCS chez le rat, une autre équipe a pu montrer que l'effet de la tDCS anodique sur la récupération post-AVC serait plus important après 7 à 14 jours de tDCS (après l'AVC) qu'après seulement 3 jours, et que la tDCS pourrait promouvoir le plasticité neuronale (Jiang *et al.*, 2012).

Notturno *et al.* (2014) ont quant à eux montré, toujours chez le rat ischémique, que des stimulations cathodiques à 0.2 mA (1 mm en arrière du Bregma, 2 mm sur la gauche ; cycles de 15 minutes de stimulation, 15 minutes de repos pendant 4 à 6 heures, respectivement 45 minutes ou immédiatement après l'attaque) entraînaient une réduction du volume de l'infarctus (aire lésée par l'ischémie) et du nombre de dépolarisations envahissantes périlésionnelles (qui sont supposées augmenter la taille de la zone cérébrale lésée). Cette étude confirme donc que la tDCS aurait un effet neuroprotecteur dans la phase aiguë de l'attaque cérébrale.

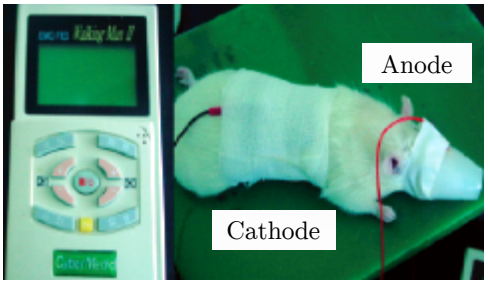


FIGURE 3.6 – Position des électrodes sur le rat dans le modèle de Kim ; l'électrode stimulatrice est posée sur le crâne et la contre-électrode contre le tronc sans chirurgie ; les animaux sont stimulés sous anesthésie. Adapté de Kim *et al.* (2010).

- Douleur : Nekhendzy et ses collaborateurs ont étudié l'effet de la tDCS seule ou combinée à la tACS (c'est-à-dire de l'otDCS) sur la douleur. Pour stimuler les rats (Sprague-Dawley mâles), les auteurs ont rasé leur tête (sous anesthésie) et placé la cathode au niveau du pôle antérieur de leur cortex frontal, et l'anode sur chaque mastoïde (surface des électrodes non précisée). Réveillés, les rats ont été stimulés 45 minutes *via* la cathode à différentes intensités et différentes fréquences, tout en subissant les tests permettant d'évaluer la douleur (test de la plaque chauffante et test de rétraction de la queue). Les auteurs ont ainsi montré que l'otDCS (mais pas la tDCS classique) avait un effet antinociceptif chez le rat pendant et jusqu'à 15 minutes après la fin de la stimulation (Nekhendzy *et al.*, 2004).

L'équipe de Torres quant à elle a montré chez des rats mâles Wistar que la tDCS annulait les effets nociceptifs induits par un stress (hyperalgésie et allodynie). Ils se sont basés sur différents modèles de stimulation, positionnant l'anode au niveau du cortex pariétal sur la tête rasée des animaux et la cathode sur l'aire supraorbitaire (ni anesthésie ni chirurgie ; figure 3.7) et appliquant un courant de 0.5 mA pendant 20 minutes sur les rats éveillés

(Spezia Adachi *et al.*, 2012, 2015). Chez des rats femelles (Wistar) ayant subi une ovariectomie (induisant une réponse accrue aux tests de douleur et altérant les taux de BDNF sanguin et hypothalamique), ils ont cette fois réalisé un traitement cathodique répété (20 minutes à 0.5 mA, pendant 8 jours). La tDCS a partiellement annulé les effets nociceptifs de l'ovariectomie. De manière intéressante, elle a également augmenté le taux de BDNF cortical chez les animaux ovariectomisés mais l'a diminué chez ceux non ovariectomisés, suggérant que l'état hormonal des femelles (et, par extension, des femmes) pourrait influer sur l'effet de la tDCS (da Silva Moreira *et al.*, 2015).

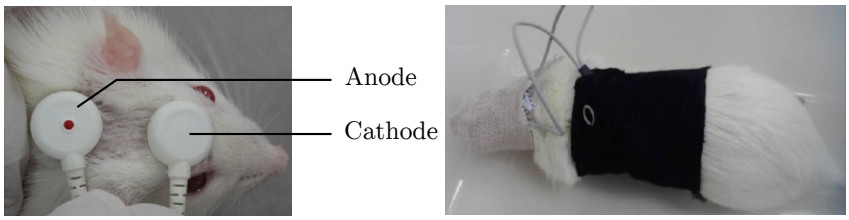


FIGURE 3.7 – Position des électrodes sur le rat dans le modèle de Torres ; l'anode et la cathode sont positionnées sans chirurgie (ni anesthésie) et les animaux sont stimulés éveillés. Adapté de Spezia Adachi *et al.* (2012).

- Maladie de Parkinson : Jiang et ses collaborateurs ont étudié l'effet de la tDCS sur le biais ipsilatéral observé chez des rats modèles de maladie de Parkinson (modèle 6-OHDA, obtenu par injection unilatérale de 6-hydroxydopamine dans le faisceau médian du télencéphale, ce qui aboutit à la destruction des neurones dopaminergiques de la substance noire). Ce biais implique que les rats négligent de la nourriture présentée du côté non dominant (controlatéral à leur côté préféré). En se basant sur le modèle de Liebetanz, les auteurs ont pu montrer qu'une stimulation anodique (30 minutes, 0.4 ou 0.8 mA) du cortex M1 annule ce biais immédiatement et pendant au moins 24 h, probablement en facilitant des mécanismes compensant la perte de fonction cérébrale ; ces résultats laissent à penser que la tDCS pourrait améliorer la fonction motrice chez des patients parkinsoniens (Li *et al.*, 2011).

L'équipe de Hu s'est intéressée quant à elle à l'optimisation des paramètres de stimulation par tDCS pour améliorer les performances motrices chez des singes modèles de la maladie de Parkinson (maladie induite par injection de 1-methyl-4-phenyl-1, 2, 3, 6-tetrahydropyridine, MPTP). La tDCS a été administrée, comme chez l'Homme, *via* une paire d'électrodes contenant une éponge imbibée de solution saline au niveau de différentes zones (M1, cortex préfrontal, et lobe temporal droit ou gauche) et selon différents

paramètres (maximum 60 minutes, à une intensité maximale de 2.5 mA). Les auteurs ont ainsi montré que la stimulation du cortex M1 améliorait significativement (mais temporairement) les capacités motrices, et surtout que cette amélioration dépendait plus de l'accumulation des sessions que de l'intensité ou la durée de chaque stimulation. Ils proposent ainsi qu'un traitement par tDCS anodique sur le long cours puisse être une meilleure stratégie pour le traitement de la maladie de Parkinson (Li *et al.*, 2015).

- Maladie d'Alzheimer : Yu *et al.* (2014) ont montré une amélioration des scores moteurs et d'indices liés à la cognition (nombre d'erreurs dans un test d'*open field*) après tDCS chez des rats ayant reçu des injections de scopolamine (protocole visant à induire des symptômes de la maladie d'Alzheimer). Les auteurs ont aussi montré une augmentation de l'activité cholinergique après tDCS ; or, l'acétylcholine dans l'hippocampe est un neurotransmetteur important pour les performances de mémoire et d'apprentissage. Les paramètres de stimulation ne sont pas exposés clairement (d'où l'absence de la présentation de ce modèle dans la table récapitulative 3.1), si ce n'est que les rats ont reçu 4 semaines de tDCS à raison de 2 fois/jour, 5 jours/semaine (sessions de 20 minutes à 0.1 mA ; Yu *et al.* (2014)).

Modèle	Chirurgie	État sous stimulation	Auteurs
Rat	oui	Anesthésié ou Veille	Liebetanz *et al.* (2009) Wachter *et al.* (2011) Dockery *et al.* (2011) Rueger *et al.* (2012) Bolzoni *et al.* (2013) Han *et al.* (2014) Rohan *et al.* (2015)
Souris			Cambiaghi *et al.* (2010, 2011) Monai *et al.* (2016) Podda *et al.* (2016)
Rat - épilepsie			Liebetanz *et al.* (2006b) Kamida *et al.* (2011)
Rat - migraine			Liebetanz *et al.* (2006a) Fregni *et al.* (2007)
Rat - Parkinson			Li *et al.* (2011)
Rat - AVC			Notturno *et al.* (2014)
Rat	non	Anesthésié	Takano *et al.* (2011) Tanaka *et al.* (2013)
Rat - AVC			Kim *et al.* (2010) Yoon *et al.* (2012) Jiang *et al.* (2012)
Rat	non	Veille	Macedo *et al.* (2016)
Rat - douleur			Nekhendzy *et al.* (2004)
Rat - épilepsie			Dhamne *et al.* (2015)
Rat - stress			Spezia Adachi *et al.* (2015)
Rate - ovariectomie			da Silva Moreira *et al.* (2015)

TABLE 3.1 – Les différents modèles de stimulation transcrânienne chez le rongeur en fonction de l'emploi de chirurgies ou d'anesthésies.

4 Intérêt d'un nouveau modèle : objectifs et présentation des travaux

Ainsi la technique de stimulation transcrânienne électrique, qui suscite un regain d'intérêt depuis la fin des années 90, a à plusieurs reprises démontré son efficacité dans le cadre du traitement de diverses pathologies neurologiques et psychiatriques. Son intérêt est d'autant plus important qu'il s'agit d'une technique peu coûteuse, très simple à mettre en place, et qui offre de nombreuses possibilités (stimulation focalisée : HD-tDCS ou non, courant alternatif, pulsé, aléatoire...) qui peuvent être opposées à un traitement placebo pour des études fiables en double-aveugle. Elle est de plus décrite comme non invasive et est bien tolérée (Kessler *et al.*, 2012).

Cependant, son mécanisme d'action reste méconnu, et la manière dont les différents acteurs cellulaires et moléculaires sont affectés par la tDCS et modifient à leur tour les fonctions cérébrales reste à déterminer.

Plusieurs modèles animaux ont été développés, évaluant un paramètre comportemental, neurobiologique, ou électrophysiologique, ceci parfois dans le cadre de pathologies spécifiques. L'objectif de ma thèse était de mettre en place la tDCS chez la souris en adaptant les procédures déjà existantes pour :

1. effectuer une caractérisation générale des comportements affectés par un protocole de stimulation répétée (censé augmenter/prolonger les effets de la tDCS chez l'Homme)
2. approfondir les recherches dans le domaine de l'addiction, où encore très peu d'études sur la tDCS sont réalisées (surtout chez l'animal)
3. émettre et commencer à tester des hypothèses pouvant expliquer les mécanismes sous-tendant les effets comportementaux de la tDCS.

Plan des travaux réalisés

Après cette introduction générale, je présenterai un chapitre sur l'approche méthodologique employée au cours de mes différentes études (protocole lié à la tDCS, tests comportementaux, tests neurobiologiques et statistiques).

Ensuite, je déclinerai mes travaux en trois parties qui porteront sur chaque grand domaine d'études réalisées au cours de ma thèse (figure 4.1) :

— Étude 1 : Mise en place d'un modèle murin de tDCS. Le choix de notre modèle murin et du protocole qui a été appliqué pour chacune de mes études y sera détaillé. Notre premier article (en annexe B) portant sur la caractérisation des effets de la tDCS (Pedron *et al.*, 2014) y sera présenté.

— Étude 2 : Études sur la prolifération cellulaire. Les résultats de nos études suggèrent que l'un des mécanismes d'action de la tDCS sur la cognition et la dépression pourrait impliquer la modulation de la neurogenèse hippocampique. Nous avons ainsi réalisé de premières études visant à évaluer l'intensité de la prolifération cellulaire dans notre modèle.

— Étude 3 : Études comportementales et neurobiologiques liées à l'exposition à différentes drogues. J'ai étudié l'effet de la tDCS sur l'attrait pour trois drogues : nicotine, alcool et cocaïne. C'est pour l'étude de cette dernière drogue que nous avons publié l'article présenté en annexe C (Pedron *et al.*, 2016).

Je conclurai ce rapport par une discussion générale sur les perspectives ouvertes par ces travaux.

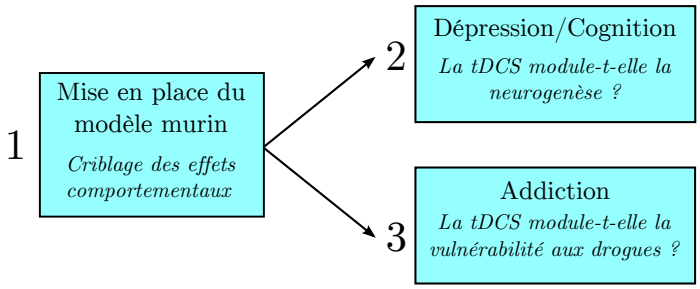


FIGURE 4.1 – Schéma récapitulatif du plan suivi au cours de ma thèse.

Deuxième partie

Matériel et méthodes

5 Le modèle animal

5.1 Sujets

La plupart des études que je présenterai ont été réalisées sur des souris femelles de souche Swiss, réparties en au moins deux groupes :

— Groupe Sham : chirurgie avec implantation de l'embase de l'électrode, pas de stimulation électrique.

— Groupe tDCS : chirurgie avec implantation de l'embase de l'électrode, tDCS anodique au niveau du lobe frontal gauche.

Conditions d'élevage

Les souris ont été élevées en conditions standard à l'animalerie (cycle jour/nuit de 12/12 h, lumières allumées à 7 h ; température et humidité contrôlées) avec eau et nourriture disponibles *ad libitum*.

Les souris bénéficiaient d'un enrichissement social dans la mesure où elles étaient placées en cages collectives tout au long de l'expérience (n=5 à 10/cage), excepté lors des périodes de chirurgie et de stimulations (placement en cages individuelles afin d'éviter le détachement de l'embase). Le milieu physique en revanche n'était pas enrichi (au moyen de jouets ou matériaux) afin de limiter tout effet sur les paramètres comportementaux et neurobiologiques (dépression, mémoire, neurogenèse...). En effet, s'il est de plus en plus démontré que l'enrichissement du milieu influence les mesures comportementales et biologiques, une standardisation des méthodes reste à déterminer car différents procédés peuvent entraîner des impacts variés (Toth, 2015) ; de plus, il semblerait que l'effet de l'enrichissement varie en fonction du sexe du rongeur (Lin *et al.*, 2011 ; Girbovan et Plamondon, 2013).

Toutes les études suivent les normes européennes pour le soin et l'utilisation des animaux de laboratoire. Elles ont été approuvées par le comité d'éthique bisontin en expérimentation animale (CEBEA-58).

Âge des souris

Il est important de porter attention à l'âge des souris (et aux périodes de la vie correspondantes chez l'Homme) lors des études. C'est particulièrement vrai lorsque l'on s'intéresse aux stimulations cérébrales, le cerveau poursuivant sa maturation après la naissance jusqu'à l'âge adulte.

En nous basant sur des revues de la littérature, nous pouvons définir différentes étapes du développement chez le rongeur (les rats et les souris suivant un profil similaire) (McCutcheon et Marinelli, 2009 ; Spear, 2000) :

— Séparation de la mère : 21 jours après la naissance
— Maturité sexuelle (début adolescence) : environ 32 jours pour les femelles, 45 jours pour les mâles
— Transition vers l'âge adulte : environ 60 jours (sexes confondus)

Ces données nous ont permis de déterminer l'âge auquel nous souhaitions mettre en place des traitements spécifiques (tels qu'un traitement à l'adolescence). Notons que dans la plupart de nos études, les animaux étaient stimulés par tDCS à l'âge de 8 semaines. Pour des souris femelles, ceci correspond au début de l'âge adulte.

5.2 La tDCS chez la souris

5.2.1 Chirurgie

Concernant l'application de la tDCS, une des principales différences entre l'Homme et la souris est la nécessité de fixer un support sur le crâne de l'animal. Ce support, appelé embase, permet de placer une électrode au-dessus d'une zone cible du cerveau et d'éviter son déplacement (dû aux mouvements de peau) pendant ou entre deux stimulations.

L'embase conçue en collaboration avec l'entreprise de biotechnologie DIXI Microtechniques (Besançon, France) est fixée lors d'une chirurgie réalisée sous anesthésie générale (solution de Kétamine 80 mg/kg et Xylazine 12 mg/kg, voie intra-péritonéale). La souris est placée dans un cadre stéréotaxique et une incision sagittale est pratiquée sur la longueur de son crâne en partant de la région supra-orbitaire. L'embase est placée sur la région frontale gauche (centre +1 mm en avant du Bregma, +1 mm sur la gauche ; figure 5.1 A et B) et fixée par l'adjonction de ciment dentaire (Glass ionomer, GC Fuji I, Japon). Une crème antibiotique (Auréomycine 3 %) et une crème anti-démangeaisons (PO12) sont appliquées sur l'incision. Du paracétamol est

administré par voie orale aux souris au cours des 24 h suivant l'opération (10 mg dilués dans 100 ml d'eau de boisson).

Afin d'éviter la dégradation ou le décrochage des embases, les souris sont placées en cages individuelles dès la fin des opérations. Une semaine de repos est respectée entre la chirurgie et le début des stimulations.

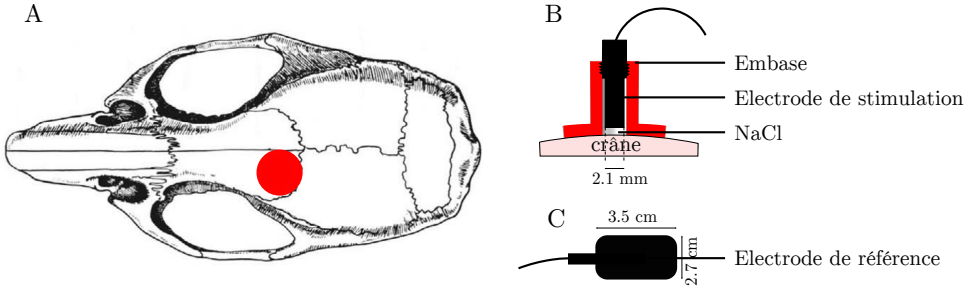


FIGURE 5.1 – Schéma du matériel de stimulation. A/ Position de l'embase sur le cortex frontal (+1 mm en avant du Bregma, +1 mm sur la gauche ; Franklin et Paxinos (1996)) ; B/ électrode stimulatrice en cuivre (recouverte d'or) vissée dans l'embase remplie de liquide physiologique (NaCl) ; C/ contre-électrode, maintenue contre le thorax de la souris dans la boîte de contention.

5.2.2 Sessions de stimulation

Les souris (Sham et tDCS) sont placées dans des systèmes de contention fabriqués au laboratoire de Neurosciences de Besançon. Ces boîtes permettent de maintenir la contre-électrode (surface de contact : 9.5 cm^2, figures 5.1 C et 5.2) recouverte de gel conducteur (ReegaPha 6101, France) sur leur thorax. L'embase est remplie de NaCl 0.9 %, et une électrode (surface de contact avec le crâne : 3.5 mm^2 ; développée en collaboration avec DIXI Microtechniques, Besançon, France) y est vissée. Deux séances de 20 minutes de stimulation anodique sont réalisées par jour (temps moyen entre deux stimulations : 6 heures), ceci pendant cinq jours consécutifs. Au cours de cette thèse nous avons utilisé un générateur de courant DC-STIMULATOR PLUS (Neuroconn, Allemagne ; également utilisé en clinique) puis un générateur fabriqué dans notre laboratoire (Open-tES, Besançon, France ; annexe D) spécialisé pour la stimulation du rongeur. L'intensité de stimulation est de 0.2 mA avec montée et descente progressives (*fade-in* et *fade-out* de 10 secondes chacun ; Cambiaghi *et al.* (2010, 2011)).

À la fin de la semaine de stimulations, les souris sont replacées en cages collectives, Sham et tDCS mélangées.

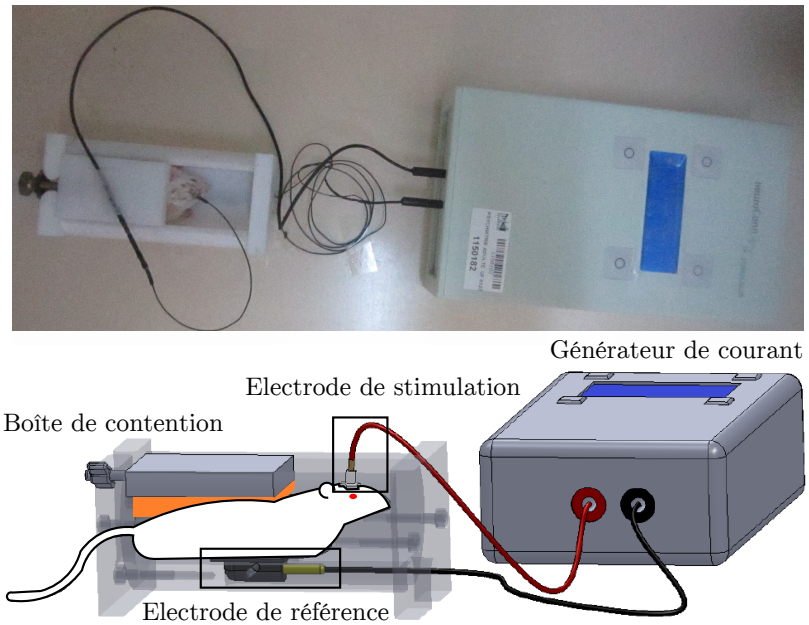


FIGURE 5.2 – Représentation d'une session de tDCS chez la souris. La boîte de contention, en téflon, possède un emplacement pour l'électrode de référence. La souris y est maintenue par un couvercle recouvert de mousse, sa tête restant libre de mouvement. La fixation chirurgicale de l'embase assure la position de l'électrode stimulatrice.

6 Tests comportementaux

En fonction de nos études, nous avons réalisé des tests de comportement soit à court (dans la semaine suivant la fin des stimulations), soit à plus long terme (à partir de 3 semaines après la fin des stimulations).

6.1 Activité locomotrice

6.1.1 En milieu familier

Ce test est réalisé dans une cage d'actimétrie (17 cm de largeur x 21 cm de longueur x 14 cm de hauteur) similaire à la cage de stabulation des souris (litière habituelle, avec accès à l'eau et aux granulés). Cette cage est placée sur un capteur de pression (mesure de l'activité au sol : immobilité, déplacements...) et entre des barres infra-rouges (mesure de l'activité verticale : redressement, escalade de la grille...). Ce système est relié à un ordinateur (logiciel d'actimétrie, Bioseb, France) qui permet l'acquisition de différentes données, dont différents paramètres d'activité de la souris :

$$Activite_{totale} = activite_{mobile}(exploration) + activite_{immobile}(toilettage, etc)$$

L'évaluation de l'activité locomotrice des souris dans un milieu qui leur est familier peut être réalisée notamment pour étudier les éventuels effets secondaires de traitements (potentiellement neurotoxiques) sur le système nerveux central (Lynch III *et al.*, 2011 ; Moser, 2011).

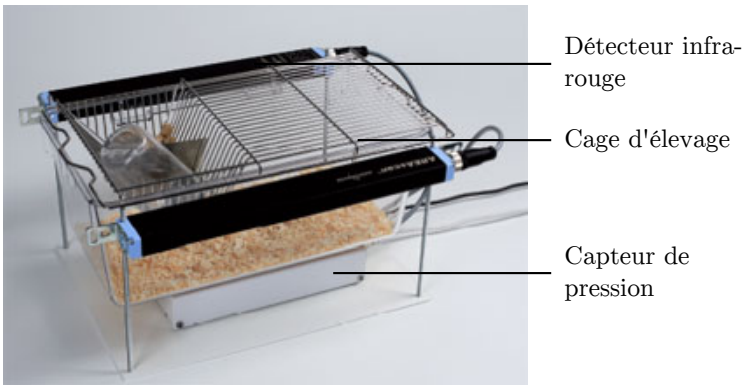


FIGURE 6.1 – Dispositif d'actimétrie (Bioseb, France). Une cage similaire à la cage des souris est posée sur un capteur de pression et entre deux barres infra-rouges. L'activité de la souris est mesurée par le logiciel Activmeter (Bioseb, France).

6.1.2 En réponse à la nouveauté

Le test de l'*open field* est un test qui permet de mesurer l'activité locomotrice générale des souris dans un milieu qui, au contraire de la cage d'actimétrie, n'est pas familier. Les souris sont placées dans un dispositif circulaire (47 cm de diamètre) ou carré (37 cm de côté) placé sous une caméra reliée à un ordinateur. Le logiciel Ethovision (Noldus, Pays-Bas) permet le calcul objectivé de plusieurs paramètres comportementaux dont la distance parcourue par les souris pendant la durée du test (40 minutes). Différentes zones peuvent également être définies, et leur fréquentation calculée.

6.2 Comportements associés à l'anxiété

L'anxiété chez les rongeurs est classiquement évaluée dans le test du labyrinthe en croix surélevée (Lister, 1987 ; Hogg, 1996). Il se base sur le conflit entre la curiosité naturelle des souris (les poussant à l'exploration) et leur préférence pour les endroits sombres et clos par rapport aux endroits exposés.

Le labyrinthe (6 cm de largeur x 30 cm de longueur ; hauteur des parois : 14.5 cm par bras) est ainsi constitué de 2 bras ouverts (BO, anxiogènes car exposés et au-dessus du vide) et de 2 bras fermés (BF, rassurants) reliés par une plate-forme centrale et situés à 45 cm au-dessus du sol (figure 6.2). La souris est placée 5 minutes dans ce dispositif (sous une luminosité de 50 lux) et son activité est enregistrée par le logiciel Ethovision. Un pourcentage de

temps passé dans les bras ouverts est calculé à la fin du test :

$$Score_{BO} = \frac{Temps_{BO}}{(Temps_{BO} + Temps_{BF})}.100$$

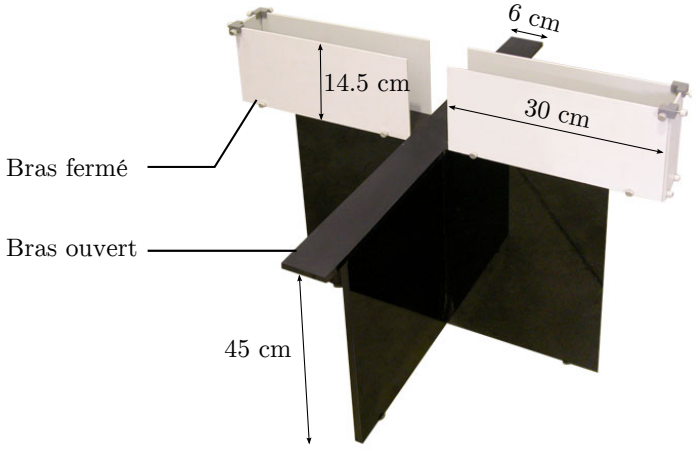


FIGURE 6.2 – Labyrinthe en croix surélevée (EPM). Ce labyrinthe est composé de deux bras fermés et deux bras ouverts au-dessus du vide (anxiogènes). Image tirée du site de Bioprobes Ltd.

6.3 Comportements associés à la dépression

Un moyen de mesurer des comportements associés au désespoir (et par extension à la dépression) chez la souris est de placer cette dernière dans une situation inconfortable. La souris cherche à s'en sortir en se débattant, puis traverse des phases de "désespoir" pendant lesquelles elle reste immobile.

Deux tests sont couramment utilisés pour mesurer ces comportements de désespoir, tous deux filmés, enregistrés, et analysés par l'expérimentateur et par une personne extérieure à l'étude ("en aveugle" : cette personne n'a pas connaissance des groupes d'appartenance des souris).

La nage forcée

Également appelé test de Porsolt (Porsolt *et al.*, 1977), ce test consiste à placer une souris dans un cylindre (18 cm de diamètre) rempli d'eau (profondeur 17 cm ; température 31 ± 2°C ; figure 6.3) pendant 6 minutes. Les paramètres mesurés sont le temps d'activité (nager et/ou escalader des parois dans le but de s'échapper) à opposer au temps d'immobilité (se laisser

flotter plus d'une seconde), ainsi que la latence avant la première immobilité en secondes (Petit-Demouliere *et al.*, 2005).

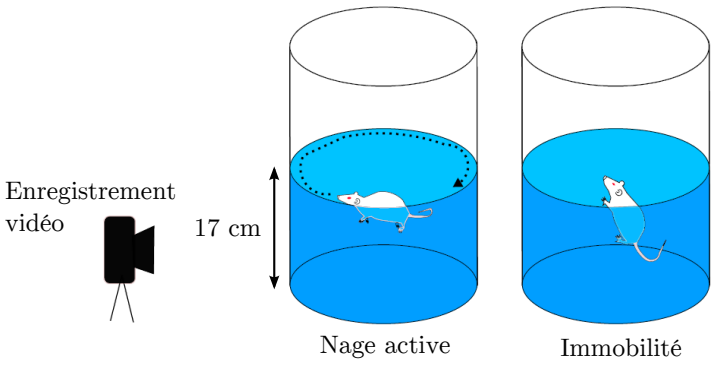


FIGURE 6.3 – Test de la nage forcée. La souris est placée dans l'eau, et l'expérimentateur mesure la latence avant la première immobilité ainsi que le temps total d'immobilité (résignation : elle ne cherche plus à s'échapper).

La suspension par la queue

Ce test se déroule dans un dispositif séparé en trois chambres (chacune de 30 cm de haut sur 24 cm de large) munies d'un crochet. La souris est suspendue par la queue au crochet, tête vers le bas (à environ 10 à 15 cm du sol) pendant 6 minutes. Ici aussi la latence et le temps passé immobile, par opposition au temps passé à se débattre et se redresser, sont mesurés (Cryan *et al.*, 2005).

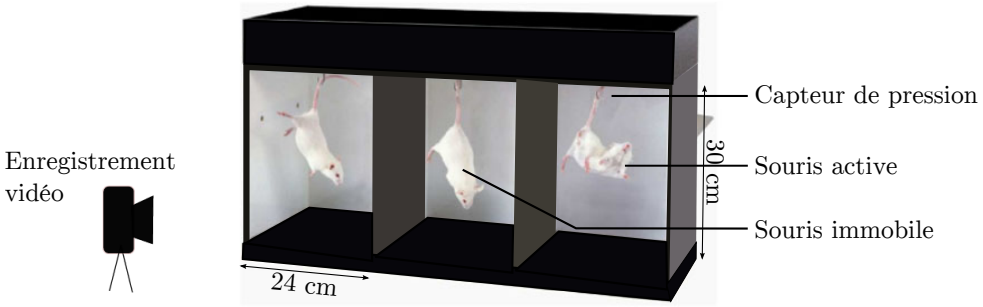


FIGURE 6.4 – Test de suspension par la queue. La souris est placée tête en bas, et l'expérimentateur mesure la latence avant la première immobilité ainsi que le temps total d'immobilité (résignation).

6.4 Mémoire

Différents types de mémoire peuvent être évalués chez le rongeur, soit dans des tests différents, soit dans un même test en faisant varier les paramètres expérimentaux.

6.4.1 La mémoire visuo-spatiale

Nous avons évalué la mémoire visuo-spatiale des souris au moyen du test de la piscine de Morris (*Morris water maze*, MWM ; Morris (1984)). Le principe repose sur le fait que l'eau constitue un environnement aversif dont la souris cherche à s'échapper en rejoignant le plus rapidement possible une plate-forme immergée (invisible) à une position fixe. La souris est lâchée dans une orientation aléatoire au centre d'une piscine (diamètre 90 cm, eau chauffée à 31 ± 2°C).

La phase d'entraînement dure 3 jours. Chaque jour sont réalisés 3 blocs de 4 essais pendant lesquels la souris apprend à localiser la plateforme au moyen d'indices visuels situés sur les parois de la piscine. Si la souris ne parvient pas à trouver la plateforme au bout de 60 secondes, l'expérimentateur la place dessus. Vingt-quatre heures après la dernière journée d'entraînement, un essai *"probe trial"* est réalisé : la souris est placée dans la piscine, la plate-forme ayant été retirée. Si la souris avait bien mémorisé la localisation de la plate-forme, elle passera plus de temps dans le quadrant où celle-ci se situait. Notons que le type de mémoire évaluée est hippocampo-dépendant, une lésion de l'hippocampe entraînant une baisse de performance dans ce test (Vorhees et Williams, 2006, 2014).

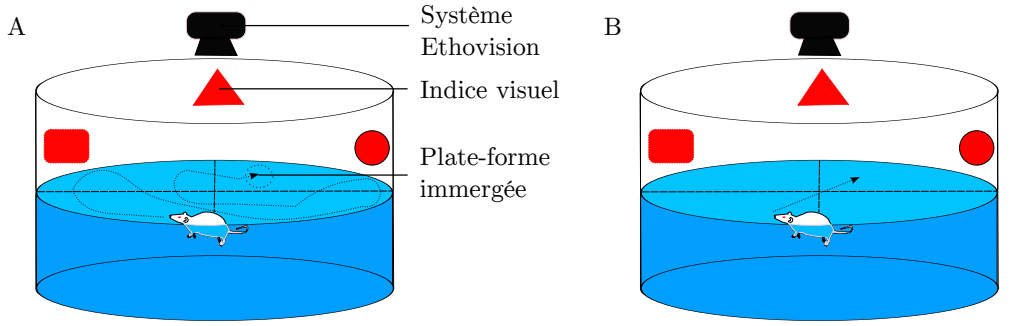


FIGURE 6.5 – Test de la piscine de Morris. A/ La souris apprend à repérer une plateforme immergée au moyen d'indices visuels (entraînement), puis B/ sa mémoire visuo-spatiale est testée (*probe trial*).

6.4.2 La mémoire de travail

La mémoire de travail des souris a été évaluée au moyen du test de reconnaissance d'objet. Les souris étaient habituées au dispositif de l'*open field* pendant quatre jours : elles étaient placées dans l'*open field* vide pendant dix minutes et pouvaient l'explorer librement. Le cinquième jour, le test se déroulait en trois phases :

— pendant 10 minutes, une souris était placée dans l'*open field* contenant deux objets identiques (nommés A) fixés par du velcro au sol ;
— elles retournaient ensuite dans leur cage pendant deux minutes ;
— un des deux objets était échangé par un autre (différent, nommé B), et la souris était placée cinq minutes dans l'*open field*.

L'expérimentateur mesure le temps passé à explorer les objets (museau à moins de 1 cm). Le pourcentage d'exploration du nouvel objet est ainsi calculé :

$$Exploration_B = \frac{Temps_B}{(Temps_B + Temps_A)}.100$$

Les souris ont naturellement tendance à explorer ce qui leur est inconnu (attrait pour la nouveauté). Un score significativement supérieur à 50 % permet donc de déterminer si la souris reconnaît le nouvel objet par rapport à celui qu'elle a déjà observé.

Dans une étude préliminaire, nous nous sommes assurés sur un autre groupe de souris qu'elles n'exprimaient pas de préférence pour un des deux objets que nous proposions (un jouet pour chats en forme de sphère à trous et une figurine des Simpsons©).

Entre chaque passage, l'*open field* et chaque objet était nettoyé à l'eau puis à l'alcool afin d'éviter toute trace olfactive.

À noter qu'il a été démontré que ce type de mémoire ne dépend pas de l'hippocampe (Ainge *et al.*, 2006 ; Barker et Warburton, 2011), contrairement au type de mémoire évaluée dans la piscine de Morris.

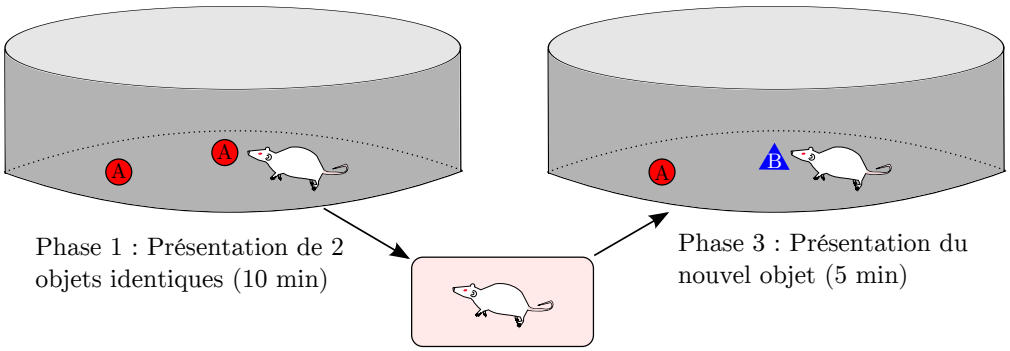


FIGURE 6.6 – Test de reconnaissance d'objet. Dans une première phase, les souris peuvent explorer deux copies d'un objet A ; au cours de la phase test, elles ont le choix entre une copie de cet objet A et un objet B qu'elles n'ont jamais vu auparavant.

6.5 Comportements vis-à-vis des drogues

6.5.1 Test de libre choix

Le test de libre choix permet d'évaluer la consommation spontanée (par voie orale) d'une substance proposée aux souris en libre choix avec leur eau de boisson habituelle.

Ce test est réalisé à l'animalerie. Les souris sont placées en cages individuelles avec accès à deux biberons, l'un contenant de l'eau et l'autre la solution à tester. Un relevé de consommation (par pesée des biberons) est réalisé tous les 2 à 3 jours pour les deux boissons, avec mesure de l'égouttement lors de la manipulation. À chaque relevé, la place des biberons est

inversée pour éviter un biais de préférence liée à leur position.

Nous avons réalisé un test de libre choix eau *versus* éthanol à 5 % qui s'est étalé sur deux semaines (avec 6 relevés de consommation). Ceci nous a permis de calculer le pourcentage de solution alcoolisée consommée (par rapport à la consommation d'eau) ainsi que la quantité d'alcool ingérée par jour (rapportée au poids de chaque souris, mesuré également à chaque relevé).

6.5.2 Propriétés appétitives des drogues d'abus

Le test de préférence de place conditionnée permet d'évaluer les effets appétitifs ou aversifs d'une substance (Tzschentke, 1998). Ce test est composé de deux compartiments (18 x 18 x 24 cm chacun) reliés par un couloir. Ces compartiments sont différentiables d'une part par leur couleur (murs et sol blancs *vs.* murs rayés de noir et sol vert) et d'autre part par leur texture (sol lisse *vs.* sol grillagé, respectivement). Le principe est de conditionner l'animal à associer son état interne (après injection de drogue) avec un environnement donné (un des deux compartiments).

Ce test se déroule en 3 phases :

— Jour 1 : Habituation. Les animaux visitent pendant 10 minutes le dispositif en ayant accès aux deux compartiments. Le temps passé dans chacun est mesuré *via* le logiciel Ethovision.

— Jours 2 à 4 : Conditionnement. Dans la mesure où dans notre test la plupart des animaux ont une préférence initiale marquée pour le compartiment aux murs rayés et au sol grillagé, nous avons appliqué la méthode de conditionnement dite "biaisée" en associant la drogue au compartiment le moins visité lors de la phase d'habituation. Les animaux reçoivent la drogue testée et sont bloqués 15 minutes dans le compartiment moins apprécié (compartiment associé à la drogue = CAD). Chaque jour ils reçoivent également une injection de solvant (sérum physiologique, additionné de 0.03 % d'acide ascorbique dans les études impliquant la cocaïne) et sont bloqués dans l'autre compartiment (compartiment neutre = CN).

— Jour 5 : Test. Le jour suivant la fin du conditionnement, les animaux sont de nouveau placés 10 minutes dans le dispositif avec accès aux deux compartiments (sans injection préalable) et le temps de visite est mesuré sous Ethovision.

Un score de préférence est calculé comme suit :

$$Score = \frac{Temps_{CAD}}{(Temps_{CAD} + Temps_{CN})}.100$$

La différence entre le score de préférence obtenu à J5 et celui obtenu à J1 est calculée.

— Différence > 0 : la drogue a eu un effet appétitif poussant les souris à augmenter leur fréquentation du compartiment où elles l'ont reçue.
— Différence < 0 : la drogue a eu un effet aversif.
— Différence $= 0$: la drogue n'a eu aucun effet dans ce test (neutre).

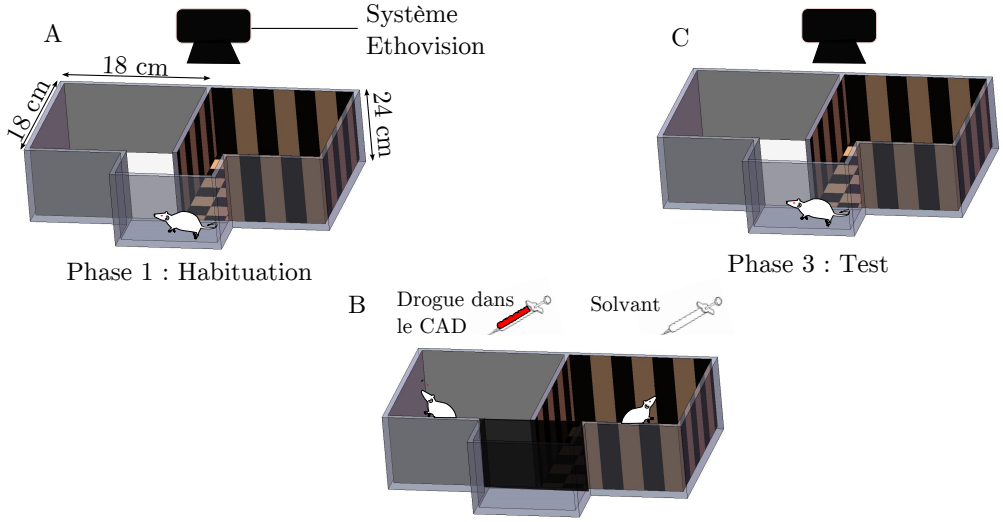


FIGURE 6.7 – Test de préférence de place conditionnée. A/ Jour 1 : Habituation (10 minutes, sans injection) ; B/ jours 2 à 4 : conditionnement (15 minutes avec la drogue et 15 minutes avec le solvant par jour pendant 3 jours) ; C/ jour 5 : test (10 minutes, sans injection). CAD = compartiment associé à la drogue.

6.5.3 Test d'auto-administration

Ce test évalue la motivation d'un animal à se procurer une drogue. Il se déroule dans une cage d'auto-administration dite de Skinner, qui permet de réaliser un conditionnement opérant. Ce type de conditionnement réfère à un apprentissage suite aux conséquences d'une action. La conséquence peut être le renforcement (effet positif du comportement, d'où une reproduction de l'action) ou la punition (effet négatif : l'action sera moins réitérée).

Lors de ma thèse, c'est plus précisément un test d'auto-administration d'alcool par voie orale qui a été réalisé. La cage (30 x 40 x 36 cm) comporte sur deux parois un indice lumineux, une fenêtre à *nose-poke*, et un système

permettant de délivrer l'alcool (figure 6.8 ; Bioseb, Vitrolles, France). Parmi ces deux trios de systèmes, l'un est actif (trou actif permettant l'allumage de l'indice visuel et la délivrance d'alcool) et l'autre est inactif (aucune conséquence en cas de *nose-poke*). Le comportement est enregistré au moyen du logiciel PackWin (Bioseb).

Dans notre protocole, les souris placées dans cette cage avaient pendant une heure la possibilité d'obtenir une dose d'alcool (20 μl d'alcool 20 %) dans une coupelle en échange d'un travail à fournir (*nose-poke*). Ce test se décompose en plusieurs phases :

— Habituation des souris à l'auto-administration : pendant plusieurs semaines, les souris sont habituées à devoir fournir un travail pour obtenir une dose d'alcool. Cela se fait ici selon un ratio fixe (FR), ce qui signifie qu'au cours d'une session la souris devra fournir une quantité fixe de *nose-pokes* pour obtenir une dose. L'habituation débute à un FR de 1 (1 *nose-poke* = 1 dose), se poursuit pendant plusieurs semaines par un FR de 2, et finit sur un FR de 3 (3 *nose-pokes* = 1 dose).

— Extinction : les souris sont placées en auto-administration, mais quel que soit le travail fourni la dose d'alcool n'est pas délivrée. Cette phase est maintenue jusqu'à ce que les souris atteignent leur niveau basal de *nose-pokes*.

— Rechute : une dose « gratuite » d'alcool est offerte (en libre accès, voie orale) à la souris en début de session, puis le travail fourni pour obtenir de nouvelles doses d'alcool est mesuré (à raison de 2 *nose-pokes* pour obtenir une dose).

— Motivation : durant cette session, le travail à fournir pour obtenir une dose d'alcool augmente progressivement au cours de l'heure. Cela permet de mesurer le point de rupture (*breaking point*) : effort maximal que la souris est prête à fournir pour obtenir une dose.

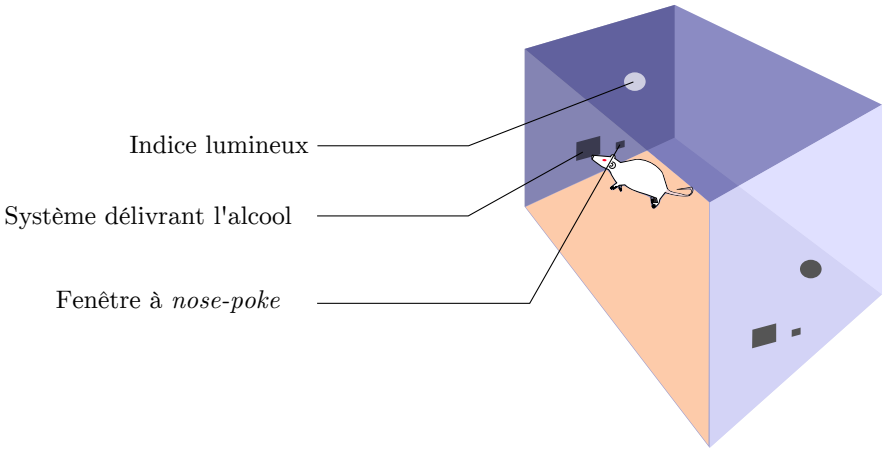


FIGURE 6.8 – Schéma de la cage d'auto-administration utilisée chez la souris. À 2 extrémités de la cage, un système composé d'un indice lumineux, d'une fenêtre à *nose-poke*, et d'une fenêtre d'accès à l'alcool est présenté. Un seul des deux systèmes est actif.

6.5.4 Sensibilisation locomotrice

Le processus de sensibilisation réfère à une forme d'apprentissage non associatif lors duquel la répétition d'un stimulus entraîne une amplification progressive de la réponse au stimulus. La théorie de la sensibilisation incitative (Robinson et Berridge, 1993) se base sur cette observation : l'exposition répétée à une drogue causerait une hypersensibilité (aux drogues et aux stimuli associés) de circuits neuronaux impliqués dans le désir de consommer.

La sensibilisation locomotrice désigne donc l'augmentation de la réponse locomotrice observée lors d'administrations répétées d'une drogue et qui persiste plusieurs mois, voire plus d'un an après son arrêt (en fonction de facteurs liés à l'animal ou au produit, tels que le nombre d'administrations de drogue ou l'intervalle entre deux ; Steketee et Kalivas (2011)).

Elle serait le reflet de la plasticité pathologique induite par la consommation chronique de drogue. En effet, les neuroadaptations sous-tendant la sensibilisation comportementale résulteraient en des modifications fonctionnelles du circuit de la récompense, menant à une forte motivation pour la drogue (Steketee et Kalivas, 2011).

Le test se déroule dans un *open-field* carré (37 x 37 x 37 cm) auquel les souris ont été préalablement habituées (3 jours d'accès après une injection de solvant). Lors de notre protocole de sensibilisation elles ont reçu une injection d'alcool en intra-péritonéal (alcool à 20 %, dose de 2.5 g/kg (Legastelois

et al., 2014) pour les souris Swiss ou 2 g/kg (Botia *et al.*, 2012) pour une autre souche de souris, DBA/2J) et ont été placées dans ce dispositif pendant 5 minutes. La sensibilisation a duré 10 jours à raison d'une injection par jour (induction de la sensibilisation), puis 5 ré-expositions « uniques » (challenge) à l'éthanol ont été réalisées (après 3 semaines sans alcool, chacune à une semaine d'intervalle) afin de mesurer l'expression de la sensibilisation.

Un score de sensibilisation peut être calculé dans ce test (Boudreau et Wolf, 2005). Il faut alors un groupe de souris "contrôle" : ces souris ne reçoivent jamais de drogue, seulement du solvant à chaque session. À partir de ce groupe, un coefficient de variation (CV) est calculé selon la formule suivante :

$$\text{Delta} = \frac{J_{10}}{J_1} \text{ ; CV} = \frac{Ecart-type_{Delta}}{Delta}$$

Ensuite, le Delta-1 du groupe des souris recevant les injections de drogue est calculé :

$$\text{Delta-1} = (\frac{J_{10}}{J_1}) - 1$$

Si le Delta-1 des souris recevant la drogue est plus élevé que le CV des souris recevant le solvant, ces souris sont dites sensibilisées. Sinon, elles sont caractérisées comme étant résistantes (pas d'augmentation de leur activité locomotrice au fur et à mesure des injections de drogue ; Legastelois *et al.* (2014)).

7 Tests neurobiologiques

7.1 Immunohistochimie : étude de la neurogenèse

La néo-neurogenèse désigne la formation de nouveaux neurones chez les individus adultes. Pour quantifier le nombre de nouvelles cellules cérébrales, nous réalisons un traitement à la bromodésoxyuridine (BrdU).

7.1.1 Traitement à la BrdU

La BrdU est un marqueur nucléaire analogue de la thymidine qui s'incorpore dans l'ADN des cellules en division (phase S du cycle cellulaire : réplication de l'ADN). Étant donné le mode semi-conservatif de la réplication de l'ADN, la dilution de la BrdU la rend indétectable à partir de 2 cycles de division. Afin de pallier cette dilution, l'administration de BrdU a été renouvelée 3 fois (3 injections intra-péritonéales espacées de 6 h, à raison de 50 mg/kg ; Klempin *et al.* (2013)).

À ce dosage, la quantité de bases marquées (BrdU) se retrouve nettement supérieure à celle des bases normales (thymidine) : la probabilité qu'une cellule se divisant après la première injection n'incorpore pas de BrdU est considérée comme nulle. Au cours de nos expérimentations, les souris ont reçu ce marqueur lors du dernier jour de la semaine de stimulations.

7.1.2 Fixation et conservation des tissus

24 heures après la première injection de BrdU, les animaux reçoivent une dose létale de pentobarbital (55 mg/kg) et subissent une perfusion transcardiaque.

La technique de perfusion transcardiaque a pour but de figer les tissus instantanément pour limiter leur dégradation et les rigidifier. Les antigènes du tissu seront préservés et pourront être reconnus par des anticorps.

Les souris sont placées sur une planche de dissection et leur cœur est dégagé. Une aiguille est insérée dans le ventricule gauche. Une pompe péristaltique envoie d'abord 15 ml de tampon phosphate (PB) 0.1 M afin d'éliminer le sang par l'oreillette droite (sectionnée), puis 40 ml de paraformaldéhyde (PFA) 4 % afin de fixer les tissus.

Le cerveau est récupéré immédiatement après la perfusion et plongé dans une solution de PFA 2 % (post-fixation) pendant 24 h. Il est ensuite plongé dans une solution de sucrose 30 % jusqu'à ce qu'il ait coulé (24 à 48 h) afin d'assurer une cryo-protection, puis est congelé dans des blocs contenant un milieu d'enrobage protecteur (O.C.T compound, Tissue-tek®, Fisher).

Des coupes coronales de 40 μm sont réalisées au microtome et conservées jusqu'au marquage dans une solution de tampon phosphate salin (PBS) 0.1 M contenant 0.1 % d'azide de sodium (agent de conservation) à 4°C.

7.1.3 Immunohistochimie

Le marquage s'effectue sur deux jours selon les étapes suivantes (réalisées, sauf indication contraire, à température ambiante) :

— **Jour 1** :

1. *Rinçage* dans du Tris-buffered saline (TBS) pour éliminer l'azide de sodium (2 x 5 minutes) ;
2. *Saturation des peroxydases endogènes* par incubation dans une solution de TBS-H_2O_2 (30 minutes) ;
3. *Rinçage* dans le TBS (3 x 5 minutes) ;
4. *Pré-traitement* pour la détection de la BrdU par incubation dans de l'acide chlorhydrique (HCl) 2N (30 min, 50°C ; dénaturation de l'ADN), puis dans du tampon borate 0.1 M à pH 8.5 (10 minutes) ;
5. *Rinçage* dans le TBS (6 x 5 minutes) puis dans du TBS+ (c'est-à-dire contenant 1 % de Triton X-100) : ce détergent permet notamment la lyse des membranes cellulaires et la mise en solution du matériel intracellulaire (30 minutes) ;
6. *Exposition à l'anticorps primaire* : incubation dans l'anticorps rat anti-BrdU (Biorad, lot MCA2060 ; figure 7.1) au 1/500 dans du TBS+ (toute la nuit).

— **Jour 2** :

1. *Rinçage* dans le TBS (2 x 15 minutes) ;
2. *Lavage* dans le TBS+ pour éliminer les liaisons aspécifiques (15 minutes) ;

3. *Exposition à l'anticorps secondaire* : incubation dans l'anticorps anti-rat biotinylé (Sigma-Aldrich, lot RI9951 ; figure 7.1) au 1/500 dans du TBS+ (2 h) ;
4. *Rinçage* dans le TBS (3 x 10 minutes) ;
5. *Ajout du réactif* par incubation dans le kit ABC (Vector Labs ; figure 7.1), qui contient le complexe avidine-biotine-peroxydase (1 h) ;
6. *Rinçage* dans le TBS (3 x 10 minutes) ;
7. *Coloration* par ajout de 3,3'-Diaminobenzidine Tetrahydrochloride (DAB, Sigma ; figure 7.1) et éventuellement de chlorure de nickel (maximum 17 minutes) ;
8. *Rinçage* dans le TBS (3 x 10 minutes).

7.1.4 Montage des lames et analyse

Les coupes, montées sur des lames pré-gélatinisées, sont ensuite plongées dans plusieurs bains d'alcool à concentration croissante (70, 90, puis 2 bains à 100 %, 3 minutes par bain) et de Xylène substitute (1 bain de 3 minutes puis 1 de 1 minute environ) afin de déshydrater et dégraisser les tissus. Elles sont alors incluses entre lame et lamelle, séchées à température ambiante (1 nuit) et nettoyées pour être observées au microscope optique (Nikon Eclipse E600). Les lames sont numérisées grâce au logiciel NIS-Elements BR3.0 pour comptage des cellules marquées à la BrdU.

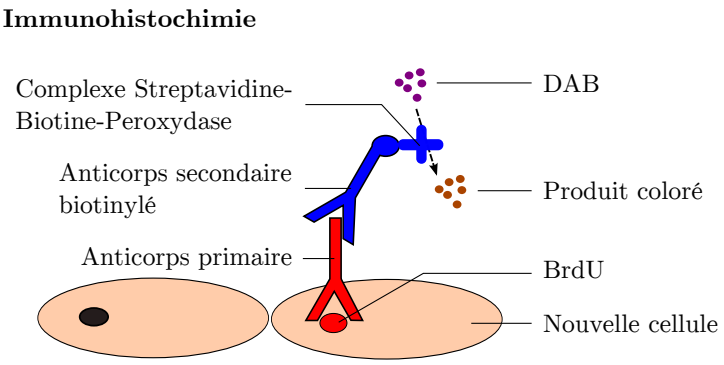


FIGURE 7.1 – Schéma représentant la technique d'immunohistochimie de type streptavidine-biotine-peroxydase. Un anticorps reconnaît la BrdU incorporée dans les nouvelles cellules ; un deuxième anticorps couplé à une enzyme reconnaît le premier. Cette enzyme permet la dégradation du DAB en un produit coloré dont le signal est analysé.

7.2 Hybridation *in situ* : *Zif268*

L'hybridation *in situ* est une technique qui permet de localiser un gène dont on connaît la séquence sur une coupe de tissu (ici, coupes de cerveau de souris). Le principe repose sur la complémentarité des bases : deux séquences nucléotidiques complémentaires s'apparient de façon spécifique et forte entre elles. Le but est donc d'appliquer une sonde marquée sur une coupe de tissu. Cette sonde reconnait un gène spécifique, se fixe dessus et le révèle par son marquage (ici, un marquage radioactif).

Au cours de ma thèse, c'est l'expression du facteur de transcription *Zif268* qui a été étudiée. Ce facteur a la particularité d'être exprimé de façon immédiate et transitoire après une stimulation neuronale (notamment une injection de cocaïne). Il serait de plus impliqué dans l'expression de gènes participant à la plasticité cérébrale (Knapska et Kaczmarek, 2004).

7.2.1 Obtention et préparation des coupes

Les animaux sont euthanasiés par exposition au CO_2 et leurs cerveaux sont prélevés et congelés dans de l'isopentane. Ils sont ensuite sectionnés au cryotome en coupes coronales de 12 μm d'épaisseur montées sur lame (Superfrost/Plus, IL, USA).

Les lames sont séchées et stockées à -30°C, puis subissent une étape de post-fixation au paraformaldéhyde 4 % (10 minutes, température ambiante), ceci afin de préserver structure et constituants cellulaires des coupes. Cette post-fixation est suivie d'une étape d'acétylation, par incubation dans de l'anhydride acétique (0.25 %) - triéthanolamine 0.1 M (10 minutes), dont le but est d'éliminer les bruits de fond et d'inactiver des ribonucléases pour aider à produire un signal d'hybridation plus fort. La préparation des lames finit par une déshydratation, un dégraissage dans du chloroforme (2 fois 5 minutes), une réhydratation et un séchage à l'air libre. Les lames peuvent alors être stockées à -30°C jusqu'à l'étape d'hybridation.

7.2.2 Marquage des sondes

Des sondes (48-mer, Invitrogen, Rockville, MD, USA) complémentaires de l'acide ribonucléique messager (ARNm) du gène d'intérêt *Zif268* ont été sélectionnées (séquence complémentaire aux bases 352 à 399, GenBank numéro d'accès M18416). Dans un premier temps, nous réalisons un marquage radioactif de ces sondes :

1. *Mélange* à température ambiante des sondes avec de l'eau distillée, une solution tampon, du chlorure de cobalt, du [33P]-dATP et de la

transférase terminale (qui catalyse l'addition des désoxynucléotides sur une fonction alcool 3'OH terminale de l'ADN) ;

2. *Incubation* au bain-marie à 38°C (15 minutes) ;
3. *Blocage* de la réaction par l'ajout de Tris-EDTA.

Les oligonucléotides non marqués sont séparés par passage du mélange au travers d'une colonne Spin (mini Quick Spin Columns pour ARN ; Roche, no. 1 814 427). Les fractions marquées sont récoltées à la sortie de la colonne. Un échantillon de la sonde est ajouté à un cocktail de scintillation et la radioactivité est comptée (elle doit être comprise entre 800 000 et 1 500 000 coups par minute (cpm)).

7.2.3 Hybridation *in situ*

Les sondes oligonucléotidiques marquées sont mélangées à du tampon d'hybridation préalablement chauffé à 37°C (de manière à ce que 100 μl de tampon contienne environ 3x10^6 cpm de sonde marquée) et placées à 56°C pendant 10 minutes. Elles sont ensuite ajoutées à chaque lame.

Les lames sont couvertes et placées sous incubation (37°C, toute une nuit) puis rincées : 4 lavages dans du citrate de sodium salin 1X, 3 lavages dans du citrate de sodium salin 2X/formamide 50 % (20 minutes à 40°C), puis 2 lavages de nouveau dans le citrate salin 1X (30 minutes à température ambiante) afin d'éliminer toutes les liaisons non spécifiques ayant pu se former. Elles sont alors rincées à l'eau distillée et séchées sous ventilateur.

7.2.4 Révélation et analyse

La dernière étape consiste à mettre en évidence les hybrides spécifiques (sonde liée au gène d'intérêt) par autoradiographie (technique d'imagerie par laquelle la sonde radio-activement marquée laisse une empreinte sur un support photographique). À la suite de l'hybridation, un bref rinçage à l'eau est réalisé puis les lames sont séchées et apposées à un film sensible aux rayons X (BioMax MR-2, Kodak, NY, USA) pendant 6 jours pour révélation. Les films obtenus sont numérisés au moyen d'une table lumineuse (Northern Light, Imaging Research, Ontario, Canada) et d'une caméra Sony CCD camera (Imaging Research), puis analysés par densitométrie (étude de la densité optique) grâce au logiciel ImageJ (Wayne Rasband, MD, USA).

Dans le cadre de ma thèse j'ai analysé l'expression de *Zif268* dans 26 régions corticales basées sur l'atlas de Paxinos et Franklin (2001) et dans 23 secteurs du striatum définis par leurs afférences corticales (Willuhn *et al.*, 2003), ceci à 4 niveaux sur le plan rostro-caudal : frontal (environ +1.98 mm par

rapport au Bregma), rostral (+1.18 mm), middle (+0.74 mm), et caudal (−0.22 mm). Les régions sont détaillées dans la figure 7.2.

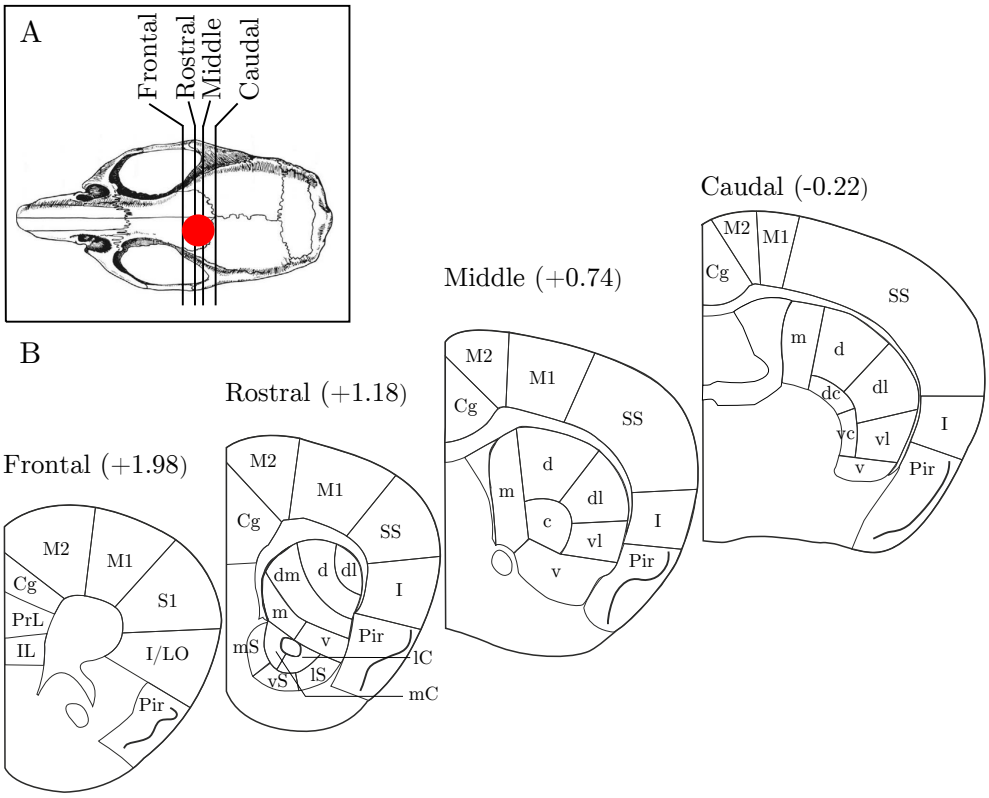


FIGURE 7.2 – Schéma représentant A/ les différents plans de coupe et la position de l'embase (en rouge) et B/ les régions du cortex (IL, infralimbique ; PrL, prélimbique ; Cg, cingulaire ; M2, moteur secondaire ; M1, moteur primaire ; S1, somatosensoriel primaire ; SS, somatosensoriel ; I/LO, insulaire/orbitaire latéral ; I, insulaire ; Pir, piriforme) et du striatum (m, médial ; dm, dorsomédial ; d, dorsal ; dl, dorsolatéral ; dc, dorsal central ; c, central ; vc, ventral central ; vl, ventrolatéral ; v, ventral. Noyau accumbens : mC et lC, cœur médial et latéral ; mS, vS et lS, coquille médiale, ventrale et latérale) étudiées.

8 Traitement des résultats

8.1 Présentation des données

Les résultats de chaque étude sont représentés sous forme d'histogrammes (paramètre comportemental testé, effet dose-réponse d'une drogue...) ou de courbes (décours temporel, apprentissage...) par la moyenne et l'erreur type (*standard error of the mean*, SEM). L'effectif des groupes (la plupart du temps, au minimum de 8 animaux/groupe) sera précisé pour chaque étude.

Lorsqu'une différence est statistiquement significative entre deux groupes, elle est représentée par des symboles (tels que l'astérisque *) dont le nombre varie en fonction du niveau de significativité (* pour $p \leq 0.05$, ** pour $p < 0.01$, et *** pour $p < 0.001$).

8.2 Statistiques

Plusieurs types de tests statistiques ont été réalisés au moyen du logiciel Statistica (StatSoft, USA) en fonction des données à analyser ; ils seront précisés pour chaque étude. Nous avons réalisé des tests paramétriques puisqu'il est considéré que la majorité des variables biologiques quantitatives continues (telles que les nôtres) possèdent une distribution normale (Preux *et al.*, 2003) ; un test de Shapiro-Wilk réalisé sur nos premières données (publiées dans l'article présenté en annexe B) nous a par ailleurs permis de le vérifier pour la plupart de nos variables comportementales. L'égalité des variances a quant à elle été vérifiée par un test de Levene.

8.2.1 t-tests

Lorsque nous avons comparé les moyennes de deux groupes expérimentaux (un seul facteur, tel qu'un traitement par tDCS actif ou sham), nous avons utilisé un test de Student.

Pour les tests impliquant une comparaison entre la moyenne d'un groupe et une moyenne théorique, tels que le test de préférence de place conditionnée ou les tests de mémoire, un t-test de type comparaison de moyenne à un standard a été appliqué.

8.2.2 ANOVAs

Des ANOVAs à plusieurs facteurs ont été réalisées quand les souris étaient réparties dans des groupes basés sur au moins deux facteurs différents (par exemple : exposition ou non à la drogue, et exposition ou non à la tDCS).

Dans le cas spécifique des tests répétés plusieurs fois sur un même groupe de souris, ou des tests avec décours temporel, des ANOVAs à mesures répétées ont été calculées avec comme facteur inter-spécifique le groupe (sham ou stimulé), et comme facteur intra-spécifique un décours temporel, ou encore la zone cérébrale considérée pour une même souris (par exemple : hémisphère droit ou gauche).

Lorsque les ANOVAs présentaient un facteur ou une interaction statistiquement significative ($p \leq 0.05$), un post-hoc de Newman-Keuls (qui permet de déterminer les différences significatives entre les moyennes des groupes dans une analyse de variance) était exécuté.

Troisième partie

Résultats

9 Étude 1 : Mise en place d'un modèle animal

Comme nous l'avons vu en introduction (chapitre 2), la stimulation transcrânienne par courant continu est une technique de neuromodulation de plus en plus explorée ces 20 dernières années du fait de ses multiples avantages. Cependant, malgré les nombreuses études parues à ce jour, des zones d'ombre persistent et doivent être clarifiées avant de pouvoir en tirer profit.

Pour commencer, les conséquences physiologiques et comportementales de la tDCS portent encore à débat. Que ce soit sur des sujets sains ou des patients atteints d'une pathologie précise, les effets recensés de cette technique varient d'une étude à l'autre, parfois entre deux études d'une même équipe (Bennabi *et al.* (2014), en annexe A).

Cette variabilité s'explique d'une part par des facteurs liés aux sujets, plus ou moins répondants à la neuromodulation en fonction de critères tels que l'âge, la génétique, ou encore les traitements pris conjointement. D'autre part, des facteurs liés aux protocoles de stimulation peuvent aussi affecter l'efficacité de la tDCS (Nitsche *et al.*, 2008). Quel que soit l'effet recherché ou la pathologie que l'on souhaite traiter, il n'existe actuellement pas de consensus quant au protocole précis à suivre : quelles doivent être l'intensité et la durée d'une session de stimulation ? Faut-il répéter les sessions, et si oui, à quel intervalle pour que les effets soient maximaux ? Est-il intéressant de réaliser des tâches pendant les stimulations ou doivent-elles être réalisées pendant un repos total du sujet - voire son sommeil ?

Il a été démontré à plusieurs reprises que le montage des électrodes aussi a une importance majeure. Pour chaque étude menée il reste donc à déterminer où positionner les électrodes et la polarité désirée - tout en gardant à l'esprit que pour une même polarité administrée sur une aire corticale, l'effet obtenu peut varier en fonction de l'intensité de la stimulation.

Par ailleurs, les mécanismes d'action de la tDCS sur les diverses aires cérébrales restent à élucider.

Il se pose donc l'intérêt de développer un modèle animal qui permettrait de réaliser des batteries de tests visant à :

— Confirmer les effets comportementaux d'une ou plusieurs sessions de tDCS et évaluer leur durée dans le temps ;
— Définir les paramètres de stimulation optimaux (temps, intensité, fréquence, intervalle, zone ciblée...) ;
— Comprendre les effets de la stimulation au niveau physiologique.

Au début de ma thèse il n'existait pas d'évaluation globale des effets comportementaux de la tDCS sur modèle animal. Les quelques études menées chez l'animal étaient des études électrophysiologiques (*in vivo* ou *in vitro*) ou portant sur un paramètre comportemental spécifique, notamment dans des modèles animaux de pathologie (par exemple, amélioration des performances motrices chez des rats modèles de l'accident vasculaire cérébral ; Kim *et al.* (2010) ; Yoon *et al.* (2012)). Cependant aucune ne cherchait à mettre en place un modèle reproduisant les différents effets de la tDCS obtenus lors des études chez l'Homme.

L'objet principal de ma thèse est donc de mettre en place, chez l'animal, un protocole de stimulation permettant de caractériser les comportements affectés par la tDCS, ceci dans le but de réaliser les études d'optimisation et d'investigation mentionnées ci-avant.

9.1 Choix du modèle animal

Les modèles animaux sont nécessaires à la recherche biomédicale, de par leur contribution à notre compréhension des mécanismes génétiques, physiologiques, pathologiques, et à l'étude de l'efficacité et de la toxicité de divers traitements. L'un des modèles animaux les plus utilisés en laboratoire est la souris.

La souris présente de nombreux avantages, à commencer par des aspects pratiques : d'élevage et de manipulation faciles (peu coûteuse à entretenir, de petite taille, se reproduisant rapidement), son génome a été entièrement séquencé. L'Homme et la souris partagent ainsi 99 % de gènes homologues, et il existe de nombreux modèles murins de pathologies humaines (incluant des modèles de troubles psychiatriques, tels que la dépression ou la schizophrénie (Nestler et Hyman, 2010)). La souris est donc un modèle intéressant pour l'étude de la stimulation transcrânienne par courant continu, avec possibilité d'étudier aussi bien une population saine qu'une population porteuse de pathologies similaires à celles rencontrées chez l'Homme.

9.1.1 La souris Swiss

La souche Swiss est une souche non consanguine, dans laquelle on cherche à maintenir une constante hétérogénéité. Elle a été créée à partir de 2 mâles et 7 femelles albinos provenant du Centre Anticancéreux de Romand (Suisse) et importée au Rockfeller Institute par Clara Lynch en 1926.

Nous avons choisi de mettre en place la tDCS dans cette souche pour son caractère non consanguin, qui implique la possibilité d'avoir une forte variabilité individuelle pour les traits étudiés, mais prend mieux en compte la disparité des réponses individuelles rencontrées dans la population humaine.

9.1.2 Protocole de stimulation

Afin de réaliser des études les plus reproductibles possibles, nous avons choisi de fixer un protocole de stimulation précis en nous basant sur la littérature déjà existante.

Nous nous sommes majoritairement inspirés du modèle de Liebetanz et collaborateurs. Comme présenté dans leurs études (Liebetanz *et al.*, 2006a,b), nous n'avons pu nous affranchir d'une chirurgie préalable consistant en la pose d'une embase permettant de recevoir l'électrode stimulatrice, ceci pour nous assurer d'une position fixe de l'électrode au dessus du lobe frontal de l'animal. Cette embase et l'électrode correspondante ont été spécialement développées en collaboration avec une entreprise de biotechnologie, Dixi microtechniques (Besançon, France).

Tout comme dans le modèle de Liebetanz, nous avons choisi d'éloigner la contre-électrode de l'électrode stimulatrice pour éviter que le courant ne passe directement de l'une à l'autre, contournant les tissus ciblés. La contre-électrode est de taille supérieure à l'électrode stimulatrice (surface de 9.5 cm^2 contre 3.5 mm^2), ceci pour diminuer la résistance au niveau de cette première tout en augmentant la densité de courant au niveau de la seconde.

L'un de nos principaux soucis était de stimuler des animaux éveillés, comme Nekhendzy *et al.* (2004), afin d'éviter toute possible interaction entre l'état de veille/sommeil des animaux et les effets physiologiques de la tDCS (la plupart des protocoles de stimulation chez l'Homme étant réalisés sur des sujets éveillés), et dans une moindre mesure pour éviter un possible effet de l'agent anesthésiant sur les tests comportementaux ultérieurs. Le corset (permettant une certaine mobilité) utilisé par l'équipe de Liebetanz n'était pas une solution facilement adaptable aux souris. Nous avons donc choisi de placer les animaux en contention à chaque session de stimulation, à l'instar

de ce qui est réalisé par Dhamne *et al.* (2015). Au sein du laboratoire nous avons dans ce but développé un dispositif de contention (figure 5.2, p.82), puis un générateur de courant plus adapté aux études chez l'animal (annexe D).

Notons que la contention (surtout répétée) constitue un stress chronique élevé ; c'est pourquoi le groupe témoin sera toujours un groupe de souris ayant subi les mêmes contentions que les souris stimulées (groupe Sham), et non un groupe "sans traitement".

Enfin, étant donné les résultats publiés chez l'Homme, nous avons choisi de stimuler chez la souris le cortex frontal *via* l'anode (0.2 mA, 20 minutes en nous basant sur les études préalablement réalisées chez le rongeur), et d'évaluer les paramètres comportementaux affectés dans 3 grands domaines : la dépression, la cognition, et le comportement vis-à-vis des drogues. Nous avons réalisé un protocole de stimulations répétées (2 fois/jour pendant 5 jours consécutifs) puisque cela augmenterait et/ou prolongerait les effets bénéfiques de la tDCS (Kekic *et al.*, 2016).

9.1.3 Le cortex frontal de la souris

Étudier les fonctions et lésions du cerveau chez l'animal est compliqué, notamment du fait des débats portant sur l'homologie entre les organes des sujets modèles et de l'Homme. Ceci est particulièrement vrai pour les zones dont l'évolution est apparue tardivement sur le plan phylogénétique et est maximale chez le primate (et *a fortiori* l'Homme, chez qui le cortex préfrontal atteint 29 % de la taille du cortex ; Fuster (2002)). Le manque de définition (anatomique et/ou fonctionnelle) précise du cortex préfrontal mène à des questions concernant l'existence de cette zone chez les mammifères non primates, particulièrement les rongeurs (Uylings *et al.*, 2003).

Un consensus existe néanmoins sur les similarités partagées entre le rongeur et l'Homme quant à l'organisation fonctionnelle du cortex cérébral (figure 9.1). Ce flou anatomique, ajouté aux contraintes matérielles inhérentes aux études présentées ici (notamment le rapport entre la taille de l'électrode stimulatrice et le cortex frontal des souris), fait que dans la suite de ce travail je parlerai de stimulation du cortex frontal (et non préfrontal dorsolatéral) des souris.

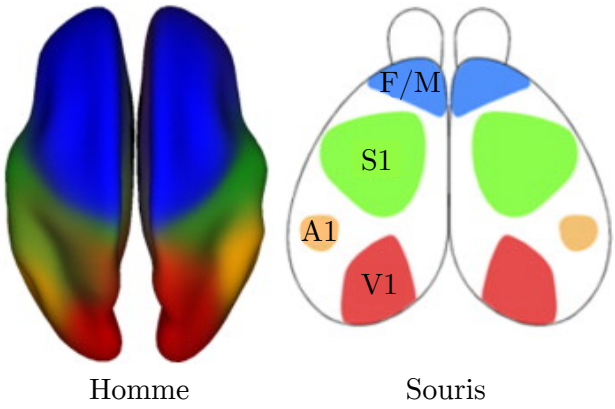


FIGURE 9.1 – Représentation schématique de l'organisation fonctionnelle du cortex cérébral chez l'Homme et la souris. F/M : cortex frontal/moteur ; S1 : cortex primaire somatosensoriel ; A1 : cortex auditif ; V1 : cortex visuel. Adapté de Chen *et al.* (2011).

L'objectif de cette première étude était de mettre en place un modèle murin de tDCS et d'évaluer l'effet de stimulations anodiques répétées sur une large variété de comportements. Cette évaluation a été réalisée de quelques jours à quelques semaines après la fin du traitement.

Si nos données sont cohérentes avec celles obtenues lors des études cliniques, notre modèle animal pourra être utilisé pour approfondir les connaissances à la fois sur les effets observables de la tDCS et sur ses mécanismes d'action.

9.2 Effets de la tDCS chez la souris

9.2.1 Criblage des effets comportementaux

L'étude présentée dans cette section est celle qui a fait l'objet de notre première publication, à consulter en annexe B (Pedron *et al.*, 2014). Le protocole ainsi que les principaux résultats obtenus sont représentés dans la figure 9.2.

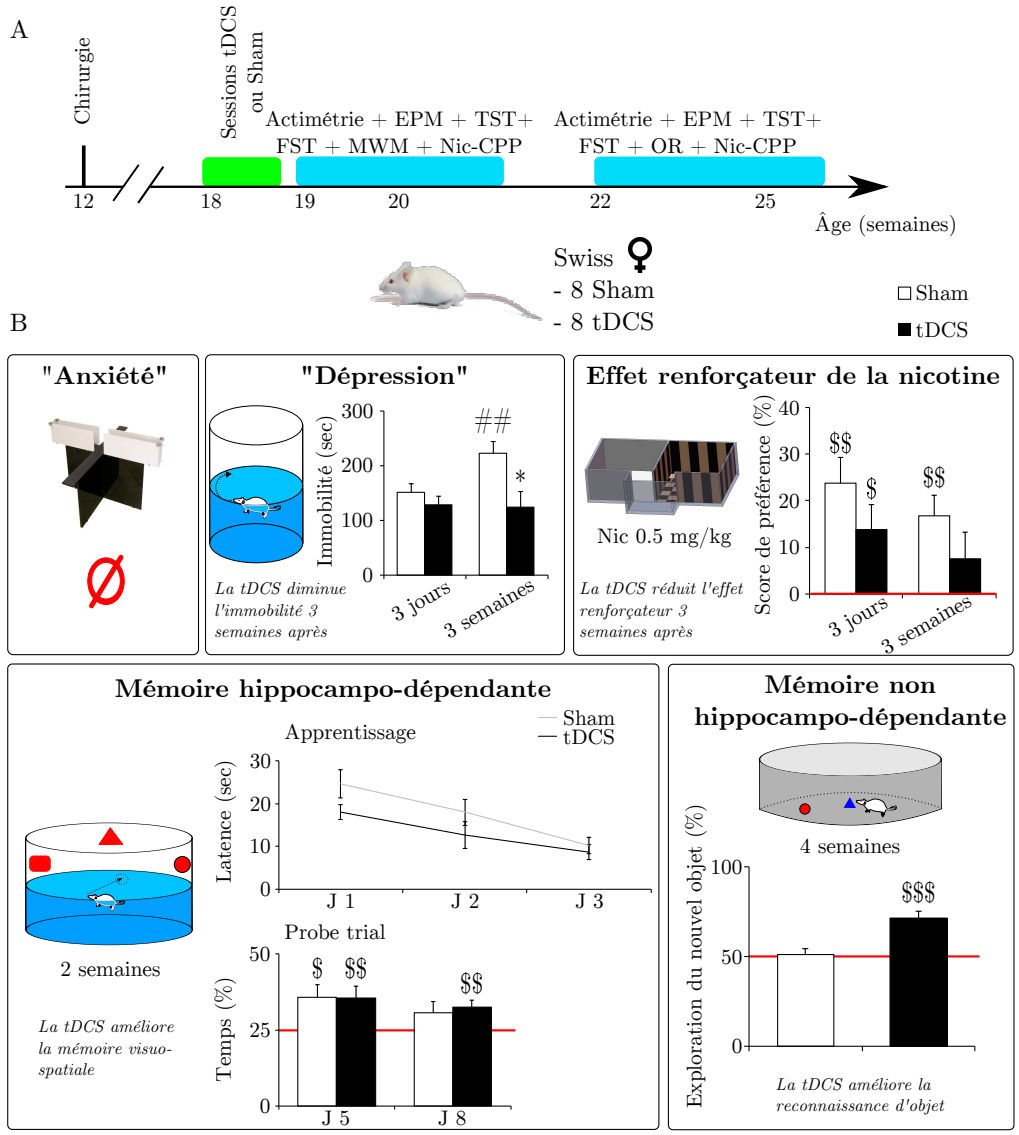


FIGURE 9.2 – Résumé de l'article n°1, partie 1. A/ Protocole expérimental. EPM : labyrinthe en croix surélevée ; FST : test de la nage forcée et TST : test de suspension par la queue ; MWM : test de la piscine de Morris ; OR : test de reconnaissance d'objet ; Nic-CPP : préférence de place conditionnée à la nicotine. B/ Principaux résultats obtenus. * $p<0.05$ *versus* Sham ; ## $p<0.01$ *versus* 3 jours ; $^{\$}$ $p<0.05$, $^{\$\$}$ $p<0.01$, $^{\$\$\$}$ $p<0.001$ *versus* une valeur standard (0, 25, ou 50 %, représentée par une ligne rouge sur les histogrammes concernés).

Dans cette étude les sessions répétées de tDCS (10 séances en 5 jours de

20 minutes de stimulation anodique à 0.2 mA) n'ont affecté ni la croissance, ni l'activité locomotrice (dans le test d'actimétrie), ni l'anxiété des souris (dans le labyrinthe en croix surélevée).

Les effets bénéfiques de la tDCS (diminution des comportements associés à la dépression, de la valeur appétitive de la nicotine, et amélioration de la mémoire) apparaissent plusieurs semaines après la fin des stimulations.

En effet, dans le FST, une ANOVA à mesures répétées (facteur intra : temps [3 jours ou 3 semaines], facteur inter : groupe [Sham ou tDCS]) révèle une interaction temps x groupe pour les deux paramètres mesurés, la latence avant la première immobilité et le temps total d'immobilité ($F_{(1,14)}= 7.67$ et $F_{(1,14)}= 7.14$; $p<0.05$, respectivement). L'analyse en post-hoc de Newman-Keuls (NK) montre une augmentation de la latence ($p<0.01$) et une diminution du temps d'immobilité ($p<0.05$) chez les souris stimulées, mais seulement 3 semaines après la fin des stimulations.

Le groupe Sham (mais pas tDCS) était affecté par l'effet répétition du test (diminution de la latence, et augmentation du temps d'immobilité à 3 semaines par rapport à 3 jours : $p<0.01$).

Notons que, bien que ce ne soit pas représenté dans le schéma récapitulatif, les comportements associés à la dépression ont également été évalués dans le test de la suspension par la queue. Ce test s'est révélé moins sensible que celui de la nage forcée, ne nous permettant de mettre en évidence qu'un effet global de la tDCS sur la latence avant la première immobilité chez les souris traitées par stimulations anodiques.

Dans le CPP, une injection de 0.5 g/kg de nicotine induit une préférence de place chez les souris Sham à 3 jours comme à 3 semaines (t-test : $p<0.01$ *versus* 0 %). Cette préférence conditionnée par la nicotine est retrouvée chez les souris tDCS seulement à 3 jours ($p<0.05$) mais plus à 3 semaines ($p=0.23$) après la fin des stimulations.

Pour précision, le CPP à 3 jours a été réalisé sur un lot de souris différent ; ceci dans le but d'éviter un biais dû à une exposition à la drogue sur le comportement dans tous les autres tests.

Dans le test de la piscine de Morris, bien que les souris stimulées par tDCS semblent réaliser un apprentissage plus rapide (temps à retrouver la plateforme immergée plus court que chez les Sham), l'ANOVA à mesures répétées ne révèle qu'une tendance (effet groupe : $F_{(1,14)}= 3.95$, $p=0.07$). Pour un probe trial réalisé 2 jours après la fin de l'entraînement, les deux groupes de souris démontrent une bonne mémoire visuo-spatiale, passant

significativement plus de 25 % de leur temps dans le quadrant qui avait contenu la plateforme ; en revanche, 5 jours après, seules les souris du groupe tDCS se remémorent la position de la plateforme ($p<0.01$ *versus* 25 %).

Enfin, dans le test de reconnaissance d'objet, seules les souris stimulées par tDCS exhibent une bonne mémoire de travail, passant significativement plus de temps à explorer le nouvel objet par rapport à l'ancien (groupe tDCS : $p<0.001$; groupe Sham : $p=0.68$ *versus* 50 %).

Expérience contrôle n°1 : la contention répétée induit-elle un comportement de type dépressif ?

Afin de stimuler les souris éveillées, notre protocole implique une contention répétée. Les souris Sham subissent le même stress que les souris stimulées, mais l'une de nos premières questions a été de vérifier si ce stress chronique induit ou non un comportement de type dépressif chez la souris dans notre principal test, la nage forcée.

Nous avons donc réalisé une étude complémentaire visant à comparer, dans le test de la nage forcée, le comportement de souris ayant subi la chirurgie mais pas les contentions (groupe témoin, n=9) à celui de souris opérées et placées en contention 20 minutes, 2 fois par jour pendant 5 jours (groupe sham, n=10). Les souris avaient 8 semaines lors des contentions (ou absence de contention, pour le groupe témoin) et le FST a été réalisé trois jours et trois semaines après la fin de ce traitement.

Nos résultats indiquent que les contentions répétées ne font pas varier le temps d'immobilité (dans la FST) chez les souris, que ce soit au bout de 3 jours ou de 3 semaines (ANOVA répétée effet groupe : $F_{(1,17)}= 0.62$, $p=0.4$; effet temps x groupe : $F_{(1,17)}= 0.002$, $p=0.96$).

Expérience contrôle n°2 : l'effet de la tDCS dans le FST dépend-il de la répétition du test ?

Classiquement, quand le test de la nage forcée est réalisé plusieurs fois sur un même lot de souris, on observe une augmentation du temps d'immobilité au deuxième passage. À la suite de nos premiers résultats dans le FST, nous avons donc réalisé une série d'expériences complémentaires visant à analyser si l'effet de la tDCS n'apparaissant qu'à 3 semaines était lié au délai post-stimulation ou uniquement à une interaction avec la répétition de ce test.

Notons que les résultats absents à 3 jours et présents à 3 semaines ont été reproduits à plusieurs reprises ultérieurement, confirmant la robustesse

de cet effet.

Les différentes méthodologies expérimentales testées sont résumées dans la figure 9.3.

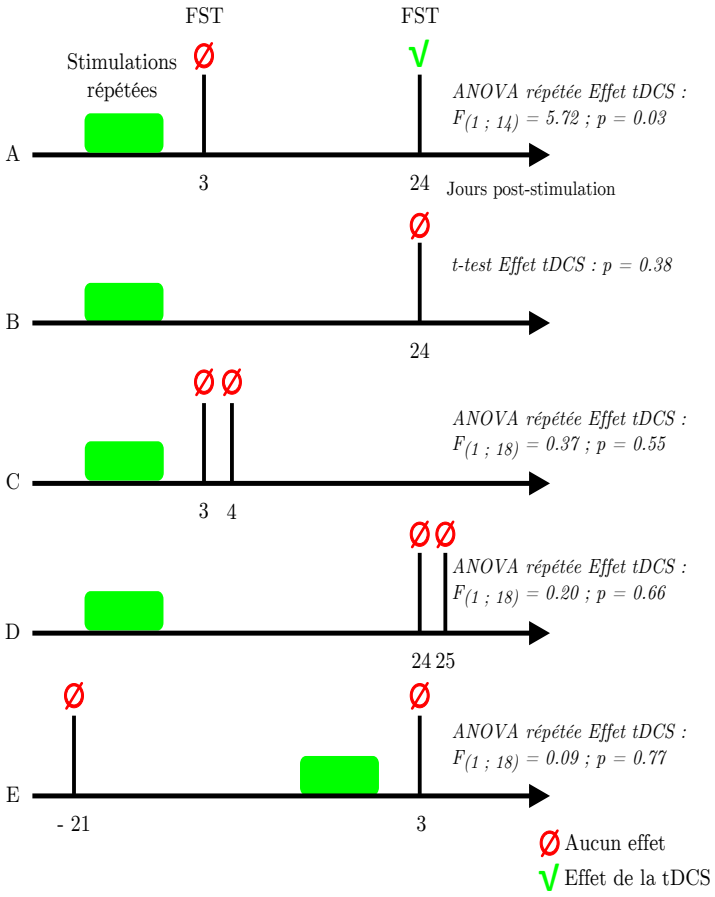


FIGURE 9.3 – Les différents protocoles de FST réalisés. Pour chaque expérience, des souris âgées de 8 semaines ont reçu 10 séances de tDCS active ou sham pendant 5 jours (N = de 9 à 20 souris/groupe), puis ont réalisé le FST à différents temps.

Dans un premier temps nous avons évalué l'effet de la tDCS dans le FST 3 semaines après la fin des stimulations sans premier test à 3 jours. Aucun effet n'a été mis en évidence (figure 9.3 B). Nous avons ensuite testé l'impact de la tDCS sur deux FST réalisés à un jour d'intervalle, ceci à court ou moyen terme après la fin des stimulations. Là encore aucun résultat significatif n'a été relevé (figure 9.3 C, D). À la lumière de ces résultats nous nous sommes assurés qu'aucun effet de la tDCS n'apparaissait dès 3 jours après la fin des stimulations sur un test de FST qui serait un deuxième passage (3 semaines

après le premier ; figure 9.3 E). Nous en concluons donc que :

— La tDCS annule l'augmentation d'immobilité liée à un deuxième passage dans le FST ;
— Cet effet nécessite néanmoins un intervalle minimum entre le test et le retest ;
— Et n'apparaît que 3 semaines après la fin des stimulations.

9.2.2 Impact de la polarité et de la position de l'électrode

Chez l'Homme, les effets de la tDCS dépendent à la fois de la polarité du courant étudié et de la position de l'électrode stimulatrice ; nous avons donc cherché à vérifier chez la souris l'importance de ces deux paramètres.

Dans ce but nous avons effectué le test de la nage forcée sur des souris stimulées soit par l'anode ou la cathode en position frontale (effet polarité), soit par l'anode en position postérieure (effet zone). Quatre groupes ont été déterminés :

— Sham : opération, contention, pas de stimulation (N = 13)
— Anode-F : 10 stimulations anodiques au niveau du cortex frontal gauche (N = 8) ; figure 9.4 (A, B)
— Cathode-F : 10 stimulations cathodiques au niveau du cortex frontal gauche (N = 9) ; figure 9.4 (A, B)
— Anode-P : 10 stimulations anodiques au niveau du cortex postérieur (N = 9) ; figure 9.4 (A, C)

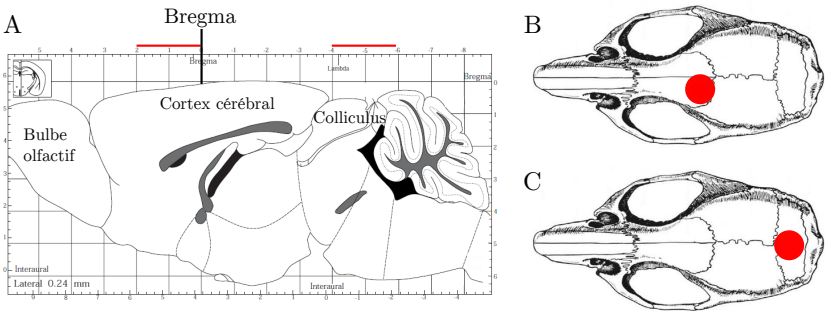


FIGURE 9.4 – Représentation schématique des positions de l'embase étudiées. A/ Vue sagittale du cerveau de souris ; adapté de l'atlas de Paxinos et Franklin (2001). Les traits rouges représentent les 2 positions étudiées. B/ Position au dessus du cortex frontal (+1 mm en avant du Bregma, 1 mm à gauche). C/ Position au dessus du colliculus, juste en avant du cervelet (Bregma -5 mm).

Les résultats sont résumés dans la figure 9.5. Une ANOVA répétée a permis de mettre en évidence un effet du groupe ($F_{(3,35)}= 3.51$, $p<0.05$) :

— 3 jours après la fin des stimulations, la tDCS n'a d'effet dans aucun groupe ;

— 3 semaines après, les souris ayant reçu la stimulation anodique (peu importe la localisation de l'électrode) sont significativement plus actives que les souris Sham dans le FST ;

— Aucune différence de comportement entre les souris ayant reçu la stimulation cathodique et les souris Sham n'a été révélée.

Ainsi nous avons pu conclure à un effet primordial de la polarité dans notre paradigme ; dans le test de la nage forcée, la stimulation cathodique échoue à modifier le comportement des souris là où la stimulation anodique diminue les comportements de type dépressif. En revanche, il semblerait que la position de l'anode sur le crâne de la souris n'ait pas d'importance majeure ici, contrairement à ce qui a été montré chez l'Homme.

Notre hypothèse est qu'étant donné la taille de l'embase recevant l'électrode comparée à la taille du crâne de la souris, et la plus forte densité de courant lors de la stimulation de l'animal (57.1 *versus* 0.57 A/m2 chez l'Homme), le courant délivré diffuse sur une large partie du cortex.

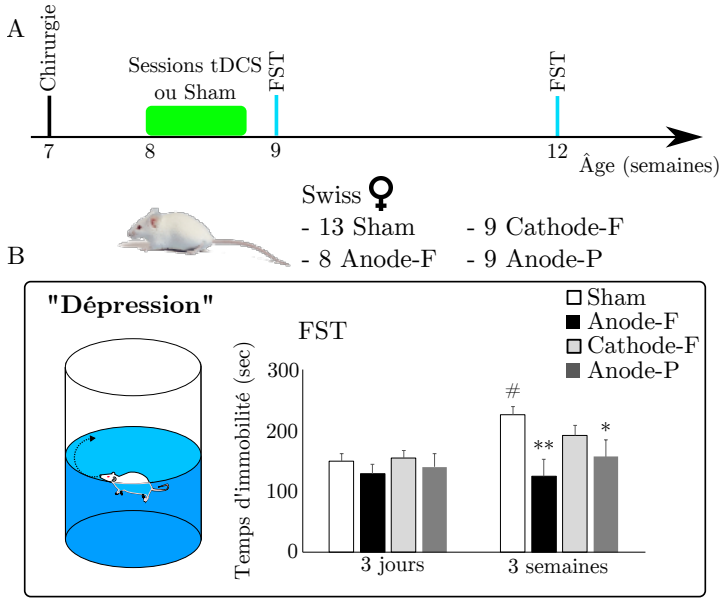


FIGURE 9.5 – A/ Protocole d'étude des effets zone et polarité sur les comportements associés à la dépression chez la souris. B/ Résultats, avec * $p<0.05$ et ** $p<0.01$ *versus* Sham ; # $p<0.05$ *versus* 3 jours.

9.3 Discussion

Au moyen de ces différentes études nous avons pu mettre en place un nouveau modèle de tDCS chez la souris. Nous avons ainsi été les premiers à publier des effets à long terme sur différents paramètres comportementaux chez l'animal ; comme chez l'Homme, nous avons retrouvé un effet de la tDCS anodique (stimulations répétées) sur les comportements associés à la dépression, à la préférence pour une drogue (en l'occurrence, la nicotine), et sur les performances des souris dans deux tests de mémoire. En revanche, la tDCS n'affectait ni la courbe de croissance des souris, ni leur activité locomotrice en milieu naturel ou leurs comportements associés à l'anxiété.

Effets de la tDCS sur la "dépression"

Il est intéressant de remarquer que nos effets sur les comportements associés à la dépression n'apparaissent pas trois jours, mais trois semaines après la fin du traitement. Ceci diffère de ce qui est retrouvé chez l'Homme, avec une apparition d'effets positifs immédiatement après tDCS. Par exemple, Boggio *et al.* (2008a) ont montré une réduction du score de dépression (échelle de Hamilton et inventaire de Beck) immédiatement et pendant au moins 30 jours après 10 sessions de tDCS (20 minutes à 2 mA, pendant 10 jours).

Ceci est d'autant plus surprenant que en ce qui concerne les traitements antidépresseurs médicamenteux, c'est la cinétique inverse qui est observée : les effets apparaissent immédiatement après une exposition aiguë chez l'animal, tandis qu'ils requièrent une administration chronique (parfois pendant des mois) avant d'apparaître chez l'Homme (Nestler *et al.*, 2002).

Ainsi il est probable que les mécanismes physiologiques sous-tendant cet effet bénéfique diffèrent, au moins en partie, du mode d'action des antidépresseurs médicamenteux. Ils pourraient notamment impliquer la formation de nouveaux neurones (néo-neurogenèse, qui prend environ trois semaines de la formation de nouvelles cellules à la maturation en neurone fonctionnel ; Kempermann *et al.* (2004)) dans une structure connue pour son implication dans les émotions et la mémoire : l'hippocampe. C'est la raison pour laquelle nous avons décidé de tester, par la suite, l'effet de la tDCS sur la prolifération cellulaire dans le gyrus denté de l'hippocampe (chapitre 10).

Enfin, les souris ont subi des contentions répétées, ce que nous supposons être un stress chronique élevé. Le stress est connu comme facteur de risque de dépression (Vialou *et al.*, 2013) et de développement d'addiction (Sinha, 2008). C'est pourquoi nous avons réalisé l'étude complémentaire comparant des souris ayant toutes reçu la chirurgie, une moitié subissant 10 séances de

contention (Sham) et l'autre non. De manière surprenante, nous avons montré une absence de différence significative entre les deux groupes dans le test de la nage forcée. Il semblerait donc que dans notre modèle, l'effet "antidépresseur" de la tDCS apparaisse chez des souris "saines", n'ayant pas développé un comportement de type dépressif (malgré un stress chronique). Ceci mériterait tout de même d'être vérifié dans d'autres tests évaluant les comportements associés à la dépression, ainsi que dans des modèles de "dépression" chez la souris (El Yacoubi et Vaugeois, 2007).

Effets de la tDCS sur la mémoire

Les effets que nous avons relevés sur la mémoire chez la souris ont été reproduits par Podda *et al.* (2016) après une unique stimulation anodique (0.35 mA, 20 minutes) de l'hippocampe gauche de souris (électrode 1 mm en arrière du Bregma, 1 mm sur la gauche). Ils ont montré une augmentation des performances mnésiques (également dans les tests de la piscine de Morris et de reconnaissance d'objet) dans les jours suivants (et une semaine après) ce traitement.

Cette équipe a associé ces observations à une augmentation de la potentialisation à long terme dans l'hippocampe aussi bien immédiatement que une semaine après la tDCS (mesure des potentiels évoqués après une stimulation haute fréquence des coupes de cerveaux des animaux stimulés et sacrifiés). De manière intéressante, cette hausse de la PLT se retrouvait dans les deux hémisphères, bien que seul le gauche soit stimulé par tDCS. Enfin, la tDCS augmentait l'expression du BDNF (notamment par voie épigénétique).

La tDCS chez le rongeur : différences avec l'Homme

Notre première préoccupation était de réaliser un modèle se rapprochant le plus possible des protocoles de stimulation réalisés chez l'Homme. Comme détaillé en introduction, nous nous sommes majoritairement basés sur le modèle de Liebetanz *et al.* (2006a,b). Il diffère de ce qui est réalisé en clinique principalement de par la nécessité d'une légère chirurgie (suivie d'un temps de repos minimal de cinq jours). Le placement de la contre-électrode est également différent de ce qui est le plus souvent utilisé chez l'Homme, quoique certains auteurs utilisent un montage avec une contre-électrode positionnée ailleurs que sur la tête (tel que Nakamura-Palacios *et al.* (2012), avec l'anode sur le CPFDL et la cathode sur l'épaule controlatérale pour une étude sur la tDCS chez des patients alcoolo-dépendants).

Une autre différence à noter est la densité de courant appliquée sur le

cortex frontal des souris. Chez l'Homme, elle est communément de l'ordre de 0.57 A/m^2 pour une stimulation de 2 mA. Dans notre modèle, du fait de la petite taille de l'électrode, elle est de 57 A/m^2. Cela étant, bien que cette densité de courant soit 100 fois plus élevée qu'en clinique, elle reste largement en dessous du seuil de densité avec lequel apparaissaient des lésions cérébrales (143 A/m^2) sous stimulation cathodique dans l'étude de Liebetanz *et al.* (2009). Des études complémentaires avec des densités de courant plus faibles sont néanmoins à réaliser, notamment dans l'esprit d'optimiser les paramètres de stimulation.

Remarquons également que, chez l'Homme, seulement 45 % du courant est supposé traverser le scalp et l'os du crâne (en choisissant une épaisseur d'os de 5 mm). Ceci a été mesuré au moyen de deux modèles : une cuve électrolytique en forme de tête contenant un demi-crâne humain, et un modèle théorique de tête composé de trois sphères concentriques représentant la résistance des tissus du cerveau, du squelette et de la peau (Rush et Driscoll, 1968). Holdefer *et al.* (2006) ont également montré un important shunt du courant entre les électrodes et par la peau sur un modèle de tête humaine ; ce shunt était réduit par l'éloignement des électrodes ou encore l'augmentation de la densité de courant administrée (simulations informatiques). Enfin, Buzsáki et Berényi de l'Université de New York City ont présenté lors d'un meeting de la *Cognitive Neuroscience Society* (2016) des travaux suggérant que ce serait en fait plutôt 90 % du courant appliqué sous tDCS ou tACS qui se trouverait dévié par la peau. Ils ont pour ceci stimulé de manière transcrânienne un cadavre humain dans le crâne duquel ils avaient au préalable implanté des électrodes d'enregistrement pour mesurer le courant traversant les tissus jusqu'au cerveau (Underwood, 2016). Les auteurs conviennent cependant que ce taux de courant parvenant aux neurones peut être suffisant pour avoir les effets décrits sur l'excitabilité des cellules.

Étant donné que chez la souris le courant n'a pas à traverser la peau, que l'épaisseur de l'os du crâne est réduite (inférieure à 1 mm ; Lapchak *et al.* (2015) ; Chang *et al.* (2014) ; Zhao *et al.* (2002)), et que la densité de courant est supérieure, nous pouvons supposer que dans notre modèle le ratio de courant arrivant aux tissus cibles est plus élevé.

Limites de notre étude

Une critique pouvant être apportée à notre étude est l'emploi exclusif de souris femelles, que nous n'avons ni ovariectomisées ni contrôlées pour leur état hormonal (ceci afin de limiter les procédures invasives et/ou stressantes).

Paulus et ses collaborateurs ont montré que la diminution d'excitabilité observée dans le cortex moteur était plus importante pendant, et prolongée après, une stimulation cathodique chez la femme par rapport à chez l'homme. Cependant aucun effet du sexe sur l'effet d'une stimulation anodique n'a été relevé (Kuo *et al.*, 2006). C'est le phénomène inverse qui est observé quand on s'intéresse au cortex visuel : la même équipe a montré qu'un effet du sexe apparaît pour une stimulation anodique (et pas cathodique), avec une augmentation d'excitabilité du cortex visuel (pendant et jusqu'à au moins 10 minutes après la stimulation) chez la femme, contre une inhibition observée 10 minutes après chez l'homme (Chaieb *et al.*, 2008).

Ces deux résultats, bien qu'apparaissant opposés (probablement du fait des mécanismes différents entre le cortex visuel et le cortex moteur), révèlent un biais lié au sexe quant aux effets de la tDCS. D'autres différences liées au sexe ont été montrées au niveau clinique (bénéfices plus importants pour les femmes de sessions répétées de tDCS chez des patients souffrant d'acouphènes ; Frank *et al.* (2012)) et comportemental (effets plus importants de la tDCS dans une tâche de raisonnement (Boggio *et al.*, 2008b) ou de reconnaissance d'expressions faciales (Fumagalli *et al.*, 2010) chez les femmes que chez les hommes). Ceci pourrait être lié à l'action des hormones sexuelles sur la modulation de la plasticité cérébrale, mais aussi à d'éventuelles différences neuro-anatomiques (dimorphisme sexuel) et fonctionnelles entre hommes et femmes.

Il serait donc intéressant de tester l'effet de la tDCS sur des souris mâles ainsi qu'à différents stades du cycle menstruel des souris, afin de vérifier l'importance des variables liées au genre et aux niveaux d'hormones sexuelles des animaux.

Intérêt du modèle animal : optimiser les paramètres

Nos résultats, montrant un effet bénéfique de la tDCS sur le comportement des souris, amènent d'autres questions auxquelles notre modèle nous permettra de répondre.

En premier lieu, notons que nous avons étudié ici (et pour chaque étude présentée dans ma thèse) l'effet de stimulations répétées (10 sessions sur 5 jours) sur le comportement des souris. Il apparaît intéressant de se demander quel serait l'effet d'une session unique de tDCS. De même, nous avons choisi une fréquence de 2 stimulations par jour en nous basant sur certains protocoles de recherche clinique. Cela étant, l'importance de la durée du traitement (de quelques jours à quelques semaines) et de l'intervalle entre les stimulations (quotidiennes, hebdomadaires, etc) est encore inconnue.

Ensuite, nous avons relevé des effets comportementaux jusqu'à 5 semaines (préférence de place conditionnée à la nicotine) après la tDCS, mais n'avons pas effectué de tests au-delà de cette période. Il reste ainsi à déterminer la durée des conséquences de la stimulation répétée sur les différents paramètres comportementaux. Un autre point à étudier serait la ré-exposition à une stimulation par tDCS après la phase de traitement de 5 jours ; un nouveau traitement (ponctuel ou répété) pourrait-il augmenter ou prolonger les effets comportementaux observés ? La réponse à cette question pourrait apporter des pistes permettant d'optimiser les paramètres de stimulation transcrânienne en recherche clinique.

Pour terminer, la cinétique d'apparition des effets doit être étudiée plus en profondeur. Nous avons testé des comportements à des moments précis (3 jours, 3 semaines), mais chacun des tests pourrait être réalisé à différents temps dans cette fenêtre afin de déterminer plus précisément le moment d'apparition des répercussions de la tDCS. De même, les comportements de type dépressif pourraient être évalués dans d'autres tests que la nage forcée (par exemple, un test d'inhibition néophobique de la prise alimentaire) afin de vérifier si le délai d'apparition et les effets varient avec le paramètre comportemental étudié.

Mise en place du modèle : objectifs validés

En conclusion, avec la mise en place de ce nouveau modèle de tDCS chez l'animal nous avons pu retrouver des effets des stimulations répétées similaires à ceux observés chez l'Homme. Ces effets se maintiennent plusieurs semaines après la fin de la stimulation et dépendent de la polarité de la stimulation au moins pour les comportements associés à la dépression.

Au vu des résultats encourageants observés sur des aspects comportementaux liés à la dépression et à la mémoire, résultats apparaissant 3 semaines après la fin des stimulations, nous avons émis l'hypothèse que parmi les mécanismes d'action de la tDCS, la neurogenèse était un bon candidat. Je présenterai nos premières études sur ce sujet dans le chapitre suivant (10).

Parallèlement, étant donné les effets de la tDCS dans le CPP pour la nicotine, nous avons choisi d'approfondir les aspects comportementaux liés à l'addiction, encore peu étudiés. Nos études seront présentées dans le chapitre 11.

10 Étude 2 : tDCS et prolifération cellulaire

10.1 La neurogenèse à l'âge adulte

Dans l'optique d'évaluer les modifications neurophysiologiques induites par la tDCS, nous nous sommes intéressés à l'impact de cette technique sur la neurogenèse chez l'adulte.

La neurogenèse désigne l'ensemble du processus de transformation d'une cellule souche neurale en neurone fonctionnel ; elle a principalement lieu lors du développement du cerveau au stade embryonnaire. Si pendant longtemps la formation de neurones à l'âge adulte a été considérée comme impossible, depuis quelques dizaines d'années il est admis qu'elle persiste à des endroits localisés et joue un rôle important dans la plasticité cérébrale. Des liens ont été mis en évidence entre cette néo-neurogenèse et les troubles de l'humeur ainsi que certains types de mémoire (Dokter et und Halbach, 2012).

Dans la mesure où nous avons publié des effets bénéfiques de la tDCS sur la dépression et la mémoire, nous avons émis l'hypothèse que ces effets puissent être liés à une augmentation de la neurogenèse au niveau de l'hippocampe des souris adultes.

10.1.1 La néo-neurogenèse

Chez les mammifères, la néo-neurogenèse survient soit au niveau de l'hippocampe, soit sous la paroi des ventricules latéraux (zone sous-ventriculaire).

La neurogenèse dans l'hippocampe

L'hippocampe est une structure cérébrale appartenant au système limbique (avec l'amygdale, le gyrus cingulaire, le fornix et l'hypothalamus). Principalement connu pour son rôle dans la mémoire et la navigation spatiale, il en a également un dans les émotions et la réponse au stress. En effet, des

études lésionnelles révèlent que si l'hippocampe dorsal est impliqué dans l'apprentissage et la mémoire spatiale, l'hippocampe ventral, lui, régule plutôt les comportements liés aux émotions et à la motivation (Fanselow et Dong, 2010).

L'hippocampe est composé de régions distinctes : le gyrus denté (composé principalement de neurones granulaires), et la corne d'Ammon (composée principalement de neurones pyramidaux ; Hagihara *et al.* (2009)).

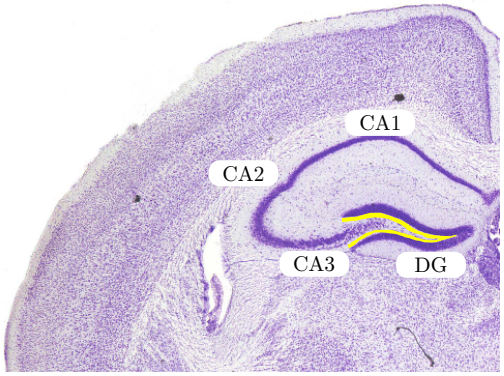


FIGURE 10.1 – Coupe coronale montrant les subdivisions de l'hippocampe chez la souris (coloration crésyl violet). CA1 à 3 : corne d'Ammon 1 à 3 ; DG : gyrus denté. La zone en jaune représente la position à laquelle on retrouve les cellules nouvellement formées. Adapté de Paxinos et Franklin (2001).

Les cellules souches neurales se trouvent dans le gyrus denté, plus précisément au niveau de la zone sous granulaire (en jaune sur la figure 10.1). Elles produisent, par division asymétrique, des progéniteurs qui prolifèreront et se différencieront en neuroblastes. Trois jours après la division initiale, la majorité de ces cellules atteint un stade post-mitotique, et commence à exprimer des protéines spécifiques telles que la calrétinine (une protéine se liant au calcium) et le marqueur neuronal NeuN. À ce stade, les cellules étendent leur axone en direction de la région CA3 de l'hippocampe pour y établir un contact. Un processus de sélection est enclenché et les cellules sont recrutées ou éliminées. Les neuroblastes migrent dans la couche granulaire, et dans les 2 à 3 semaines suivant le stade post-mitotique, elles commencent à exprimer la calbindine à la place de la calrétinine. Mais il faudra attendre 4 à 7 semaines (après la division initiale) pour que les cellules deviennent des neurones complètement matures et fonctionnels (figure 10.2). Ces neurones doivent alors s'intégrer dans le circuit de l'hippocampe et y établir des connexions avec les autres neurones et interneurones (Kempermann *et al.*, 2004).

Parmi les cellules fonctionnelles issues de cette niche, se retrouvent majo-

ritairement des cellules granulaires (neurones excitateurs). Une petite partie deviendrait cependant des cellules gliales (oligodendrocytes et astrocytes) ; ces cellules forment l'environnement des neurones, assurant notamment un rôle de soutien et de protection du tissu nerveux (Lledo et Gheusi, 2006). Cameron *et al.* (1993) décrivent une proportion de plus de 70 % de neurones parmi des cellules nouvellement marquées dans le gyrus denté de rats adultes (trois et quatre semaines après l'injection d'une base nucléotidique marquée).

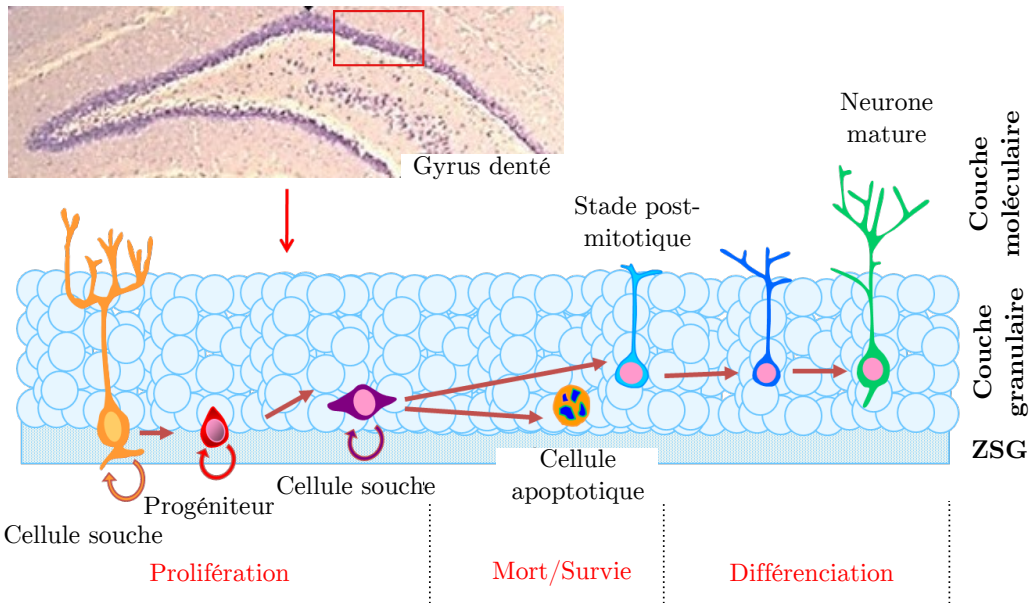


FIGURE 10.2 – Schéma représentant les différentes étapes de neurogenèse au niveau du gyrus denté. ZSG : zone sous-granulaire. Adapté du site de l'équipe de N. Abrous (www.neurocentre-magendie.fr).

La neurogenèse dans la zone sous-ventriculaire

Dans la paroi des ventricules latéraux, ou zone sous-ventriculaire (ZSV), se situe une autre niche de cellules souches neurales. Là aussi les cellules souches engendrent des cellules progénitrices qui prolifèrent puis se différencient en neuroblastes. Néanmoins, contrairement au devenir des cellules dans le gyrus denté, ces neuroblastes migrent hors de la ZSV et suivent une voie qui aboutit au niveau du bulbe olfactif, où ils acquièrent leur fonction (Sawada et Sawamoto, 2013).

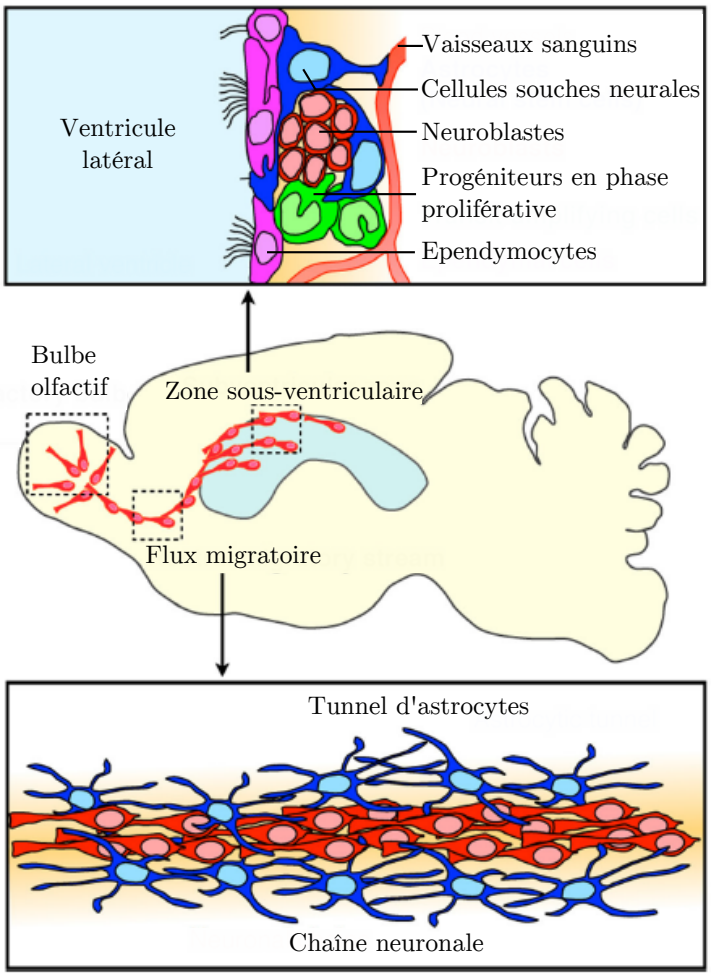


FIGURE 10.3 – Schéma représentant les différentes étapes de neurogenèse au niveau de la zone sous-ventriculaire chez le rongeur. Adapté de l'article de Sawada et Sawamoto (2013).

10.1.2 Neurogenèse hippocampique et dépression

La dépression est une pathologie des processus de régulation de l'humeur et des émotions. Les mécanismes la sous-tendant sont complexes et encore méconnus ; plusieurs régions cérébrales sont impliquées dans la régulation des émotions (amygdale, cortex cingulaire...), des fonctions exécutives (cortex frontal, hippocampe...), de la récompense (noyau accumbens...), et un dysfonctionnement de ces circuits peut conduire à des symptômes dépressifs (Krishnan et Nestler, 2008). Ces circuits sont régulés par des projections monoaminergiques provenant de l'aire tegmentale ventrale (dopamine), des

noyaux du raphé (sérotonine), et du *locus cæruleus* (noradrénaline), d'où l'importante "hypothèse monoaminergique" postulant que la dépression est due à une diminution de la fonction monoaminergique dans le cerveau. Le fait que beaucoup d'antidépresseurs ont une action entraînant l'augmentation de la transmission monoaminergique accrédite cette hypothèse ; néanmoins, plusieurs observations prouvent que la seule altération du système monoaminergique ne suffit pas à expliquer les symptômes de dépression ni les effets bénéfiques des antidépresseurs. Notamment, il est à noter que les antidépresseurs provoquent une augmentation immédiate de la transmission monoaminergique, mais l'apparition d'effets sur l'humeur demande des semaines de traitement (Krishnan et Nestler, 2008).

Diminution de la neurogenèse dans la dépression

De nombreuses études (autopsies et neuro-imagerie) ont montré une diminution du volume de matière grise et de la densité de la glie au niveau du cortex préfrontal et de l'hippocampe chez des patients souffrant de dépression (Krishnan et Nestler, 2008).

Certains auteurs postulent donc que la formation de nouveaux neurones à l'âge adulte serait importante dans le contrôle de l'humeur et l'action des antidépresseurs (Dokter et und Halbach, 2012 ; Eisch et Petrik, 2012).

La réduction du volume hippocampique observée dans la dépression pourrait être due à un remodelage cellulaire, avec une diminution de la neurogenèse dans le gyrus denté (Campbell et MacQueen, 2004). En effet, le stress se traduit par une augmentation de l'activité de l'axe hypothalamo-hypophysaire qui conduit à une élévation du taux de glucocorticoïdes, communément retrouvée dans l'épisode dépressif majeur. Ceci a pour effet de diminuer la neurogenèse (Cameron et McKay, 1999) et d'affecter la régulation du taux de BDNF (en inhibant son augmentation activité-dépendante), ce qui, potentiellement, rendrait le neurone moins sensible aux stimuli et inhiberait l'arborisation dendritique (Campbell et MacQueen, 2004).

Les antidépresseurs augmentent la neurogenèse

Toujours dans le sens de cette hypothèse, différentes thérapies permettant d'améliorer l'humeur des patients dépressifs semblent augmenter le taux de neurogenèse dans l'hippocampe. Ainsi chez le rat, il a été montré que des traitements chroniques par des antidépresseurs de différentes classes ou par électroconvulsivothérapie augmentent la prolifération cellulaire au niveau du gyrus denté, et que les nouvelles cellules deviennent des neurones fonctionnels (Malberg *et al.*, 2000). L'augmentation de la prolifération cellulaire

serait donc un des mécanismes expliquant l'efficacité des traitements antidépresseurs.

Mais...

Différents travaux ont cependant mené à des résultats mitigés, certains auteurs rapportant que l'inhibition de la neurogenèse ne se traduit pas forcément par des symptômes associés à la dépression (Eisch et Petrik, 2012 ; Tanti et Belzung, 2013), et que l'efficacité des antidépresseurs ne peut s'expliquer qu'en partie par un effet sur la neurogenèse (David *et al.*, 2009 ; Tanti et Belzung, 2013).

Pour conclure, nous considérons actuellement que la diminution de la neurogenèse à l'âge adulte n'est pas un des facteurs causaux les plus importants de développement de la dépression, mais qu'une partie des effets bénéfiques des traitements antidépresseurs s'explique par une modulation de cette néo-neurogenèse (Sahay et Hen, 2007 ; David *et al.*, 2009).

10.1.3 Neurogenèse hippocampique et mémoire

L'hippocampe est une structure connue pour son implication notamment dans la mémoire épisodique et dans l'apprentissage spatial (mémoire déclarative).

L'apprentissage module la neurogenèse

Il a été montré que certains types de comportements entraînent une régulation de la neurogenèse (Gould *et al.*, 1999). L'apprentissage spatial (test de la piscine de Morris, chez le rat) provoquerait une augmentation de la survie des nouvelles cellules lors d'une période critique de maturation (stade intermédiaire de leur développement, au moment de l'extension des axones). L'entraînement augmenterait aussi le pourcentage de nouvelles cellules exprimant un marqueur neuronal (NeuN), ayant donc un impact sur le devenir des cellules nouvellement formées dans l'hippocampe (Epp *et al.*, 2007).

L'étude de gènes précoces a par ailleurs permis de mettre en évidence que l'exploration spatiale active les nouveaux neurones intégrés dans l'hippocampe dans une plus grande proportion que les neurones plus âgés (Ramirez-Amaya *et al.*, 2006). Ces nouveaux neurones seraient en outre préférentiellement intégrés aux circuits impliqués dans la mémoire spatiale par rapport aux "anciens" (chez des souris ayant réalisé un apprentissage spatial dans le

test de la piscine de Morris ; Kee *et al.* (2007)). Les différentes études menées chez l'animal confortent donc l'hypothèse que les nouveaux neurones intégrés dans l'hippocampe sont spécifiquement activés (en comparaison aux neurones plus anciens) et contribuent à l'apprentissage et à la mémoire.

Inhibition de la neurogenèse et mémoire

En revanche, les études chez l'animal visant à inhiber la neurogenèse et à évaluer par la suite les performances cognitives ont mené à des résultats moins clairs. L'inhibition de la neurogenèse n'altère en rien, comme c'était prévisible, les performances dans des tâches non hippocampo-dépendantes. Cependant cette inhibition conduit à une baisse des performances uniquement dans certaines tâches hippocampo-dépendantes (Deng *et al.*, 2010). Des résultats variables sont obtenus en fonction du test étudié ou pour un même test (par exemple la piscine de Morris). En effet, l'inhibition de la neurogenèse peut diminuer ou ne pas impacter les performances en fonction de la méthode utilisée pour réaliser cette inhibition, de l'âge des animaux, de leur espèce et de leur souche, ou encore des paramètres choisis pour évaluer les comportements (Deng *et al.*, 2010)...

En conclusion, si la fonction exacte des neurones nouvellement formés et intégrés dans l'hippocampe reste floue, il est désormais acquis que la néo-neurogenèse joue un rôle dans l'exécution de certaines tâches d'apprentissage et de différents types de mémoire.

Nos premiers résultats, présentés dans le chapitre 9, nous ont permis de mettre en évidence des effets de la tDCS sur des comportements associés à la dépression et à la mémoire visuo-spatiale chez la souris. Ces effets apparaissant trois semaines après la fin du traitement, nous avons voulu tester l'hypothèse que parmi ses mécanismes d'action, la tDCS entraîne une modulation de la neurogenèse à l'âge adulte. Cette régulation pourrait prendre divers aspects ; la tDCS pourrait agir sur la prolifération cellulaire au niveau de l'hippocampe (formation d'un plus grand nombre de nouvelles cellules), ou bien sur la survie ou encore le devenir des nouvelles cellules.

10.2 Effets de la stimulation transcrânienne sur la prolifération cellulaire

Je présenterai ici nos études visant à vérifier si notre protocole de stimulation module la prolifération de nouvelles cellules au niveau du gyrus denté de l'hippocampe chez la souris.

Pour ceci, nous avons stimulé 17 souris (9 Sham et 8 tDCS) âgées de 8 semaines pendant 5 jours. Le jour des dernières stimulations, nous leur avons injecté de la BrdU à raison de 50 mg/kg (3 injections espacées de 6 h). 24 heures après la première injection, les souris ont été sacrifiées, et leurs cerveaux récupérés pour comptage de la prolifération cellulaire (voir section 7.1 et figure 10.4 A).

10.2.1 La tDCS augmente la prolifération cellulaire

Nos résultats indiquent que le traitement par tDCS augmente la prolifération cellulaire au niveau de l'hippocampe des souris, et ce 24h après la fin d'une série de 10 stimulations.

Les sessions de tDCS augmentent significativement le nombre de cellules formées dans l'hippocampe indépendamment de l'hémisphère considéré (ANOVA répétée effet groupe : $F_{(1,15)} = 24.8$; $p<0.001$), bien que l'anode soit située sur la gauche du cortex frontal. Le pourcentage d'augmentation est de 43 ± 10 % dans l'hémisphère gauche, stimulé, et de 48 ± 7 % dans l'hémisphère droit. Si on compare, chez les souris tDCS, les pourcentages d'augmentation de cellules BrdU-positives entre l'hémisphère droit et le gauche, aucune différence n'est révélée (t-test : $p = 0.72$).

Cette augmentation de prolifération cellulaire a lieu aussi bien dans le gyrus dorsal (≈ Bregma -0.94 à -2.70 mm), impliqué dans les fonctions cognitives, que dans le gyrus ventral (≈ Bregma -2.80 à -3.88 mm), qui serait plutôt impliqué dans le stress et les émotions (ANOVA répétée effet groupe : $F_{(1,15)} = 24.9$; $p<0.001$). L'ANOVA répétée révèle une interaction avec la zone considérée (effet zone x groupe : $F(1, 15) = 4.6$; $p<0.05$). Si le nombre de cellules marquées augmente de 50 ± 10 % dans la zone dorsale, cette augmentation est seulement de 32 ± 6 % dans la zone ventrale (figure 10.4 B). Cependant un t-test réalisé chez les souris tDCS ne révèle pas de différence entre l'augmentation dans la zone dorsale et celle dans la zone ventrale ($p = 0.15$).

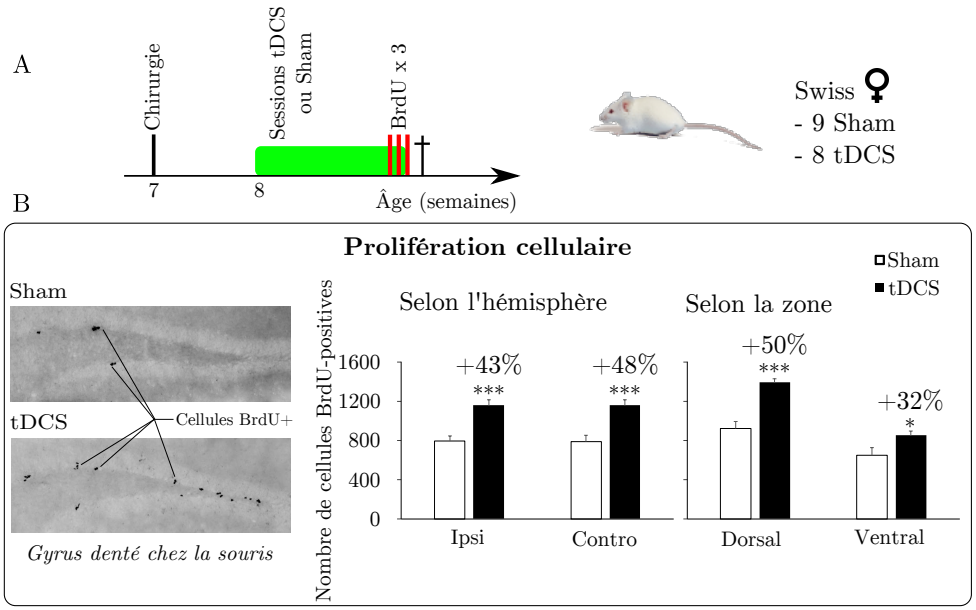


FIGURE 10.4 – A/ Protocole d'étude de la prolifération cellulaire. Les souris âgées de 8 semaines ont reçu 10 sessions de tDCS anodique puis 3 injections de BrdU le dernier jour de stimulation. Elles ont été sacrifiées 24 h après la première injection, et leur cerveau a été récupéré. B/ Résultats obtenus. À gauche : coupes coronales centrées sur le gyrus denté de l'hippocampe. À droite : représentation graphique du nombre de cellules marquées selon l'hémisphère (Ipsi : hémisphère gauche, stimulé ; Contro : hémisphère droit) ou la zone (dorsale ou ventrale). * $p<0.05$; *** $p<0.001$ *versus* Sham.

Ces résultats ont été obtenus chez des souris ayant été stimulées à l'âge de 8 semaines (jeunes adultes). Or, nous savons que le phénomène de neurogenèse diminue avec l'âge, y compris chez les rongeurs (Amrein *et al.*, 2011). Nous avons donc réalisé la même étude sur des souris plus âgées afin de voir si la modulation de la prolifération cellulaire est affectée par l'âge des souris.

10.2.2 Impact de l'âge des souris

Un autre groupe de souris a été stimulé à l'âge de 10 mois et comparé au précédent. Les données présentées ici sont sur les hémisphères moyennés, puisque dans l'étude précédente aucune différence entre le côté stimulé et l'autre n'a été mise en évidence.

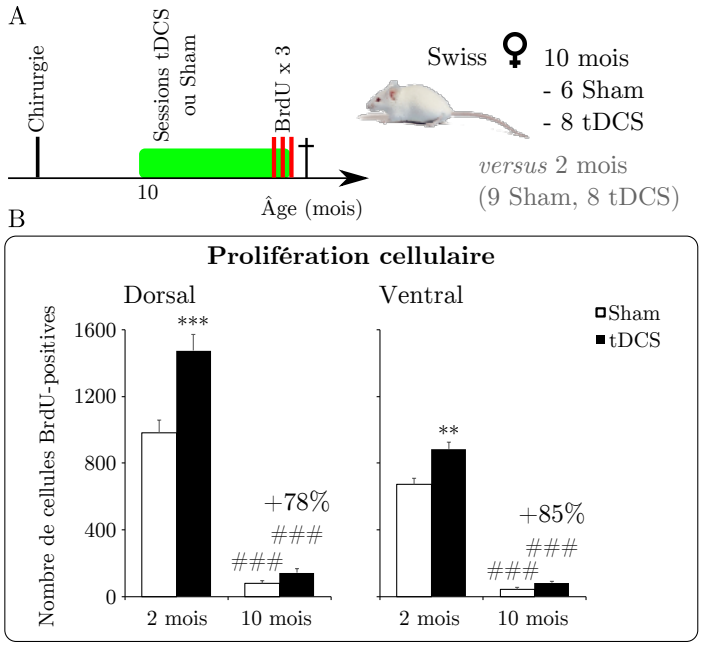


FIGURE 10.5 – A/ Protocole d'étude de l'effet de l'âge des souris sur la prolifération cellulaire. Le groupe stimulé à 2 mois est celui dont les données détaillées sont présentées ci-avant. Les souris âgées de 2 ou 10 mois ont reçu 10 sessions de tDCS anodique puis 3 injections de BrdU le dernier jour de stimulation. Elles ont été sacrifiées 24 h après la première injection, et leur cerveau a été récupéré. B/ Les données sont présentées selon la zone étudiée (dorsale ou ventrale), les deux hémisphères moyennés. ** $p<0.01$ et *** $p<0.001$ *versus* Sham ; ### $p<0.001$ comparé aux souris âgées de 2 mois.

Les groupes ont été comparés par une ANOVA répétée (1 facteur intra : la zone [dorsale ou ventrale] et 2 facteurs inter : le groupe [tDCS ou Sham] et l'âge de stimulation [2 ou 10 mois]).

Nous avons ainsi pu montrer des interactions groupe x âge (ANOVA répétée : $F_{(1,27)} = 14.0$; $p<0.001$), zone x âge (ANOVA répétée : $F_{(1,27)} = 30.8$; $p<0.001$), et zone x groupe (ANOVA répétée : $F_{(1,27)} = 4.3$; $p<0.05$).

La prolifération cellulaire diminue quand l'âge des souris augmente (figure 10.5), aussi bien dans le groupe Sham que dans le groupe tDCS (NK : $p<0.001$ 2 mois *versus* 10 mois, quelle que soit la zone et le groupe).

Comme vu ci-avant la stimulation par tDCS augmente le taux de prolifération cellulaire chez les souris âgées de 2 mois (figure 10.5), à la fois dans l'hippocampe dorsal (NK : $p<0.001$ Sham *versus* tDCS) et dans l'hippo-

campe ventral (NK : $p<0.01$).

En revanche, bien que chez les souris stimulées à l'âge de 10 mois nous retrouvions une augmentation de la prolifération cellulaire hippocampique (de 78 ± 31 % dans la zone dorsale, et de 85 ± 19 % dans la zone ventrale), l'ANOVA répétée ne permet pas de mettre en évidence un effet significatif (NK : $p>0.05$ quelle que soit la zone considérée).

Cependant, en réalisant une ANOVA répétée (groupe x zone), uniquement chez les souris stimulées à l'âge de 10 mois, un effet groupe ($F_{(1,12)} = 5.6$; $p<0.05$) et un effet zone ($F_{(1,12)} = 13.1$; $p<0.01$) apparaissent. Nous retrouvons alors une différence (non reportée sur la figure 10.5) entre Sham et tDCS pour la zone dorsale (NK : $p=0.05$) et la zone ventrale (NK : $p<0.01$).

10.3 Discussion

Comme décrit dans la littérature, la neurogenèse à l'âge adulte est impliquée dans l'amélioration de certains aspects cognitifs et dans le traitement de la dépression (certains antidépresseurs favorisant la formation de nouvelles cellules au niveau de l'hippocampe).

Dans la mesure où nous avons publié des effets encourageants de la tDCS sur ces deux paramètres au niveau comportemental, nous avons émis l'hypothèse que l'efficacité de cette méthode de stimulation puisse être liée, au moins en partie, à une augmentation de la neurogenèse au niveau de l'hippocampe des souris adultes. Dans un premier temps, nous avons étudié le phénomène de prolifération cellulaire immédiatement après 5 jours de stimulations bi-quotidiennes. Nous montrons ainsi une augmentation de la formation de nouvelles cellules dans l'hippocampe, ceci aussi bien dans la zone du gyrus impliquée dans les fonctions cognitives (zone dorsale), que dans celle reliée à l'état émotionnel (gyrus ventral ; Fanselow et Dong (2010)). Notons cependant que cet effet de la tDCS est plus fort chez des souris jeunes adultes (stimulées à 2 mois).

À notre connaissance, il n'existe encore aucune étude publiée faisant état d'une augmentation de la neurogenèse suite à des stimulations répétées par tDCS anodique.

Il a été montré chez l'animal qu'un traitement chronique par antidépresseurs augmente la prolifération cellulaire au niveau de l'hippocampe. Par exemple, Malberg *et al.* (2000) ont administré différentes classes d'antidépresseurs pendant 1 à 28 jours (inhibiteurs de la monoamine oxydase : tranylcypromine, inhibiteurs de la recapture de la noradrénaline ou de la sé-

rotonine : réboxétine ou fluoxétine, respectivement) ou un traitement par électrochocs (0.3 secondes à 50 mA, quotidiennement pendant 10 jours) à différents groupes de rats mâles. Les rats ont reçu de la BrdU soit avant le traitement antidépresseur (étude de la survie cellulaire) soit 4 jours après le dernier traitement (étude de la prolifération et de la différenciation cellulaire) et ont été sacrifiés 1 ou 28 jours après. Les auteurs ont ainsi mis en évidence que le traitement chronique par antidépresseurs médicamenteux ou électrochocs augmente la prolifération cellulaire dans le gyrus denté (24 heures après l'injection de BrdU ; augmentation d'environ 20 à 40% pour les médicaments et d'environ 50% pour l'ECT) et que ces nouvelles cellules survivent (au moins 28 jours après). De plus, ils ont réalisé un phénotypage des nouvelles cellules, montrant qu'aucun des traitements antidépresseurs n'a d'effet sur la différenciation cellulaire (pour chaque groupe, y compris le groupe contrôle, la proportion était de 75% de neurones pour 13% de cellules gliales, les 12% restants étant non identifiables)(Malberg *et al.*, 2000).

Notons que Madsen *et al.* (2000) avaient noté, toujours chez le rat mâle, un effet plus important de l'ECT. Une augmentation du marquage BrdU dans l'hippocampe était remarquée après une unique session d'ECT (si la BrdU était injectée 3 ou 5 jours après ; injectée 12 h ou 7 jours après, plus aucun effet significatif n'était relevé) ou après un traitement chronique (5 ou 10 séances d'ECT ; traitement à la BrdU pendant 21 jours à partir de la première séance). Cette augmentation pouvait aller jusqu'à +100%.

De manière intéressante, cet effet sur la prolifération cellulaire a également été montré chez des rats mâles âgés de 4 mois ayant reçu un traitement chronique par rTMS haute fréquence (traitement appliqué comme antidépresseur ; 1 fois par jour pendant 14 jours) et sacrifiés 24 heures après la fin de ce traitement. Un marquage à la BrdU a permis de mettre en évidence une augmentation de 62% de la prolifération cellulaire chez les animaux traités par rTMS (Ueyama *et al.*, 2011).

Pour aller plus loin, Tanti *et al.* (2013) ont montré que différents traitements agissant sur l'humeur entraînent des régulations spécifiques de la neurogenèse. Ainsi parmi les traitements améliorant l'humeur, l'exposition de souris à un environnement enrichi augmente la prolifération et la survie cellulaire préférentiellement dans la région septale de leur hippocampe (qui correspond à la région dorsale, dans notre étude). Un traitement chronique par fluoxétine en revanche n'affecte ces deux paramètres que dans la partie temporale (c'est-à-dire ventrale) chez les souris saines (bien que ce même traitement chez des souris stressées, dont la neurogenèse était altérée dans tout l'hippocampe, rétablit une prolifération et une survie cellulaires normales aussi bien dans la partie septale que la partie temporale).

Nos résultats vont dans le même sens que ces données, et suggèrent que les effets de la tDCS pourraient s'expliquer au moins en partie par une augmentation de la prolifération cellulaire hippocampique (à la fois dans sa partie dorsale et sa partie ventrale). Soulignons cependant qu'il est probable que le mécanisme d'action de la tDCS diffère de celui des antidépresseurs médicamenteux, tels que la fluoxétine, puisque ces derniers sont actifs immédiatement après une administration aiguë chez le rongeur (Castagné *et al.*, 2009) et chez la souris saine induisent une prolifération limitée à la partie ventrale de l'hippocampe (Tanti *et al.*, 2013). Par ailleurs, nos résultats ne concernent que l'étude de la prolifération cellulaire, et Tanti *et al.* (2013) ont montré que les traitements connus pour affecter l'humeur régulent la neurogenèse différemment en fonction de l'étape considérée (par exemple, progéniteur ou neurone post-mitotique immature).

Notre étude n'apporte pas non plus d'éléments expliquant par quel mécanisme la tDCS pourrait favoriser la prolifération cellulaire (voire la neurogenèse). Une piste à suivre serait celle du BDNF ; ce facteur neurotrophique est connu pour augmenter la neurogenèse, stimulant à la fois la prolifération et la survie (Binder et Scharfman, 2004). Plusieurs auteurs font le lien entre traitement antidépresseur, neurogenèse et BDNF (notamment hippocampique). Ainsi un traitement chronique par ECT ou par différents antidépresseurs médicamenteux (dont la sertraline) augmente l'expression du BDNF dans l'hippocampe chez le rat (Nibuya *et al.*, 1995). Chez le rat (stressé ou non) également, Bambico *et al.* (2015) ont montré une augmentation de la prolifération cellulaire hippocampique après un traitement chronique par stimulation cérébrale profonde (du cortex préfrontal ventromédial) qui pourrait s'expliquer en partie par une augmentation de l'expression du BDNF (retrouvée principalement dans le cortex préfrontal et dans une moindre mesure dans l'hippocampe). Rappelons par ailleurs que Podda *et al.* (2016), dans le cadre d'une étude sur la plasticité synaptique, ont montré chez la souris une augmentation de l'expression de BDNF dans l'hippocampe après une stimulation par tDCS anodique (20 minutes, 0.35 mA) de l'hippocampe gauche.

Dans la lignée de ces études, il sera intéressant d'évaluer si l'impact de la tDCS sur la prolifération cellulaire hippocampique est liée (au moins en partie) à une modulation du taux de BDNF dans plusieurs zones cérébrales (notamment le cortex préfrontal et l'hippocampe).

Une stimulation (0.2 - 0.25 mA, 20 minutes) par courant continu (quelle que soit la polarité) de tranches d'hippocampe de rat entraîne une augmentation de l'expression de *Zif268* dans les cornes d'Ammon 1 et 3 (immunohistochimie réalisée 6 h après la stimulation ; Ranieri *et al.* (2012)). Or ce

facteur de transcription interviendrait dans la survie des nouvelles cellules formées dans les zones de neurogenèse (Veyrac *et al.*, 2013).

Ces données, en plus des résultats obtenus par Malberg *et al.* (2000), nous laissent penser qu'en plus d'augmenter la prolifération cellulaire après quelques jours de stimulation, la tDCS pourrait agir sur la survie de ces cellules par le biais de l'induction de facteurs de transcription (tels que *Zif268*). Cet effet de la tDCS fait l'objet d'une étude en cours au laboratoire. Des souris âgées de 8 semaines seront stimulées selon notre protocole habituel ; comme dans les études présentées ci-avant, trois doses de BrdU (50 mg/kg) leur seront administrées lors du dernier jour de stimulation, et elles seront sacrifiées cette fois-ci 3 semaines après pour analyse du marquage des cellules hippocampiques apparues à la fin des stimulations et survivant pendant plusieurs semaines. Un double marquage permettant d'identifier le devenir des cellules (doublecortine, NeuN) est également prévu. Enfin, les techniques de marquage des cellules en division par rétrovirus (exprimant des marqueurs tels que la protéine fluorescente verte) s'avéreraient utiles pour l'étude de la morphologie des nouvelles cellules formées (et donc, de la connectivité des nouveaux neurones à différents stades de leur vie ; Zhao *et al.* (2006)).

S'il est possible de mettre en évidence un effet de la tDCS sur la neurogenèse hippocampique, il serait important de réaliser des études visant à déterminer si cet effet est nécessaire pour l'action anti-dépressive et pro-cognitive de ce traitement.

En effet, certains auteurs ont étudié l'effet de traitements antidépresseurs chez des souris chez lesquelles la neurogenèse était bloquée (par exemple après application de rayons X sur l'hippocampe). Santarelli *et al.* (2003) ont ainsi montré chez la souris la nécessité d'une neurogenèse pour que deux classes d'antidépresseurs (fluoxétine et imipramine) agissent sur le comportement dans le test d'inhibition néophobique de la prise alimentaire (*Novelty-Suppressed Feeding*, NSF). David *et al.* (2009) ont confirmé que l'effet comportemental de la fluoxétine dans le NSF dépend de la neurogenèse ; en revanche, l'effet de cette même molécule sur d'autres comportements (notamment dans le test de la nage forcée) semble indépendant de la neurogenèse. Pour citer un dernier exemple, Meshi *et al.* (2006) ont publié que la neurogenèse hippocampique n'était pas nécessaire pour observer des conséquences comportementales (sur l'anxiété et l'apprentissage spatial) de l'enrichissement du milieu chez des souris.

C'est pourquoi une étude complémentaire évaluant les effets comportementaux de la tDCS chez des souris traitées de manière à inhiber la neurogenèse sera à réaliser.

En conclusion, l'application d'un traitement chronique par tDCS chez la souris augmente la prolifération cellulaire au niveau du gyrus denté, comme ce qui a été montré pour différents traitements antidépresseurs (médicamenteux ou par stimulations cérébrales). Le fait que nos principaux effets comportementaux (notamment liés à la dépression et à la mémoire) apparaissent plusieurs semaines après la fin des stimulations est par ailleurs cohérent avec l'hypothèse que les effets de la tDCS s'expliquent au moins en partie par une augmentation du nombre de nouveaux neurones dans l'hippocampe.

Les études complémentaires qui seront menées dans ce cadre permettront d'apporter de nouveaux éléments et de confirmer l'implication de la neurogenèse dans les effets de la tDCS, ou d'ouvrir de nouvelles pistes de réflexion.

11 Étude 3 : tDCS et vulnérabilité aux drogues

L'addiction est un « processus dans lequel est réalisé un comportement qui peut avoir pour fonction de procurer du plaisir et de soulager un malaise intérieur, et qui se caractérise par l'échec répété de son contrôle et sa persistance en dépit des conséquences négatives » (Goodman, 1993).

Si par le passé cette pathologie n'était pas reconnue, voire considérée comme un simple trait de caractère (manque de volonté), aujourd'hui elle fait l'objet d'une définition caractérisée par des critères précis dans le manuel diagnostique et statistique des troubles mentaux (DSM-V, American Psychiatric Association (2013)).

Son traitement est complexe car l'addiction implique à la fois des modifications biologiques au niveau cérébral et des problèmes psychologiques et socio-environnementaux.

Pour une addiction à une substance chimique (tabac, alcool ou cocaïne, par exemple), la cure vise d'abord la diminution ou l'abstinence de consommation de cette substance (sevrage). Ce sevrage peut être facilité par l'administration d'un traitement de substitution (tels que la méthadone ou le subutex comme substitution aux opiacés) et s'accompagner d'une psychothérapie, mais il n'existe pas à ce jour d'intervention ayant démontré une réelle efficacité sur le long terme pour éliminer les risques de rechute. Par ailleurs, les médicaments s'accompagnent souvent d'effets indésirables. Ainsi il apparaît intéressant de développer de nouvelles stratégies, complémentaires aux traitements actuels, qui pourraient aider les sujets dépendants à s'affranchir de leur addiction.

11.1 Mode d'action des drogues

Les drogues d'abus ont des propriétés renforçantes (renforcement positif : la fréquence d'apparition d'un comportement augmente du fait de l'obtention

d'un stimulus appétitif ; renforcement négatif : la fréquence d'un comportement augmente du fait de l'arrêt d'un stimulus - par exemple, les symptômes de sevrage agissent comme des renforçateurs négatifs) qui sont à l'origine du maintien de la consommation. Elles augmentent le taux de dopamine dans le circuit mésocorticolimbique (circuit qui part de l'aire tegmentale ventrale, et innerve notamment le noyau accumbens, le cortex frontal et l'amygdale ; schéma 11.1 ; Feltenstein et See (2008)).

Toutes les substances psychoactives ont pour point commun d'agir en augmentant la concentration de dopamine extracellulaire de manière directe ou indirecte. Ainsi, comme illustré dans le schéma 11.1, la nicotine se lie à ses récepteurs sur les neurones dopaminergiques ; les opioïdes se fixent sur les neurones GABAergiques dans l'aire tegmentale ventrale, inhibant la libération de GABA (neurotransmetteur inhibiteur) et augmentant ainsi l'activité des neurones dopaminergiques. L'alcool agit à plusieurs niveaux, modulant d'une part la conductance ionique médiée par le GABA et le glutamate dans l'aire tegmentale ventrale et inhibant d'autre part une enzyme de dégradation de la dopamine, la monoamine oxydase, dans le noyau accumbens (conduisant à l'augmentation de la concentration de dopamine). Les amphétamines agissent à la fois en augmentant la libération de dopamine et, à l'instar de la cocaïne, en bloquant sa recapture.

La dopamine libérée active le circuit de la récompense, entraînant une sensation de plaisir et modifiant l'état de conscience ; la prise répétée de drogues entraîne des modifications de ce circuit, conduisant à un fonctionnement anormal et à la dépendance.

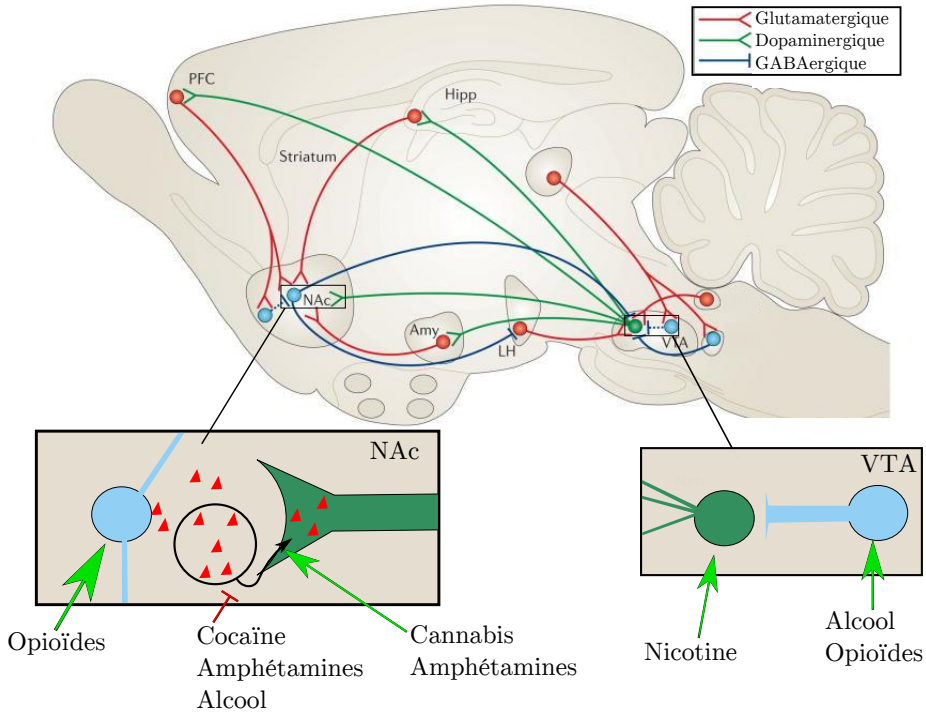


FIGURE 11.1 – Schéma simplifié du circuit de la récompense (cerveau de rongeur) et des sites d'action de plusieurs drogues d'abus. PFC : Cortex préfrontal ; Hipp : hippocampe ; VTA : aire tegmentale ventrale ; LH : hypothalamus latéral ; Amy : amygdale ; NAc : noyau accumbens. Adapté de Russo et Nestler (2013).

Notons que la consommation occasionnelle de substance addictive est à distinguer de la perte de contrôle menant à la recherche compulsive de drogue qui caractérise l'addiction. Par exemple en ce qui concerne l'alcool, si 51 % des américains âgés de plus de 12 ans en consomment régulièrement, seuls 7.7 % sont diagnostiqués dépendants (Koob et Volkow, 2010).

On peut aussi définir trois principales étapes dans le phénomène d'addiction : intoxication (consommation), sevrage (effet négatif), et anticipation (*craving*). Ces étapes font intervenir des circuits spécifiques (figure 11.2) qui ont été identifiés grâce aux études chez l'animal et en imagerie chez l'Homme (Koob et Volkow, 2010).

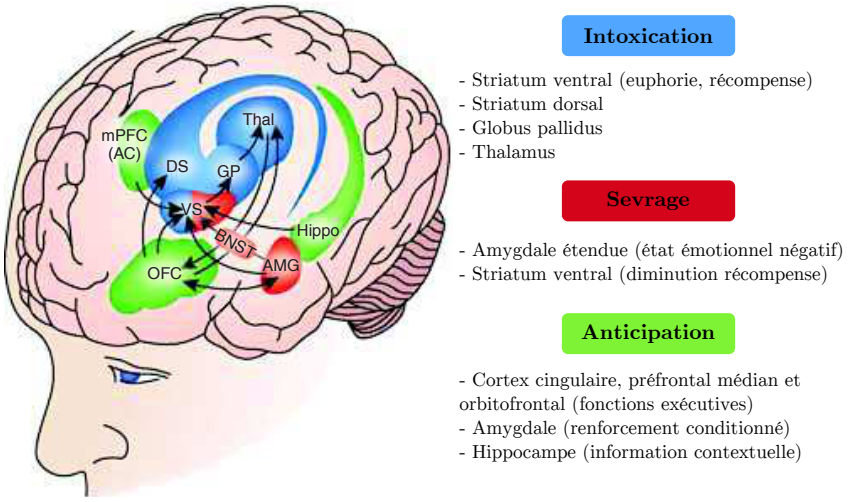


FIGURE 11.2 – Schéma des trois étapes de l'addiction et des zones cérébrales associées. La première étape, l'intoxication, implique le striatum ventral (VS) et dorsal (DS) ainsi que le globus pallidus (GP) et le thalamus (Thal). La deuxième étape, le sevrage, fait intervenir l'amygdale étendue (AMG), comprenant aussi le noyau de la strie terminale (BNST) et le noyau accumbens (dans le VS). La troisième étape, l'anticipation, engage le traitement d'informations dans l'amygdale basolatérale et l'hippocampe (Hippo), ainsi que le contrôle exécutif par les zones corticales (cortex préfrontal médian (mPFC), cingulaire antérieur (AC) et cortex orbitofrontal (OFC)). Adapté de Koob et Volkow (2010).

Il existe d'autres modèles décrivant l'addiction, tels que celui de l'*incentive salience* qui contrairement au précédent, fait la distinction entre recherche et consommation de drogue. Ce modèle soutient l'hypothèse que la poursuite d'un but n'est pas obligatoirement proportionnelle au plaisir ressenti lors de la consommation. Il existe ainsi deux réseaux neuronaux différents entre l'hédonicité (*liking*) et la motivation (*wanting*). Deux hotspots seraient impliqués dans l'hédonicité : un dans le quart rostrocaudal de la coquille médiale du noyau accumbens, et un dans la moitié postérieure du pallidum ventral. La motivation serait médiée par des substrats cérébraux plus largement distribués et plus faciles à activer (ce qui expliquerait que l'on puisse désirer une récompense sans l'aimer autant) (Berridge *et al.*, 2009).

11.2 La tDCS et la consommation de drogues

Comme nous l'avons vu dans l'introduction générale (section 2.1.3), plusieurs études sur les effets de la stimulation transcrânienne non invasive ont montré des effets bénéfiques chez certains patients dépendants à des substances.

Ainsi, rappelons que en ce qui concerne le tabac, Fregni et ses collaborateurs ont observé qu'une unique session de stimulation anodique du CPFDL (droit ou gauche) conduit à une réduction immédiate du *craving* (Fregni *et al.*, 2008a), impact renforcé et accompagné d'une réduction du nombre de cigarettes fumées après la répétition des sessions de stimulation (Boggio *et al.*, 2009b) chez des fumeurs dépendants (n'ayant pas fumé depuis 1 h 30), ceci pendant plusieurs jours (Fecteau *et al.*, 2014). Chez des fumeurs abstinents depuis la veille, une stimulation anodique du CPFDL gauche diminue les affects négatifs (Xu *et al.*, 2013) et le nombre de cigarettes fumées jusqu'à 30 minutes après la stimulation (Falcone *et al.*, 2015).

Ces effets ne semblent pas spécifiques du tabagisme, puisqu'une stimulation unilatérale (anode à gauche) ou bilatérale du CPFDL entraîne une réduction du *craving* pour l'alcool chez des patients alcoolo-dépendants (Boggio *et al.*, 2008c) ou grands buveurs (den Uyl *et al.*, 2015). La répétition des sessions de stimulation aurait les mêmes effets en plus d'une diminution de scores de dépression (da Silva *et al.*, 2013), ou une facilitation de l'abstinence pendant au moins 6 mois accompagnée d'une amélioration perçue de la qualité de vie (Klauss *et al.*, 2014). Les études sur les drogues illégales sont moins nombreuses, mais la stimulation par tDCS pourrait aussi entraîner des améliorations, telles qu'une diminution du *craving* pour la marijuana (Boggio *et al.*, 2010) ou pour la cocaïne (Batista *et al.*, 2015) après stimulation bilatérale du CPFDL.

Bien que les résultats des essais cliniques se révèlent encourageants, les mécanismes physiologiques qui sous-tendent les effets bénéfiques de la tDCS restent mal connus. Les études présentées dans ce chapitre portent sur l'évaluation dans notre modèle animal des effets de la tDCS sur la vulnérabilité aux drogues (nicotine, alcool, cocaïne), mais également sur la recherche des zones cérébrales impliquées.

11.3 Effets de la tDCS chez des souris exposées à la nicotine pendant l'adolescence

L'adolescence est une période de vulnérabilité face aux drogues, puisque l'expérimentation et le début de consommation régulière de produits psychoactifs (notamment tabac et alcool) ont souvent lieu avant la majorité. La plupart des patients dépendants adultes déclarent d'ailleurs une initiation durant les premières années de l'adolescence.

Or, l'adolescence constitue aussi une période critique pour le développement cérébral, durant laquelle se produit une réorganisation fonctionnelle et neuroanatomique du cerveau. Cette période de transition peut expliquer la plus grande propension des adolescents à avoir des comportements à risque, notamment du fait qu'un système dit *"bottom-up"*, qui exprime une réactivité exacerbée aux stimuli motivationnels, apparaît tôt dans le développement, en n'étant contrebalancé que tardivement par le renforcement d'un système dit *"top-down"*, qui exerce un contrôle cognitif. Ce déséquilibre augmente la propension aux comportements à risque et cause une plus forte sensibilité aux effets des drogues (Casey et Jones, 2010).

Suite à nos premiers résultats sur les comportements associés à la dépression et à la préférence pour la nicotine chez des souris "naïves" (dans le sens où elles n'avaient jamais été exposées à une drogue et n'avaient pas un comportement caractéristique d'une pathologie psychiatrique ; chapitre 9), nous avons voulu tester l'efficacité d'un traitement par tDCS chez des souris ayant subi une exposition chronique à la nicotine pendant l'adolescence.

En effet, Iñiguez *et al.* (2009) ont montré chez le rat qu'un tel traitement à l'adolescence (mais pas chez l'adulte) entraîne un état similaire à la dépression et à l'anxiété à l'âge adulte. Un traitement antidépresseur permet cependant de normaliser ces comportements. De manière intéressante, une réexposition à la nicotine aussi, ce qui pourrait favoriser le maintien de la consommation de nicotine à l'âge adulte.

Nous avons donc cherché, dans un premier temps, à reproduire ces effets délétères de l'exposition à la drogue pendant l'adolescence dans notre modèle murin, et à tester l'efficacité de la tDCS sur les troubles provoqués par ce traitement à l'âge adulte.

11.3.1 La tDCS après une prise chronique de nicotine à l'adolescence

L'étude présentée ici fait l'objet de la deuxième partie de l'article présenté en annexe B (Pedron *et al.*, 2014). Des souris adolescentes (4 semaines, McCutcheon et Marinelli (2009)) ont reçu deux injections par jour de nicotine (1 mg/kg) ou de solvant (NaCl) pendant 14 jours. Ce traitement a été suivi de la chirurgie puis de sessions répétées de stimulations anodiques ou sham à l'âge de 8 semaines (jeunes adultes). 3 groupes ont été formés : Veh-Sham (N = 10), Nic-Sham (N = 9) et Nic-tDCS (N = 10). Deux séries de tests comportementaux ont été réalisés, à 3 jours puis 3 semaines après les stimulations.

Le protocole ainsi que les principaux résultats obtenus sont représentés dans la figure 9.2.

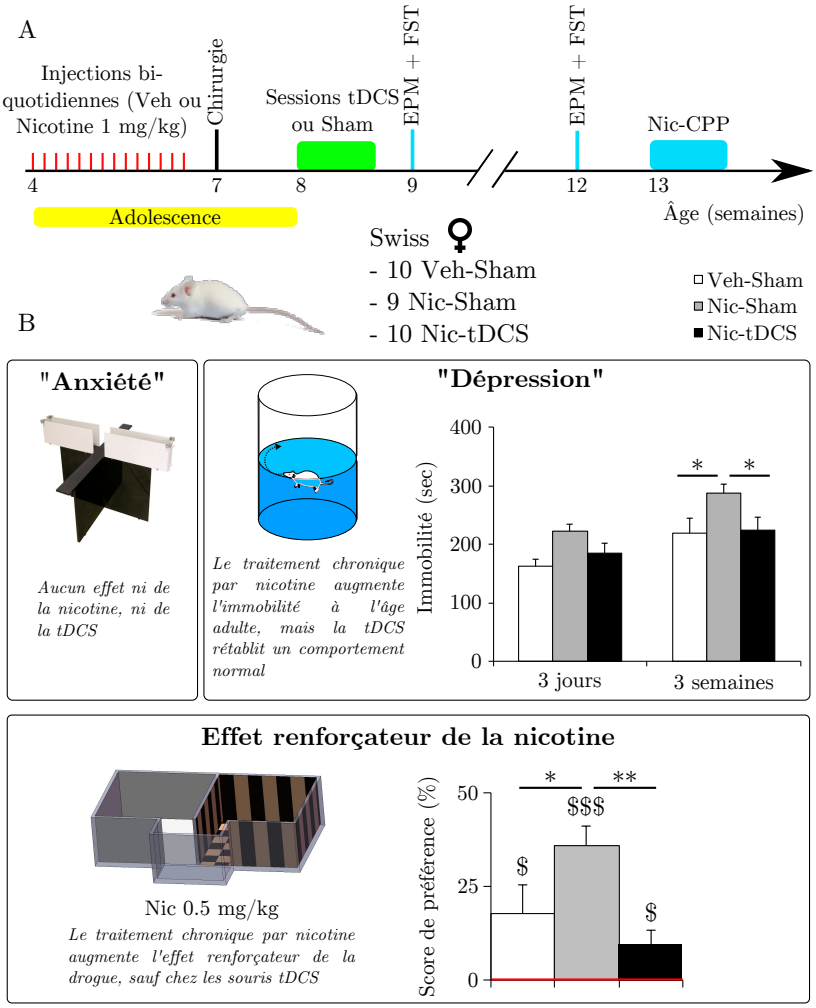


FIGURE 11.3 – Résumé de l'article n°1, partie 2. A/ Protocole expérimental. EPM : labyrinthe en croix surélevée ; FST : test de la nage forcée ; Nic-CPP : préférence de place conditionnée par la nicotine ; Veh-Sham : souris traitées au solvant pendant l'adolescence et par stimulations inactives à l'âge adulte ; Nic-Sham ou Nic-tDCS : souris traitées à la nicotine pendant l'adolescence et par stimulations inactives ou anodiques, respectivement, à l'âge adulte. B/ Principaux résultats obtenus. * $p<0.05$ et ** $p<0.01$ *versus* groupe indiqué ; $^{\$}$ $p<0.05$, $^{\$\$\$}$ $p<0.001$ *versus* 0 % (symbolisé par la ligne rouge).

La première remarque que l'on peut faire est que le traitement chronique à la nicotine pendant l'adolescence a induit un comportement de type dépressif (ANOVA à mesures répétées : effet groupe $F_{(2,26)}= 4.66$, $p<0.05$), les souris Nic-Sham passant plus de temps immobile dans le FST (NK : $p<0.05$

comparé aux Veh-Sham). Les souris Nic-tDCS ont cependant un comportement similaire à celui des souris n'ayant jamais été exposées à la drogue (NK : $p<0.05$ *versus* Nic-Sham et $p = 0.51$ *versus* Veh-Sham). Ces effets sont relevés, comme dans notre première étude, trois semaines après la fin des stimulations.

La nicotine induit une préférence de place chez les souris Veh-Sham ($p<0.05$ *versus* 0 %). Cet effet est augmenté chez les Nic-Sham (ANOVA : effet groupe $F_{(2,26)}= 5.21$, $p<0.05$; NK : $p<0.05$ *versus* Veh-Sham. $p<0.001$ *versus* 0 %). Mais la tDCS rétablit un comportement normal, avec une préférence de place ($p<0.05$ *versus* 0 %) significativement réduite (NK : $p<0.01$ *versus* Nic-Sham) et non différente des Veh-Sham.

11.3.2 Discussion

Nos résultats présentés ici montrent que notre protocole de stimulations répétées du cortex frontal gauche réduit, chez la souris, les troubles comportementaux observés après une exposition chronique à la nicotine pendant l'adolescence.

Comme observé par Iñiguez *et al.* (2009) chez le rat, un traitement à la nicotine pendant l'adolescence induit chez la souris un comportement de type dépressif à l'âge adulte (après sevrage forcé). En outre, ce traitement augmente l'expression de la préférence de place conditionnée par la nicotine. Or il a été mis en évidence que des épisodes de dépression augmentent les risques de passer d'une consommation de tabac à une réelle dépendance, et diminuent les chances de réussir à arrêter (Breslau *et al.*, 1993 ; Covey *et al.*, 1990).
Iñiguez *et al.* (2009) ont observé que l'administration d'un traitement antidépresseur annule ces effets de la nicotine. Notre traitement par tDCS induit un effet antidépresseur au bout de trois semaines, et en outre permet d'annuler l'effet délétère du traitement à la nicotine dans le test de préférence de place conditionnée.

Ces résultats laissent à penser que la tDCS pourrait constituer une aide au sevrage tabagique. Ils corroborent ceux observés chez l'Homme ; chez des fumeurs, des sessions répétées de tDCS peuvent diminuer le *craving* pour le tabac ou encore le nombre de cigarettes fumées (Boggio *et al.*, 2009b). Notre étude chez l'animal confirme donc le potentiel de la tDCS comme aide à la cessation du tabagisme, et à la diminution du risque de rechute chez des fumeurs abstinents. Ceci *via* la réduction de l'effet appétitif de la nicotine,

et de l'effet négatif de l'abstinence sur l'humeur.

11.4 Effets de la tDCS sur la consommation d'alcool (en collaboration avec le GRAP)

L'usage nocif de l'alcool est un problème majeur de santé public en cela qu'en plus du risque de développer une dépendance, l'alcool est un important facteur de risque pour plusieurs centaines de maladies telles que la cirrhose du foie ou certains cancers. En 2012, l'OMS (ou WHO pour *World Health Organization*) estime à 3.3 millions le nombre de décès dans le monde imputables à une consommation abusive d'alcool (WHO, 2014).

La thérapie contre l'alcoolo-dépendance, comme pour les autres addictions, consiste actuellement à viser le sevrage ou une baisse de la consommation et éviter les rechutes. Afin d'y parvenir, les thérapeutes peuvent prescrire des médicaments diminuant les symptômes de sevrage (par exemple, des anxiolytiques), ou des traitements réduisant l'envie de consommer (e.g. naltrexone, acamprosate...). Parmi les nouveaux traitements actuellement étudiés, le baclofène et l'Alcover® semblent particulièrement efficaces pour faciliter le sevrage (le premier bénéficiant d'une autorisation temporaire d'utilisation, et le second d'une autorisation de mise sur le marché en Italie et en Autriche).

Comme vu en introduction, plusieurs équipes de chercheurs se sont intéressées à la tDCS (la structure ciblée étant le cortex préfrontal dorsolatéral) pour aider les patients alcoolo-dépendants à se sevrer et à éviter les rechutes (Boggio *et al.*, 2008c ; den Uyl *et al.*, 2015 ; da Silva *et al.*, 2013).

Dans cette optique et après avoir montré des effets encourageants de la tDCS sur l'effet renforçateur de la nicotine chez la souris, nous avons cherché à vérifier si notre protocole de stimulation pouvait diminuer l'effet renforçateur d'autres drogues, telles que l'alcool. Nous avons mené quatre études dont deux en collaboration avec l'équipe du Pr. Naassila au sein du Groupe de Recherche sur l'Alcool et les Pharmacodépendances (GRAP INSERM ERI 24, Amiens). Ce laboratoire est hautement spécialisé en recherche sur l'addiction à l'alcool et sur la maladie alcoolique du foie, et a notamment pu mettre en place un modèle animal d'addiction à l'alcool unique en France.

11.4.1 tDCS et consommation spontanée d'éthanol

Dans une première étude, nous avons cherché à évaluer la consommation d'alcool par voie orale des souris quand une solution d'éthanol (diluée à 5 %

dans l'eau de boisson) leur était proposée en libre choix avec de l'eau.

Cette étude a été menée sur un groupe de souris ayant reçu des stimulations par tDCS active ou sham, puis des injections répétées d'alcool (2 g/kg, quotidiennement pendant 2 semaines) pour mettre en place un protocole de sensibilisation locomotrice (résultats non présentés puisque ce test a été de nouveau fait en collaboration avec le GRAP ; Cf. 11.4.4). Le test de libre choix a été effectué sur 2 semaines, 8 semaines après la fin des stimulations (figure 11.4 A).

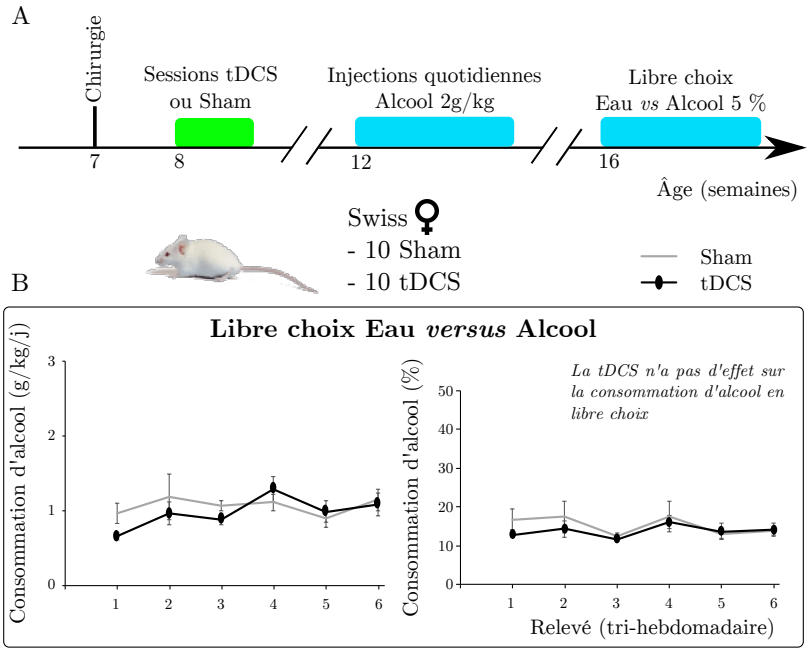


FIGURE 11.4 – A/ Protocole expérimental et B/ résultats obtenus chez des souris ayant accès à de l'éthanol 5 % en libre choix avec de l'eau (en quantité consommée en g/kg/jour, à gauche, et en score de préférence (%) comparé à l'eau, à droite.

Les souris ont consommé 12 à 18 % de solution alcoolisée (par rapport à leur consommation totale de fluide), soit environ 1g/kg d'éthanol chaque jour. Ces valeurs correspondent à celles relevées par Legastelois *et al.* (2014) (pour des boissons contenant 3 à 6 % d'éthanol) chez la souris Swiss femelle. Un effet du temps est relevé (ANOVA à mesures répétées : effet temps $F_{(5,70)}= 0.24$, $p<0.05$), mais aucun effet significatif de la tDCS n'a été noté (effet groupe $F_{(1,14)}= 0.42$, $p>0.05$; effet temps x groupe $F_{(5,70)}= 0.85$, $p>0.05$; figure 11.4 B).

11.4.2 tDCS et préférence de place conditionnée par l'éthanol

Nous avons par la suite évalué l'impact de notre protocole de stimulations répétées sur la préférence de place conditionnée pour l'éthanol, ceci pour deux doses.

Cette étude a été menée sur 4 groupes de souris stimulées par tDCS active ou sham, puis réalisant le test comportemental soit 4 semaines (dose de 1 g/kg), soit 5 semaines (dose de 2 g/kg) après (figure 11.5 A).

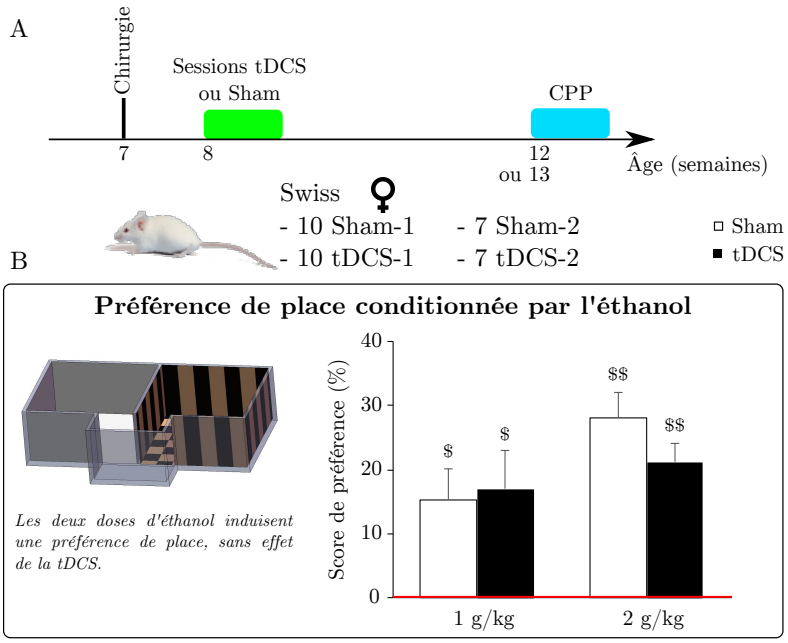


FIGURE 11.5 – A/ Protocole expérimental et B/ résultats obtenus dans le test de préférence de place conditionnée par l'éthanol. Sham-1 ou tDCS-1 : souris ayant reçu les stimulations sham ou anodiques, puis réalisant le CPP pour une dose d'éthanol de 1 g/kg 4 semaines après. Sham-2 ou tDCS-2 : souris ayant reçu les stimulations sham ou anodiques, puis réalisant le CPP pour une dose d'éthanol de 2 g/kg 5 semaines après. $^{\$}$ $p<0.05$, $^{\$\$}$ $p<0.01$ *versus* 0 % (représenté par une barre rouge sur l'histogramme).

Quel que soit le groupe, les souris ont exprimé une préférence de place conditionnée ($p<0.05$ et $p<0.01$ *versus* 0 % pour les doses de 1 ou de 2 g/kg, respectivement). Une ANOVA factorielle ne révèle d'effet ni de la dose (effet dose : $F_{(1,30)}= 2.9$, $p>0.05$) ni de la tDCS (effet groupe $F_{(1,30)}= 0.26$; effet dose x groupe $F_{(1,30)}= 0.77$, tous deux $p>0.05$; figure 11.5 B).

11.4.3 tDCS et rechute en auto-administration

Dans le cadre de notre collaboration avec le GRAP, je me suis rendue en stage à Amiens où nous avons évalué l'impact de la tDCS dans le test d'auto-administration, qui permet d'évaluer plusieurs critères associés à l'addiction chez le rongeur (Deroche-Gamonet *et al.*, 2004).

Pour étudier cette question, nous avons mis en place le protocole suivant (figure 11.6 A)) :

- Libre choix : pour les habituer au goût de l'alcool, 54 souris Swiss ont eu accès en libre choix (à l'animalerie) à deux biberons, l'un contenant de l'eau et l'autre une solution d'alcool dont la concentration a été augmentée progressivement (6, 10, puis 20 %) sur deux semaines ;
- Auto-administration : pendant 6 semaines, les souris ont appris à fournir un travail selon un ratio fixe (FR1 ou FR2 : 1 ou 2 *nose-pokes*) pour obtenir une dose d'alcool (Cf. matériel et méthodes, section 6.5.3) ;
- Stimulations transcrâniennes : les 22 plus "grandes buveuses" (souris ayant demandé le plus grand nombre de doses d'alcool en FR2 lors de l'étape précédente) ont été sélectionnées, ont subi la chirurgie, et un traitement par stimulations sham ou anodiques ;
- Extinction du comportement d'auto-administration : à la fin des stimulations les souris ont été replacées dans le dispositif, mais sans accès à l'alcool quel que soit le travail fourni. Cette phase a été maintenue jusqu'à ce que les souris atteignent un niveau bas et stable de *nose-pokes* dans la fenêtre active (soit 4 semaines) ;
- Rechute : Afin de déclencher la reprise du comportement de recherche d'alcool (*nose-pokes*), une dose (en libre accès) a été donnée aux souris en début de session d'auto-administration, puis leur comportement a été mesuré sur une session classique en FR2. La ré-acquisition du comportement d'auto-administration a ainsi été mesurée pendant 2 semaines.

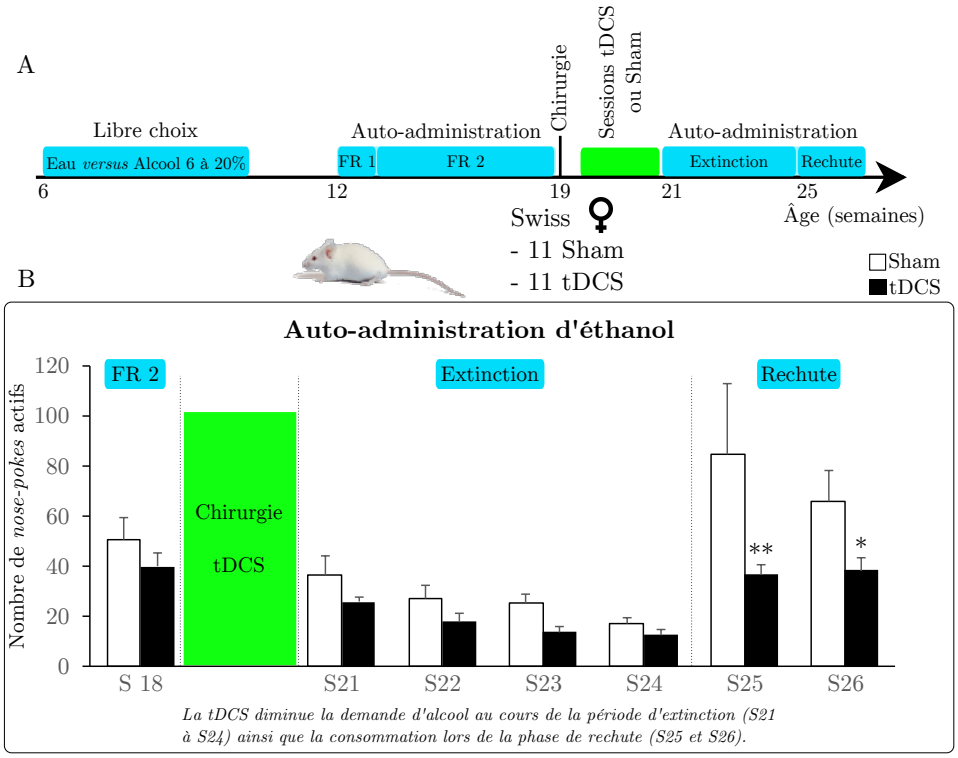


FIGURE 11.6 – A/ Protocole expérimental. Les souris ont été habituées au goût de l'alcool (libre choix) puis au dispositif d'auto-administration pendant 6 semaines. Les 22 plus grandes buveuses ont été sélectionnées et réparties dans les groupe Sham ou tDCS. FR1, FR2 : ratio fixe de 1 ou 2. B/ Principaux résultats obtenus dans le test d'auto-administration d'éthanol au cours des sessions d'extinction et de rechute. * $p<0.05$, ** $p<0.01$ *versus* Sham.

Avant traitement par tDCS, les 22 souris réalisant le plus de *nose-pokes* ont été sélectionnées. Elles ont été placées en sevrage forcé (pas de session d'auto-administration pendant les deux semaines d'opération et tDCS), puis ont subi une extinction du comportement opérant.

De manière générale, nos résultats montrent une diminution de la consommation d'alcool chez les souris ayant reçu la tDCS (ANOVA à mesures répétées sur les sessions S21 à S26 : effet groupe $F_{(1,20)}= 5.66$, $p<0.05$). L'analyse post-hoc de Newman-Keuls montre une différence significative entre les deux groupes pendant les deux semaines de rechute (S25 et S26), les souris tDCS fournissant significativement moins de demandes pour obtenir de l'alcool que les souris Sham (NK, $p<0.05$; figure 11.6 B).

11.4.4 tDCS et sensibilisation locomotrice à l'éthanol

Toujours dans le cadre de notre collaboration avec le GRAP, nous avons testé l'impact de la tDCS sur la sensibilisation aux effets locomoteurs de l'éthanol. Rappelons que la sensibilisation comportementale décrit, après un traitement chronique, une réponse de plus en plus intense à une administration de drogue.

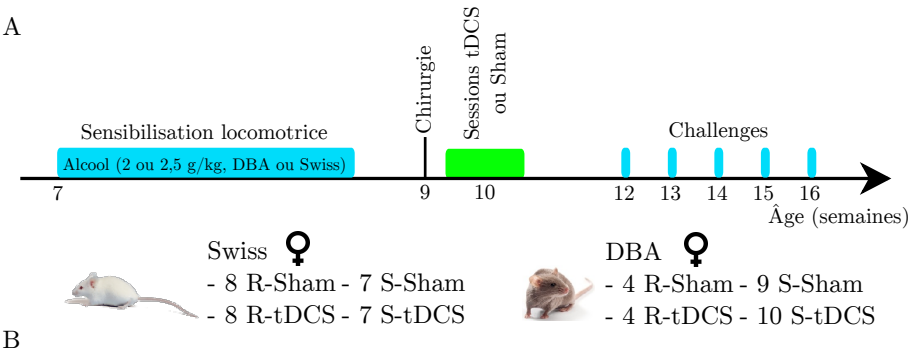
Nous avons testé la sensibilisation locomotrice à l'éthanol chez des souris Swiss et des souris DBA/2J, ces dernières ayant été choisies pour leur forte propension à la sensibilisation à l'éthanol (Phillips *et al.*, 1994 ; Melón et Boehm, 2011).

Dans cette étude :

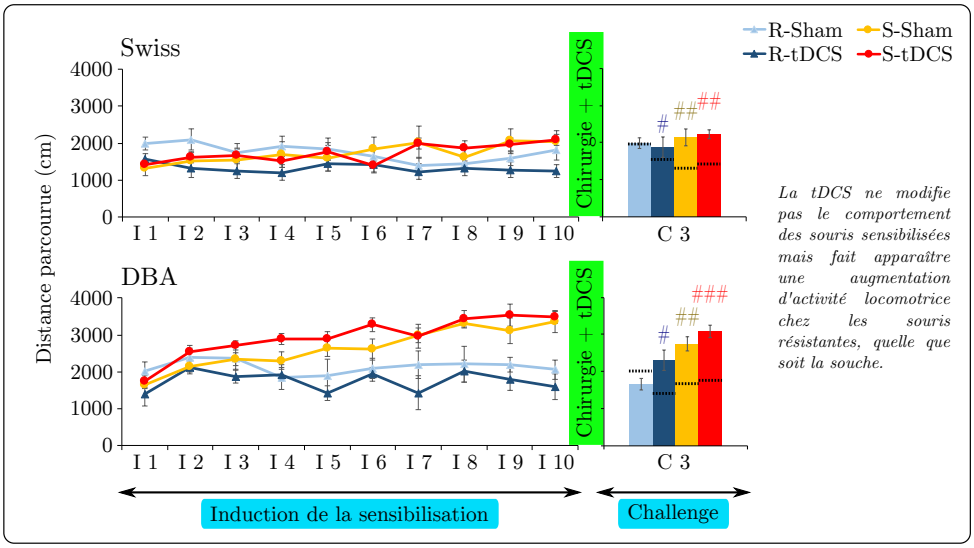
— les souris ont d'abord suivi le protocole de sensibilisation locomotrice, avec un groupe contrôle par souche (sans injection d'éthanol) ;
— le score de sensibilisation de chaque souris a été calculé ;
— les souris ont ensuite subi la chirurgie, et un traitement par stimulations sham ou anodiques pour atteindre les effectifs décrits ci-après (figure 11.7 A) ;
— puis elles ont subi 5 challenges (5 injections d'éthanol séparées d'une semaine d'intervalle), le premier 1 semaine après la fin des stimulations (soit après 3 semaines sans alcool).

Pour commencer, deux profils ont été définis pour chaque souche à partir du score de sensibilisation (section 6.5.4) : profil Résistant (R) à la sensibilisation (pas d'augmentation de l'activité locomotrice entre la première injection d'éthanol et la dixième) ou Sensibilisé (S, augmentation significative au cours des injections). Comme décrit dans la littérature, la sensibilisation a été plus importante chez les souris DBA (8 résistantes pour 19 sensibilisées) que chez les Swiss (16 résistantes pour 14 sensibilisées). À la suite de l'induction de la sensibilisation (injection quotidienne d'éthanol), les souris ont été opérées et réparties équitablement dans les groupes Sham ou tDCS. Les injections dites "Challenge" (expression de la sensibilisation) ont commencé deux semaines après les stimulations (figure 11.7 A).

A



B



La tDCS ne modifie pas le comportement des souris sensibilisées mais fait apparaître une augmentation d'activité locomotrice chez les souris résistantes, quelle que soit la souche.

C

Groupe		C1	C2	C3	C4	C5
SWISS	R-Sham	Ø	Ø	Ø	Ø	Ø
	R-tDCS	Ø	#	#	#	Ø
	S-Sham	#	##	##	#	##
	S-tDCS	###	###	##	###	Ø
DBA	R-Sham	Ø	Ø	Ø	Ø	Ø
	R-tDCS	Ø	#	#	Ø	Ø
	S-Sham	###	##	##	###	###
	S-tDCS	##	###	###	###	##

Différence d'activité locomotrice pour chaque challenge comparée au premier jour d'injection d'éthanol (I 1). Les différences importantes (hausse d'activité locomotrice chez des souris auparavant résistantes) sont représentées en rouge.

FIGURE 11.7 – A/ Protocole expérimental débutant par une induction de la sensibilisation (I 1 à I 10) à l'éthanol. Les souris ont été classées selon leur profil (R : Résistante ou S : Sensibilisée) puis opérées et traitées par stimulations actives ou Sham (4 groupes par souche : R-Sham, R-tDCS, S-Sham, S-tDCS). Elles ont alors reçu 5 injections d'éthanol espacées d'une semaine (Challenge, C 1 à C 5). B/ Résultats obtenus pour l'induction de la sensibilisation et le challenge 3. La ligne en pointillés représente l'activité locomotrice à I 1 pour chaque groupe. C/ Table récapitulant les différences significatives entre chaque challenge et I 1 pour chaque groupe. # $p<0.05$, ## $p<0.01$ et ### $p<0.001$ *versus* I 1.

Souris Swiss : une ANOVA à mesures répétées (facteur intra : injections (I 1, I 10, et C 1 à C 5) ; facteurs inter : caractéristique (R ou S) et groupe : tDCS ou Sham) montre une interaction injections x caractéristique ($F_{(6,156)}$= 4.33 ; p<0.001)), sans effet du groupe.

Les souris Sham résistantes ne voient jamais leur activité locomotrice augmenter au cours des différents challenges. En revanche, les souris R-tDCS expriment une augmentation significative de leur activité locomotrice en réponse à l'éthanol lors des challenges 2, 3 et 4 (NK : p<0.05 ; figure 11.7 B, C).

Les souris déterminées comme sensibilisées quant à elles continuent à exprimer une activité locomotrice plus élevée (que lors de le première injection) en réponse aux cinq challenges effectués quel que soit leur groupe.

Souris DBA : Une ANOVA a été réalisée bien que l'effectif des DBA résistantes soit faible ; nos résultats statistiques devront donc être nuancés. L'ANOVA (mêmes facteurs que précédemment) montre une interaction injections x caractéristique ($F_{(6,138)}$= 7.09 ; p<0.001), et une interaction injections x groupe ($F_{(6,138)}$= 2.42 ; p<0.05).

Comme chez la souche Swiss, les souris R-Sham ne voient jamais leur activité locomotrice augmenter au cours des différents challenges (NK : p>0.05). À l'inverse, les R-tDCS expriment une activité locomotrice plus élevée (qu'à I 1) en réponse à l'éthanol lors des challenges 2 et 3 (NK : p<0.05 ; figure 11.7 B, C).

Enfin, chez les DBA non plus la tDCS n'a pas d'impact sur le comportement des souris sensibilisées.

Nos résultats révèlent donc qu'un traitement par tDCS anodique sur des souris sensibilisées à l'éthanol ne corrige pas leur réponse locomotrice exacerbée.

En revanche, ce traitement chez des souris résistantes a pour effet de provoquer une augmentation de leur réponse locomotrice en réponse à une injection d'éthanol (aux alentours de 3 semaines après les stimulations). Il reste cependant délicat de parler d'apparition d'une sensibilisation, puisque cet effet ne semble pas perdurer.

11.4.5 Discussion

La tDCS ne semble pas modifier la consommation spontanée et l'effet appétitif de l'éthanol chez la souris

Nos premières études ont porté sur la consommation spontanée d'alcool ou l'effet appétitif de cette drogue chez la souris Swiss. Nos résultats semblent indiquer que la tDCS n'a pas d'effet sur ces paramètres comportementaux ; cependant, plusieurs limites sont à relever.

Tout d'abord, nous avons effectué ces tests chez la souris Swiss, cette souche n'étant pas caractérisée comme étant une "grande buveuse" contrairement à d'autres souches telles que les souris consanguines des familles C57/C58 (Yoneyama *et al.*, 2008).

Ensuite, pour des raisons techniques, ces deux études ont été réalisées de 4 à 6 semaines après la fin des stimulations. Afin de pouvoir définitivement conclure à une absence de bénéfice de la tDCS, il sera important de réaliser des tests plus tôt après le traitement.

Enfin, en ce qui concerne le test de consommation spontanée d'alcool, notons que nous avons utilisé une dose d'alcool n'induisant pas une forte consommation chez les souris Swiss, ni en pourcentage de consommation, ni en quantité d'alcool pur ingéré. Les valeurs que nous avons relevées sont concordantes à celles retrouvées dans la littérature (Legastelois *et al.*, 2014), et il sera intéressant de vérifier si un effet de la tDCS apparaît pour des doses incitant à une plus forte consommation (boisson contenant 10 ou 20 % d'éthanol). De même, l'étude pourra être menée sur un modèle d'exposition intermittente à l'alcool (alcool présenté à la place de l'eau pendant plusieurs heures, de nuit, durant une période définie). Il a été montré que ce type d'exposition, chez la souris C57BL/6J notamment, permet de faire atteindre aux animaux une concentration d'éthanol dans le sang suffisante pour que l'alcool ait des effets physiologiques et/ou comportementaux (contrairement au test de libre choix, qui ne permet en général pas d'atteindre ces niveaux d'éthanol sanguin ; Rhodes *et al.* (2005)).

En parallèle, il sera intéressant d'étudier l'effet de la tDCS chez des souris exposées à de fortes doses d'alcool pendant leur adolescence (modèle qui cherche à reproduire le phénomène de *"binge drinking"*, ou "biture express"). En effet, il a été montré que ce mode de consommation d'alcool pendant l'adolescence constitue un facteur de risque de développer une consommation abusive d'alcool, y compris chez le rat (avec une augmentation de la consommation d'alcool en libre-choix et de la motivation à s'en procurer dans un test d'auto-administration, Alaux-Cantin *et al.* (2013)).

La tDCS diminue la consommation d'éthanol dans le test d'auto-administration

Le principal objectif de notre collaboration avec le GRAP était d'étudier l'impact de la tDCS sur le comportement de souris dans un test d'auto-administration d'éthanol.

Nos résultats indiquent qu'à la suite d'un sevrage forcé d'alcool (avec extinction du comportement d'auto-administration), les animaux stimulés par tDCS présentent une ré-acquisition significativement plus faible du comportement d'auto-administration d'alcool lorsque la substance est à nouveau disponible.

Ceci vient appuyer des résultats publiés chez l'Homme qui montrent qu'une ou plusieurs sessions de tDCS anodique au niveau du cortex préfrontal dorsolatéral réduit l'envie impérieuse de consommer de l'alcool chez des patients alcoolo-dépendants abstinents depuis plus ou moins longtemps (Boggio *et al.*, 2008c ; da Silva *et al.*, 2013). Si Klauss et ses collaborateurs n'ont pas retrouvé ces effets sur le *craving*, ils ont en revanche pu montrer une réduction du risque de rechute après des sessions répétées de tDCS bilatérale sur le CPFDL (Klauss *et al.*, 2014). Ces études, ainsi que nos résultats, suggèrent que la tDCS pourrait se révéler particulièrement bénéfique chez des patients alcoolo-dépendants sevrés à risque de rechute.

D'autres tests doivent être réalisés afin de confirmer les effets bénéfiques de la tDCS comme aide au sevrage pour les sujets dépendants. Les résultats présentés ici ont été obtenus sur une population de souris caractérisées comme « grandes buveuses ». Il serait désormais intéressant de vérifier si la tDCS a un effet bénéfique sur les différents paramètres évalués par le test d'auto-administration sur une population d'animaux rendus dépendants par inhalation chronique de vapeurs d'alcool (Aufrère *et al.*, 1997), modèle qui est mis en place au sein du GRAP.

Par ailleurs, nos résultats concernent les 6 semaines suivant les stimulations. Il serait important de vérifier sur quelle durée s'inscrivent ces effets, et si une ou plusieurs stimulations ultérieures permettraient de les prolonger.

L'effet de la tDCS sur la sensibilisation comportementale

En ce qui concerne le test de sensibilisation locomotrice, nous obtenons une augmentation de la réponse à l'éthanol après des sessions répétées de tDCS. En effet, chez les souris résistantes, la tDCS induit une augmentation de l'activité locomotrice consécutive à une injection de drogue. Cette aug-

mentation est temporaire (puisque n'est retrouvée que dans les deux à quatre semaines après la tDCS, et pas après), alors que la sensibilisation est censée être un phénomène pouvant durer des mois voire plus d'un an. Ceci soulève plusieurs points intéressants.

De prime abord ce résultat semble contredire les études publiant des effets bénéfiques de la tDCS chez des patients alcoolo-dépendants ; en effet, la sensibilisation comportementale refléterait des modifications neuronales aboutissant à des comportements exacerbés de recherche de drogue.

Robinson et Berridge, les auteurs qui ont proposé la théorie de la sensibilisation incitatrice en 1993, exposent cependant que la sensibilisation des circuits cérébraux impliqués dans le désir pour la drogue peut apparaître sans modification des circuits impliqués dans les effets liés à l'hédonicité (plaisir, effets agréables des drogues) (Robinson et Berridge, 1993, 2001). Ceci appuie le fait que le plaisir lié à la drogue n'augmente pas forcément (voire diminue pour une même dose : phénomène de tolérance) au fil des expositions.

Le deuxième point à soulever est qu'il a été indiqué à plusieurs reprises chez la souris que celles consommant le plus d'éthanol (quand proposé en libre choix) étaient aussi les moins vulnérables au développement d'une sensibilisation locomotrice à l'éthanol. Ceci a notamment été démontré par Legastelois *et al.* (2014) chez la souris Swiss ; les auteurs émettent l'hypothèse que l'augmentation de la réponse aux effets stimulants de l'éthanol (sensibilisation) conduit à une diminution de la consommation de cette drogue qui pourrait être un facteur protecteur contre une prise excessive d'alcool. Selon ces auteurs, la résistance à la sensibilisation serait au contraire un facteur de vulnérabilité face à la consommation d'alcool.

De même, la régulation de certains facteurs neurobiologiques aurait des effets opposés selon que l'on s'intéresse au processus de sensibilisation ou de consommation d'éthanol : on observe une augmentation de la consommation d'alcool mais une absence de sensibilisation chez des souris déficientes en neuropeptide Y (impliqué dans la réponse à l'alcool), et l'inverse chez des souris mutantes n'exprimant pas le transporteur de la dopamine (permettant sa recapture dans la fente synaptique)(Legastelois *et al.*, 2014). Ainsi, les mécanismes de régulation de ces deux types de comportement se baseraient sur des substrats neurobiologiques différents.

Conclusion

Nos résultats, notamment dans le test d'auto-administration, viennent appuyer les études encourageantes menées chez l'Homme. La stimulation par

courant continu semble être un outil prometteur pour l'aide au sevrage des patients alcoolo-dépendants et la diminution du risque de rechute.

11.5 Effets de la tDCS chez des souris exposées à la cocaïne

La majorité des travaux s'intéressant aux effets de la tDCS chez des sujets dépendants se cantonne au domaine des addictions au tabac et à l'alcool. Les effets potentiels de la tDCS chez les sujets dépendants à des psychostimulants tels que la cocaïne ont été peu étudiés, et les mécanismes qui pourraient expliquer ces effets ainsi que les zones cérébrales impliquées restent inconnus.

Les altérations de la régulation génique intervenant après une exposition à la cocaïne ont été particulièrement recherchées chez l'animal. En effet, des boucles de régulation spécifiques entre le cortex et le striatum (circuits cortico-striataux) jouent un rôle critique dans plusieurs aspects de l'addiction tels que le processus de récompense, la formation d'habitudes anormales, et les comportements compulsifs (Steiner et Van Waes, 2013 ; Everitt, 2014).

Ainsi, nous avons cherché à vérifier si notre protocole de stimulation par tDCS a un impact sur les comportements associés à la prise de cocaïne, et si les éventuels effets de la tDCS s'accompagnent d'une régulation de l'expression génique au niveau de ces circuits cortico-striataux.

11.5.1 Les ganglions de la base

Les ganglions de la base - ou noyaux gris centraux - font partie des régions télencéphalique et diencéphalique. Ces noyaux sous-corticaux comprennent le striatum (noyau caudé et putamen), le globus pallidus, le noyau sous-thalamique et la substance noire.

Le striatum reçoit des entrées excitatrices en provenance du cortex et des structures limbiques (et indirectement, en provenance du tronc cérébral *via* le thalamus) et en retour renvoie des signaux inhibiteurs (figure 11.8 A). Les régions corticales impliquées sont engagées dans les émotions, la cognition, mais aussi les processus de motivation et de contrôle sensori-moteur du comportement (Redgrave *et al.*, 2011).

Ces réseaux sont disposés en boucles de régulation parallèles, topographiquement organisées : le striatum est divisé en territoires fonctionnels déterminés par leurs afférences corticales, et comporte des parties motrice, associative et limbique. Ces aires ont été définies par des études de traçage de voies, d'électrophysiologie, et d'imagerie (e.g. : Willuhn *et al.* (2003)).

La partie dorsale du striatum reçoit des projections sensori-motrices (figure 11.8 B) et est donc impliquée préférentiellement dans les fonctions motrices. C'est la partie ventrale (noyau accumbens) qui joue un rôle dans les processus motivationnels et l'addiction. Mais en réalité, la ségrégation fonctionnelle n'est pas si stricte entre ces deux structures. L'exposition répétée à une drogue entraîne une transition de l'implication des circuits cortico-striataux ventraux (incluant le noyau accumbens) vers des circuits dorsaux (incluant le striatum dorso-latéral). Cette transition refléterait le passage d'un usage de drogue récréatif à un usage habituel (Corbit *et al.*, 2012 ; Belin-Rauscent *et al.*, 2012 ; Belin *et al.*, 2013), qui pourrait marquer l'entrée dans un état de dépendance.

L'expression génique est effectivement altérée par l'usage de drogues plutôt dans la partie dorsale du striatum (Willuhn *et al.*, 2003). Cette région est impliquée dans l'apprentissage de comportements habituels (insensibles à la dévaluation de la récompense) (Balleine et O'Doherty, 2010) et sa dérégulation (la formation d'un apprentissage anormal) serait responsable de la nature compulsive de la prise de drogue (Everitt, 2014).

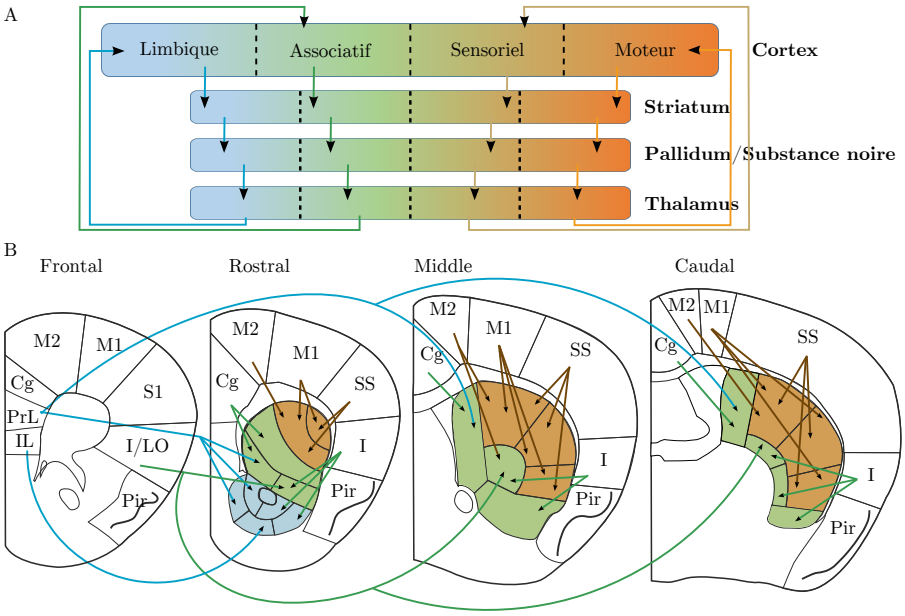


FIGURE 11.8 – A/ Organisation simplifiée des boucles de régulation cortico-striatales, adaptée du site www.reliawire.com/basal-ganglia/. Les projections corticales définissent des territoires fonctionnels au niveau des ganglions de la base, décrivant des boucles parallèles limbique, associative et sensori-motrice. B/ Schéma des boucles chez la souris telles que définies par Willuhn *et al.* (2003) (4 niveaux de coupe). Les régions du cortex (IL, infralimbique ; PrL, prélimbique ; Cg, cingulaire ; M2/M1, moteur secondaire/primaire ; S1, somatosensoriel primaire ; SS, somatosensoriel ; I/LO, insulaire/orbitaire latéral ; I, insulaire ; Pir, piriforme) projettent sur des territoires spécifiques du striatum (détaillés dans la figure 7.2, p. 100). Les aires et flèches bleues décrivent la partie limbique, les vertes la partie associative, et les marron la partie sensori-motrice. Pour simplifier, les projections sont représentées sur un même plan de coupe bien qu'elles soient en fait étendues sur un plus large plan rostro-caudal ; de même, les projections bilatérales ne sont pas représentées.

11.5.2 Cocaïne et *Zif268*

L'exposition à des agents pharmacologiques, tels que des psychostimulants, entraîne l'expression rapide et transitoire de facteurs de transcription (gènes précoces). Ces gènes se lient à des sites spécifiques de l'ADN, orchestrant la cascade de modifications induites par l'agent ; ils sont soupçonnés d'être à l'origine des effets à long terme des drogues (Bhat *et al.*, 1992).

Zif268 est un de ces facteurs de transcription immédiats. Contrôlant l'ex-

pression de gènes qui induisent des modifications structurales et fonctionnelles au sein des tissus où ils sont exprimés, c'est une cible intéressante pour étudier la réponse des neurones à divers stimuli. En effet, en plus de servir de marqueur d'activité (permettant une cartographie des zones répondant à un stimulus), il est connu notamment pour jouer un rôle dans la plasticité cérébrale (capacité qu'ont les neurones à s'adapter à des modifications de leur environnement ; Knapska et Kaczmarek (2004)).

Sur-exprimé suite à une exposition à des psychostimulants, *Zif268* serait un médiateur des changements induits par les drogues au niveau neuronal. Après une injection de cocaïne, l'expression de l'ARNm augmente jusqu'à atteindre un pic entre 30 et 60 minutes, puis diminue progressivement jusqu'à son niveau basal dans les 3 heures suivantes (Bhat *et al.*, 1992). La répartition de son expression au niveau du cortex et du striatum varie en fonction de la drogue administrée, ce qui refléterait les effets spécifiques de chaque drogue sur le système monoaminergique.

11.5.3 tDCS et impact d'une exposition aiguë à la cocaïne

La cartographie des effets de la cocaïne au niveau cérébral est désormais bien décrite chez l'animal (Willuhn *et al.*, 2003 ; Steiner et Van Waes, 2013). En collaboration avec l'équipe du Pr. Steiner de la *Chicago Medical School* (États-Unis) spécialisée dans la recherche sur les psychostimulants, nous avons cherché à évaluer l'impact de la tDCS sur les effets comportementaux et neurobiologiques d'une injection aiguë de cocaïne.

Notre objectif était d'évaluer si un pré-traitement par tDCS modifie la réponse motrice et l'expression de *Zif268* après une injection aiguë de cocaïne. Ces tests ont été réalisés 3 semaines après la fin des stimulations, puisque dans notre premier article (Pedron *et al.*, 2014) nous avions montré des effets comportementaux robustes après ce délai.

Cette étude fait l'objet de la première partie de notre troisième article, en annexe C (Pedron *et al.*, 2016).

Pour répondre à cette question, nous avons commencé par administrer un traitement par stimulations anodiques répétées (0.2 mA, 20 minutes ; 2 fois/jour pendant 5 jours) ou sham à des souris femelles de souche Swiss âgées de 8 semaines. Trois semaines après la fin de ce traitement, les souris ont reçu une injection de cocaïne ou de solvant selon la répartition suivante :

— Injection de solvant (Veh) : Sham-Veh (N=8) et tDCS-Veh (N=6)

— Injection de 5 mg/kg de cocaïne : Sham-5 (N=9) et tDCS-5 (N=10)
— Injection de 10 mg/kg de cocaïne : Sham-10 (N=9) et tDCS-10 (N=10)
— Injection de 25 mg/kg de cocaïne : Sham-25 (N=8) et tDCS-25 (N=8)

Immédiatement après l'injection, l'activité locomotrice des souris a été analysée dans un *open field* pendant 40 minutes. Les souris ayant reçu une injection de solvant ou de 25 mg/kg de cocaïne ont été sacrifiées par inhalation de CO_2 et leurs cerveaux ont été récupérés et analysés par hybridation *in situ* (figure 11.9 A). Les souris Sham-25 et tDCS-25 ont été choisies car c'est la dose pour laquelle un effet comportemental de la tDCS a été relevé.

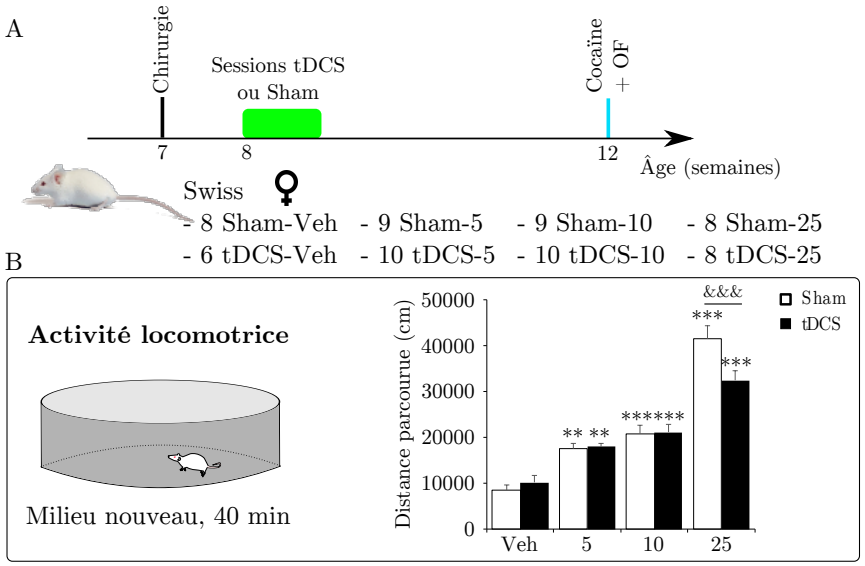


FIGURE 11.9 – A/ Protocole expérimental. Sham-Veh ou tDCS-Veh : souris traitées par stimulations inactives ou anodiques puis au solvant (NaCl + acide ascorbique) ; Sham/tDCS-5, -10 ou -25 : souris traitées par stimulations inactives ou anodiques puis à la cocaïne (injection unique de 5, 10 ou 25 mg/kg). B/ Résultats obtenus dans le test de l'*open field* (OF). ** $p<0.01$ et *** $p<0.001$ *versus* Veh respectif ; $^{\&\&\&}$ $p<0.001$ *versus* Sham.

Concernant le test d'activité locomotrice, une ANOVA à deux facteurs (facteurs inter : groupe (Sham ou tDCS) et drogue (Veh, 5, 10 ou 25) révèle un effet de l'interaction groupe x drogue ($F_{(3,59)}= 3.87$; $p<0.05$). Une injection de cocaïne augmente significativement la distance parcourue pendant 40 minutes dans un *open field* pour une dose de 5 (NK : $p<0.01$), 10 ou 25 mg/kg (NK : $p<0.001$).

La tDCS n'a aucun effet sur l'activité locomotrice des souris traitées au solvant ou par des doses faibles (5 et 10) de cocaïne. En revanche, l'impact d'une dose élevée de cocaïne sur la locomotion est significativement diminué chez les souris traitées par stimulations anodiques (comparé aux souris Sham-25, NK : $p<0.001$; figure 11.9 B).

La cartographie des zones cérébrales activées par la tDCS et/ou la cocaïne a été réalisée selon le découpage présenté dans l'article et dans la section 7.2.

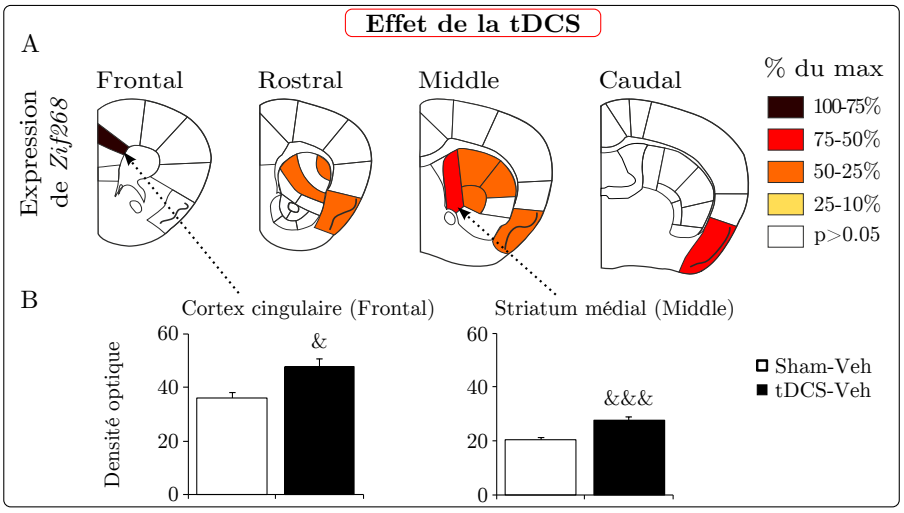


FIGURE 11.10 – Topographie des effets de la tDCS 3 semaines après les stimulations. A/ Distribution de l'augmentation d'expression de *Zif268* (différence de signal tDCS-Veh - Sham-Veh pour chaque zone). Les secteurs où l'augmentation est significative sont colorés comme indiqué. Le dégradé représente les valeurs relatives par rapport à l'augmentation maximum (mesurée dans le cortex cingulaire au niveau frontal). B/ Densité moyenne de l'expression de *Zif268* relevée dans le cortex cingulaire (Frontal) et le striatum médial (Middle). $^{\&}$ $p<0.05$ et $^{\&\&\&}$ $p<0.001$ *versus* Sham.

Le premier résultat que nous pouvons mettre en avant est que malgré le décalage de l'embase (sur le cortex gauche), aucune différence dans l'expression de *Zif268* n'a été relevée entre l'hémisphère gauche et l'hémisphère droit des souris, que ce soit pour l'effet de la tDCS ou celui de la cocaïne (ANOVA trois facteurs (hémisphère, groupe et drogue) : facteur hémisphère seul ou interaction toujours $p>0.05$). Les données issues des deux hémisphères ont

donc été moyennées pour le reste de l'étude.

L'effet de la tDCS chez les animaux traités au solvant est représentée dans la figure 11.10 ; notons que le dégradé présente quelques différences avec celui exposé dans l'article en annexe C puisque ici nous ne représentons plus seulement le striatum, mais aussi le cortex (l'effet maximal de la tDCS sur *Zif268* se retrouve donc au niveau du cortex cingulaire frontal, et non du striatum médial).

En comparant les coupes des animaux Sham-Veh et tDCS-Veh, nous pouvons remarquer que la tDCS augmente l'expression de *Zif268* dans 4 zones corticales (cortex cingulaire au niveau frontal et piriforme aux niveaux rostral, middle et caudal) et 6 zones striatales (rostral : striatum dorsolatéral et dorsomédial ; middle : striatum médial, dorsal, dorsolatéral et central).

Puisque la tDCS a un effet sur l'expression de *Zif268*, nous avons mesuré les effets de la cocaïne à partir de valeurs relatives (pourcentage de variation par rapport au groupe contrôle : Sham-Veh ou tDCS-Veh). Les résultats sont présentés dans la figure 11.11.

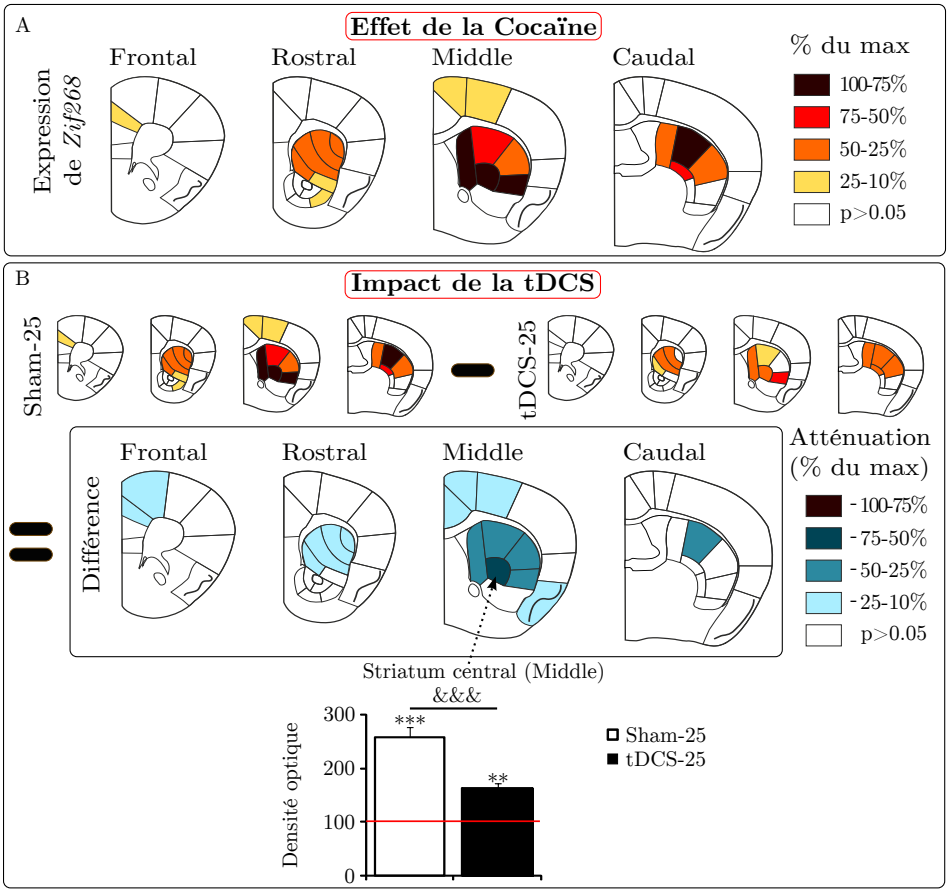


FIGURE 11.11 – Topographie des effets de la cocaïne et de la tDCS. Ici les valeurs représentées sont relatives (pourcentage de variation par rapport au groupe contrôle). A/ Distribution de l'augmentation d'expression de *Zif268* 40 minutes après une injection de cocaïne (souris Sham-25). B/ Différence entre Sham-25 et tDCS-25. Dans ces deux groupes, l'expression de *Zif268* est augmentée de manière différente. La différence entre les deux est exprimée en pourcentage d'atténuation par la tDCS (dégradé bleu) par rapport au maximum observé (au niveau Middle, région du striatum central chez les Sham-25). C/ Densité moyenne de l'expression de *Zif268* relevée dans le striatum central (Middle) et exprimée en pourcentage du groupe contrôle. ** $p<0.01$ et *** $p<0.001$ *versus* contrôle respectif (Veh = 100 %, axe rouge) ; $^{\&\&\&}$ $p<0.001$ *versus* Sham.

Une augmentation de l'expression de *Zif268* consécutive à l'injection de cocaïne (25 mg/kg) se retrouve principalement dans le striatum. Chez les souris ayant reçu le traitement par stimulations répétées trois semaines avant l'exposition à la cocaïne, un nombre moins important de zones sont affectées

par la drogue (tableau 11.1).

	Sham-25	tDCS-25
Cortex	3	0
Striatum	15	11

TABLE 11.1 – Nombre de zones où l'expression de *Zif268* est significativement augmentée (par rapport au groupe contrôle) par l'exposition à la cocaïne.

Par ailleurs une comparaison statistique directe entre les deux groupes de souris ayant reçu la cocaïne montre une atténuation significative de l'expression de *Zif268* par la tDCS dans 10 zones striatales et 6 zones corticales. Ces zones sont représentées en dégradé bleu dans la figure 11.11.

Pour finir, l'effet de la tDCS et de la cocaïne sur l'expression de *Zif268* a été étudié par des analyses de corrélation entre les secteurs striataux et leurs afférences corticales (telles que définies ci-avant). Nos résultats montrent une corrélation positive (test de Pearson : effet de la tDCS chez les animaux Veh : $r=0.415$, $p<0.05$; et chez les animaux traités par cocaïne : $r=0.627$, $p<0.001$). Ainsi, les changements induits par la tDCS interviennent dans des boucles de régulation cortico-striatales spécifiques.

11.5.4 tDCS et préférence de place conditionnée par la cocaïne

Au vu de nos résultats précédents, nous avons cherché à voir si la tDCS diminue également les effets de la cocaïne dans le test de préférence de place conditionnée. En effet, il a été montré que l'expression de *Zif268* est nécessaire à l'établissement d'une préférence pour le compartiment associé à la cocaïne (Valjent *et al.*, 2006).

Aussi, nous avons soumis un lot de souris Swiss à un traitement par tDCS (active ou sham) et, trois semaines après la fin des stimulations, nous avons effectué un test de CPP pour les doses de drogue précédemment étudiées (Veh, 5, 10 et 25 mg/kg). Ces résultats sont présentés en deuxième partie de notre article en annexe C (Pedron *et al.*, 2016) et dans la figure 11.12.

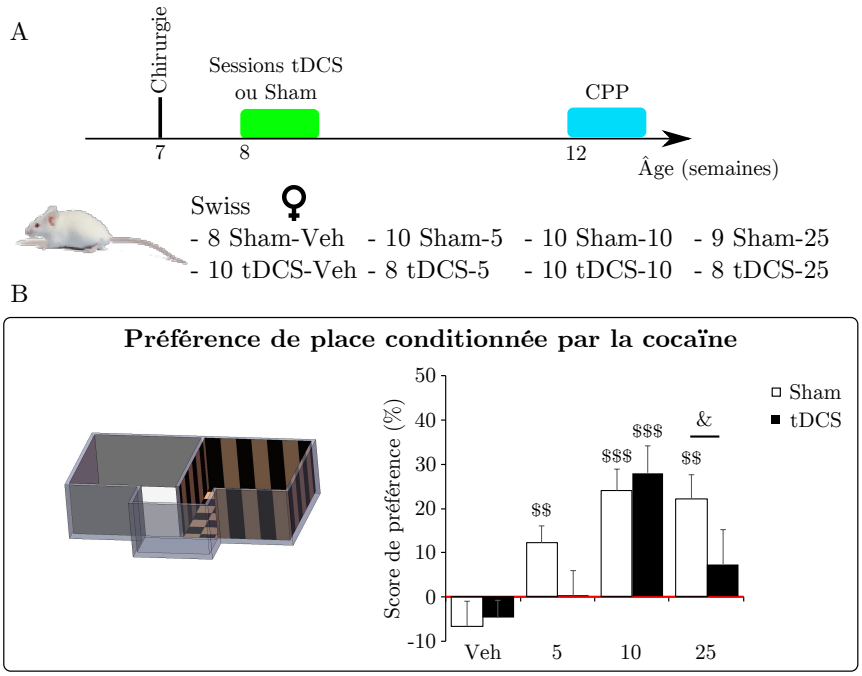


FIGURE 11.12 – A/ Protocole expérimental. CPP : test de préférence de place conditionnée ; Sham : souris traitées par stimulations inactives ; tDCS : souris traitées par stimulations anodiques ; Veh : conditionnement au solvant ; 5, 10 ou 25 : conditionnement à la cocaïne 5, 10 ou 25 mg/kg, respectivement. B/ Résultats obtenus lors de l'étude de la courbe dose-réponse dans le CPP. $^{\$\$}$ $p<0.01$ et $^{\$\$\$}$ $p<0.001$ *versus* 0 % (symbolisé par l'axe rouge) ; $^{\&}$ $p<0.05$ *versus* Sham.

Un test de comparaison de moyennes (à une valeur standard, 0 %) nous indique que le conditionnement au solvant (Veh) pendant trois jours ne modifie pas le comportement de visite des souris pendant le test (Sham-Veh : $p=0.26$ et tDCS-Veh : $p=0.25$), ceci bien que nous appliquions la méthode dite biaisée pour conditionner les souris (les souris reçoivent les injections de drogue dans le compartiment qu'elles visitaient le moins lors du premier jour de test).

Les trois doses de cocaïne induisent une préférence chez les souris Sham (Sham-5 et Sham-25 : $p<0.01$; Sham-10 : $p<0.001$ *versus* 0 %).

Les sessions répétées de tDCS suppriment la préférence pour les doses de 5 et 25 mg/kg de cocaïne ($p=0.98$ et $p=0.37$ *versus* 0 %, respectivement), mais pas pour 10 mg/kg ($p<0.001$ *versus* 0 %). Une ANOVA à 2 facteurs montre un effet groupe ($F_{(1,49)}= 4.07$, $p<0.05$) avec une différence entre Sham et tDCS pour la dose de 25 mg/kg.

11.5.5 Discussion

En conclusion, un traitement par stimulations répétées altère divers types de réponses comportementales (activité locomotrice et préférence de place conditionnée) et neurobiologique (induction de *Zif268*) faisant suite à l'injection d'une forte dose de cocaïne (25 mg/kg).

La tDCS *per se* augmente l'expression de *Zif268*

Nos résultats montrent que trois semaines après des sessions répétées de tDCS, l'expression de *Zif268* est augmentée dans plusieurs zones cérébrales (notamment dans le striatum) chez des souris n'ayant pas reçu de drogue. Ces souris avaient été sacrifiées juste après un test d'activité locomotrice en milieu non familier ; la question qui se pose est si cette augmentation représente une régulation génique à long terme (permanente) ou une réponse exacerbée (temporaire) aux conditions expérimentales.

Deuxième point, il semble que les effets de la tDCS au niveau neurobiologique ne dépendent pas strictement de la position de l'électrode : la régulation génique n'est pas limitée à l'hémisphère stimulé (le gauche), mais se retrouve de manière égale dans l'hémisphère droit. De même, les zones cérébrales affectées ne sont pas uniquement celles situées sous l'anode.

Rappelons que dans le chapitre 9 relatif à la mise en place de notre modèle animal, nous avions montré que de déplacer l'électrode de stimulation (en la plaçant à un niveau postérieur) n'affectait pas l'effet de la tDCS dans le test de la nage forcée. De plus, comme décrit dans le chapitre 10, notre protocole de tDCS entraînait une régulation de la prolifération cellulaire hippocampique identique entre les deux hémisphères. Les résultats obtenus ici tendent à confirmer que notre protocole de stimulation est non focal, et que le courant diffuserait sur une zone cérébrale plus large que celle située juste en regard de l'électrode.

Cela étant, nos études de corrélation montrent que la tDCS n'entraîne pas une augmentation globale de l'expression de *Zif268*, mais une activation ciblée de circuits cortico-striataux spécifiques (sensori-moteur et associatif). Ceci est vrai aussi bien chez les animaux ayant reçu du solvant que chez ceux ayant reçu de la cocaïne.

La tDCS atténue l'induction de *Zif268* par la cocaïne

Trois semaines après un traitement par stimulations répétées, nous observons un affaiblissement de la réponse neurobiologique induite par la cocaïne.

L'expression de *Zif268* dépendrait de l'activité dopaminergique et serait liée à l'activité de divers récepteurs, dont les récepteurs NMDA (Veyrac *et al.*, 2014). Elle représenterait ainsi l'activité synaptique en réponse à des stimuli, et *Zif268* sert de marqueur permettant de prédire les adaptations neuronales apparaissant en cas d'exposition répétée à une drogue.

Effectivement, le rôle de ce facteur a été montré dans l'établissement de la mémoire associée aux drogues : l'exposition à des indices relatifs à la prise de drogue (facteur de rechute chez des personnes dépendantes abstinentes) ou à une administration de drogue induit son expression (Valjent *et al.*, 2006).

De manière intéressante, c'est dans la partie dorsolatérale du striatum que la tDCS diminue le plus l'impact de la cocaïne sur l'expression de *Zif268*. Comme vu ci-avant, si la partie ventrale (noyau accumbens) est impliquée plutôt dans les aspects liés à la motivation et à l'addiction, la transition de l'activation de ce circuit vers l'activation de circuits incluant le striatum dorso-latéral marquerait une étape importante de l'addiction : le passage d'un usage récréatif à un usage habituel (non diminué lorsque la récompense est dévaluée) (Belin *et al.*, 2013).

Nous avons analysé l'expression de *Zif268* après une injection aiguë de cocaïne. Puisque c'est le traitement répété par une drogue qui est supposé induire une transition vers une activation des circuits dorsaux, nous pouvons nous étonner de l'effet très modeste de la cocaïne en administration aiguë au niveau du striatum ventral (la seule zone significativement affectée étant le *lateral shell*) en comparaison à nos effets dans le striatum dorsal. Ce motif d'activation a cependant déjà été montré dans d'autres études, et refléterait le fait que la cocaïne n'active l'expression de gènes précoces que dans une petite proportion de neurones au niveau du noyau accumbens (Steiner et Van Waes, 2013). La diminution de l'impact de la cocaïne dans le striatum dorsal après tDCS laisse à penser que ce pré-traitement pourrait avoir un effet protecteur contre l'activation des circuits dorsaux en cas d'exposition répétée aux drogues.

Valjent *et al.* (2006) ont montré que *Zif268* était nécessaire à la mise en place de la préférence conditionnée pour cette drogue : des souris mutantes n'exprimant pas ce facteur ne développaient pas de préférence conditionnée par la cocaïne (alors qu'elles en développaient pour un autre type de récompense, la nourriture).

Aussi l'atténuation de *Zif268* que nous observons serait cohérente avec la diminution de l'effet appétitif de la cocaïne dans le CPP. Cependant notons que nos effets apparaissent principalement dans le striatum dorsolatéral, qui ne joue pas de rôle dans l'apprentissage dans le CPP (Featherstone et

McDonald, 2004).

Dans la même étude, Valjent *et al.* (2006) démontraient que la mutation du gène codant pour *Zif268* diminuait aussi la sensibilisation locomotrice à la cocaïne ; il serait donc intéressant de tester ce paramètre comportemental après tDCS.

Pour résumer, nos résultats montrent que des sessions répétées de tDCS permettent sur le long terme de diminuer l'impact d'une injection aiguë de cocaïne (pour une forte dose) au niveau comportemental (activité locomotrice et effet appétitif de la drogue). Cet effet comportemental s'accompagne d'une régulation au niveau neurobiologique qui intervient dans des circuits cortico-striataux spécifiques (sensorimoteur et associatif), impliqués dans des aspects de prise de drogues liés aux habitudes et à la compulsion ainsi qu'à la rechute après abstinence (Steiner et Van Waes, 2013 ; Everitt et Robbins, 2005 ; Berke et Hyman, 2000 ; Fuchs *et al.*, 2006).

11.6 Conclusion de l'étude 3

En conclusion nous avons pu montrer pour la première fois dans un modèle animal que des sessions répétées de tDCS anodique diminuent les effets de plusieurs drogues aussi bien au niveau comportemental que neurobiologique.

Nous avons commencé par montrer cet effet chez des souris qui avaient subi un sevrage forcé après avoir été exposées à la nicotine à l'adolescence. À l'âge adulte, ces souris avaient un comportement de type dépressif et une préférence renforcée pour la nicotine ; le traitement par tDCS permettait de normaliser ces comportements.

Nos études suivantes nous indiquent que la tDCS diminue l'effet appétitif de certains psychostimulants (baisse de la préférence de place conditionnée pour la nicotine et la cocaïne). Concernant nos résultats dans les études sur l'alcool, des stimulations répétées entraînent à long terme une diminution du comportement de rechute dans le test d'auto-administration mais pas d'effet sur le CPP pour plusieurs doses d'éthanol.

Ceci peut s'expliquer par le fait que bien que les substances addictives agissent toutes en augmentant la concentration de dopamine extracellulaire dans le système mésocorticolimbique, leur mode d'action est variable. Celui de certaines drogues est bien déterminé ; par exemple, la cocaïne bloque la recapture de neurotransmetteurs tels que la dopamine, la sérotonine et la noradrénaline. Celui de l'alcool, en revanche, est plus difficile à cerner. L'alcool ingéré arrive au cerveau en quelques minutes, où il a un grand nombre d'ef-

fets. Il modifie les membranes neuronales, diffuse dans les cellules et modifie certaines enzymes et canaux ioniques, mais se lie aussi à plusieurs récepteurs (tels que ceux du GABA et du glutamate, Nutt (1999)). De plus, ses métabolites, tels que le salsolinol (un alcaloïde dérivé de la dopamine, produit lors du métabolisme de l'alcool), peuvent également jouer un rôle sur diverses cibles dont les neurones dopaminergiques et les récepteurs μ (Xie *et al.*, 2013).

Ainsi, ces variations dans le mode d'action des drogues pourraient expliquer l'impact différent de la tDCS en fonction de la classe de drogue considérée.

Pour terminer, rappelons que le système mésocorticolimbique naît dans l'aire tegmentale ventrale et projette sur des structures limbiques et sur le cortex frontal (Abernathy *et al.*, 2010). C'est pourquoi l'exposition répétée aux drogues ne modifie pas uniquement le système de la récompense mais également les fonctions du cortex préfrontal. La stimulation du CPFDL apparaît comme une cible d'étude intéressante si elle peut par exemple inhiber les comportements de recherche de drogue ou encore améliorer l'humeur des patients en cours de sevrage. Des études supplémentaires devront cependant être menées afin d'élucider le mécanisme d'action sous-tendant les effets bénéfiques de la tDCS sur la réponse aux drogues.

Quatrième partie

Conclusion générale

12 Discussion générale

L'objectif des travaux réalisés au cours de cette thèse était de mettre en place un modèle animal de stimulation transcrânienne par courant continu, d'étudier l'effet de ce type de stimulation sur divers aspects comportementaux, puis d'essayer d'appréhender ses mécanismes neurobiologiques.

Ainsi, nous avons appliqué cette technique chez la souris et révélé les comportements affectés par notre protocole de stimulation : des effets apparaissent dès trois semaines après la fin de 10 séances de stimulations (à raison de deux par jour pendant cinq jours consécutifs) sur les comportements associés à la dépression, à la mémoire (mémoire visuo-spatiale et mémoire de travail ; chapitre 9), et à la valeur hédonique des drogues (nicotine, alcool, cocaïne ; chapitre 11). Aucun effet de notre protocole de stimulation n'a été relevé sur la croissance (courbe de suivi pondéral), l'activité locomotrice (dans l'environnement familier ou en milieu inconnu), ou les comportements associés à l'anxiété. Nos effets sur la dépression dépendent de la polarité du courant appliqué, une stimulation par la cathode n'ayant aucun impact sur le comportement des souris dans le test de la nage forcée ; en revanche, la zone d'application de la tDCS semble avoir moins d'importance dans notre modèle murin. En effet, placer l'électrode stimulatrice (anode) sur la partie postérieure du cortex (en avant du cervelet) provoque des effets similaires à la stimulation anodique du cortex frontal des souris, probablement du fait de la diffusion du courant sur l'ensemble du cortex cérébral.

Nous avons pu mettre en évidence une augmentation de la prolifération cellulaire au niveau du gyrus denté de l'hippocampe (une zone de neurogenèse à l'âge adulte chez les mammifères) à la fin de cinq jours de stimulation (Cf. chapitre 10). Enfin, nous avons également recherché les zones cérébrales affectées par notre protocole de stimulation chez des souris exposées ou non à une injection de cocaïne *via* l'étude de l'expression du facteur de transcription *Zif268*.

12.1 Limites de notre modèle

Avant de conclure sur les effets de notre protocole de tDCS, il est important de rappeler que notre modèle animal souffre de quelques limites.

Tout d'abord, d'un point de vue purement technique, l'application du courant chez la souris diffère de ce qui est pratiqué chez l'Homme. Outre la nécessité d'une chirurgie et d'une contention répétée pour réaliser la stimulation d'animaux éveillés, quelques différences quant à l'administration de la stimulation sont à souligner.

Pour commencer, le courant est appliqué par l'intermédiaire de deux électrodes positionnées l'une sur la zone d'intérêt à stimuler (le cortex frontal), et l'autre sur le thorax ; chez l'Homme, le placement de l'électrode de référence se fait le plus souvent en position céphalique (notamment sur la région supra-orbitaire controlatérale).

Ensuite, la densité de courant appliquée est, comme nous l'avons discuté dans le chapitre 9, 100 fois supérieure à ce qui est retrouvé dans un grand nombre d'études chez l'Homme. Bien que nous restions en dessous du seuil de densité entraînant des lésions cérébrales chez le rat (Liebetanz *et al.*, 2009), des études complémentaires testant des densités de courant plus proches du modèle humain sont à réaliser.

En ce qui concerne plus spécifiquement notre modèle, la principale différence entre les données obtenues chez l'Homme et les nôtres est que les effets de la tDCS sur les comportements associés à la dépression, chez la souris, ne semblent pas dépendre de la zone stimulée. Chez l'Homme, la stimulation anodique du cortex occipital n'entraîne pas d'effet bénéfique sur des scores de dépression, tandis que la stimulation anodique du CPFDL y parvient (Boggio *et al.*, 2008a). Dans notre modèle murin, nous avons obtenu une réduction des comportements associés à la dépression dans le test de la nage forcée après stimulation anodique aussi bien du cortex frontal que d'une zone plus caudale (colliculus). Ceci pourrait être dû à une propagation du courant sur tout le cortex cérébral chez la souris, alors que ce courant serait plus localisé chez l'Homme.

Il reste à déterminer si cet effet est imputable uniquement aux aspects techniques de notre stimulation (tels que la densité de courant élevée), ou également à des aspects biologiques : la surface du cortex de la souris est lisse (lissencéphale) tandis que celle du cortex humain est composée de circonvolutions (gyrencéphale). Cet aspect différent du cerveau pourrait influencer la diffusion du courant ; de plus, rappelons que l'effet de la tDCS sur l'activité neuronale dépend de la position des neurones dans le cortex (Purpura et McMurtry, 1965). Aussi, il ne faut pas perdre de vue que les données

obtenues sur un modèle murin peuvent être de bonnes indications des effets de la stimulation cérébrale chez l'Homme, mais nos conclusions doivent être nuancées et si possible vérifiées par les études cliniques.

Cependant, malgré les différences d'un point de vue technique et biologique, les résultats que nous avons obtenus chez la souris sont cohérents avec ceux observés chez l'Homme, nous autorisant à étudier les mécanismes de la tDCS au niveau physiologique.

12.2 La tDCS pour soulager des symptômes psychiatriques

Comme nous l'avons montré dans notre premier article (Pedron *et al.*, 2014), nous avons observé, chez la souris, une amélioration des comportements associés à la dépression trois semaines après la fin des stimulations. Ce résultat a été retrouvé aussi bien chez des souris "naïves" que chez des souris ayant subi un sevrage forcé après une exposition chronique à une drogue d'abus, la nicotine. Notons que pour les études présentées dans cette thèse, les souris contrôle (Sham), au même titre que les souris stimulées, avaient subi un stress chronique inhérent à notre protocole de tDCS, avec une contention répétée. Le stress chronique étant un facteur de risque pour la dépression, nous pouvions supposer que ces souris présenteraient un comportement de type "dépressif" ; cependant, une étude contrôle comparant le comportement de souris Sham et celui de souris n'ayant pas subi le protocole de contention n'a pas montré de différence entre ces deux groupes dans le test de la nage forcée (ni à court, ni à long terme). Nos résultats sont cohérents avec ceux obtenus chez l'Homme, où les effets bénéfiques de la tDCS chez des patients souffrant de dépression ont été montrés à plusieurs reprises (pour revue, voir Meron *et al.* (2015)).

De manière intéressante, nous notons également une amélioration des performances mnésiques dans notre modèle murin (mémoire de travail et mémoire visuo-spatiale). Parmi les autres études chez le rat, une amélioration des performances dans un test d'apprentissage et de mémoire de travail (de navigation spatiale, le test d'évitement de place) apparaissait 21 jours après 3 séances de stimulation cette fois cathodique (Dockery *et al.*, 2011). Plusieurs auteurs font également référence à des améliorations de performances cognitives après tDCS chez le sujet humain sain (Brasil-Neto, 2012). En effet, la stimulation cathodique de la région supra-orbitaire droite, ou la

stimulation anodique de zones corticales impliquées dans une tâche spécifique, résulteraient en une amélioration de certaines performances en terme d'apprentissage et de mémoire (Bennabi *et al.*, 2014).

Puisque des troubles de l'humeur (incluant des symptômes dépressifs) et des déficits cognitifs peuvent être retrouvés dans un grand nombre de pathologies neuro-psychiatriques (telles que la schizophrénie, l'addiction, les maladies neuro-dégénératives...), il est envisageable qu'un traitement (complémentaire aux thérapies actuelles) par ces stimulations électriques non invasives et ayant peu d'effets secondaires (Kessler *et al.*, 2012) puisse aider à alléger les symptômes ressentis par ces patients, voire à la récupération.

L'exposition répétée à la nicotine pendant l'adolescence que nous avons réalisée chez la souris entraîne à l'âge adulte une apparition de comportements associés à la dépression et une augmentation du score de préférence dans un test évaluant l'effet renforçateur de la nicotine (Pedron *et al.*, 2014). Ces effets sont concordants avec la théorie stipulant que le sevrage de la nicotine pourrait entraîner la maladie dépressive (Picciotto *et al.*, 2002). Le fait que la stimulation transcrânienne répétée ait résulté en un retour à la normale des comportements affectés nous amène à penser que ce traitement pourrait constituer une aide efficace pour le sevrage tabagique.

Nos résultats obtenus pour des traitements à la cocaïne (traitement aigu, diminution de l'impact de la drogue sur l'activité locomotrice et l'expression de *Zif268*) ou des injections répétées plusieurs jours (test de préférence de place conditionnée) trois semaines après des stimulations répétées par tDCS indiquent que ces stimulations entraînent des modifications biologiques permettant de diminuer la réponse à la drogue. Il est ainsi permis d'émettre l'hypothèse que la tDCS pourrait diminuer les risques, chez des consommateurs occasionnels, de tomber dans la dépendance à certaines substances (telles que les psychostimulants). Il sera également intéressant de tester si la tDCS permet d'éviter les phénomènes d'addiction à certaines médications (analgésiques, anxiolytiques, antidépresseurs...), dans les cas où un traitement complémentaire par stimulation électrique serait compatible avec le traitement de la maladie.

En ce qui concerne l'alcool, nous avons obtenu peu d'indices sur l'impact de la tDCS sur les effets appétitifs ou la consommation d'éthanol chez les souris au cours de ma thèse. Plusieurs auteurs ont rapporté une diminution des scores de *craving* pour l'alcool après tDCS chez des patients dépendants (Cf. section 2.1.3 ; Boggio *et al.* (2008c) ; den Uyl *et al.* (2015) ; da Silva *et al.* (2013)). Nous avons principalement pu montrer chez la souris une atténuation des comportements de rechute dans le test d'auto-administration. Cela étant, notre étude portait sur des souris Swiss caractérisées grandes buveuses

mais non dépendantes ; tester le même protocole sur des souris qui auraient préalablement été rendues alcoolo-dépendantes (par exemple, par exposition répétée à des vapeurs d'éthanol ; Griffin (2014)) pourrait nous apporter des réponses plus précises à la fois au niveau comportemental et au niveau neurobiologique par l'étude de facteurs impliqués dans l'addiction (tels que ΔFosB, un facteur de transcription étudié comme marqueur neurobiologique de l'état d'addiction aux drogues d'abus ; Nestler (2008)).

12.3 Comprendre les mécanismes de la tDCS

Puisqu'au cours de ma thèse nous avons pu mettre en place un modèle animal de tDCS et retrouver des effets positifs de notre protocole de stimulations répétées, nous avons réalisé deux études visant pour la première à tester l'hypothèse d'un impact de ces stimulations sur la neurogenèse hippocampique, et pour la seconde à identifier les zones cérébrales affectées par la tDCS (dans le cadre d'une exposition à la drogue).

Dans un premier temps nous nous sommes intéressés à la prolifération de nouvelles cellules dans l'hippocampe. Nous avons ainsi mis en évidence que dès la fin de dix séances de stimulation, les souris présentent une augmentation de la prolifération cellulaire à la fois dans l'hippocampe dorsal (impliqué dans les fonctions cognitives), et dans l'hippocampe ventral (impliqué dans les états émotionnels ; Fanselow et Dong (2010)).

Cette étude ne suffit pas à affirmer que les effets de la tDCS impliquent une néo-neurogenèse. Il apparaît nécessaire d'étudier le devenir de ces nouvelles cellules, mais aussi l'importance de la neurogenèse dans l'apparition des effets de la tDCS. Comme cibles d'étude potentielles, nous pouvons citer la doublecortine, exprimée dans les neurones en différenciation, ou encore NeuN, un marqueur de neurones matures (Dokter et und Halbach, 2012). À l'inverse, pour étudier l'importance de la neurogenèse dans les effets de la tDCS, des études portant sur la stimulation de modèles animaux chez qui la création de nouveaux neurones a été inhibée seront à réaliser.

Les résultats de ces études permettront d'apporter des pistes expliquant les mécanismes d'action de la tDCS sur divers aspects cognitifs, et sur ses effets bénéfiques dans des pathologies telles que les troubles dépressifs. Ils pourront aussi valider l'indication de cette technique de stimulation pour la récupération de fonctions cognitives dans le cadre de pathologies neurologiques (telles que la maladie d'Alzheimer).

Dans la dernière étude présentée ici, notre cartographie des zones céré-

brales (par l'étude de *Zif268*) nous a indiqué que les effets de la tDCS apparaissent dans des circuits impliqués plutôt dans les aspects liés au contrôle de la prise de drogue (formation d'habitudes anormales, compulsion...). Afin de mieux caractériser les effets neurobiologiques de la tDCS dans le cadre de l'addiction, il sera intéressant d'étudier l'expression de facteurs liés spécifiquement à cette pathologie.

Dans le cadre d'une consommation régulière, les drogues déclenchent des adaptations pathologiques dans le circuit de la récompense qui sous-tendent le phénomène de dépendance. Par exemple, la protéine ΔFosB voit son expression augmenter (notamment dans le noyau accumbens et le striatum dorsal) de manière transitoire après une injection aiguë de drogue, et s'accumule dans des régions cérébrales spécifiques en cas de répétition de l'exposition (Nestler, 2008). Ceci est vrai pour chaque drogue d'abus bien que le degré d'induction de la protéine dans les différentes régions du striatum et du noyau accumbens puisse varier. Ce phénomène, qui serait responsable notamment de comportements de recherche de drogue, fait de ΔFosB une cible de choix pour l'étude de la sensibilité aux drogues. Analyser son expression après une administration aiguë ou chronique de drogues (par exemple la cocaïne ou l'alcool) chez des animaux stimulés par tDCS pourrait apporter des éléments de compréhension du mécanisme d'action de ce traitement au niveau comportemental.

12.4 Perspective : stimuler à l'adolescence

L'une des principales questions que nous nous posons à la fin de ces travaux concerne la possibilité de stimuler le cerveau de patients adolescents.

L'adolescence est une période de transition, source d'instabilité, entre enfance et âge adulte. Dans un rapport de 2002, une expertise collective de l'INSERM révèle qu'en France comme dans le monde, environ 12 % des enfants et adolescents seraient touchés par au moins un trouble mental (principalement troubles de l'humeur ; INSERM (2002)).

Un groupe d'experts, toujours pour l'Inserm, note en 2014 que l'initiation à la consommation de substances psychoactives (licites ou non) se fait principalement à l'adolescence (en France en 2011, 91 % des jeunes déclarent avoir consommé de l'alcool, 68 % du tabac, et 42 % du cannabis avant la fin de leur adolescence. Seuls 6.6 % n'auraient jamais consommé une de ces trois drogues ; INSERM (2014)). Or d'une part, si répétée, l'expérimentation de drogues est susceptible d'entraîner la dépendance ; et d'autre part, d'importantes modifications neurobiologiques ont lieu durant l'adolescence, avec une réorganisation fonctionnelle et anatomique de diverses aires cérébrales

(Spear, 2000).

Le cortex préfrontal, cible privilégiée pour l'étude des effets de la tDCS sur différents troubles neurologiques ou psychiatriques, fait partie des zones cérébrales subissant un profond remodelage lors de l'adolescence, avec notamment la maturation des fonctions cognitives (Spear, 2000). C'est pourquoi l'adolescence constitue une période critique durant laquelle une altération du développement (notamment du cortex préfrontal) peut entraîner ou accélérer le développement de troubles psychiatriques tels que la schizophrénie, les troubles de l'humeur, ou encore l'addiction (Giedd *et al.*, 2008).

Parmi les différents neurotransmetteurs impliqués dans la maturation du cortex préfrontal, le circuit GABAergique a été la cible de plusieurs études du fait de son rôle dans l'inhibition et la synchronisation des populations neuronales (Caballero *et al.*, 2014b). Les interneurones GABAergiques peuvent être distingués en trois principales populations en fonction de la protéine liant le calcium qu'ils expriment : la parvalbumine (PV), la calrétinine (CR), ou la calbindine (CB). L'expression de ces protéines change lors de la maturation du système nerveux ; l'altération de ce processus résulterait en une désinhibition du cortex préfrontal qui pourrait être responsable de certaines pathologies psychiatriques apparaissant lors de l'adolescence, telles que la schizophrénie ou l'addiction (Caballero *et al.*, 2014a ; Cass *et al.*, 2013).

À partir de ces données, nous pouvons nous demander quel effet aurait la stimulation transcrânienne sur la maturation du système nerveux pendant l'adolescence. Un traitement par tDCS des adolescents souffrant de certaines pathologies (telles que des troubles de l'humeur ou du comportement alimentaire) est intéressant puisque *a priori* sans effet secondaire. En effet, Moliadze *et al.* (2015) ont montré que la stimulation (10 minutes, 1 mA) du cortex moteur d'adolescents (sujets sains âgés de 11 à 16 ans) était bien tolérée, sans effet secondaire reporté ou mesuré par électro-encéphalographie (tels que des marqueurs d'activité épileptiformes après stimulation, par exemple). Cette bonne tolérance avait aussi été démontrée dans une population de patients atteints de schizophrénie infantile (âgés de 10 à 17 ans), qui avaient reçu 10 sessions de tDCS bilatérale (anodique ou cathodique) sur le CPFDL (20 minutes par session, 2 mA ; Mattai *et al.* (2011)).

Cependant, les études sur les enfants et les adolescents restent rares (Muszkat *et al.*, 2016) et l'absence d'effets secondaires sur le long terme est à vérifier (les études précédemment citées ne mesurant ces effets que dans les heures suivants la tDCS). Notamment, il apparaît raisonnable de se demander si la stimulation cérébrale risque d'avoir un impact négatif sur la maturation du système nerveux des adolescents. Ou encore, si chez des su-

jets adolescents dont la maturation du cortex préfrontal est effectivement altérée (par une pathologie), ce type de stimulation permettrait de rétablir un développement neuronal normal...

Afin de répondre à ces questions, il serait intéressant dans un premier temps de stimuler le cortex frontal d'animaux adolescents sains, et de contrôler la trajectoire développementale des différentes sous-populations d'interneurones GABAergiques afin de vérifier l'impact de la tDCS sur la maturation du système nerveux.

En collaboration avec l'équipe du Pr. Tseng de la Chicago Medical School, nous avons réalisé une étude pilote sur 14 souris (7 Sham et 7 tDCS) stimulées à l'âge de 35 à 39 jours (adolescence) et sacrifiées à 48 jours (jeunes adultes ; Tirelli *et al.* (2003)). Nous avons étudié par immunofluorescence l'expression de la parvalbumine dans le cortex préfrontal. Les interneurones GABAergiques exprimant la parvalbumine sont moins nombreux chez les jeunes rongeurs qu'à l'âge adulte ; dans les conditions normales leur expression augmente au cours de l'adolescence.

Dans cette étude pilote, nous avons observé qu'un traitement chronique par tDCS pendant l'adolescence (20 minutes à 0.2 mA, 2 fois par jour pendant 5 jours consécutifs) diminuerait l'expression de la parvalbumine dans une zone restreinte du cortex préfrontal (région limbique du cortex autour du niveau Bregma +1.54) des souris jeunes adultes. L'expression de la PV dans les régions voisines (régions limbiques de la zone Bregma +1.94 et régions cingulaires/motrices plus postérieures (Bregma +1.10 et après)) ne semble en revanche pas affectée. Cependant cette étude pilote ne donne d'indications qu'à un âge précis, et n'indique pas si la modification ou l'absence de modification de l'expression de la PV est temporaire ou durable.

Aussi, avant de pouvoir conclure quant aux implications fonctionnelles de ces premiers résultats, il sera nécessaire d'étudier la trajectoire développementale des différents types d'interneurones à différents âges après tDCS.

12.5 Conclusion

En conclusion, au cours de cette thèse, nous avons pu mettre en place la tDCS chez la souris, et retrouver des effets comportementaux similaires à ceux observés chez l'Homme. Le modèle murin sera intéressant à plusieurs points de vue, notamment pour l'étude des effets de la tDCS sur des modèles de pathologies psychiatriques (avec ou sans mutation génétique), et pour rechercher les mécanismes neurobiologiques sous-tendant les effets de ce type de stimulation.

La tDCS est à replacer dans le champ de plus en plus exploré des techniques de stimulation cérébrale. Rappelons que certaines de ces techniques font partie, parfois depuis plusieurs décennies (exemple de l'électroconvulsivothérapie), des traitements pouvant être prescrits dans le cadre de pathologies psychiatriques ou neurologiques. Chacune a ses spécificités (domaine d'application, public visé...), ses avantages et ses inconvénients (caractère invasif ou non, effets secondaires...). Il est probable que dans les prochaines années la tDCS et ses différentes modalités deviennent à leur tour des traitements prescriptibles dans le cadre de certains troubles.

Les résultats présentés ici ouvrent la voie à des études complémentaires (par exemple, l'impact de la tDCS sur la maturation cérébrale pendant l'adolescence). Notre modèle animal de tDCS constitue un outil avantageux pour ces études, ainsi que pour l'exploration d'autres aspects peu évoqués au cours de ma thèse, tels que l'amélioration des protocoles de stimulation chez l'Homme.

Bibliographie

Abernathy, K., Chandler, L. J. et Woodward, J. J. (2010). ALCOHOL AND THE PREFRONTAL CORTEX. *International review of neurobiology*, 91 :289–320.

Ainge, J. A., Heron-Maxwell, C., Theofilas, P., Wright, P., de Hoz, L. et Wood, E. R. (2006). The role of the hippocampus in object recognition in rats : examination of the influence of task parameters and lesion size. *Behavioural Brain Research*, 167(1) :183–195.

Alaux-Cantin, S., Warnault, V., Legastelois, R., Botia, B., Pierrefiche, O., Vilpoux, C. et Naassila, M. (2013). Alcohol intoxications during adolescence increase motivation for alcohol in adult rats and induce neuroadaptations in the nucleus accumbens. *Neuropharmacology*, 67 :521–531.

American Psychiatric Association (2013). *Diagnostic and Statistical Manual of Mental Disorders*. Numéro Fifth edition de DSM Library. American Psychiatric Association.

Amrein, I., Isler, K. et Lipp, H.-P. (2011). Comparing adult hippocampal neurogenesis in mammalian species and orders : influence of chronological age and life history stage. *The European Journal of Neuroscience*, 34(6) :978–987.

ANAES (1997). Indications et modalités de l'électroconvulsivothérapie. Rapport technique.

Andrews, S. C., Hoy, K. E., Enticott, P. G., Daskalakis, Z. J. et Fitzgerald, P. B. (2011). Improving working memory : the effect of combining cognitive activity and anodal transcranial direct current stimulation to the left dorsolateral prefrontal cortex. *Brain Stimulation*, 4(2) :84–89.

Antal, A., Chaieb, L., Moliadze, V., Monte-Silva, K., Poreisz, C., Thirugnanasambandam, N., Nitsche, M. A., Shoukier, M., Lud-

WIG, H. et PAULUS, W. (2010). Brain-derived neurotrophic factor (BDNF) gene polymorphisms shape cortical plasticity in humans. *Brain Stimulation*, 3(4) :230–237.

ANTAL, A., KRIENER, N., LANG, N., BOROS, K. et PAULUS, W. (2011). Cathodal transcranial direct current stimulation of the visual cortex in the prophylactic treatment of migraine. *Cephalalgia : An International Journal of Headache*, 31(7) :820–828.

ASHARE, R. L., FALCONE, M. et LERMAN, C. (2014). Cognitive function during nicotine withdrawal : Implications for nicotine dependence treatment. *Neuropharmacology*, 76 Pt B :581–591.

AUFRÈRE, G., LE BOURHIS, B. et BEAUGÉ, F. (1997). Ethanol intake after chronic intoxication by inhalation of ethanol vapour in rats : behavioural dependence. *Alcohol (Fayetteville, N.Y.)*, 14(3) :247–253.

BALLEINE, B. W. et O'DOHERTY, J. P. (2010). Human and rodent homologies in action control : corticostriatal determinants of goal-directed and habitual action. *Neuropsychopharmacology : Official Publication of the American College of Neuropsychopharmacology*, 35(1) :48–69.

BAMBICO, F. R., BREGMAN, T., DIWAN, M., LI, J., DARVISH-GHANE, S., LI, Z., LAVER, B., AMORIM, B. O., COVOLAN, L., NOBREGA, J. N. et HAMANI, C. (2015). Neuroplasticity-dependent and -independent mechanisms of chronic deep brain stimulation in stressed rats. *Translational Psychiatry*, 5(11) :e674.

BARBEY, A. K., KOENIGS, M. et GRAFMAN, J. (2013). Dorsolateral prefrontal contributions to human working memory. *Cortex; a Journal Devoted to the Study of the Nervous System and Behavior*, 49(5) :1195–1205.

BARKER, G. R. I. et WARBURTON, E. C. (2011). When is the hippocampus involved in recognition memory ? *The Journal of Neuroscience : The Official Journal of the Society for Neuroscience*, 31(29) :10721–10731.

BATISTA, E. K., KLAUSS, J., FREGNI, F., NITSCHE, M. A. et NAKAMURA-PALACIOS, E. M. (2015). A Randomized Placebo-Controlled Trial of Targeted Prefrontal Cortex Modulation with Bilateral tDCS in Patients with Crack-Cocaine Dependence. *The international journal of neuropsychopharmacology / official scientific journal of the Collegium Internationale Neuropsychopharmacologicum (CINP)*.

Batsikadze, G., Moliadze, V., Paulus, W., Kuo, M.-F. et Nitsche, M. A. (2013). Partially non-linear stimulation intensity-dependent effects of direct current stimulation on motor cortex excitability in humans. *The Journal of Physiology*, 591(Pt 7) :1987–2000.

Bear, M.-F., Connors, B. W., Paradiso, M. A. et Nieoullon, A. (2007). *Neurosciences : A la découverte du cerveau*. Pradel Editions, Paris, 3e édition édition.

Belin, D., Belin-Rauscent, A., Murray, J. E. et Everitt, B. J. (2013). Addiction : failure of control over maladaptive incentive habits. *Current Opinion in Neurobiology*, 23(4) :564–572.

Belin-Rauscent, A., Everitt, B. J. et Belin, D. (2012). Intrastriatal Shifts Mediate the Transition from Drug-Seeking Actions to Habits. *Biological Psychiatry*, 72(5) :343–345.

Belzung, C. et Lemoine, M. (2011). Criteria of validity for animal models of psychiatric disorders : focus on anxiety disorders and depression. *Biology of Mood & Anxiety Disorders*, 1(1) :9.

Ben Taib, N. O. et Manto, M. (2009). Trains of transcranial direct current stimulation antagonize motor cortex hypoexcitability induced by acute hemicerebellectomy. *Journal of Neurosurgery*, 111(4) :796–806.

Bennabi, D., Nicolier, M., Monnin, J., Tio, G., Pazart, L., Vandel, P. et Haffen, E. (2015). Pilot study of feasibility of the effect of treatment with tDCS in patients suffering from treatment-resistant depression treated with escitalopram. *Clinical Neurophysiology : Official Journal of the International Federation of Clinical Neurophysiology*, 126(6) :1185–1189.

Bennabi, D., Pedron, S., Haffen, E., Monnin, J., Peterschmitt, Y. et Van Waes, V. (2014). Transcranial direct current stimulation for memory enhancement : from clinical research to animal models. *Frontiers in Systems Neuroscience*, 8 :159.

Benninger, D. H., Lomarev, M., Lopez, G., Wassermann, E. M., Li, X., Considine, E. et Hallett, M. (2010). Transcranial direct current stimulation for the treatment of Parkinson's disease. *Journal of Neurology, Neurosurgery & Psychiatry*, 81(10) :1105–1111.

Berke, J. D. et Hyman, S. E. (2000). Addiction, Dopamine, and the Molecular Mechanisms of Memory. *Neuron*, 25(3) :515–532.

Berridge, K. C., Robinson, T. E. et Aldridge, J. W. (2009). Dissecting components of reward : 'liking', 'wanting', and learning. *Current opinion in pharmacology*, 9(1) :65–73.

Bhat, R. V., Cole, A. J. et Baraban, J. M. (1992). Role of monoamine systems in activation of zif268 by cocaine. *Journal of Psychiatry and Neuroscience*, 17(3) :94–102.

Binder, D. K. et Scharfman, H. E. (2004). Brain-derived Neurotrophic Factor. *Growth factors (Chur, Switzerland)*, 22(3) :123–131.

Binder, S., Berg, K., Gasca, F., Lafon, B., Parra, L. C., Born, J. et Marshall, L. (2014a). Transcranial slow oscillation stimulation during sleep enhances memory consolidation in rats. *Brain Stimulation*, 7(4) :508–515.

Binder, S., Rawohl, J., Born, J. et Marshall, L. (2014b). Transcranial slow oscillation stimulation during NREM sleep enhances acquisition of the radial maze task and modulates cortical network activity in rats. *Frontiers in Behavioral Neuroscience*, 7 :220.

Bindman, L. J., Lippold, O. C. J. et Redfearn, J. W. T. (1964). The action of brief polarizing currents on the cerebral cortex of the rat (1) during current flow and (2) in the production of long-lasting after-effects. *The Journal of Physiology*, 172(3) :369–382.

Blumberger, D. M., Tran, L. C., Fitzgerald, P. B., Hoy, K. E. et Daskalakis, Z. J. (2012). A randomized double-blind sham-controlled study of transcranial direct current stimulation for treatment-resistant major depression. *Frontiers in Psychiatry*, 3 :74.

Boggio, P. S., Ferrucci, R., Mameli, F., Martins, D., Martins, O., Vergari, M., Tadini, L., Scarpini, E., Fregni, F. et Priori, A. (2012). Prolonged visual memory enhancement after direct current stimulation in Alzheimer's disease. *Brain Stimulation*, 5(3) :223–230.

Boggio, P. S., Ferrucci, R., Rigonatti, S. P., Covre, P., Nitsche, M., Pascual-Leone, A. et Fregni, F. (2006). Effects of transcranial direct current stimulation on working memory in patients with Parkinson's disease. *Journal of the Neurological Sciences*, 249(1) :31–38.

Boggio, P. S., Khoury, L. P., Martins, D. C. S., Martins, O. E. M. S., de Macedo, E. C. et Fregni, F. (2009a). Temporal cortex direct current stimulation enhances performance on a visual recognition memory task in

Alzheimer disease. *Journal of Neurology, Neurosurgery, and Psychiatry*, 80(4) :444–447.

Boggio, P. S., Liguori, P., Sultani, N., Rezende, L., Fecteau, S. et Fregni, F. (2009b). Cumulative priming effects of cortical stimulation on smoking cue-induced craving. *Neuroscience letters*, 463(1) :82–86.

Boggio, P. S., Rigonatti, S. P., Ribeiro, R. B., Myczkowski, M. L., Nitsche, M. A., Pascual-Leone, A. et Fregni, F. (2008a). A randomized, double-blind clinical trial on the efficacy of cortical direct current stimulation for the treatment of major depression. *The international journal of neuropsychopharmacology / official scientific journal of the Collegium Internationale Neuropsychopharmacologicum (CINP)*, 11(2) :249–254.

Boggio, P. S., Rocha, R. R., da Silva, M. T. et Fregni, F. (2008b). Differential modulatory effects of transcranial direct current stimulation on a facial expression go-no-go task in males and females. *Neuroscience Letters*, 447(2-3) :101–105.

Boggio, P. S., Sultani, N., Fecteau, S., Merabet, L., Mecca, T., Pascual-Leone, A., Basaglia, A. et Fregni, F. (2008c). Prefrontal cortex modulation using transcranial DC stimulation reduces alcohol craving : a double-blind, sham-controlled study. *Drug and alcohol dependence*, 92(1-3) :55–60.

Boggio, P. S., Zaghi, S., Lopes, M. et Fregni, F. (2008d). Modulatory effects of anodal transcranial direct current stimulation on perception and pain thresholds in healthy volunteers. *European Journal of Neurology*, 15(10) :1124–1130.

Boggio, P. S., Zaghi, S., Villani, A. B., Fecteau, S., Pascual-Leone, A. et Fregni, F. (2010). Modulation of risk-taking in marijuana users by transcranial direct current stimulation (tDCS) of the dorsolateral prefrontal cortex (DLPFC). *Drug and alcohol dependence*, 112(3) :220–225.

Bolzoni, F., Bączyk, M. et Jankowska, E. (2013). Subcortical effects of transcranial direct current stimulation in the rat. *The Journal of Physiology*, 591(Pt 16) :4027–4042.

Botia, B., Legastelois, R., Alaux-Cantin, S. et Naassila, M. (2012). Expression of Ethanol-Induced Behavioral Sensitization Is Associated with Alteration of Chromatin Remodeling in Mice. *PLoS ONE*, 7(10) :e47527.

Boudreau, A. C. et Wolf, M. E. (2005). Behavioral Sensitization to Cocaine Is Associated with Increased AMPA Receptor Surface Expression in the Nucleus Accumbens. *The Journal of Neuroscience*, 25(40) :9144–9151.

Bouhassira, D. et Calvino, B. (2009). *Douleurs : physiologie, physiopathologie et pharmacologie*, volume 3 de *Références en douleur et analgésie*. Arnette.

Brasil-Neto, J. P. (2012). Learning, memory, and transcranial direct current stimulation. *Frontiers in Psychiatry*, 3 :80.

Breit, S., Schulz, J. B. et Benabid, A.-L. (2004). Deep brain stimulation. *Cell and Tissue Research*, 318(1) :275–288.

Breslau, N., Kilbey, M. M. et Andreski, P. (1993). Nicotine dependence and major depression. New evidence from a prospective investigation. *Archives of General Psychiatry*, 50(1) :31–35.

Brighina, F., Cosentino, G. et Fierro, B. (2013). Brain stimulation in migraine. *Handbook of Clinical Neurology*, 116 :585–598.

Brody, A. L., Mandelkern, M. A., London, E. D., Childress, A. R., Lee, G. S., Bota, R. G., Ho, M. L., Saxena, S., Baxter, L. R., Madsen, D. et Jarvik, M. E. (2002). Brain metabolic changes during cigarette craving. *Archives of General Psychiatry*, 59(12) :1162–1172.

Brunelin, J., Levasseur-Moreau, J. et Fecteau, S. (2013). Is it ethical and safe to use non-invasive brain stimulation as a cognitive and motor enhancer device for military services ? A reply to Sehm and Ragert (). *Frontiers in Human Neuroscience*, 7.

Brunelin, J., Mondino, M., Gassab, L., Haesebaert, F., Gaha, L., Suaud-Chagny, M.-F., Saoud, M., Mechri, A. et Poulet, E. (2012). Examining transcranial direct-current stimulation (tDCS) as a treatment for hallucinations in schizophrenia. *The American Journal of Psychiatry*, 169(7) :719–724.

Brunoni, A. R., Boggio, P. S., De Raedt, R., Benseñor, I. M., Lotufo, P. A., Namur, V., Valiengo, L. C. L. et Vanderhasselt, M. A. (2014a). Cognitive control therapy and transcranial direct current stimulation for depression : A randomized, double-blinded, controlled trial. *Journal of Affective Disorders*, 162 :43–49.

Brunoni, A. R., Kemp, A. H., Shiozawa, P., Cordeiro, Q., Valiengo, L. C. L., Goulart, A. C., Coprerski, B., Lotufo, P. A., Brunoni, D., Perez, A. B. A., Fregni, F. et Benseñor, I. M. (2013a). Impact of 5-HTTLPR and BDNF polymorphisms on response to sertraline versus transcranial direct current stimulation : Implications for the serotonergic system. *European Neuropsychopharmacology*, 23(11) :1530–1540.

Brunoni, A. R., Machado-Vieira, R., Zarate, C. A., Vieira, E. L. M., Vanderhasselt, M.-A., Nitsche, M. A., Valiengo, L., Benseñor, I. M., Lotufo, P. A., Gattaz, W. F. et Teixeira, A. L. (2014b). BDNF plasma levels after antidepressant treatment with sertraline and transcranial direct current stimulation : results from a factorial, randomized, sham-controlled trial. *European Neuropsychopharmacology : The Journal of the European College of Neuropsychopharmacology*, 24(7) :1144–1151.

Brunoni, A. R., Sampaio-Junior, B., Moffa, A. H., Borrione, L., Nogueira, B. S., Aparício, L. V. M., Veronezi, B., Moreno, M., Fernandes, R. A., Tavares, D., Bueno, P. V. S., Seibt, O., Bikson, M., Fraguas, R. et Benseñor, I. M. (2015). The Escitalopram versus Electric Current Therapy for Treating Depression Clinical Study (ELECT-TDCS) : rationale and study design of a non-inferiority, triple-arm, placebo-controlled clinical trial. *São Paulo Medical Journal = Revista Paulista De Medicina*, 133(3) :252–263.

Brunoni, A. R., Valiengo, L., Baccaro, A., Zanão, T. A., de Oliveira, J. F., Goulart, A., Boggio, P. S., Lotufo, P. A., Benseñor, I. M. et Fregni, F. (2013b). The sertraline vs. electrical current therapy for treating depression clinical study : results from a factorial, randomized, controlled trial. *JAMA psychiatry*, 70(4) :383–391.

Brunoni, A. R. et Vanderhasselt, M.-A. (2014). Working memory improvement with non-invasive brain stimulation of the dorsolateral prefrontal cortex : A systematic review and meta-analysis. *Brain and Cognition*, 86 :1–9.

Brunyé, T. T., Holmes, A., Cantelon, J., Eddy, M. D., Gardony, A. L., Mahoney, C. R. et Taylor, H. A. (2014). Direct current brain stimulation enhances navigation efficiency in individuals with low spatial sense of direction. *Neuroreport*, 25(15) :1175–1179.

Buckner, R. L., Kelley, W. M. et Petersen, S. E. (1999). Frontal cortex contributes to human memory formation. *Nature Neuroscience*, 2(4) :311–314.

Burt, T., Lisanby, S. H. et Sackeim, H. A. (2002). Neuropsychiatric applications of transcranial magnetic stimulation : a meta analysis. *The international journal of neuropsychopharmacology / official scientific journal of the Collegium Internationale Neuropsychopharmacologicum (CINP)*, 5(1) :73–103.

Caballero, A., Flores-Barrera, E., Cass, D. K. et Tseng, K. Y. (2014a). Differential regulation of parvalbumin and calretinin interneurons in the prefrontal cortex during adolescence. *Brain Structure & Function*, 219(1) :395–406.

Caballero, A., Thomases, D. R., Flores-Barrera, E., Cass, D. K. et Tseng, K. Y. (2014b). Emergence of GABAergic-dependent regulation of input-specific plasticity in the adult rat prefrontal cortex during adolescence. *Psychopharmacology*, 231(8) :1789–1796.

Cambiaghi, M., Teneud, L., Velikova, S., Gonzalez-Rosa, J. J., Cursi, M., Comi, G. et Leocani, L. (2011). Flash visual evoked potentials in mice can be modulated by transcranial direct current stimulation. *Neuroscience*, 185 :161–165.

Cambiaghi, M., Velikova, S., Gonzalez-Rosa, J. J., Cursi, M., Comi, G. et Leocani, L. (2010). Brain transcranial direct current stimulation modulates motor excitability in mice. *The European journal of neuroscience*, 31(4) :704–709.

Cameron, H. A. et McKay, R. D. G. (1999). Restoring production of hippocampal neurons in old age. *Nature Neuroscience*, 2(10) :894–897.

Cameron, H. A., Woolley, C. S., McEwen, B. S. et Gould, E. (1993). Differentiation of newly born neurons and glia in the dentate gyrus of the adult rat. *Neuroscience*, 56(2) :337–344.

Campbell, S. et MacQueen, G. (2004). The role of the hippocampus in the pathophysiology of major depression. *Journal of Psychiatry and Neuroscience*, 29(6) :417–426.

Casey, B. J. et Jones, R. M. (2010). Neurobiology of the adolescent brain and behavior : implications for substance use disorders. *Journal of the American Academy of Child and Adolescent Psychiatry*, 49(12) :1189–1201 ; quiz 1285.

Cass, D. K., Thomases, D. R., Caballero, A. et Tseng, K. Y. (2013). Developmental disruption of gamma-aminobutyric acid function in the medial prefrontal cortex by noncontingent cocaine exposure during early adolescence. *Biological Psychiatry*, 74(7) :490–501.

Castagné, V., Moser, P. et Porsolt, R. D. (2009). Behavioral Assessment of Antidepressant Activity in Rodents. Dans Buccafusco, J. J., éditeur : *Methods of Behavior Analysis in Neuroscience*, Frontiers in Neuroscience. CRC Press/Taylor & Francis, Boca Raton (FL), 2nd édition.

Castillo-Saavedra, L., Gebodh, N., Bikson, M., Diaz-Cruz, C., Brandao, R., Coutinho, L., Truong, D., Datta, A., Shani-Hershkovich, R., Weiss, M., Laufer, I., Reches, A., Peremen, Z., Geva, A., Parra, L. C. et Fregni, F. (2016). Clinically Effective Treatment of Fibromyalgia Pain With High-Definition Transcranial Direct Current Stimulation : Phase II Open-Label Dose Optimization. *The Journal of Pain : Official Journal of the American Pain Society*, 17(1) :14–26.

Chaieb, L., Antal, A. et Paulus, W. (2008). Gender-specific modulation of short-term neuroplasticity in the visual cortex induced by transcranial direct current stimulation. *Visual Neuroscience*, 25(1) :77–81.

Chang, M.-K., Kramer, I., Huber, T., Kinzel, B., Guth-Gundel, S., Leupin, O. et Kneissel, M. (2014). Disruption of Lrp4 function by genetic deletion or pharmacological blockade increases bone mass and serum sclerostin levels. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 111(48) :E5187–E5195.

Chen, C.-H., Panizzon, M., Eyler, L., Jernigan, T., Thompson, W., Fennema-Notestine, C., Jak, A., Neale, M., Franz, C., Hamza, S., Lyons, M., Grant, M., Fischl, B., Seidman, L., Tsuang, M., Kremen, W. et Dale, A. (2011). Genetic Influences on Cortical Regionalization in the Human Brain. *Neuron*, 72(4) :537–544.

Clark, V. P. (2014). The ethical, moral, and pragmatic rationale for brain augmentation. *Frontiers in Systems Neuroscience*, 8.

Cogiamanian, F., Marceglia, S., Ardolino, G., Barbieri, S. et Priori, A. (2007). Improved isometric force endurance after transcranial direct current stimulation over the human motor cortical areas. *The European Journal of Neuroscience*, 26(1) :242–249.

Conti, C. L., Moscon, J. A., Fregni, F., Nitsche, M. A. et Nakamura-Palacios, E. M. (2014). Cognitive related electrophysiological changes

induced by non-invasive cortical electrical stimulation in crack-cocaine addiction. *The international journal of neuropsychopharmacology / official scientific journal of the Collegium Internationale Neuropsychopharmacologicum (CINP)*, 17(9) :1465–1475.

Conti, C. L. et Nakamura-Palacios, E. M. (2014). Bilateral transcranial direct current stimulation over dorsolateral prefrontal cortex changes the drug-cued reactivity in the anterior cingulate cortex of crack-cocaine addicts. *Brain Stimulation*, 7(1) :130–132.

Corbit, L. H., Nie, H. et Janak, P. H. (2012). Habitual Alcohol Seeking : Time Course and the Contribution of Subregions of the Dorsal Striatum. *Biological Psychiatry*, 72(5) :389–395.

Costain, R., Redfearn, J. W. et Lippold, O. C. (1964). A controlled trial of the therapeutic effect of polarization of the brain in depressive illness. *The British Journal of Psychiatry : The Journal of Mental Science*, 110 :786–799.

Covey, L. S., Glassman, A. H. et Stetner, F. (1990). Depression and depressive symptoms in smoking cessation. *Comprehensive Psychiatry*, 31(4) :350–354.

Cretaz, E., Brunoni, A., R, Lafer, B., Cretaz, E., Brunoni, A., R et Lafer, B. (2015). Magnetic Seizure Therapy for Unipolar and Bipolar Depression : A Systematic Review, Magnetic Seizure Therapy for Unipolar and Bipolar Depression : A Systematic Review. *Neural Plasticity, Neural Plasticity*, 2015, 2015 :e521398.

Creutzfeldt, O. D., Fromm, G. H. et Kapp, H. (1962). Influence of transcortical d-c currents on cortical neuronal activity. *Experimental Neurology*, 5(6) :436–452.

Cryan, J. F., Mombereau, C. et Vassout, A. (2005). The tail suspension test as a model for assessing antidepressant activity : review of pharmacological and genetic studies in mice. *Neuroscience and Biobehavioral Reviews*, 29(4-5) :571–625.

da Silva, M. C., Conti, C. L., Klauss, J., Alves, L. G., do Nascimento Cavalcante, H. M., Fregni, F., Nitsche, M. A. et Nakamura-Palacios, E. M. (2013). Behavioral effects of transcranial Direct Current Stimulation (tDCS) induced dorsolateral prefrontal cortex plasticity in alcohol dependence. *Journal of Physiology-Paris*, 107(6) :493–502.

da Silva Moreira, S. F., Medeiros, L. F., de Souza, A., de Oliveira, C., Scarabelot, V. L., Fregni, F., Caumo, W. et Torres, I. L. S. (2015). Transcranial direct current stimulation (tDCS) neuromodulatory effects on mechanical hyperalgesia and cortical BDNF levels in ovariectomized rats. *Life Sciences*.

David, D. J., Samuels, B. A., Rainer, Q., Wang, J.-W., Marsteller, D., Mendez, I., Drew, M., Craig, D. A., Guiard, B. P., Guilloux, J.-P., Artymyshyn, R. P., Gardier, A. M., Gerald, C., Antonijevic, I. A., Leonardo, E. D. et Hen, R. (2009). Neurogenesis-dependent and -independent effects of fluoxetine in an animal model of anxiety/depression. *Neuron*, 62(4) :479–493.

Davis, N. J. et van Koningsbruggen, M. G. (2013). "Non-invasive" brain stimulation is not non-invasive. *Frontiers in Systems Neuroscience*, 7 :76.

Dayan, E., Censor, N., Buch, E. R., Sandrini, M. et Cohen, L. G. (2013). Noninvasive brain stimulation : from physiology to network dynamics and back. *Nature Neuroscience*, 16(7) :838–844.

Delgado, J. M. (1977). Instrumentation, working hypotheses, and clinical aspects of neurostimulation. *Applied Neurophysiology*, 40(2-4) :88–110.

DeLong MR et Benabid A (2014). Discovery of high-frequency deep brain stimulation for treatment of parkinson disease : 2014 lasker award. *JAMA*, 312(11) :1093–1094.

den Uyl, T. E., Gladwin, T. E. et Wiers, R. W. (2015). Transcranial direct current stimulation, implicit alcohol associations and craving. *Biological Psychology*, 105 :37–42.

Deng, W., Aimone, J. B. et Gage, F. H. (2010). New neurons and new memories : how does adult hippocampal neurogenesis affect learning and memory ? *Nature reviews. Neuroscience*, 11(5) :339–350.

Deroche-Gamonet, V., Belin, D. et Piazza, P. V. (2004). Evidence for addiction-like behavior in the rat. *Science (New York, N.Y.)*, 305(5686) :1014–1017.

Dhamne, S. C., Ekstein, D., Zhuo, Z., Gersner, R., Zurakowski, D., Loddenkemper, T., Pascual-Leone, A., Jensen, F. E. et Rotenberg, A. (2015). Acute seizure suppression by transcranial direct current stimulation in rats. *Annals of Clinical and Translational Neurology*, 2(8) :843–856.

Dockery, C. A., Liebetanz, D., Birbaumer, N., Malinowska, M. et Wesierska, M. J. (2011). Cumulative benefits of frontal transcranial direct current stimulation on visuospatial working memory training and skill learning in rats. *Neurobiology of learning and memory*, 96(3) :452–460.

Dokter, M. et und Halbach, O. v. B. (2012). Neurogenesis within the adult hippocampus under physiological conditions and in depression. *Neural Regeneration Research*, 7(7) :552–559.

Due, D. L., Huettel, S. A., Hall, W. G. et Rubin, D. C. (2002). Activation in mesolimbic and visuospatial neural circuits elicited by smoking cues : evidence from functional magnetic resonance imaging. *The American Journal of Psychiatry*, 159(6) :954–960.

Edwardson, M. A., Lucas, T. H., Carey, J. R. et Fetz, E. E. (2012). New modalities of brain stimulation for stroke rehabilitation. *Experimental Brain Research*, 224(3) :335–358.

Eisch, A. J. et Petrik, D. (2012). Depression and hippocampal neurogenesis : a road to remission ? *Science (New York, N.Y.)*, 338(6103) :72–75.

El Yacoubi, M. et Vaugeois, J.-M. (2007). Genetic rodent models of depression. *Current Opinion in Pharmacology*, 7(1) :3–7.

Epp, J. R., Spritzer, M. D. et Galea, L. A. M. (2007). Hippocampus-dependent learning promotes survival of new neurons in the dentate gyrus at a specific time during cell maturation. *Neuroscience*, 149(2) :273–285.

Everitt, B. J. (2014). Neural and psychological mechanisms underlying compulsive drug seeking habits and drug memories – indications for novel treatments of addiction. *The European Journal of Neuroscience*, 40(1) :2163–2182.

Everitt, B. J. et Robbins, T. W. (2005). Neural systems of reinforcement for drug addiction : from actions to habits to compulsion. *Nature Neuroscience*, 8(11) :1481–1489.

Falcone, M., Bernardo, L., Ashare, R. L., Hamilton, R., Faseyitan, O., McKee, S. A., Loughead, J. et Lerman, C. (2015). Transcranial Direct Current Brain Stimulation Increases Ability to Resist Smoking. *Brain Stimulation*.

Fanselow, M. S. et Dong, H.-W. (2010). Are The Dorsal and Ventral Hippocampus functionally distinct structures ? *Neuron*, 65(1) :7.

Featherstone, R. E. et McDonald, R. J. (2004). Dorsal striatum and stimulus-response learning : lesions of the dorsolateral, but not dorsomedial, striatum impair acquisition of a stimulus-response-based instrumental discrimination task, while sparing conditioned place preference learning. *Neuroscience*, 124(1) :23–31.

Fecteau, S., Agosta, S., Hone-Blanchet, A., Fregni, F., Boggio, P., Ciraulo, D. et Pascual-Leone, A. (2014). Modulation of smoking and decision-making behaviors with transcranial direct current stimulation in tobacco smokers : a preliminary study. *Drug and Alcohol Dependence*, 140 :78–84.

Fecteau, S., Knoch, D., Fregni, F., Sultani, N., Boggio, P. et Pascual-Leone, A. (2007). Diminishing risk-taking behavior by modulating activity in the prefrontal cortex : a direct current stimulation study. *The Journal of Neuroscience : The Official Journal of the Society for Neuroscience*, 27(46) :12500–12505.

Feltenstein, M. W. et See, R. E. (2008). The neurocircuitry of addiction : an overview. *British Journal of Pharmacology*, 154(2) :261–274.

Ferrucci, R., Mameli, F., Guidi, I., Mrakic-Sposta, S., Vergari, M., Marceglia, S., Cogiamanian, F., Barbieri, S., Scarpini, E. et Priori, A. (2008). Transcranial direct current stimulation improves recognition memory in Alzheimer disease. *Neurology*, 71(7) :493–498.

Fertonani, A., Pirulli, C. et Miniussi, C. (2011). Random noise stimulation improves neuroplasticity in perceptual learning. *The Journal of Neuroscience : The Official Journal of the Society for Neuroscience*, 31(43) :15416–15423.

Frank, E., Schecklmann, M., Landgrebe, M., Burger, J., Kreuzer, P., Poeppl, T. B., Kleinjung, T., Hajak, G. et Langguth, B. (2012). Treatment of chronic tinnitus with repeated sessions of prefrontal transcranial direct current stimulation : outcomes from an open-label pilot study. *Journal of Neurology*, 259(2) :327–333.

Franklin, K. B. J. et Paxinos, G. (1996). *The Mouse Brain in Stereotaxic Coordinates*. Academic press.

Fregni, F., Boggio, P. S., Lima, M. C., Ferreira, M. J. L., Wagner, T., Rigonatti, S. P., Castro, A. W., Souza, D. R., Riberto, M., Freedman, S. D., Nitsche, M. A. et Pascual-Leone, A. (2006a). A sham-controlled, phase II trial of transcranial direct current stimulation for the treatment of central pain in traumatic spinal cord injury. *Pain*, 122(1-2) :197–209.

Fregni, F., Boggio, P. S., Mansur, C. G., Wagner, T., Ferreira, M. J. L., Lima, M. C., Rigonatti, S. P., Marcolin, M. A., Freedman, S. D., Nitsche, M. A. et Pascual-Leone, A. (2005a). Transcranial direct current stimulation of the unaffected hemisphere in stroke patients. *Neuroreport*, 16(14) :1551–1555.

Fregni, F., Boggio, P. S., Nitsche, M., Bermpohl, F., Antal, A., Feredoes, E., Marcolin, M. A., Rigonatti, S. P., Silva, M. T. A., Paulus, W. et Pascual-Leone, A. (2005b). Anodal transcranial direct current stimulation of prefrontal cortex enhances working memory. *Experimental brain research. Experimentelle Hirnforschung. Expérimentation cérébrale*, 166(1) :23–30.

Fregni, F., Boggio, P. S., Nitsche, M. A., Rigonatti, S. P. et Pascual-Leone, A. (2006b). Cognitive effects of repeated sessions of transcranial direct current stimulation in patients with depression. *Depression and Anxiety*, 23(8) :482–484.

Fregni, F., Boggio, P. S., Santos, M. C., Lima, M., Vieira, A. L., Rigonatti, S. P., Silva, M. T. A., Barbosa, E. R., Nitsche, M. A. et Pascual-Leone, A. (2006c). Noninvasive cortical stimulation with transcranial direct current stimulation in Parkinson's disease. *Movement Disorders*, 21(10) :1693–1702.

Fregni, F., Liebetanz, D., Monte-Silva, K. K., Oliveira, M. B., Santos, A. A., Nitsche, M. A., Pascual-Leone, A. et Guedes, R. C. A. (2007). Effects of transcranial direct current stimulation coupled with repetitive electrical stimulation on cortical spreading depression. *Experimental Neurology*, 204(1) :462–466.

Fregni, F., Liguori, P., Fecteau, S., Nitsche, M. A., Pascual-Leone, A. et Boggio, P. S. (2008a). Cortical stimulation of the prefrontal cortex with transcranial direct current stimulation reduces cue-provoked smoking craving : a randomized, sham-controlled study. *The Journal of clinical psychiatry*, 69(1) :32–40.

Fregni, F., Orsati, F., Pedrosa, W., Fecteau, S., Tome, F. A. M., Nitsche, M. A., Mecca, T., Macedo, E. C., Pascual-Leone, A. et Boggio, P. S. (2008b). Transcranial direct current stimulation of the prefrontal cortex modulates the desire for specific foods. *Appetite*, 51(1) :34–41.

Fregni, F., Thome-Souza, S., Nitsche, M. A., Freedman, S. D., Valente, K. D. et Pascual-Leone, A. (2006d). A Controlled Clinical Trial of Cathodal DC Polarization in Patients with Refractory Epilepsy. *Epilepsia*, 47(2) :335–342.

Fritsch, B., Reis, J., Martinowich, K., Schambra, H. M., Ji, Y., Cohen, L. G. et Lu, B. (2010). Direct current stimulation promotes BDNF-dependent synaptic plasticity : Potential implications for motor learning. *Neuron*, 66(2) :198–204.

Fuchs, R. A., Branham, R. K. et See, R. E. (2006). Different Neural Substrates Mediate Cocaine Seeking after Abstinence versus Extinction Training : A Critical Role for the Dorsolateral Caudate–Putamen. *The Journal of Neuroscience*, 26(13) :3584–3588.

Fumagalli, M., Vergari, M., Pasqualetti, P., Marceglia, S., Mameli, F., Ferrucci, R., Mrakic-Sposta, S., Zago, S., Sartori, G., Pravettoni, G., Barbieri, S., Cappa, S. et Priori, A. (2010). Brain switches utilitarian behavior : does gender make the difference ? *PloS One*, 5(1) :e8865.

Fuster, J. M. (2001). The prefrontal cortex–an update : time is of the essence. *Neuron*, 30(2) :319–333.

Fuster, J. M. (2002). Frontal lobe and cognitive development. *Journal of Neurocytology*, 31(3-5) :373–385.

Garavan, H. et Hester, R. (2007). The role of cognitive control in cocaine dependence. *Neuropsychology Review*, 17(3) :337–345.

Göder, R., Baier, P. C., Beith, B., Baecker, C., Seeck-Hirschner, M., Junghanns, K. et Marshall, L. (2013). Effects of transcranial direct current stimulation during sleep on memory performance in patients with schizophrenia. *Schizophrenia Research*, 144(1–3) :153–154.

Giedd, J. N., Keshavan, M. et Paus, T. (2008). Why do many psychiatric disorders emerge during adolescence ? *Nature reviews. Neuroscience*, 9(12) :947–957.

Girbovan, C. et Plamondon, H. (2013). Environmental enrichment in female rodents : considerations in the effects on behavior and biochemical markers. *Behavioural Brain Research*, 253 :178–190.

Goodman, A. (1993). The addictive process : a psychoanalytic understanding. *The Journal of the American Academy of Psychoanalysis*, 21(1) :89–105.

Gould, E., Beylin, A., Tanapat, P., Reeves, A. et Shors, T. J. (1999). Learning enhances adult neurogenesis in the hippocampal formation. *Nature Neuroscience*, 2(3) :260–265.

Grant, S., London, E. D., Newlin, D. B., Villemagne, V. L., Liu, X., Contoreggi, C., Phillips, R. L., Kimes, A. S. et Margolin, A. (1996). Activation of memory circuits during cue-elicited cocaine craving. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 93(21) :12040–12045.

Gray, H. (1918). *Anatomy of the Human Body*. Lea & Febiger.

Griffin, W. C. (2014). Alcohol dependence and free-choice drinking in mice. *Alcohol (Fayetteville, N.Y.)*, 48(3) :287–293.

Grimm, S., Beck, J., Schuepbach, D., Hell, D., Boesiger, P., Bermpohl, F., Niehaus, L., Boeker, H. et Northoff, G. (2008). Imbalance between left and right dorsolateral prefrontal cortex in major depression is linked to negative emotional judgment : an fMRI study in severe major depressive disorder. *Biological Psychiatry*, 63(4) :369–376.

Grimonprez, A., Raedt, R., Baeken, C., Boon, P. et Vonck, K. (2015). The antidepressant mechanism of action of vagus nerve stimulation : Evidence from preclinical studies. *Neuroscience & Biobehavioral Reviews*, 56 :26–34.

Hagihara, H., Toyama, K., Yamasaki, N. et Miyakawa, T. (2009). Dissection of Hippocampal Dentate Gyrus from Adult Mouse. *Journal of Visualized Experiments : JoVE*, (33).

Hammer, A., Mohammadi, B., Schmicker, M., Saliger, S. et Münte, T. F. (2011). Errorless and errorful learning modulated by transcranial direct current stimulation. *BMC neuroscience*, 12 :72.

Han, C.-H., Song, H., Kang, Y.-G., Kim, B.-M. et Im, C.-H. (2014). Hemodynamic responses in rat brain during transcranial direct current stimulation : a functional near-infrared spectroscopy study. *Biomedical Optics Express*, 5(6) :1812–1821.

Herrmann, C. S., Rach, S., Neuling, T. et Strüber, D. (2013). Transcranial alternating current stimulation : a review of the underlying mechanisms and modulation of cognitive processes. *Frontiers in Human Neuroscience*, 7 :279.

Ho, K.-A., Taylor, J. L. et Loo, C. K. (2015). Comparison of the effects of transcranial random noise stimulation and transcranial direct current stimulation on motor cortical excitability. *The journal of ECT*, 31(1) :67–72.

Hogg, S. (1996). A review of the validity and variability of the elevated plus-maze as an animal model of anxiety. *Pharmacology, Biochemistry, and Behavior*, 54(1) :21–30.

Holdefer, R. N., Sadleir, R. et Russell, M. J. (2006). Predicted current densities in the brain during transcranial electrical stimulation. *Clinical neurophysiology : official journal of the International Federation of Clinical Neurophysiology*, 117(6) :1388–1397.

Hoy, K. E., Arnold, S. L., Emonson, M. R. L., Daskalakis, Z. J. et Fitzgerald, P. B. (2014). An investigation into the effects of tDCS dose on cognitive performance over time in patients with schizophrenia. *Schizophrenia Research*, 155(1-3) :96–100.

Iñiguez, S. D., Warren, B. L., Parise, E. M., Alcantara, L. F., Schuh, B., Maffeo, M. L., Manojlovic, Z. et Bolaños-Guzmán, C. A. (2009). Nicotine exposure during adolescence induces a depression-like state in adulthood. *Neuropsychopharmacology : official publication of the American College of Neuropsychopharmacology*, 34(6) :1609–1624.

INSERM (2002). Troubles mentaux : dépistage et prévention chez l'enfant et l'adolescent. Rapport technique XXII, Les éditions Inserm.

INSERM (2014). Conduites addictives chez les adolescents. Rapport technique XVIII, Les éditions Inserm.

Islam, N., Aftabuddin, M., Moriwaki, A., Hattori, Y. et Hori, Y. (1995). Increase in the calcium level following anodal polarization in the rat brain. *Brain Research*, 684(2) :206–208.

Islam, N., Moriwaki, A., Hattori, Y. et Hori, Y. (1994). Appearance of dark neurons following anodal polarization in the rat brain. *Acta Medica Okayama*, 48(3) :123–130.

Jiang, T., Xu, R. X., Zhang, A. W., Di, W., Xiao, Z. J., Miao, J. Y., Luo, N. et Fang, Y. N. (2012). Effects of transcranial direct current stimulation on hemichannel pannexin-1 and neural plasticity in rat model of cerebral infarction. *Neuroscience*, 226 :421–426.

Kabakov, A. Y., Muller, P. A., Pascual-Leone, A., Jensen, F. E. et Rotenberg, A. (2012). Contribution of axonal orientation to pathway-dependent modulation of excitatory transmission by direct current stimulation in isolated rat hippocampus. *Journal of Neurophysiology*, 107(7) :1881–1889.

Kamida, T., Kong, S., Eshima, N., Abe, T., Fujiki, M. et Kobayashi, H. (2011). Transcranial direct current stimulation decreases convulsions and spatial memory deficits following pilocarpine-induced status epilepticus in immature rats. *Behavioural brain research*, 217(1) :99–103.

Kee, N., Teixeira, C. M., Wang, A. H. et Frankland, P. W. (2007). Preferential incorporation of adult-generated granule cells into spatial memory networks in the dentate gyrus. *Nature Neuroscience*, 10(3) :355–362.

Kekic, M., Boysen, E., Campbell, I. C. et Schmidt, U. (2016). A systematic review of the clinical efficacy of transcranial direct current stimulation (tDCS) in psychiatric disorders. *Journal of Psychiatric Research*, 74 :70–86.

Kempermann, G., Jessberger, S., Steiner, B. et Kronenberg, G. (2004). Milestones of neuronal development in the adult hippocampus. *Trends in Neurosciences*, 27(8) :447–452.

Kessler, S. K., Turkeltaub, P. E., Benson, J. G. et Hamilton, R. H. (2012). Differences in the experience of active and sham transcranial direct current stimulation. *Brain Stimulation*, 5(2) :155–162.

Khedr, E. M., Elfetoh, N. A., Ali, A. M. et Noamany, M. (2014). Anodal transcranial direct current stimulation over the dorsolateral prefrontal cortex improves anorexia nervosa : A pilot study. *Restorative Neurology and Neuroscience*, 32(6) :789–797.

Kim, S. J., Kim, B. K., Ko, Y. J., Bang, M. S., Kim, M. H. et Han, T. R. (2010). Functional and Histologic Changes After Repeated Transcranial

Direct Current Stimulation in Rat Stroke Model. *Journal of Korean Medical Science*, 25(10) :1499.

Kincses, T. Z., Antal, A., Nitsche, M. A., Bártfai, O. et Paulus, W. (2004). Facilitation of probabilistic classification learning by transcranial direct current stimulation of the prefrontal cortex in the human. *Neuropsychologia*, 42(1) :113–117.

Klauss, J., Penido Pinheiro, L. C., Silva Merlo, B. L., de Almeida Correia Santos, G., Fregni, F., Nitsche, M. A. et Miyuki Nakamura-Palacios, E. (2014). A randomized controlled trial of targeted prefrontal cortex modulation with tDCS in patients with alcohol dependence. *The international journal of neuropsychopharmacology / official scientific journal of the Collegium Internationale Neuropsychopharmacologicum (CINP)*, 17(11) :1793–1803.

Klempin, F., Beis, D., Mosienko, V., Kempermann, G., Bader, M. et Alenina, N. (2013). Serotonin is required for exercise-induced adult hippocampal neurogenesis. *The Journal of Neuroscience : The Official Journal of the Society for Neuroscience*, 33(19) :8270–8275.

Knapska, E. et Kaczmarek, L. (2004). A gene for neuronal plasticity in the mammalian brain : Zif268/Egr-1/NGFI-A/Krox-24/TIS8/ZENK ? *Progress in Neurobiology*, 74(4) :183–211.

Koenigs, M. et Grafman, J. (2009). The functional neuroanatomy of depression : Distinct roles for ventromedial and dorsolateral prefrontal cortex. *Behavioural brain research*, 201(2) :239–243.

Koob, G. F. et Volkow, N. D. (2010). Neurocircuitry of Addiction. *Neuropsychopharmacology*, 35(1) :217–238.

Krause, B., Márquez-Ruiz, J. et Cohen Kadosh, R. (2013). The effect of transcranial direct current stimulation : a role for cortical excitation/inhibition balance ? *Frontiers in Human Neuroscience*, 7 :602.

Krishnan, V. et Nestler, E. J. (2008). The molecular neurobiology of depression. *Nature*, 455(7215) :894–902.

Kuncel, A. M. et Grill, W. M. (2004). Selection of stimulus parameters for deep brain stimulation. *Clinical Neurophysiology*, 115(11) :2431–2441.

Kuo, M.-F. et Nitsche, M. A. (2015). Exploring prefrontal cortex functions in healthy humans by transcranial electrical stimulation. *Neuroscience Bulletin*, 31(2) :198–206.

Kuo, M.-F., Paulus, W. et Nitsche, M. A. (2006). Sex differences in cortical neuroplasticity in humans. *Neuroreport*, 17(16) :1703–1707.

Lapchak, P. A., Boitano, P. D., Butte, P. V., Fisher, D. J., Hölscher, T., Ley, E. J., Nuño, M., Voie, A. H. et Rajput, P. S. (2015). Transcranial Near-Infrared Laser Transmission (NILT) Profiles (800 nm) : Systematic Comparison in Four Common Research Species. *PLOS ONE*, 10(6) :e0127580.

Lapenta, O. M., Sierve, K. D., de Macedo, E. C., Fregni, F. et Boggio, P. S. (2014). Transcranial direct current stimulation modulates ERP-indexed inhibitory control and reduces food consumption. *Appetite*, 83 :42–48.

Lefaucheur, J.-P. (2009). Methods of therapeutic cortical stimulation. *Neurophysiologie Clinique = Clinical Neurophysiology*, 39(1) :1–14.

Legastelois, R., Botia, B., Coune, F., Jeanblanc, J. et Naassila, M. (2014). Deciphering the relationship between vulnerability to ethanol-induced behavioral sensitization and ethanol consumption in outbred mice. *Addiction Biology*, 19(2) :210–224.

Levasseur-Moreau, J., Brunelin, J. et Fecteau, S. (2013). Non-invasive brain stimulation can induce paradoxical facilitation. Are these neuroenhancements transferable and meaningful to security services ? *Frontiers in Human Neuroscience*, 7.

Li, H., Lei, X., Yan, T., Li, H., Huang, B., Li, L., Xu, L., Liu, L., Chen, N., Lü, L., Ma, Y., Xu, L., Li, J., Wang, Z., Zhang, B. et Hu, X. (2015). The temporary and accumulated effects of transcranial direct current stimulation for the treatment of advanced Parkinson's disease monkeys. *Scientific Reports*, 5 :12178.

Li, Y., Tian, X., Qian, L., Yu, X. et Jiang, W. (2011). Anodal transcranial direct current stimulation relieves the unilateral bias of a rat model of Parkinson's disease. *Conference proceedings : ... Annual International Conference of the IEEE Engineering in Medicine and Biology Society. IEEE Engineering in Medicine and Biology Society. Annual Conference*, 2011 :765–768.

Liebetanz, D., Fregni, F., Monte-Silva, K. K., Oliveira, M. B., Amâncio-dos Santos, A., Nitsche, M. A. et Guedes, R. C. A. (2006a). After-effects of transcranial direct current stimulation (tDCS) on cortical spreading depression. *Neuroscience Letters*, 398(1-2) :85–90.

Liebetanz, D., Klinker, F., Hering, D., Koch, R., Nitsche, M. A., Potschka, H., Löscher, W., Paulus, W. et Tergau, F. (2006b). Anticonvulsant Effects of Transcranial Direct-current Stimulation (tDCS) in the Rat Cortical Ramp Model of Focal Epilepsy. *Epilepsia*, 47(7) :1216–1224.

Liebetanz, D., Koch, R., Mayenfels, S., König, F., Paulus, W. et Nitsche, M. A. (2009). Safety limits of cathodal transcranial direct current stimulation in rats. *Clinical Neurophysiology : Official Journal of the International Federation of Clinical Neurophysiology*, 120(6) :1161–1167.

Liebetanz, D., Nitsche, M. A., Tergau, F. et Paulus, W. (2002). Pharmacological approach to the mechanisms of transcranial DC-stimulation-induced after-effects of human motor cortex excitability. *Brain : a journal of neurology*, 125(Pt 10) :2238–2247.

Lin, E.-J. D., Choi, E., Liu, X., Martin, A. et During, M. J. (2011). Environmental enrichment exerts sex-specific effects on emotionality in C57bl/6j mice. *Behavioural Brain Research*, 216(1) :349–357.

Lindenberg, R., Renga, V., Zhu, L. L., Nair, D. et Schlaug, G. (2010). Bihemispheric brain stimulation facilitates motor recovery in chronic stroke patients. *Neurology*, 75(24) :2176–2184.

Lippold, O. C. et Redfearn, J. W. (1964). Mental changes resulting from the passage of small direct currents through the human brain. *The British Journal of Psychiatry : The Journal of Mental Science*, 110 :768–772.

Lister, R. G. (1987). The use of a plus-maze to measure anxiety in the mouse. *Psychopharmacology*, 92(2) :180–185.

Lledo, P.-M. et Gheusi, G. (2006). Adult neurogenesis : from basic research to clinical applications. *Bulletin De l'Académie Nationale De Médecine*, 190(2) :385–400 ; discussion 400–402.

Loo, C. K., Alonzo, A., Martin, D., Mitchell, P. B., Galvez, V. et Sachdev, P. (2012). Transcranial direct current stimulation for depression : 3-week, randomised, sham-controlled trial. *The British Journal of Psychiatry : The Journal of Mental Science*, 200(1) :52–59.

Loo, C. K., Martin, D. M., Alonzo, A., Gandevia, S., Mitchell, P. B. et Sachdev, P. (2011). Avoiding skin burns with transcranial direct current stimulation : preliminary considerations. *International Journal of Neuropsychopharmacology*, 14(3) :425–426.

Loo, C. K., Sachdev, P., Martin, D., Pigot, M., Alonzo, A., Malhi, G. S., Lagopoulos, J. et Mitchell, P. (2010). A double-blind, sham-controlled trial of transcranial direct current stimulation for the treatment of depression. *The international journal of neuropsychopharmacology / official scientific journal of the Collegium Internationale Neuropsychopharmacologicum (CINP)*, 13(1) :61–69.

Loughead, J., Wileyto, E. P., Ruparel, K., Falcone, M., Hopson, R., Gur, R. et Lerman, C. (2015). Working memory-related neural activity predicts future smoking relapse. *Neuropsychopharmacology : Official Publication of the American College of Neuropsychopharmacology*, 40(6) :1311–1320.

Lüscher, C. et Malenka, R. C. (2012). NMDA Receptor-Dependent Long-Term Potentiation and Long-Term Depression (LTP/LTD). *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology*, 4(6) :a005710.

Lynch III, J. J., Castagné, V., Moser, P. C. et Mittelstadt, S. W. (2011). Comparison of methods for the assessment of locomotor activity in rodent safety pharmacology studies. *Journal of Pharmacological and Toxicological Methods*, 64(1) :74–80.

Maas, L. C., Lukas, S. E., Kaufman, M. J., Weiss, R. D., Daniels, S. L., Rogers, V. W., Kukes, T. J. et Renshaw, P. F. (1998). Functional magnetic resonance imaging of human brain activation during cue-induced cocaine craving. *The American Journal of Psychiatry*, 155(1) :124–126.

Macdonald, A. J. R. (1993). A brief review of the history of electrotherapy and its union with acupuncture. *Acupuncture in Medicine*, 11(2) :66–75.

Macedo, I. C., de Oliveira, C., Vercelino, R., Souza, A., Laste, G., Medeiros, L. F., Scarabelot, V. L., Nunes, E. A., Kuo, J., Fregni, F., Caumo, W. et Torres, I. L. S. (2016). Repeated transcranial direct current stimulation reduces food craving in Wistar rats. *Appetite*, 103 :29–37.

Madsen, T. M., Treschow, A., Bengzon, J., Bolwig, T. G., Lindvall, O. et Tingström, A. (2000). Increased neurogenesis in a model of electroconvulsive therapy. *Biological Psychiatry*, 47(12) :1043–1049.

Mahmoudi, H., Borhani Haghighi, A., Petramfar, P., Jahanshahi, S., Salehi, Z. et Fregni, F. (2011). Transcranial direct current stimulation : electrode montage in stroke. *Disability and Rehabilitation*, 33(15-16) :1383–1388.

Malberg, J. E., Eisch, A. J., Nestler, E. J. et Duman, R. S. (2000). Chronic antidepressant treatment increases neurogenesis in adult rat hippocampus. *The Journal of Neuroscience : The Official Journal of the Society for Neuroscience*, 20(24) :9104–9110.

Manenti, R., Brambilla, M., Petesi, M., Ferrari, C. et Cotelli, M. (2013). Enhancing verbal episodic memory in older and young subjects after non-invasive brain stimulation. *Frontiers in Aging Neuroscience*, 5 :49.

Matsuo, A., Maeoka, H., Hiyamizu, M., Shomoto, K., Morioka, S. et Seki, K. (2011). Enhancement of precise hand movement by transcranial direct current stimulation. *Neuroreport*, 22(2) :78–82.

Mattai, A., Miller, R., Weisinger, B., Greenstein, D., Bakalar, J., Tossell, J., David, C., Wassermann, E. M., Rapoport, J. et Gogtay, N. (2011). Tolerability of transcranial direct current stimulation in childhood-onset schizophrenia. *Brain Stimulation*, 4(4) :275–280.

McCutcheon, J. E. et Marinelli, M. (2009). Age matters. *The European Journal of Neuroscience*, 29(5) :997–1014.

Melón, L. C. et Boehm, S. L. (2011). Role of genotype in the development of locomotor sensitization to alcohol in adult and adolescent mice : comparison of the DBA/2j and C57bl/6j inbred mouse strains. *Alcoholism, clinical and experimental research*, 35(7) :1351–1360.

Meron, D., Hedger, N., Garner, M. et Baldwin, D. S. (2015). Transcranial direct current stimulation (tDCS) in the treatment of depression : Systematic review and meta-analysis of efficacy and tolerability. *Neuroscience and Biobehavioral Reviews*.

Meshi, D., Drew, M. R., Saxe, M., Ansorge, M. S., David, D., Santarelli, L., Malapani, C., Moore, H. et Hen, R. (2006). Hippocampal neurogenesis is not required for behavioral effects of environmental enrichment. *Nature Neuroscience*, 9(6) :729–731.

Miller, B. L. et Cummings, J. L. (2007). *The Human Frontal Lobes : Functions and Disorders*. Guilford Press.

Moliadze, V., Andreas, S., Lyzhko, E., Schmanke, T., Gurashvili, T., Freitag, C. M. et Siniatchkin, M. (2015). Ten minutes of 1 mA transcranial direct current stimulation was well tolerated by children and adolescents : Self-reports and resting state EEG analysis. *Brain Research Bulletin*, 119(Pt A) :25–33.

Moliadze, V., Antal, A. et Paulus, W. (2010). Boosting brain excitability by transcranial high frequency stimulation in the ripple range. *The Journal of Physiology*, 588(24) :4891–4904.

Moliadze, V., Atalay, D., Antal, A. et Paulus, W. (2012). Close to threshold transcranial electrical stimulation preferentially activates inhibitory networks before switching to excitation with higher intensities. *Brain Stimulation*, 5(4) :505–511.

Monai, H., Ohkura, M., Tanaka, M., Oe, Y., Konno, A., Hirai, H., Mikoshiba, K., Itohara, S., Nakai, J., Iwai, Y. et Hirase, H. (2016). Calcium imaging reveals glial involvement in transcranial direct current stimulation-induced plasticity in mouse brain. *Nature Communications*, 7 :11100.

Monte-Silva, K., Kuo, M.-F., Hessenthaler, S., Fresnoza, S., Liebetanz, D., Paulus, W. et Nitsche, M. A. (2013). Induction of Late LTP-Like Plasticity in the Human Motor Cortex by Repeated Non-Invasive Brain Stimulation. *Brain Stimulation*, 6(3) :424–432.

Monte-Silva, K., Kuo, M.-F., Liebetanz, D., Paulus, W. et Nitsche, M. A. (2010). Shaping the Optimal Repetition Interval for Cathodal Transcranial Direct Current Stimulation (tDCS). *Journal of Neurophysiology*, 103(4) :1735–1740.

Montenegro, R. A., Okano, A. H., Cunha, F. A., Gurgel, J. L., Fontes, E. B. et Farinatti, P. T. V. (2012). Prefrontal cortex transcranial direct current stimulation associated with aerobic exercise change aspects of appetite sensation in overweight adults. *Appetite*, 58(1) :333–338.

Morris, R. (1984). Developments of a water-maze procedure for studying spatial learning in the rat. *Journal of Neuroscience Methods*, 11(1) :47–60.

Moser, V. C. (2011). Functional Assays for Neurotoxicity Testing. *Toxicologic Pathology*, 39(1) :36–45.

Márquez-Ruiz, J., Leal-Campanario, R., Sánchez-Campusano, R., Molaee-Ardekani, B., Wendling, F., Miranda, P. C., Ruffini, G., Gruart, A. et Delgado-García, J. M. (2012). Transcranial direct-current stimulation modulates synaptic mechanisms involved in associative learning in behaving rabbits. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 109(17) :6710–6715.

Muszkat, D., Polanczyk, G. V., Dias, T. G. C. et Brunoni, A. R. (2016). Transcranial Direct Current Stimulation in Child and Adolescent Psychiatry. *Journal of Child and Adolescent Psychopharmacology*.

Nair, D. G., Renga, V., Lindenberg, R., Zhu, L. et Schlaug, G. (2011). Optimizing recovery potential through simultaneous occupational therapy and non-invasive brain-stimulation using tDCS. *Restorative Neurology and Neuroscience*, 29(6) :411–420.

Nakamura-Palacios, E. M., de Almeida Benevides, M. C., da Penha Zago-Gomes, M., de Oliveira, R. W. D., de Vasconcellos, V. F., de Castro, L. N. P., da Silva, M. C., Ramos, P. A. et Fregni, F. (2012). Auditory event-related potentials (P3) and cognitive changes induced by frontal direct current stimulation in alcoholics according to Lesch alcoholism typology. *The international journal of neuropsychopharmacology / official scientific journal of the Collegium Internationale Neuropsychopharmacologicum (CINP)*, 15(5) :601–616.

Nardone, R., Bergmann, J., Christova, M., Caleri, F., Tezzon, F., Ladurner, G., Trinka, E. et Golaszewski, S. (2012). Effect of transcranial brain stimulation for the treatment of Alzheimer disease : a review. *International Journal of Alzheimer's Disease*, 2012 :687909.

Nardone, R., Höller, Y., Tezzon, F., Christova, M., Schwenker, K., Golaszewski, S., Trinka, E. et Brigo, F. (2015). Neurostimulation in Alzheimer's disease : from basic research to clinical applications. *Neurological Sciences : Official Journal of the Italian Neurological Society and of the Italian Society of Clinical Neurophysiology*, 36(5) :689–700.

Nekhendzy, V., Fender, C. P., Davies, M. F., Lemmens, H. J. M., Kim, M. S., Bouley, D. M. et Maze, M. (2004). The antinociceptive effect of transcranial electrostimulation with combined direct and alternating current in freely moving rats. *Anesthesia and Analgesia*, 98(3) :730–737, table of contents.

Nestler, E. J. (2008). Transcriptional mechanisms of addiction : role of FosB. *Philosophical Transactions of the Royal Society of London B : Biological Sciences*, 363(1507) :3245–3255.

Nestler, E. J., Barrot, M., DiLeone, R. J., Eisch, A. J., Gold, S. J. et Monteggia, L. M. (2002). Neurobiology of depression. *Neuron*, 34(1) :13–25.

Nestler, E. J. et Hyman, S. E. (2010). Animal models of neuropsychiatric disorders. *Nature Neuroscience*, 13(10) :1161–1169.

Nibuya, M., Morinobu, S. et Duman, R. S. (1995). Regulation of BDNF and trkB mRNA in rat brain by chronic electroconvulsive seizure and antidepressant drug treatments. *The Journal of Neuroscience*, 15(11) :7539–7547.

Nitsche, M. A., Boggio, P. S., Fregni, F. et Pascual-Leone, A. (2009a). Treatment of depression with transcranial direct current stimulation (tDCS) : a review. *Experimental neurology*, 219(1) :14–19.

Nitsche, M. A., Cohen, L. G., Wassermann, E. M., Priori, A., Lang, N., Antal, A., Paulus, W., Hummel, F., Boggio, P. S., Fregni, F. et Pascual-Leone, A. (2008). Transcranial direct current stimulation : State of the art 2008. *Brain stimulation*, 1(3) :206–223.

Nitsche, M. A., Fricke, K., Henschke, U., Schlitterlau, A., Liebetanz, D., Lang, N., Henning, S., Tergau, F. et Paulus, W. (2003a). Pharmacological modulation of cortical excitability shifts induced by transcranial direct current stimulation in humans. *The Journal of physiology*, 553(Pt 1) :293–301.

Nitsche, M. A., Kuo, M.-F., Karrasch, R., Wächter, B., Liebetanz, D. et Paulus, W. (2009b). Serotonin affects transcranial direct current-induced neuroplasticity in humans. *Biological Psychiatry*, 66(5) :503–508.

Nitsche, M. A., Lampe, C., Antal, A., Liebetanz, D., Lang, N., Tergau, F. et Paulus, W. (2006). Dopaminergic modulation of long-lasting direct current-induced cortical excitability changes in the human motor cortex. *The European Journal of Neuroscience*, 23(6) :1651–1657.

Nitsche, M. A., Liebetanz, D., Schlitterlau, A., Henschke, U., Fricke, K., Frommann, K., Lang, N., Henning, S., Paulus, W. et Tergau, F. (2004). GABAergic modulation of DC stimulation-induced motor cortex excitability shifts in humans. *The European Journal of Neuroscience*, 19(10) :2720–2726.

Nitsche, M. A., Schauenburg, A., Lang, N., Liebetanz, D., Exner, C., Paulus, W. et Tergau, F. (2003b). Facilitation of implicit motor learning by weak transcranial direct current stimulation of the primary motor cortex in the human. *Journal of Cognitive Neuroscience*, 15(4) :619–626.

Notturno, F., Pace, M., Zappasodi, F., Cam, E., Bassetti, C. L. et Uncini, A. (2014). Neuroprotective effect of cathodal transcranial direct current stimulation in a rat stroke model. *Journal of the Neurological Sciences*, 342(1-2) :146–151.

Nutt, D. (1999). Alcohol and the brain. Pharmacological insights for psychiatrists. *The British Journal of Psychiatry*, 175(2) :114–119.

Ohn, S. H., Park, C.-I., Yoo, W.-K., Ko, M.-H., Choi, K. P., Kim, G.-M., Lee, Y. T. et Kim, Y.-H. (2008). Time-dependent effect of transcranial direct current stimulation on the enhancement of working memory. *Neuroreport*, 19(1) :43–47.

Olbrich, H. M., Valerius, G., Paris, C., Hagenbuch, F., Ebert, D. et Juengling, F. D. (2006). Brain activation during craving for alcohol measured by positron emission tomography. *The Australian and New Zealand Journal of Psychiatry*, 40(2) :171–178.

Palm, U., Schiller, C., Fintescu, Z., Obermeier, M., Keeser, D., Reisinger, E., Pogarell, O., Nitsche, M. A., Möller, H.-J. et Padberg, F. (2012). Transcranial direct current stimulation in treatment resistant depression : a randomized double-blind, placebo-controlled study. *Brain Stimulation*, 5(3) :242–251.

Patterson, F., Jepson, C., Loughead, J., Perkins, K., Strasser, A. A., Siegel, S., Frey, J., Gur, R. et Lerman, C. (2010). Working memory deficits predict short-term smoking resumption following brief abstinence. *Drug and Alcohol Dependence*, 106(1) :61–64.

Paulus, W. (2011). Transcranial electrical stimulation (tES – tDCS ; tRNS, tACS) methods. *Neuropsychological Rehabilitation*, 21(5) :602–617.

Paxinos, G. et Franklin, K. B. J. (2001). *The Mouse Brain in Stereotaxic Coordinates*. Academic press, San Diego, second edition édition.

Payne, N. A. et Prudic, J. (2009). Electroconvulsive Therapy Part I : A Perspective on the Evolution and Current Practice of ECT. *Journal of psychiatric practice*, 15(5) :346–368.

Pedron, S., Beverley, J., Haffen, E., Andrieu, P., Steiner, H. et Van Waes, V. (2016). Transcranial direct current stimulation produces long-lasting attenuation of cocaine-induced behavioral responses and gene regulation in corticostriatal circuits. *Addiction Biology*.

Pedron, S., Monnin, J., Haffen, E., Sechter, D. et Van Waes, V. (2014). Repeated transcranial direct current stimulation prevents abnormal behaviors associated with abstinence from chronic nicotine consumption. *Neuropsychopharmacology : official publication of the American College of Neuropsychopharmacology*, 39(4) :981–988.

Pelletier, S. J. et Cicchetti, F. (2014). Cellular and molecular mechanisms of action of transcranial direct current stimulation : evidence from in vitro and in vivo models. *The international journal of neuropsychopharmacology / official scientific journal of the Collegium Internationale Neuropsychopharmacologicum (CINP)*, 18(2).

Pelletier, S. J., Lagacé, M., St-Amour, I., Arsenault, D., Cisbani, G., Chabrat, A., Fecteau, S., Lévesque, M. et Cicchetti, F. (2015). The Morphological and Molecular Changes of Brain Cells Exposed to Direct Current Electric Field Stimulation. *International Journal of Neuropsychopharmacology*, 18(5).

Petit-Demouliere, B., Chenu, F. et Bourin, M. (2005). Forced swimming test in mice : a review of antidepressant activity. *Psychopharmacology*, 177(3) :245–255.

Phillips, T. J., Dickinson, S. et Burkhart-Kasch, S. (1994). Behavioral sensitization to drug stimulant effects in C57bl/6j and DBA/2j inbred mice. *Behavioral Neuroscience*, 108(4) :789–803.

Picciotto, M. R., Brunzell, D. H. et Caldarone, B. J. (2002). Effect of nicotine and nicotinic receptors on anxiety and depression. *Neuroreport*, 13(9) :1097–1106.

Podda, M. V., Cocco, S., Mastrodonato, A., Fusco, S., Leone, L., Barbati, S. A., Colussi, C., Ripoli, C. et Grassi, C. (2016). Anodal transcranial direct current stimulation boosts synaptic plasticity and memory in mice via epigenetic regulation of Bdnf expression. *Scientific Reports*, 6 :22180.

Porsolt, R. D., Le Pichon, M. et Jalfre, M. (1977). Depression a new animal model sensitive to antidepressant treatments. *Nature*, 266(5604) :730–732.

Preux, P., Druet-Cabanac, M., Dalmay, F. et Vergnenègre, A. (2003). Qu'est-ce qu'un test paramétrique ? *Revue des Maladies Respiratoires*, 20(6-C1) :952–954.

Priori, A., Berardelli, A., Rona, S., Accornero, N. et Manfredi, M. (1998). Polarization of the human motor cortex through the scalp. *Neuroreport*, 9(10) :2257–2260.

Purpura, D. P. et McMurtry, J. G. (1965). Intracellular activities and evoked potential changes during polarization of motor cortex. *Journal of Neurophysiology*, 28 :166–185.

Rahman, A., Reato, D., Arlotti, M., Gasca, F., Datta, A., Parra, L. C. et Bikson, M. (2013). Cellular effects of acute direct current stimulation : somatic and synaptic terminal effects. *The Journal of Physiology*, 591(Pt 10) :2563–2578.

Ramirez-Amaya, V., Marrone, D. F., Gage, F. H., Worley, P. F. et Barnes, C. A. (2006). Integration of new neurons into functional neural networks. *The Journal of Neuroscience : The Official Journal of the Society for Neuroscience*, 26(47) :12237–12241.

Ranieri, F., Podda, M. V., Riccardi, E., Frisullo, G., Dileone, M., Profice, P., Pilato, F., Lazzaro, V. D. et Grassi, C. (2012). Modulation of LTP at rat hippocampal CA3-CA1 synapses by direct current stimulation. *Journal of Neurophysiology*, 107(7) :1868–1880.

Redfearn, J. W., Lippold, O. C. et Costain, R. (1964). A preliminary account of the clinical effects of polarizing the brain in certain psychiatric disorders. *The British Journal of Psychiatry : The Journal of Mental Science*, 110 :773–785.

Redgrave, P., Vautrelle, N. et Reynolds, J. N. J. (2011). Functional properties of the basal ganglia's re-entrant loop architecture : selection and reinforcement. *Neuroscience*, 198 :138–151.

Rhodes, J. S., Best, K., Belknap, J. K., Finn, D. A. et Crabbe, J. C. (2005). Evaluation of a simple model of ethanol drinking to intoxication in C57bl/6j mice. *Physiology & Behavior*, 84(1) :53–63.

Riggall, K., Forlini, C., Carter, A., Hall, W., Weier, M., Partridge, B. et Meinzer, M. (2015). Researchers' perspectives on scientific and ethical issues with transcranial direct current stimulation : An international survey. *Scientific Reports*, 5.

Robinson, T. E. et Berridge, K. C. (1993). The neural basis of drug craving : an incentive-sensitization theory of addiction. *Brain Research. Brain Research Reviews*, 18(3) :247–291.

Robinson, T. E. et Berridge, K. C. (2001). Incentive-sensitization and addiction. *Addiction (Abingdon, England)*, 96(1) :103–114.

Rohan, J. G., Carhuatanta, K. A., McInturf, S. M., Miklasevich, M. K. et Jankord, R. (2015). Modulating Hippocampal Plasticity with In Vivo Brain Stimulation. *The Journal of Neuroscience : The Official Journal of the Society for Neuroscience*, 35(37) :12824–12832.

Rueger, M. A., Keuters, M. H., Walberer, M., Braun, R., Klein, R., Sparing, R., Fink, G. R., Graf, R. et Schroeter, M. (2012). Multi-session transcranial direct current stimulation (tDCS) elicits inflammatory and regenerative processes in the rat brain. *PloS One*, 7(8) :e43776.

Rush, S. et Driscoll, D. A. (1968). Current distribution in the brain from surface electrodes. *Anesthesia and Analgesia*, 47(6) :717–723.

Russo, S. J. et Nestler, E. J. (2013). The Brain Reward Circuitry in Mood Disorders. *Nature reviews. Neuroscience*, 14(9).

Sahay, A. et Hen, R. (2007). Adult hippocampal neurogenesis in depression. *Nature Neuroscience*, 10(9) :1110–1115.

Saiote, C., Turi, Z., Paulus, W. et Antal, A. (2013). Combining functional magnetic resonance imaging with transcranial electrical stimulation. *Frontiers in Human Neuroscience*, 7 :435.

Santarelli, L., Saxe, M., Gross, C., Surget, A., Battaglia, F., Dulawa, S., Weisstaub, N., Lee, J., Duman, R., Arancio, O., Belzung, C. et Hen, R. (2003). Requirement of hippocampal neurogenesis for the behavioral effects of antidepressants. *Science (New York, N.Y.)*, 301(5634) :805–809.

Sauvaget, A., Trojak, B., Bulteau, S., Jiménez-Murcia, S., Fernández-Aranda, F., Wolz, I., Menchón, J. M., Achab, S., Vanelle, J.-M. et Grall-Bronnec, M. (2015). Transcranial direct current stimulation (tDCS) in behavioral and food addiction : a systematic review of efficacy, technical, and methodological issues. *Frontiers in Neuroscience*, 9 :349.

Sawada, M. et Sawamoto, K. (2013). Mechanisms of neurogenesis in the normal and injured adult brain. *The Keio Journal of Medicine*, 62(1) :13–28.

Schlaug G, Renga V et Nair D (2008). Transcranial direct current stimulation in stroke recovery. *Archives of Neurology*, 65(12) :1571–1576.

Schweid, L., Rushmore, R. J. et Valero-Cabré, A. (2008). Cathodal transcranial direct current stimulation on posterior parietal cortex disrupts visuo-spatial processing in the contralateral visual field. *Experimental brain research*, 186(3) :409–417.

Segrave, R. A., Arnold, S., Hoy, K. et Fitzgerald, P. B. (2014). Concurrent cognitive control training augments the antidepressant efficacy of tDCS : a pilot study. *Brain Stimulation*, 7(2) :325–331.

Sehm, B. et Ragert, P. (2013). Why non-invasive brain stimulation should not be used in military and security services. *Frontiers in Human Neuroscience*, 7.

Sienaert, P., De Fruyt, J., Dierick, M. et Ansseau, M. (2007). *Electroconvulsivothérapie*. Academia Press, Belgique, première édition édition.

Sinha, R. (2008). Chronic Stress, Drug Use, and Vulnerability to Addiction. *Annals of the New York Academy of Sciences*, 1141 :105–130.

Song, J.-J., Vanneste, S., Van de Heyning, P. et De Ridder, D. (2012). Transcranial Direct Current Stimulation in Tinnitus Patients : A Systemic Review and Meta-Analysis. *The Scientific World Journal*, 2012.

Spear, L. P. (2000). The adolescent brain and age-related behavioral manifestations. *Neuroscience and Biobehavioral Reviews*, 24(4) :417–463.

Spezia Adachi, L. N., Caumo, W., Laste, G., Fernandes Medeiros, L., Ripoll Rozisky, J., de Souza, A., Fregni, F. et Torres, I. L. S. (2012). Reversal of chronic stress-induced pain by transcranial direct current stimulation (tDCS) in an animal model. *Brain Research*, 1489 :17–26.

Spezia Adachi, L. N., Quevedo, A. S., de Souza, A., Scarabelot, V. L., Rozisky, J. R., de Oliveira, C., Marques Filho, P. R., Medeiros, L. F., Fregni, F., Caumo, W. et Torres, I. L. S. (2015). Exogenously induced brain activation regulates neuronal activity by top-down modulation : conceptualized model for electrical brain stimulation. *Experimental Brain Research*, 233(5) :1377–1389.

Stagg, C. J., Best, J. G., Stephenson, M. C., O'Shea, J., Wylezinska, M., Kincses, Z. T., Morris, P. G., Matthews, P. M. et Johansen-Berg, H. (2009). Polarity-Sensitive Modulation of Cortical

Neurotransmitters by Transcranial Stimulation. *The Journal of Neuroscience*, 29(16) :5202–5206.

Stagg, C. J. et Nitsche, M. A. (2011). Physiological basis of transcranial direct current stimulation. *The Neuroscientist : a review journal bringing neurobiology, neurology and psychiatry*, 17(1) :37–53.

Steenbergen, L., Sellaro, R., Hommel, B., Lindenberger, U., Kühn, S. et Colzato, L. S. (2015). "Unfocus" on foc.us : commercial tDCS headset impairs working memory. *Experimental Brain Research*.

Steinberg, H. (2013). A Pioneer Work on Electric Brain Stimulation in Psychotic Patients. Rudolph Gottfried Arndt and his 1870s Studies. *Brain Stimulation*, 6(4) :477–481.

Steiner, H. et Van Waes, V. (2013). Addiction-related gene regulation : risks of exposure to cognitive enhancers vs. other psychostimulants. *Progress in neurobiology*, 100 :60–80.

Steketee, J. D. et Kalivas, P. W. (2011). Drug Wanting : Behavioral Sensitization and Relapse to Drug-Seeking Behavior. *Pharmacological Reviews*, 63(2) :348–365.

Takano, Y., Yokawa, T., Masuda, A., Niimi, J., Tanaka, S. et Hironaka, N. (2011). A rat model for measuring the effectiveness of transcranial direct current stimulation using fMRI. *Neuroscience Letters*, 491(1) :40–43.

Tanaka, S., Hanakawa, T., Honda, M. et Watanabe, K. (2009). Enhancement of pinch force in the lower leg by anodal transcranial direct current stimulation. *Experimental Brain Research. Experimentelle Hirnforschung. Experimentation Cerebrale*, 196(3) :459–465.

Tanaka, T., Takano, Y., Tanaka, S., Hironaka, N., Kobayashi, K., Hanakawa, T., Watanabe, K. et Honda, M. (2013). Transcranial direct-current stimulation increases extracellular dopamine levels in the rat striatum. *Frontiers in Systems Neuroscience*, 7 :6.

Tanti, A. et Belzung, C. (2013). Hippocampal neurogenesis : a biomarker for depression or antidepressant effects ? Methodological considerations and perspectives for future research. *Cell and Tissue Research*, 354(1) :203–219.

Tanti, A., Westphal, W.-P., Girault, V., Brizard, B., Devers, S., Leguisquet, A.-M., Surget, A. et Belzung, C. (2013). Region-dependent and stage-specific effects of stress, environmental enrichment, and antidepressant treatment on hippocampal neurogenesis. *Hippocampus*, 23(9) :797–811.

Teo, F., Hoy, K. E., Daskalakis, Z. J. et Fitzgerald, P. B. (2011). Investigating the Role of Current Strength in tDCS Modulation of Working Memory Performance in Healthy Controls. *Frontiers in Psychiatry*, 2 :45.

Terney, D., Chaieb, L., Moliadze, V., Antal, A. et Paulus, W. (2008). Increasing human brain excitability by transcranial high-frequency random noise stimulation. *The Journal of Neuroscience : The Official Journal of the Society for Neuroscience*, 28(52) :14147–14155.

Tirelli, E., Laviola, G. et Adriani, W. (2003). Ontogenesis of behavioral sensitization and conditioned place preference induced by psychostimulants in laboratory rodents. *Neuroscience & Biobehavioral Reviews*, 27(1–2) :163–178.

To, W. T., Hart, J., De Ridder, D. et Vanneste, S. (2016). Considering the influence of stimulation parameters on the effect of conventional and high-definition transcranial direct current stimulation. *Expert Review of Medical Devices*.

Toth, L. A. (2015). The influence of the cage environment on rodent physiology and behavior : Implications for reproducibility of pre-clinical rodent research. *Experimental Neurology*, 270 :72–77.

Tsoucalas, G., Karamanou, M., Lymperi, M., Gennimata, V. et Androutsos, G. (2014). The "torpedo" effect in medicine. *International Maritime Health*, 65(2) :65–67.

Tzschentke, T. M. (1998). Measuring reward with the conditioned place preference paradigm : a comprehensive review of drug effects, recent progress and new issues. *Progress in Neurobiology*, 56(6) :613–672.

Ueyama, E., Ukai, S., Ogawa, A., Yamamoto, M., Kawaguchi, S., Ishii, R. et Shinosaki, K. (2011). Chronic repetitive transcranial magnetic stimulation increases hippocampal neurogenesis in rats. *Psychiatry and Clinical Neurosciences*, 65(1) :77–81.

Underwood, E. (2016). Cadaver study challenges brain stimulation methods. *Science*, 352(6284) :397–397.

Uylings, H. B. M., Groenewegen, H. J. et Kolb, B. (2003). Do rats have a prefrontal cortex ? *Behavioural Brain Research*, 146(1-2) :3–17.

Valjent, E., Aubier, B., Corbillé, A.-G., Brami-Cherrier, K., Caboche, J., Topilko, P., Girault, J.-A. et Hervé, D. (2006). Plasticity-associated gene Krox24/Zif268 is required for long-lasting behavioral effects of cocaine. *The Journal of Neuroscience : The Official Journal of the Society for Neuroscience*, 26(18) :4956–4960.

Veyrac, A., Besnard, A., Caboche, J., Davis, S. et Laroche, S. (2014). The transcription factor Zif268/Egr1, brain plasticity, and memory. *Progress in Molecular Biology and Translational Science*, 122 :89–129.

Veyrac, A., Gros, A., Bruel-Jungerman, E., Rochefort, C., Kleine Borgmann, F. B., Jessberger, S. et Laroche, S. (2013). Zif268/egr1 gene controls the selection, maturation and functional integration of adult hippocampal newborn neurons by learning. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 110(17) :7062–7067.

Vialou, V., Feng, J., Robison, A. J. et Nestler, E. J. (2013). Epigenetic mechanisms of depression and antidepressant action. *Annual Review of Pharmacology and Toxicology*, 53 :59–87.

Vidailhet, P., Foucher, J., Lauer, V. et Chassagnon, S. (2005). La stimulation magnétique répétitive en thérapeutique neurologique et psychiatrique : des espoirs et des limites en commun. *Epileptologie*, (22) :157 – 167.

Vonck, K., Raedt, R., Naulaerts, J., De Vogelaere, F., Thiery, E., Van Roost, D., Aldenkamp, B., Miatton, M. et Boon, P. (2014). Vagus nerve stimulation...25 years later ! What do we know about the effects on cognition ? *Neuroscience & Biobehavioral Reviews*, 45 :63–71.

Vorhees, C. V. et Williams, M. T. (2006). Morris water maze : procedures for assessing spatial and related forms of learning and memory. *Nature Protocols*, 1(2) :848–858.

Vorhees, C. V. et Williams, M. T. (2014). Assessing spatial learning and memory in rodents. *ILAR journal / National Research Council, Institute of Laboratory Animal Resources*, 55(2) :310–332.

Wachter, D., Wrede, A., Schulz-Schaeffer, W., Taghizadeh-Waghefi, A., Nitsche, M. A., Kutschenko, A., Rohde, V. et Liebetanz, D. (2011). Transcranial direct current stimulation induces polarity-specific changes of cortical blood perfusion in the rat. *Experimental Neurology*, 227(2) :322–327.

WHO (2014). Global status report on alcohol and health 2014. Rapport technique WM 274.

Willuhn, I., Sun, W. et Steiner, H. (2003). Topography of cocaine-induced gene regulation in the rat striatum : relationship to cortical inputs and role of behavioural context. *The European Journal of Neuroscience*, 17(5) :1053–1066.

Wilson, S. J., Sayette, M. A. et Fiez, J. A. (2004). Prefrontal responses to drug cues : a neurocognitive analysis. *Nature Neuroscience*, 7(3) :211–214.

Wrase, J., Grüsser, S. M., Klein, S., Diener, C., Hermann, D., Flor, H., Mann, K., Braus, D. F. et Heinz, A. (2002). Development of alcohol-associated cues and cue-induced brain activation in alcoholics. *European Psychiatry : The Journal of the Association of European Psychiatrists*, 17(5) :287–291.

Xie, G., Krnjević, K. et Ye, J.-H. (2013). Salsolinol modulation of dopamine neurons. *Frontiers in Behavioral Neuroscience*, 7 :52.

Xu, J., Fregni, F., Brody, A. L. et Rahman, A. S. (2013). Transcranial direct current stimulation reduces negative affect but not cigarette craving in overnight abstinent smokers. *Frontiers in psychiatry*, 4 :112.

Yoneyama, N., Crabbe, J. C., Ford, M. M., Murillo, A. et Finn, D. A. (2008). Voluntary Ethanol Consumption in 22 Inbred Mouse Strains. *Alcohol (Fayetteville, N.Y.)*, 42(3) :149–160.

Yoon, K. J., Oh, B.-M. et Kim, D.-Y. (2012). Functional improvement and neuroplastic effects of anodal transcranial direct current stimulation (tDCS) delivered 1 day vs. 1 week after cerebral ischemia in rats. *Brain research*, 1452 :61–72.

Yu, S. H., Park, S. D. et Sim, K. C. (2014). The Effect of tDCS on Cognition and Neurologic Recovery of Rats with Alzheimer's Disease. *Journal of Physical Therapy Science*, 26(2) :247–249.

Zhao, C., Teng, E. M., Summers, R. G., Ming, G.-l. et Gage, F. H. (2006). Distinct Morphological Stages of Dentate Granule Neuron Maturation in the Adult Mouse Hippocampus. *The Journal of Neuroscience*, 26(1) :3–11.

Zhao, M., Harris, S. E., Horn, D., Geng, Z., Nishimura, R., Mundy, G. R. et Chen, D. (2002). Bone morphogenetic protein receptor signaling is necessary for normal murine postnatal bone formation. *The Journal of Cell Biology*, 157(6) :1049–1060.

Zheng, X., Alsop, D. C. et Schlaug, G. (2011). Effects of Transcranial Direct Current Stimulation (tDCS) on Human Regional Cerebral Blood Flow. *NeuroImage*, 58(1) :26–33.

Annexes

A Revue bibliographique - *Transcranial direct current stimulation for memory enhancement : from clinical research to animal models*

frontiers in
SYSTEMS NEUROSCIENCE

MINI REVIEW ARTICLE
published: 04 September 2014
doi: 10.3389/fnsys.2014.00159

Transcranial direct current stimulation for memory enhancement: from clinical research to animal models

Djamila Bennabi[1†], Solène Pedron[1†], Emmanuel Haffen[1,2], Julie Monnin[1,2], Yvan Peterschmitt[1] and Vincent Van Waes[1]*

[1] *EA 481 Laboratory of Integrative and Clinical Neuroscience, University of Franche-Comté/SFR FED 4234, Besançon, France*
[2] *INSERM CIC-IT 808 Clinical Investigation Centre for Innovative Technology, University Hospital of Besançon, Besançon, France*

Edited by:
Ioan Opris, Wake Forest University, USA

Reviewed by:
Berthold Langguth, University of Regensburg, Germany
Estate M. Sokhadze, University of Louisville, USA

***Correspondence:**
Vincent Van Waes, EA 481 Laboratory of Integrative and Clinical Neuroscience, University of Franche-Comté - UFR Sciences et Techniques, 2 Place Leclerc, 25030 Besançon, France
e-mail: vincent.van_waes@univ-fcomte.fr

† *Co-first authors.*

There is a growing demand for new brain-enhancing technologies to improve mental performance, both for patients with cognitive disorders and for healthy individuals. Transcranial direct current stimulation (tDCS) is a non-invasive, painless, and easy to use neuromodulatory technique that can improve performance on a variety of cognitive tasks in humans despite its exact mode of action remains unclear. We have conducted a mini-review of the literature to first briefly summarize the growing amount of data from clinical trials assessing the efficacy of tDCS, focusing exclusively on learning and memory performances in healthy human subjects and in patients with depression, schizophrenia, and other neurological disorders. We then discuss these findings in the context of the strikingly few studies resulting from animal research. Finally, we highlight future directions and limitations in this field and emphasize the need to develop translational studies to better understand how tDCS improves memory, a necessary condition before it can be used as a therapeutic tool.

Keywords: tDCS, neuromodulation, prefrontal cortex, cognitive enhancement, memory

Non-invasive neuromodulatory techniques including tDCS have been shown to improve performance on a variety of cognitive domains. tDCS is a painless stimulation method that delivers subthreshold electrical currents to the brain and manipulates the resting membrane potential of cortical neurons (e.g., Stagg and Nitsche, 2011). Since the dorsolateral prefrontal cortex (DLPFC) is a crucial element in the neural network subserving executive functions (i.e., working memory, planning, goal-oriented behavior, attention, and inhibitory control; Wood and Grafman, 2003), targeting this area with neuromodulatory techniques represents a promising therapeutic option for improving cognition. In this mini-review, we summarize data obtained from clinical trials (see **Tables 1A**, **B**) and animal models focusing on tDCS-induced memory enhancement in healthy subjects and in subjects with psychiatric and neurological disorders known to induce mild to severe cognition impairments. Limitations and perspectives are then discussed.

HUMAN STUDIES

tDCS FOR COGNITIVE ENHANCEMENT IN HEALTHY SUBJECTS

To date, most studies conducted in healthy individuals have assessed the effect of tDCS in enhancing verbal and visuospatial components of working memory (WM) and learning processes. Fregni et al. found that online anodal tDCS at 1 mA applied over the left DLPFC enhances accuracy in a three-back letter task compared with cathodal stimulation of the same area or anodal stimulation of the primary motor cortex (Fregni et al., 2005). Based on the same paradigm, Ohn et al. investigated the time-dependency of tDCS and found an increased number of correct responses starting 20 min after the beginning of active stimulation compared to sham, whereas earlier measurements did not reveal any stimulation effects (Ohn et al., 2008). More recently, Lally et al. confirmed these results in a larger cohort, but only when subjects were tested during the stimulation session (online), without a persisting effect 48 h later (Lally et al., 2013). Mulquiney et al. obtained discordant results in a sample of 10 healthy volunteers, with no improvement in accuracy but in speed performance after anodal tDCS (Mulquiney et al., 2011). However, Marshall et al. reported increased reaction time in the same task during both anodal and cathodal bilateral intermittent stimulation over the DLPFC (Marshall et al., 2005). Andrews and collaborators investigated the impact of 1 session of anodal tDCS delivered during a WM task (n-back task) on performances on a subsequent WM task (digit span forward) (Andrews et al., 2011). Upon completion of the n-back task, they observed a significant improvement in performance on the digit span forward task. Berryhill and Jones enhanced WM by application of anodal tDCS over the left or right DLPFC in subjects with a high educational level, whereas tDCS provided no benefit in WM performance to a less educated group (Berryhill and Jones, 2012). Interestingly, Teo et al. found that WM performances are influenced by current strength of anodal tDCS (Teo et al., 2011). Gladwin et al. explored the impact of anodal left DLPFC tDCS on Sternberg task completion when distractor stimuli were presented during the retention period. tDCS improved reaction time only when the incorrect choice had been a distractor suggesting stimulation might have an effect on selective attention. In a subsequent study, they showed that tDCS improves reaction time in an implicit association test

Table 1A | Studies investigating the cognitive effects of tDCS in healthy subjects.

Study					tDCS parameters				Results
Author	**Design**	**n**	**Task**		**A/C**	**I (mA)**	**D (min)**	**E (cm^2)**	
Fregni et al., 2005	Cross over Single blind	15	n-back task	Online	F3/FP2	1	10	35	Improvement in accuracy (more correct responses) No improvement in reaction time
Ohn et al., 2008	Cross over Single blind	15	n-back task	Online Offline	F3/FP2	1	20	35	Increased number of correct responses after 30 min of stimulation with anodal stimulation
Lally et al., 2013	Cross over Double blind	21	n-back task	Online Offline	F3/cheek	1	10	35	Improvement of performance during the first stimulation phase with active stimulation
Mulquiney et al., 2011	Cross over	10	Cogstate Sternberg task	Online Offline	F3/FP2	1	10	35	2-back task: no effects of session or time in accuracy; improvement in reaction time Sternberg task: no effect of session or time
Marshall et al., 2005	Cross over Double blind	12	Modified Sternberg task	Online	F3/F4	0.26	15	64	No improvement in accuracy Slower reaction time after anodal and cathodal tDCS
Andrews et al., 2011	Cross over	10	n-back task Digit span tasks	Online Offline	F3/FP2	1	10	35	Previous application of tDCS during the n-back task resulted in increased performance on digit span forward
Berryhill and Jones, 2012	Cross over	25	n-back task	Offline	F3/cheek F4/cheek	1.5	10	35	Low education group: unchanged or impaired performance High education group: improved performance
Teo et al., 2011	Cross over Double blind	12	n-back task Sternberg task	Online Offline	F3/FP2	1 or 2	20	35	n-back task: decrease reaction time during the last 5 min of 2 mA session. Sternberg task: no difference in reaction time and accuracy between 1 mA, 2 mA, or sham stimulation
Gladwin et al., 2012a	Cross over	14	Sternberg task	Online Offline	F3/FP2	1	10	35	Improvement in reaction time, influence of interference
Gladwin et al., 2012b	Cross over	20	Modified version of the IAT	Offline	F3/FP2	1	10	35	Improvement in reaction time in the congruent rather than in the incongruent condition
Kincses et al., 2004	Cross over	14	PCL	Online	F3/Cz	1	10	35	Improvement of implicit learning by anodal but not cathodal stimulation
Hammer et al., 2011	Cross over Single blind	36	Recognition memory task	Online Offline	F3/FP2	1	30	35	Cathodal stimulation hampered memory performance after errorful learning, whereas anodal stimulation did not alter encoding and memory retrieval
Manenti et al., 2013	Cross over Single blind	64	Episodic memory task	Online	F3/F4	1.5	6	35	Improvement of verbal episodic memory with anodal tDCS applied during the retrieval phase Better performances in young subjects
Zwissler et al., 2014	Cross over Double blind	85	Episodic memory task	Online	F3/contralateral musculus deltoideus	1	15	35	Anodal tDCS increased whereas cathodal stimulation decreased the number of false alarms to lure pictures in subsequent recognition memory testing

Cz, midline central (international 10/20 EEG system); F3, left dorsolateral prefrontal cortex; F4, right dorsolateral prefrontal cortex; FP2, supraorbital right; IAT, Implicit Association Test; PCL, probabilistic classification learning; I, intensity; D, duration; E, electrodes size.

Table 1B | Studies investigating the cognitive effects of tDCS in psychiatric diseases.

Study					tDCS parameters				Results
Author	**Design**	**n**	**Task**		**A/C**	**I (mA)**	**D (min)**	**E (cm^2)**	
DEPRESSION									
Brunoni et al., 2013	Double blind RCT	28 UP	Probabilistic classification learning	Online	F3/F4	2	30	25	No improvement in implicit learning after real stimulation
Fregni et al., 2006	Double blind RCT	18 UP	Digit span forward and backward test	Online	F3/FP2	1	10	35	Improvement in working memory
Oliveira et al., 2013	Double blind RCT	28 UP	n-back task	Online	F3/F4	2	30	25	Enhancement of working memory Increase rate of correct responses Increase ability to discriminate between correct responses and false alarms
Wolkenstein and Plewnia, 2013	Double blind RCT	22 MDD	Delayed- response working memory task	Online	F3/Right upper arm	1	20	35	Enhancement of working memory performance and elimination of attentional bias
Ferrucci et al., 2009	Open label	8 MDD	Sternberg Task Word recognition task Posner paradigm	Offline	F3/F4	2	20	32	Cognitive tasks showed no significant difference between active or sham stimulation
Loo et al., 2012	Double blind RCT	64 MDD	RAVLT, Stroop Test, COWAT, Digit span, SDMT	Offline	F3/F8	2	20	35	Improvement of working memory performances, indexed by the SDMT, after 1 tDCS session No improvement in cognitive performances after 15 sessions
Palm et al., 2012	Double blind RCT	22 MDD	VLMT, RWT LNS_{WAIS}	Offline	F3/FP2	1 or 2	20	35	Cognitive tasks showed no significant difference between active or sham stimulation
SCHIZOPHRENIA									
Vercammen et al., 2011	Single blind Cross over	20	Probabilistic classification learning	Online	F3/FP2	2	20	35	Improvement in implicit learning after real stimulation in a subset of patient
Hoy et al., 2014	Double blind RCT	18	nback	Offline	F3/FP2	1 or 2	20		Improvement in working memory at 2 mA
Goder et al., 2013	Cross over	14	RAVLT	Offline	F3/F4	0–0.3	During sleep	64	Improvement in working memory
ALZHEIMER									
Boggio et al., 2009	Double blind RCT	10	Digit span test Visual recognition Memory task Stroop test	Online	F3/ FP2 T7/FP2	2	30	35	Improvement in working memory after prefrontal and temporal stimulation No effect on digit span and Stroop performance
Cotelli et al., 2014	Double blind RCT	36 (mild to moderate)	Face-name association memory task Memory training	Offline	F3/Right deltoid muscle	2	24		No additive effects of anodal tDCS on memory performance when combined with memory training

(Continued)

Table 1B | Continued

Study					tDCS parameters				Results
Author	**Design**	**n**	**Task**		**A/C**	**I (mA)**	**D (min)**	**E (cm^2)**	
PARKINSON									
Boggio et al., 2006	Double blind RCT	18	n-back task	Online	F3/ FP2	1 or 2	20	35	Improvement in accuracy No improvement in reaction time No effect at 1 mA
Pereira et al., 2013	Cross over	16	Semantic fluency task phonemic task	Offline	F3/FP2 P3-T5/FP2	2	20	35	Improvement in the phonemic fluency task after DLPFC tDCS
POST-STROKE									
Kang et al., 2009	Double blind RCT	10	Go/No-Go	Offline	F3/FP2	2	20	25	Improvement in response accuracy at 1 and 3 h post-stimulation
Jo et al., 2009	Double blind RCT	10	n-back task	Offline	F3/FP2	2	30	35	Improvement in the two-back task after DLPFC tDCS
Park et al., 2013	Double blind RCT	11	Seoul computerized neuropsychological test	Offline	F3/F4	2	30	25	Improvement in attention when combined with cognitive rehabilitation

COWAT, Controlled Oral Word Association Test; F3, left dorsolateral prefrontal cortex (international 10/20 EEG system); F4, right dorsolateral prefrontal cortex; FP2, supraorbital right; F8, lateral aspect of the right orbit; LNS_{WAIS}, Letter Number Sequencing Task of the Wechsler Adult Intelligence Scale; MDD, Major Depressive Disorder; RAVLT, Ray Auditory Verbal Learning Test; RCT, Randomized Controlled Trial; RWT, Regensburg Word Fluency Test; SDMT, Symbol Digit Modalities Test; UP, Unipolar Depression; I, intensity; D, duration; E, electrodes size; VLMT, Verbal Learning Memory Test, P3-T5, left temporo-parietal cortex.

without affecting the subjects' ability to overcome bias (Gladwin et al., 2012a,b).

In addition, tDCS has been recently used as an investigative tool in other memory domains. With regard to implicit memory (probabilistic classification learning), Kincses et al. first demonstrated that anodal tDCS performed over the left DLPFC at 1 mA in healthy volunteers resulted in immediate improvement in implicit learning (Kincses et al., 2004). Hammer et al. showed that cathodal stimulation hampered memory performance after errorful learning, whereas anodal stimulation did not alter encoding and memory retrieval (Hammer et al., 2011). Manenti et al. found that anodal stimulation enhances the long-term episodic memory capacities of young and older subjects with more robust effects in young participants (Manenti et al., 2013). Plewnia and collaborators also reported that tDCS shapes accuracy of episodic memory via polaritiy-specific modulation of false recognition. When applied during encoding of pictures, anodal tDCS increased whereas cathodal stimulation reduced the number of false alarms (i.e., responses to highly similar distracter images) in subsequent recognition memory testing (Zwissler et al., 2014).

tDCS FOR COGNITIVE ENHANCEMENT IN PSYCHIATRIC AND NEUROLOGICAL DISORDERS

Bifrontal tDCS has been shown to prevent procedural learning in depressive states, possibly by inducing a decrease in the activity of the right DLPFC (Brunoni et al., 2013). Beneficial effects of online stimulation applied over the left DLPFC have been reported for working memory, attentional performances, and information processing in depressed patients (Fregni et al., 2006; Oliveira et al., 2013; Wolkenstein and Plewnia, 2013). However, two randomized controlled trials and one open-label trial failed to replicate this finding with offline stimulation, suggesting that multiple tDCS sessions do not have cumulative cognitive enhancing effects (Ferrucci et al., 2009; Loo et al., 2012; Palm et al., 2012).

Only a small number of studies have examined the impact of tDCS on selective cognitive domains altered in schizophrenia. Focusing on working memory, Vercammen et al. reported that a single session of anodal tDCS to the left DLPCF improves probabilistic association learning in a specific subset of schizophrenic patients (Vercammen et al., 2011). These findings were interpreted as an enhancement of DLPFC function primarily in individuals with relatively higher neural and cognitive reserve. Hoy et al. observed the same tDCS effects on a working memory task after a 2 mA stimulation (Hoy et al., 2014). Göder et al. showed improved sleep-associated memory consolidation in patients with schizophrenia when anodal tDCS oscillating at a frequency of 0.75 Hz was applied during sleep (Goder et al., 2013).

Cognitive enhancing properties of tDCS have also been explored in a number of neurological diseases. For example, in Alzheimer disease, Boggio et al. (2009) reported short-term facilitation effects on visual recognition memory after prefrontal and temporal anodal tDCS applied 30 min at 2 mA, with no changes in attention. More recently, Cotelli et al. demonstrated that repeated sessions of anodal tDCS to the left DLFPC plus computerized memory training led to an increase in performance in a face-name association task (Cotelli et al., 2014). However, combined treatment failed to ameliorate the memory performance more

than memory training alone suggesting an absence of effects of tDCS in this paradigm. It has also been shown that a single tDCS session can ameliorate memory deficits in Parkinson's disease. Boggio et al. enhanced WM by application of anodal tDCS over the left DPFC at 2 mA, whereas stimulation with intensities of 1 mA or of other area (motor cortex) provided no benefit in WM performance (Boggio et al., 2006). Pereira et al. found that anodal tDCS (at 2 mA) applied over the left DLPFC enhanced performance and functional connectivity in task-related networks in a verbal fluency task tested during fMRI (Pereira et al., 2013).

Kang et al. reported increased response accuracy in a Go/NoGo task tested 1 and 3 h after anodal stimulation at 2 mA over the DLPFC in 10 patients with post-stroke cognitive decline (MMSE $\leq$ 25) (Kang et al., 2009). Jo et al. also reported that 10 patients with subacute stroke achieved a significant improvement in the accuracy of verbal two-back working memory after receiving the tDCS to the left prefrontal cortex at an intensity of 2 mA for 30 min (Jo et al., 2009). Park et al. found that the concomitant use of anodal tDCS with a computer-assisted cognitive rehabilitation program had a significant effect on improving attention in post-stroke patients with mild-to-moderate cognitive dysfunction (Park et al., 2013).

In spite of the increasing number of clinical studies showing beneficial effects of prefrontal tDCS on the domains of learning and memory, its mechanism of action remains unclear. Recent clinical studies have started to tackle this question (e.g., Keeser et al., 2011a,b; Amadi et al., 2013; Dayan et al., 2013; Palm et al., 2013; Plewnia et al., 2013; Stagg and Johansen-Berg, 2013); however, the cellular mechanisms underlying tDCS will likely require the use of animal models.

ANIMAL MODELS OF tDCS

Animal models provide a powerful tool to identify the mechanisms by which tDCS modulates neural network function to support improved cognition. In rats, tDCS was first used to evaluate the safety limits of cathodal stimulations (Liebetanz et al., 2009) and to map brain activation patterns after tDCS (Takano et al., 2011). In the latter study, the authors observed significantly increased fMRI signal intensities in the frontal cortex and nucleus accumbens of rats after anodal tDCS (of the frontal lobe), suggesting that tDCS induces neuronal activation both in cortical and subcortical areas. To date, few animal studies have addressed the impact of tDCS on learning and memory processes.

tDCS FOR COGNITIVE ENHANCEMENT IN HEALTHY ANIMALS

Similar to humans, the prefrontal cortex (or more generally speaking, the frontal lobe) has been the main target of animal studies for its implication in working memory. In a recent paper, Dockery et al. performed experiments in rats using the Allothetic Place Avoidance Alternation Task (APAAT), a behavioral model of visuospatial working memory and skill learning (Dockery et al., 2011). In this paradigm, a recent memory is engaged by the necessity to remember the location of a to-be-avoided sector (punished by an electric shock), which is alternated daily. tDCS on the frontal lobe (30 min/day before the APAAT task [3 days in total], 200 μA, epicranial electrode: 3.5 mm^2 over the frontal lobe, counter electrode: 10.5 cm^2 placed between the shoulders) had no measurable short-term effect on on-going place avoidance learning. However, in a follow-up session (18 days after the last APAAT session), the rats previously treated with cathodal (but not anodal) tDCS showed significantly more efficient place avoidance and skill retention compared to controls. Other types of memory, such as associative learning processes, can also be affected by tDCS (Marquez-Ruiz et al., 2012). In this case, tDCS was applied to behaving rabbits *via* four silver-ball stimulating electrodes (1 mm in diameter, placed symmetrically above the skull 3 mm from the right S1 vibrissa area on the somatosensory cortex) with a saline-soaked sponge (35 cm^2 surface area) attached to the contralateral ear serving as the counter electrode. The authors found that the acquisition of classical eyeblink conditioning is potentiated or depressed by the simultaneous application of anodal or cathodal tDCS, respectively, when stimulation of the whisker pad was used as a conditioned stimulus. These results suggest that tDCS modulates the sensory perception processes necessary for this type of associative learning (Marquez-Ruiz et al., 2012).

Recently, we have adapted a model of tDCS in mice and tested its validity in a wide range of behavioral paradigms (Pedron et al., 2014). We applied repeated anodal tDCS over the left frontal cortex of the mouse (see, **Figures 1A,B**) and used a 2 $\times$ 20 min/day stimulation paradigm at 200 μA for 5 consecutive days. In agreement with human studies, our data suggest that repeated anodal tDCS improves long-term spatial memory (in the Morris water maze, **Figure 1C**) and working memory (object recognition, **Figure 1D**) without affecting behaviors such as locomotor activity and anxiety-related behaviors (Pedron et al., 2014).

Finally, Marshall and collaborators have investigated the interaction of tDCS with hippocampo-neocortical rhythms and reported that a transcranial slow oscillation stimulation during sleep enhances memory consolidation in rats (anodes: bilaterally over the prefrontal cortex; return electrodes: over the cerebellum; sinusoidal constant current fluctuating between 0 and 5.6 μA at a frequency of 1.5 Hz applied during non-rapid eyes movement sleep) (Binder et al., 2014a,b).

COGNITIVE ENHANCEMENT IN ANIMAL MODELS OF NEUROLOGICAL DISORDERS

To the best of our knowledge, tDCS has yet to be tested for enhancing cognition in animal models of psychiatric disorders, but it has been shown to facilitate recovery from cognitive impairments induced by stroke or status epilepticus in rats. After cerebral ischemia, Yoon et al. employed a cup-shaped anodal stimulation electrode positioned at the ischemic borderline, and a rectangular rubber cathodal electrode (80 $\times$ 60 mm) fixed on the anterior chest (Yoon et al., 2012) to inject a direct current at an intensity of 200 μA for 20 min, once a day for 5 consecutive days. Both early (1 day) and late (1 week after ischemic injury) treatment had a beneficial outcome on cognition (spatial memory evaluated in the Barnes maze test) without exacerbating ischemic volume. Interestingly, this effect was not present 1 day after tDCS, but began to appear 2 weeks after the stimulations and was maximal after 4 weeks. Therapeutic effects of tDCS on cognition were associated with an increase in the

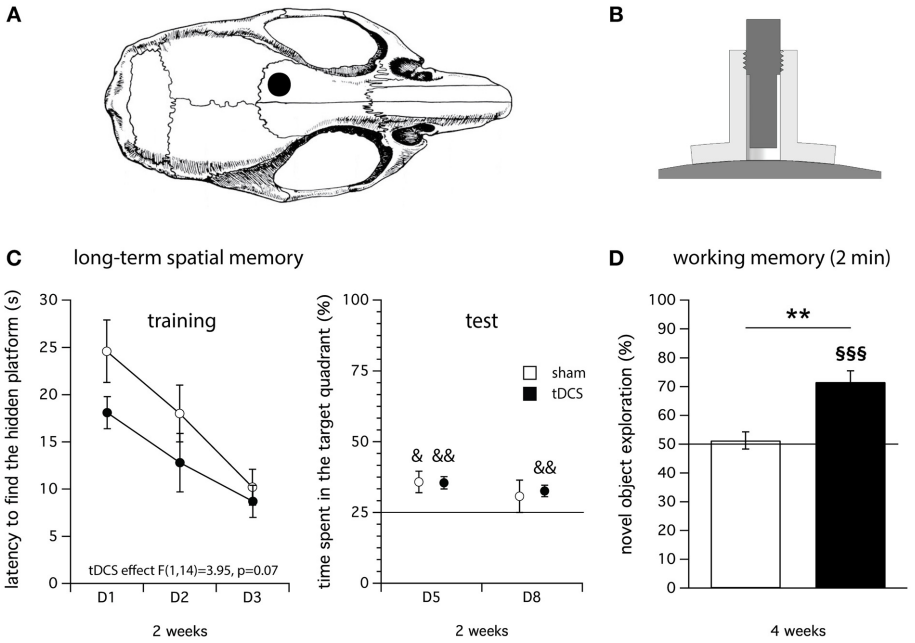


FIGURE 1 | Illustration of the tDCS device used to deliver the electrical stimulation in mice (Pedron et al., 2014) and main results obtained on cognition. (A) The center of the stimulation electrode (anode) is positioned over the left frontal cortex 1 mm anterior to the coronal fissure and 1 mm left of the sagittal fissure (Paxinos and Franklin, 2001). The cathode (rubber-plate electrode, 9.5 cm^2) is placed onto the ventral thorax (not shown). **(B)** Anode: A tubular plastic jacket (internal diameter: 2.1 mm) is surgically fixed onto the skull and filled with saline solution before the stimulation. The stimulation electrode is screwed into the tubular plastic jacket and immersed in the saline solution. Only the saline solution is in contact with the skull. **(C)** Four month-old Swiss female mice were subjected to repeated anodal tDCS for 5 consecutive days (2 × 20 min/day constant current, 0.2 mA). Long-term spatial memory was evaluated 2 weeks after the last stimulation in the Morris water navigation task (training: left; test: right). tDCS significantly improved long-term spatial memory. **(D)** Effect of repeated anodal tDCS on working memory evaluated in an object recognition task (inter-trial interval: 2 min) 4 weeks after the last stimulation. The novel object exploration (score in %) was significantly higher than 50% in the tDCS group, reflecting a better working memory performance compared to sham group for which the score was not significantly different than 50%. $^{\&}p < 0.05$ and $^{\&\&}p < 0.01$ vs. 25%, $^{**}p < 0.01$ vs. sham, $^{\S\S\S}p < 0.001$ vs. 50%; $N = 8$ per group.

expression of Map-2 (a stabilizer of microtubules growth) and Gap-43 (a neuronal growth-promoting gene) in the early treatment group and in the late treatment group, respectively, in both peri-lesional and contra-lesional cortex. Kamida et al. used cathodal tDCS (1.5 mm to the right, 2 mm anterior from bregma; counter electrode: 1 cm needle electrode inserted into the back of the neck, 30 min per day for 2 weeks at 200 μA) to evaluate its effect on seizures and spatial memory deficits following pilocarpine-induced status epilepticus in immature rats (Kamida et al., 2011). Repeated cathodal tDCS reduced seizures, spatial memory impairments, status epilepticus-induced hippocampal cell loss, and supragranular and CA3 mossy fiber sprouting.

POTENTIAL MECHANISMS OF ACTION AND PERSPECTIVES

CANDIDATE MECHANISMS UNDERLYING tDCS ACTION ON COGNITION

To date, it is known that tDCS modifies the resting membrane potential when online and induces prolonged offline after-effects similar to long-term potentiation/depression (Paulus, 2004), considered to be the cellular mechanisms of learning and memory. For example, in humans the long-lasting effects of tDCS (both anodal and cathodal) on the primary motor cortex are suppressed after NMDA-receptor blockade indicating a dependence on glutamatergic activity (Liebetanz et al., 2002). Moreover, previous experiments in rats have shown that anodal polarization directly applied to the cortex has the ability to modulate neural plasticity (i.e., c-Fos activation) *via* activation of NMDA receptors (Islam et al., 1995).

Our team has started to investigate the role of adult neurogenesis as a mechanism involved in tDCS action. Neurogenesis in the hippocampus is of particular interest as tDCS induces both antidepressant effects and enhances cognition in humans and mice, two phenomena critically linked to the generation of new neurons in the adult dentate gyrus (Deng et al., 2010; Eisch and Petrik, 2012). In addition, the time course for the onset of long term tDCS effect on depression-related behavior and on cognition in our animal model (after several weeks, Pedron et al., 2014) is consistent with the delay necessary for newly generated cells in the hippocampus to be functionally integrated (Klempin et al., 2010). Of particular interest is the impact of tDCS on brain-derived neurotrophic factor (BDNF) levels. This growth factor is important for long-term memory (Bekinschtein et al., 2008), is involved in depressive-like behaviors and antidepressant drug action, and can modulate neurogenesis levels (Castren and Rantamaki, 2010; Vithlani et al., 2013). A recent study has shown that BDNF activation is necessary for DCS-induced long-term potentiation in mouse M1 slices

(Fritsch et al., 2010). Enhancement of motor skill acquisition by anodal tDCS also seems to be related to BDNF, as the BDNF val66met polymorphism in humans is associated with decreased proclivity to tDCS-induced benefits on skill learning (Fritsch et al., 2010). Other indirect mechanisms cannot be ruled out, such as the impact of tDCS on cortical blood perfusion (Wachter et al., 2011; Stagg et al., 2013).

LIMITATIONS AND FUTURE DIRECTIONS

One outstanding question in the above-mentioned studies is: where does the current flow? Considering that tDCS has poor spatial resolution on brain tissue, it is important to acknowledge the limitation on the precision with which tDCS is able to target specific areas of the brain. A main issue is the difference between the electrodes used in animals and those used in clinical applications, preventing direct comparisons of current density and voltage distributions between experimental models (higher current densities are often reported in animals). Because in humans the outcome of stimulation depends of the amount of current delivered, it would be necessary to test whether similar dose-response curves occur in animals and attempt stimulation parameters more closely related to clinical studies. Another limiting factor is the considerable protocol variations particularly among animal models. This lack of standardization is deleterious and could contribute to the discrepancy sometimes observed in the literature. The standardization of physical parameters, namely the current density and shape, electrodes size, shape and localization (2 epicranial electrodes vs. 1 epicranial/ 1 outside the skull), the duration and number of stimulations, and the state of animals during the stimulation (awake or anesthetized) would greatly aid in the elucidation of the mechanisms and efficacy of tDCS.

Another often overlooked point is the population on which tDCS is used. The interaction of stimulation polarity, cognitive domain and other intra- and interindividual variables such as anatomic or genetic factors (Plewnia et al., 2013; Kim et al., 2014), personality (Pena-Gomez et al., 2011; Pripfl et al., 2013), cognitive strategy (Berryhill and Jones, 2012) and baseline neuronal activation state (Jacobson et al., 2012) need to be taken into consideration. Likewise, the age at which electrical stimulation occurs (Kessler et al., 2013) might be a key determinants for the physiological and behavioral outcomes of the stimulation. tDCS effects might for example be stronger/different and possibly harmful if applied to the brain during a critical stage of development such as during adolescence when the prefrontal cortex is still not fully mature.

Finally, further basic research is needed to elucidate the duration of the effects of tDCS on memory, which require evaluations at different time-points. The eventual necessity to re-stimulate the brain to maintain the beneficial effects of tDCS has yet to be investigated.

In conclusion, the data reported here are very promising and show that electrical stimulation of the brain is able to improve cognition in humans, in both healthy and in patients with psychiatric or neurological disorders. However, before it can be applied as a therapeutic tool, there is a clear need for method standardization and for a better understanding of its mode of action through the combined use of clinical research and animal models.

ACKNOWLEDGMENT

We would like to warmly thank Adriana Caballero for proofreading and editing the manuscript.

REFERENCES

Amadi, U., Ilie, A., Johansen-Berg, H., and Stagg, C. J. (2013). Polarity-specific effects of motor transcranial direct current stimulation on fMRI resting state networks. *Neuroimage* 88C, 155–161. doi: 10.1016/j.neuroimage.2013.11.037

Andrews, S. C., Hoy, K. E., Enticott, P. G., Daskalakis, Z. J., and Fitzgerald, P. B. (2011). Improving working memory: the effect of combining cognitive activity and anodal transcranial direct current stimulation to the left dorsolateral prefrontal cortex. *Brain Stimul.* 4, 84–89. doi: 10.1016/j.brs.2010.06.004

Bekinschtein, P., Cammarota, M., Katche, C., Slipczuk, L., Rossato, J. I., Goldin, A., et al. (2008). BDNF is essential to promote persistence of long-term memory storage. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 105, 2711–2716. doi: 10.1073/pnas.0711863105

Berryhill, M. E., and Jones, K. T. (2012). tDCS selectively improves working memory in older adults with more education. *Neurosci. Lett.* 521, 148–151. doi: 10.1016/j.neulet.2012.05.074

Binder, S., Berg, K., Gasca, F., Lafon, B., Parra, L. C., Born, J., et al. (2014a). Transcranial slow oscillation stimulation during sleep enhances memory consolidation in rats. *Brain Stimul.* 7, 508–515. doi: 10.1016/j.brs.2014.03.001

Binder, S., Rawohl, J., Born, J., and Marshall, L. (2014b). Transcranial slow oscillation stimulation during NREM sleep enhances acquisition of the radial maze task and modulates cortical network activity in rats. *Front. Behav. Neurosci.* 7:220. doi: 10.3389/fnbeh.2013.00220

Boggio, P. S., Ferrucci, R., Rigonatti, S. P., Covre, P., Nitsche, M., Pascual-Leone, A., et al. (2006). Effects of transcranial direct current stimulation on working memory in patients with Parkinson's disease. *J. Neurol. Sci.* 249, 31–38. doi: 10.1016/j.jns.2006.05.062

Boggio, P. S., Khoury, L. P., Martins, D. C., Martins, O. E., De Macedo, E. C., and Fregni, F. (2009). Temporal cortex direct current stimulation enhances performance on a visual recognition memory task in Alzheimer disease. *J. Neurol. Neurosurg. Psychiatr.* 80, 444–447. doi: 10.1136/jnnp.2007.141853

Brunoni, A. R., Zanao, T. A., Ferrucci, R., Priori, A., Valiengo, L., De Oliveira, J. F., et al. (2013). Bifrontal tDCS prevents implicit learning acquisition in antidepressant-free patients with major depressive disorder. *Prog. Neuropsychopharmacol. Biol. Psychiatry* 43, 146–150. doi: 10.1016/j.pnpbp.2012.12.019

Castren, E., and Rantamaki, T. (2010). The role of BDNF and its receptors in depression and antidepressant drug action: reactivation of developmental plasticity. *Dev. Neurobiol.* 70, 289–297. doi: 10.1002/dneu.20758

Cotelli, M., Manenti, R., Brambilla, M., Petesi, M., Rosini, S., Ferrari, C., et al. (2014). Anodal tDCS during face-name associations memory training in Alzheimer's patients. *Front. Aging Neurosci.* 6:38. doi: 10.3389/fnagi.2014.00038

Dayan, E., Censor, N., Buch, E. R., Sandrini, M., and Cohen, L. G. (2013). Noninvasive brain stimulation: from physiology to network dynamics and back. *Nat. Neurosci.* 16, 838–844. doi: 10.1038/nn.3422

Deng, W., Aimone, J. B., and Gage, F. H. (2010). New neurons and new memories: how does adult hippocampal neurogenesis affect learning and memory? *Nat. Rev. Neurosci.* 11, 339–350. doi: 10.1038/nrn2822

Dockery, C. A., Liebetanz, D., Birbaumer, N., Malinowska, M., and Wesierska, M. J. (2011). Cumulative benefits of frontal transcranial direct current stimulation on visuospatial working memory training and skill learning in rats. *Neurobiol. Learn. Mem.* 96, 452–460. doi: 10.1016/j.nlm.2011.06.018

Eisch, A. J., and Petrik, D. (2012). Depression and hippocampal neurogenesis: a road to remission? *Science* 338, 72–75. doi: 10.1126/science.1222941

Ferrucci, R., Bortolomasi, M., Vergari, M., Tadini, L., Salvoro, B., Giacopuzzi, M., et al. (2009). Transcranial direct current stimulation in severe, drug-resistant major depression. *J. Affect. Disord.* 118, 215–219. doi: 10.1016/j.jad.2009.02.015

Fregni, F., Boggio, P. S., Nitsche, M., Bermpohl, F., Antal, A., Feredoes, E., et al. (2005). Anodal transcranial direct current stimulation of prefrontal cortex enhances working memory. *Exp. Brain Res.* 166, 23–30. doi: 10.1007/s00221-005-2334-6

Fregni, F., Boggio, P. S., Nitsche, M. A., Marcolin, M. A., Rigonatti, S. P., and Pascual-Leone, A. (2006). Treatment of major depression with transcranial direct current stimulation. *Bipolar Disord.* 8, 203–204. doi: 10.1111/j.1399-5618.2006.00291.x

Fritsch, B., Reis, J., Martinowich, K., Schambra, H. M., Ji, Y., Cohen, L. G., et al. (2010). Direct current stimulation promotes BDNF-dependent synaptic plasticity: potential implications for motor learning. *Neuron* 66, 198–204. doi: 10.1016/j.neuron.2010.03.035

Gladwin, T. E., Den Uyl, T. E., Fregni, F. F., and Wiers, R. W. (2012a). Enhancement of selective attention by tDCS: interaction with interference in a Sternberg task. *Neurosci. Lett.* 512, 33–37. doi: 10.1016/j.neulet.2012.01.056

Gladwin, T. E., Den Uyl, T. E., and Wiers, R. W. (2012b). Anodal tDCS of dorsolateral prefontal cortex during an Implicit Association Test. *Neurosci. Lett.* 517, 82–86. doi: 10.1016/j.neulet.2012.04.025

Goder, R., Baier, P. C., Beith, B., Baecker, C., Seeck-Hirschner, M., Junghanns, K., et al. (2013). Effects of transcranial direct current stimulation during sleep on memory performance in patients with schizophrenia. *Schizophr. Res.* 144, 153–154. doi: 10.1016/j.schres.2012.12.014

Hammer, A., Mohammadi, B., Schmicker, M., Saliger, S., and Munte, T. F. (2011). Errorless and errorful learning modulated by transcranial direct current stimulation. *BMC Neurosci.* 12:72. doi: 10.1186/1471-2202-12-72

Hoy, K. E., Arnold, S. L., Emonson, M. R., Daskalakis, Z. J., and Fitzgerald, P. B. (2014). An investigation into the effects of tDCS dose on cognitive performance over time in patients with schizophrenia. *Schizophr. Res.* 155, 96–100. doi: 10.1016/j.schres.2014.03.006

Islam, N., Moriwaki, A., Hattori, Y., Hayashi, Y., Lu, Y. F., and Hori, Y. (1995). c-Fos expression mediated by N-methyl-D-aspartate receptors following anodal polarization in the rat brain. *Exp. Neurol.* 133, 25–31. doi: 10.1006/exnr.1995.1004

Jacobson, L., Koslowsky, M., and Lavidor, M. (2012). tDCS polarity effects in motor and cognitive domains: a meta-analytical review. *Exp. Brain Res.* 216, 1–10. doi: 10.1007/s00221-011-2891-9

Jo, J. M., Kim, Y. H., Ko, M. H., Ohn, S. H., Joen, B., and Lee, K. H. (2009). Enhancing the working memory of stroke patients using tDCS. *Am. J. Phys. Med. Rehabil.* 88, 404–409. doi: 10.1097/PHM.0b013e3181a0e4cb

Kamida, T., Kong, S., Eshima, N., Abe, T., Fujiki, M., and Kobayashi, H. (2011). Transcranial direct current stimulation decreases convulsions and spatial memory deficits following pilocarpine-induced status epilepticus in immature rats. *Behav. Brain Res.* 217, 99–103. doi: 10.1016/j.bbr.2010.08.050

Kang, E. K., Baek, M. J., Kim, S., and Paik, N. J. (2009). Non-invasive cortical stimulation improves post-stroke attention decline. *Restor. Neurol. Neurosci.* 27, 645–650. doi: 10.3233/RNN-2009-0514

Keeser, D., Meindl, T., Bor, J., Palm, U., Pogarell, O., Mulert, C., et al. (2011a). Prefrontal transcranial direct current stimulation changes connectivity of resting-state networks during fMRI. *J. Neurosci.* 31, 15284–15293. doi: 10.1523/JNEUROSCI.0542-11.2011

Keeser, D., Padberg, F., Reisinger, E., Pogarell, O., Kirsch, V., Palm, U., et al. (2011b). Prefrontal direct current stimulation modulates resting EEG and event-related potentials in healthy subjects: a standardized low resolution tomography (sLORETA) study. *Neuroimage* 55, 644–657. doi: 10.1016/j.neuroimage.2010.12.004

Kessler, S. K., Minhas, P., Woods, A. J., Rosen, A., Gorman, C., and Bikson, M. (2013). Dosage considerations for transcranial direct current stimulation in children: a computational modeling study. *PLoS ONE* 8:e76112. doi: 10.1371/journal.pone.0076112

Kim, J. H., Kim, D. W., Chang, W. H., Kim, Y. H., Kim, K., and Im, C. H. (2014). Inconsistent outcomes of transcranial direct current stimulation may originate from anatomical differences among individuals: electric field simulation using individual MRI data. *Neurosci. Lett.* 564, 6–10. doi: 10.1016/j.neulet.2014.01.054

Kincses, T. Z., Antal, A., Nitsche, M. A., Bartfai, O., and Paulus, W. (2004). Facilitation of probabilistic classification learning by transcranial direct current stimulation of the prefrontal cortex in the human. *Neuropsychologia* 42, 113–117. doi: 10.1016/S0028-3932(03)00124-6

Klempin, F., Babu, H., De Pietri Tonelli, D., Alarcon, E., Fabel, K., and Kempermann, G. (2010). Oppositional effects of serotonin receptors 5-HT1a, 2, and 2c in the regulation of adult hippocampal neurogenesis. *Front. Mol. Neurosci.* 3:14. doi: 10.3389/fnmol.2010.00014

Lally, N., Nord, C. L., Walsh, V., and Roiser, J. P. (2013). Does excitatory fronto-extracerebral tDCS lead to improved working memory performance? *F1000Research* 2:219. doi: 10.12688/f1000research.2-219.v2

Liebetanz, D., Koch, R., Mayenfels, S., Konig, F., Paulus, W., and Nitsche, M. A. (2009). Safety limits of cathodal transcranial direct current stimulation in rats. *Clin. Neurophysiol.* 120, 1161–1167. doi: 10.1016/j.clinph.2009.01.022

Liebetanz, D., Nitsche, M. A., Tergau, F., and Paulus, W. (2002). Pharmacological approach to the mechanisms of transcranial DC-stimulation-induced after-effects of human motor cortex excitability. *Brain* 125, 2238–2247. doi: 10.1093/brain/awf238

Loo, C. K., Alonzo, A., Martin, D., Mitchell, P. B., Galvez, V., and Sachdev, P. (2012). Transcranial direct current stimulation for depression: 3-week, randomised, sham-controlled trial. *Br. J. Psychiatry* 200, 52–59. doi: 10.1192/bjp.bp.111.097634

Manenti, R., Brambilla, M., Petesi, M., Ferrari, C., and Cotelli, M. (2013). Enhancing verbal episodic memory in older and young subjects after non-invasive brain stimulation. *Front. Aging Neurosci.* 5:49. doi: 10.3389/fnagi.2013.00049

Marquez-Ruiz, J., Leal-Campanario, R., Sanchez-Campusano, R., Molaee-Ardekani, B., Wendling, F., Miranda, P. C., et al. (2012). Transcranial direct-current stimulation modulates synaptic mechanisms involved in associative learning in behaving rabbits. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 109, 6710–6715. doi: 10.1073/pnas.1121147109

Marshall, L., Molle, M., Siebner, H. R., and Born, J. (2005). Bifrontal transcranial direct current stimulation slows reaction time in a working memory task. *BMC Neurosci.* 6:23. doi: 10.1186/1471-2202-6-23

Mulquiney, P. G., Hoy, K. E., Daskalakis, Z. J., and Fitzgerald, P. B. (2011). Improving working memory: exploring the effect of transcranial random noise stimulation and transcranial direct current stimulation on the dorsolateral prefrontal cortex. *Clin. Neurophysiol.* 122, 2384–2389. doi: 10.1016/j.clinph.2011.05.009

Ohn, S. H., Park, C. I., Yoo, W. K., Ko, M. H., Choi, K. P., Kim, G. M., et al. (2008). Time-dependent effect of transcranial direct current stimulation on the enhancement of working memory. *Neuroreport* 19, 43–47. doi: 10.1097/WNR.0b013e3282f2adfd

Oliveira, J. F., Zanao, T. A., Valiengo, L., Lotufo, P. A., Bensenor, I. M., Fregni, F., et al. (2013). Acute working memory improvement after tDCS in antidepressant-free patients with major depressive disorder. *Neurosci. Lett.* 537, 60–64. doi: 10.1016/j.neulet.2013.01.023

Palm, U., Fintescu, Z., Obermeier, M., Schiller, C., Reisinger, E., Keeser, D., et al. (2013). Serum levels of brain-derived neurotrophic factor are unchanged after transcranial direct current stimulation in treatment-resistant depression. *J. Affect. Disord.* 150, 659–663. doi: 10.1016/j.jad.2013.03.015

Palm, U., Schiller, C., Fintescu, Z., Obermeier, M., Keeser, D., Reisinger, E., et al. (2012). Transcranial direct current stimulation in treatment resistant depression: a randomized double-blind, placebo-controlled study. *Brain Stimul.* 5, 242–251. doi: 10.1016/j.brs.2011.08.005

Park, S. H., Koh, E. J., Choi, H. Y., and Ko, M. H. (2013). A double-blind, sham-controlled, pilot study to assess the effects of the concomitant use of transcranial direct current stimulation with the computer assisted cognitive rehabilitation to the prefrontal cortex on cognitive functions in patients with stroke. *J. Korean Neurosurg. Soc.* 54, 484–488. doi: 10.3340/jkns.2013.54.6.484

Paulus, W. (2004). Outlasting excitability shifts induced by direct current stimulation of the human brain. *Suppl. Clin. Neurophysiol.* 57, 708–714. doi: 10.1016/S1567-424X(09)70411-8

Paxinos, G., and Franklin, K. (2001). *The Mouse Brain in Stereotaxic Coordinate, 2nd Edn.* San Diego, CA; London: Academic Press.

Pedron, S., Monnin, J., Haffen, E., Sechter, D., and Van Waes, V. (2014). Repeated transcranial direct current stimulation prevents abnormal behaviors associated with abstinence from chronic nicotine consumption. *Neuropsychopharmacology* 39, 981–988. doi: 10.1038/npp.2013.298

Pena-Gomez, C., Vidal-Pineiro, D., Clemente, I. C., Pascual-Leone, A., and Bartres-Faz, D. (2011). Down-regulation of negative emotional processing by transcranial direct current stimulation: effects of personality characteristics. *PLoS ONE* 6:e22812. doi: 10.1371/journal.pone.0022812

Pereira, J. B., Junque, C., Bartres-Faz, D., Marti, M. J., Sala-Llonch, R., Compta, Y., et al. (2013). Modulation of verbal fluency networks by transcranial direct current stimulation (tDCS) in Parkinson's disease. *Brain Stimul.* 6, 16–24. doi: 10.1016/j.brs.2012.01.006

Plewnia, C., Zwissler, B., Langst, I., Maurer, B., Giel, K., and Kruger, R. (2013). Effects of transcranial direct current stimulation (tDCS) on executive functions: influence of COMT Val/Met polymorphism. *Cortex* 49, 1801–1807. doi: 10.1016/j.cortex.2012.11.002

Pripfl, J., Neumann, R., Kohler, U., and Lamm, C. (2013). Effects of transcranial direct current stimulation on risky decision making are mediated by 'hot' and

'cold' decisions, personality, and hemisphere. *Eur. J. Neurosci.* 38, 3778–3785. doi: 10.1111/ejn.12375

Stagg, C. J., and Johansen-Berg, H. (2013). Studying the effects of transcranial direct-current stimulation in stroke recovery using magnetic resonance imaging. *Front. Hum. Neurosci.* 7:857. doi: 10.3389/fnhum.2013.00857

Stagg, C. J., Lin, R. L., Mezue, M., Segerdahl, A., Kong, Y., Xie, J., et al. (2013). Widespread modulation of cerebral perfusion induced during and after transcranial direct current stimulation applied to the left dorsolateral prefrontal cortex. *J. Neurosci.* 33, 11425–11431. doi: 10.1523/JNEUROSCI.3887-12.2013

Stagg, C. J., and Nitsche, M. A. (2011). Physiological basis of transcranial direct current stimulation. *Neuroscientist* 17, 37–53. doi: 10.1177/1073858410386614

Takano, Y., Yokawa, T., Masuda, A., Niimi, J., Tanaka, S., and Hironaka, N. (2011). A rat model for measuring the effectiveness of transcranial direct current stimulation using fMRI. *Neurosci. Lett.* 491, 40–43. doi: 10.1016/j.neulet.2011.01.004

Teo, F., Hoy, K. E., Daskalakis, Z. J., and Fitzgerald, P. B. (2011). Investigating the role of current strength in tDCS modulation of working memory performance in healthy controls. *Front. Psychiatry* 2:45. doi: 10.3389/fpsyt.2011.00045

Vercammen, A., Rushby, J. A., Loo, C., Short, B., Weickert, C. S., and Weickert, T. W. (2011). Transcranial direct current stimulation influences probabilistic association learning in schizophrenia. *Schizophr. Res.* 131, 198–205. doi: 10.1016/j.schres.2011.06.021

Vithlani, M., Hines, R. M., Zhong, P., Terunuma, M., Hines, D. J., Revilla-Sanchez, R., et al. (2013). The ability of BDNF to modify neurogenesis and depressive-like behaviors is dependent upon phosphorylation of tyrosine residues 365/367 in the GABA(A)-receptor gamma2 subunit. *J. Neurosci.* 33, 15567–15577. doi: 10.1523/JNEUROSCI.1845-13.2013

Wachter, D., Wrede, A., Schulz-Schaeffer, W., Taghizadeh-Waghefi, A., Nitsche, M. A., Kutschenko, A., et al. (2011). Transcranial direct current stimulation induces polarity-specific changes of cortical blood perfusion in the rat. *Exp. Neurol.* 227, 322–327. doi: 10.1016/j.expneurol.2010.12.005

Wolkenstein, L., and Plewnia, C. (2013). Amelioration of cognitive control in depression by transcranial direct current stimulation. *Biol. Psychiatry* 73, 646–651. doi: 10.1016/j.biopsych.2012.10.010

Wood, J. N., and Grafman, J. (2003). Human prefrontal cortex: processing and representational perspectives. *Nat. Rev. Neurosci.* 4, 139–147. doi: 10.1038/nrn1033

Yoon, K. J., Oh, B. M., and Kim, D. Y. (2012). Functional improvement and neuroplastic effects of anodal transcranial direct current stimulation (tDCS) delivered 1 day vs. 1 week after cerebral ischemia in rats. *Brain Res.* 1452, 61–72. doi: 10.1016/j.brainres.2012.02.062

Zwissler, B., Sperber, C., Aigeldinger, S., Schindler, S., Kissler, J., and Plewnia, C. (2014). Shaping memory accuracy by left prefrontal transcranial direct current stimulation. *J. Neurosci.* 34, 4022–4026. doi: 10.1523/JNEUROSCI.5407-13.2014

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.

Received: 01 June 2014; accepted: 13 August 2014; published online: 04 September 2014.

Citation: Bennabi D, Pedron S, Haffen E, Monnin J, Peterschmitt Y and Van Waes V (2014) Transcranial direct current stimulation for memory enhancement: from clinical research to animal models. Front. Syst. Neurosci. ***8****:159. doi: 10.3389/fnsys.2014.00159 This article was submitted to the journal Frontiers in Systems Neuroscience.*

Copyright © 2014 Bennabi, Pedron, Haffen, Monnin, Peterschmitt and Van Waes. 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.

B Article 1 - *Repeated transcranial direct current stimulation prevents abnormal behaviors associated with abstinence from chronic nicotine consumption*

Neuropsychopharmacology (2013), 1–8
© 2013 American College of Neuropsychopharmacology. All rights reserved 0893-133X/13
www.neuropsychopharmacology.org

Repeated Transcranial Direct Current Stimulation Prevents Abnormal Behaviors Associated with Abstinence from Chronic Nicotine Consumption

Solène Pedron[1], Julie Monnin[1,2], Emmanuel Haffen[1,2], Daniel Sechter[1] and Vincent Van Waes*[,1]

[1]EA 481 Laboratory of Integrative and Clinical Neuroscience, University of Franche-Comté/SFR FED 4234, Besançon, France;
[2]INSERM CIC-IT 808 Clinical Investigation Centre for Innovative Technology, University Hospital of Besançon, Besançon, France

Successful available treatments to quit smoking remain scarce. Recently, the potential of transcranial direct current stimulation (tDCS) as a tool to reduce craving for nicotine has gained interest. However, there is no documented animal model to assess the neurobiological mechanisms of tDCS on addiction-related behaviors. To address this topic, we have developed a model of repeated tDCS in mice and used it to validate its effectiveness in relieving nicotine addiction. Anodal repeated tDCS was applied over the frontal cortex of Swiss female mice. The stimulation electrode (anode) was fixed directly onto the cranium, and the reference electrode was placed onto the ventral thorax. A 2 × 20 min/day stimulation paradigm for five consecutive days was used (0.2 mA). In the first study, we screened for behaviors altered by the stimulation. Second, we tested whether tDCS could alleviate abnormal behaviors associated with abstinence from nicotine consumption. In naive animals, repeated tDCS had antidepressant-like properties 3 weeks after the last stimulation, improved working memory, and decreased conditioned place preference for nicotine without affecting locomotor activity and anxiety-related behavior. Importantly, abnormal behaviors associated with chronic nicotine exposure (ie, depression-like behavior, increase in nicotine-induced place preference) were normalized by repeated tDCS. Our data show for the first time in an animal model that repeated tDCS is a promising, non-expensive clinical tool that could be used to reduce smoking craving and facilitate smoking cessation. Our animal model will be useful to investigate the mechanisms underlying the effects of tDCS on addiction and other psychiatric disorders.
Neuropsychopharmacology advance online publication, 20 November 2013; doi:10.1038/npp.2013.298

Keywords: neuromodulation; nicotine withdrawal; depression; conditioned place preference; memory; addiction

INTRODUCTION

Transcranial direct current stimulation (tDCS) is a neuromodulatory technique that consists in stimulating the cerebral cortex with a weak constant electric current in a non-invasive and painless manner. Since a decade ago, tDCS has been used experimentally to treat several psychiatric disorders, including depressive symptoms (Brunoni *et al*, 2012; Nitsche *et al*, 2009). The mechanisms underlying its effects are not well understood, but early studies in animals using current directly applied to the cortex suggest that anodal stimulation causes a depolarization of the resting membrane potential and increases the firing rates of cortical neurons in the tissue under the electrode (Bindman *et al*, 1964; Purpura and McMurtry, 1965; Stagg and Nitsche, 2011).

Recently, the use of tDCS-induced modulation of cortical excitability has gained interest in the scientific community as a means to decrease maladaptive behaviors in drug-dependent patients (Feil and Zangen, 2010). Two preliminary clinical studies carried out in chronic smokers support/exemplify tDCS efficacy in relieving addiction-related behaviors (Boggio *et al*, 2009; Fregni *et al*, 2008). In these studies, the dorsolateral prefrontal cortex (DLPFC) was targeted because smoking craving processing has been associated with enhanced activity of this area (Brody *et al*, 2002; Due *et al*, 2002; McBride *et al*, 2006; Wilson *et al*, 2004). In the first clinical trial, Fregni *et al* (2008) showed that a single-tDCS session over the DLPFC reduced cue-induced smoking craving in tobacco users. Participants received three different types of tDCS: sham tDCS, anodal tDCS of the left DLPFC, and anodal tDCS of the right DLPFC (a single session of 2 mA for 20 min). Before and right after the electrical stimulation, they completed a visual analog scale (VAS) to evaluate mood and a nicotine-based VAS to measure craving levels. The authors found that stimulation of both left and right DLPFC with active, but not sham, tDCS reduced general and smoking cue-induced nicotine craving with no other significant mood changes associated with the tDCS treatment. In the second study (Boggio *et al*, 2009), chronic smokers were randomized to receive either sham tDCS or active anodal tDCS of the left DLPFC for five

*Correspondence: Dr V Van Waes, Laboratory of Integrative and Clinical Neuroscience, University of Franche-Comté—UFR Sciences et Techniques, 2 Place Leclerc, 25030 Besancon, Cedex, France,
Tel: (+33)381665726, Fax: (+33)381665746,
E-mail: vincent.van_waes@univ-fcomte.fr
Received 29 July 2013; revised 2 October 2013; accepted 16 October 2013; accepted article preview online 24 October 2013

consecutive days (2 mA, 1 session of 20 min per day). The results indicated a cumulative effect of tDCS such that the magnitude of tDCS on reducing cue-induced craving increased after each session. Nonetheless, the duration of this phenomenon was not evaluated in this work.

These preliminary findings are very encouraging because current available treatment options for smoking cessation remain limited and/or are associated with poor long-term success rates (O'Brien, 2008). Several approaches, such as nicotine replacement therapy (patch, chewing gum, electronic cigarette), drugs (eg, brupopion, varenicline), and psychotherapy (behavioral and motivational interventions) are used for the purpose of decreasing smoking craving (see Stead and Lancaster, 2012); however, their relative poor efficacy and potential drug side effects limit the use of these methods. In this context, electrical stimulation of specific brain regions appears as innovative and attractive technique worth of further investigation to reduce smoking craving (Fraser and Rosen, 2012).

In spite of these promising results, a suitable experimental animal model with translational value is presently lacking in order to investigate the mechanisms underlying tDCS effects on addiction-related behavior. The aim of the present work is to characterize an animal model that can be used to study the neurobiological mechanisms associated with the efficacy of the tDCS treatment. The first step toward this goal is to demonstrate that protocols of tDCS in laboratory animal can result in positive/negative outcomes on a variety of behavioral measures that are clinically relevant. On the basis of the work of Liebetanz *et al* (2006; 2009), we have developed a model of repeated tDCS in mice with an experimental paradigm similar to that used in clinical trials. In a first experiment, we screened naive animals (never exposed to nicotine) for behaviors altered by repeated tDCS (depression, anxiety, memory, and reinforcing effect of nicotine). In a second set of experiments, we tested whether tDCS could alleviate behaviors associated with abstinence from chronic nicotine consumption during adolescence (postnatal day, PND 30–43), a period of high vulnerability to nicotine exposure (Iniguez *et al*, 2009). Our data show for the first time in an animal model that repeated tDCS has antidepressant properties and decreases the reinforcing effect of nicotine consistent with the outcomes observed after repeated tDCS in humans.

MATERIALS AND METHODS

Subjects

Swiss female mice (Janvier, Laval, France) were housed 4–5 per cage under standard laboratory conditions (12:12-hour light/dark cycle; lights on at 0700 hours) with food and water available *ad libitum*. Before the surgery, mice were allowed 1 week of acclimation, during which they were repeatedly handled. All procedures met the NIH guidelines for the care and use of laboratory animals and were approved by the University of Franche-Comté Animal Care and Use Committee.

Surgery

A tubular plastic jacket (internal diameter: 2.1 mm) was surgically fixed onto the skull 1 week before the stimulation protocol (Figure 1). Animals were anesthetized with ketamine hydrochloride/xylazine (80 mg/12 mg/kg, respectively; i.p.) and were placed in a stereotaxic apparatus. The center of the plastic jacket was positioned over the left frontal cortex 1 mm anterior to the coronal fissure and 1 mm left of the sagittal fissure (Figure 1b) and fixed with a coating of glass ionomer cement (GC Fuji I, Leuven, Belgium). After surgery, all animals were allowed to recover for 1 week before undergoing tDCS. During this period as well as during the electrical stimulations, mice were placed in individual cages. Experimental design of experiments 1 and 2 is summarized in Figures 2a and 3a.

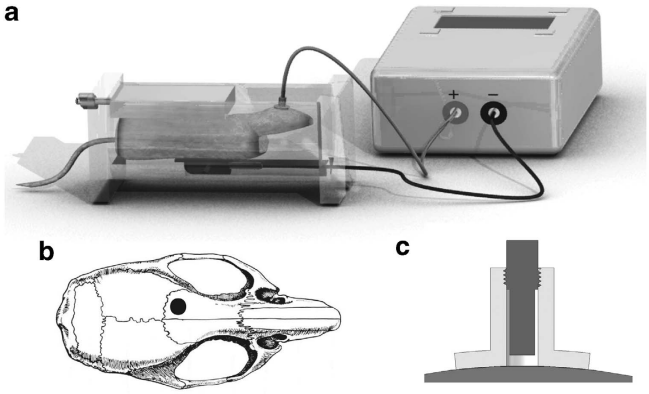


Figure 1 Illustration of the tDCS device used to deliver the current stimulation. (a) The mouse is placed in a custom-made restraint box. The anode (contact area 3.5 mm^2) is positioned over the left frontal cortex and the cathode (rubber-plate electrode, 9.5 cm^2) onto the ventral thorax. A 2×20 min/day constant current of 0.2 mA is applied transcranially using a direct current stimulator (DC-Stimulator Plus) for five consecutive days, with a linear fade in/fade out of 10s. (b) The center of the electrode is positioned over the left frontal cortex 1 mm anterior to the coronal fissure and 1 mm left of the sagittal fissure (adapted from Paxinos and Franklin, 2001). (c) Anode: a tubular plastic jacket (internal diameter: 2.1 mm) is surgically fixed onto the skull and filled with saline solution before the stimulation. The stimulation electrode is screwed into the tubular plastic jacket and dip in the saline solution. Only the saline solution is in contact with the skull.

Stimulation Protocol

The jacket was filled with saline solution (NaCl 0.9%) before the stimulation to establish a contact area of 3.5 mm^2 toward the skull. The stimulation electrode (anode, Figure 1c, DIXI Medical, Besançon, France) was screwed into the tubular plastic jacket. A larger conventional rubber-plate electrode (cathode, 9.5 cm^2; Physiomed Elektromedizin AG, Schnaittach, Germany) served as the counter-electrode and was placed onto the ventral thorax (adapted from Liebetanz *et al*, 2009, Figure 1a). This setting prevented the bypassing of currents (shunting effect) that would occur in the case of two juxtaposed encephalic electrodes in mice. An anodal 2×20 min/day constant current of 0.2 mA was applied transcranially over the frontal cortex using a DC-Stimulator Plus (NeuroConn, Ilnemau, Germany) for five consecutive days, with a linear fade in/fade out of 10s (Ferrucci *et al*, 2009; Rigonatti *et al*, 2008). Animals were awake and restrained during the tDCS (Figure 1a) to prevent possible interactions between tDCS effects and anesthetic drugs. Control animals were subjected

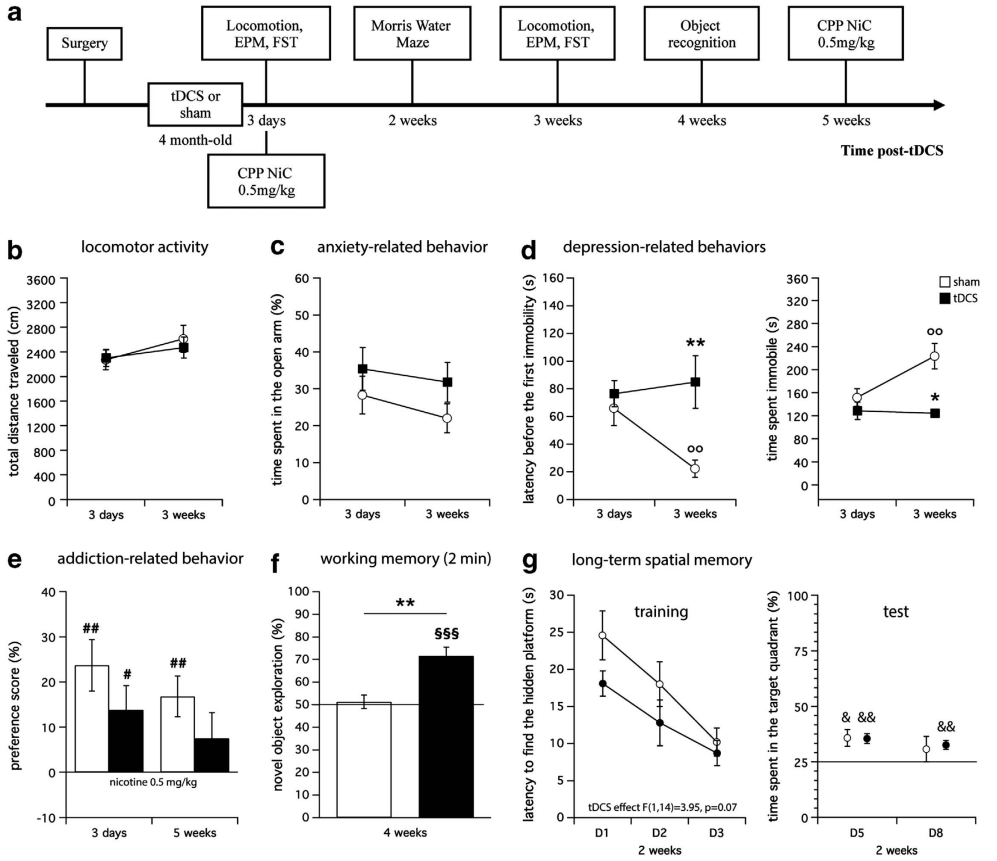


Figure 2 Experiment 1. (a) Experimental design. Four-month-old Swiss female mice never exposed to nicotine were subjected to repeated anodal tDCS for five consecutive days (2 × 20 min/day constant current, 0.2 mA). Behavioral effects of tDCS were screened from 3 days to 5 weeks following the last electrical stimulation. The same animals were used in all behavioral tests (sham $N = 8$, tDCS $N = 8$) except in the CPP test at 3 days for which another batch of mice was used (sham $N = 10$, tDCS $N = 10$). EPM: elevated plus maze, FST: forced swim test, CPP: conditioned place preference, NiC: nicotine. Effect of repeated anodal tDCS on (b) locomotor activity, (c) anxiety-related behavior, (d) depression-related behaviors, and (e) addiction-related behavior 3 days and 3–5 weeks following the last electrical stimulation. (f) Effect of repeated anodal tDCS on working memory 4 weeks after the last stimulation and (g) effect of repeated anodal tDCS on long-term spatial memory (training, left; test, right) 2 weeks after the last stimulation. $^{*}p < 0.05$ and $^{**}p < 0.01$ *vs* sham, $^{\circ\circ}p < 0.01$ 3 days *vs* 3 weeks, $^{\#}p < 0.05$ and $^{\#\#}p < 0.01$ *vs* 0%, $^{\S\S\S}p < 0.001$ *vs* 50%, $^{\&}p < 0.05$ and $^{\&\&}p < 0.01$ *vs* 25%.

to the same procedure (surgeries, restraint box, electrode montage), but current was not delivered.

Nicotine Treatment during Adolescence

Adolescent mice (PND 30–43) were treated twice a day for 14 consecutive days with nicotine (1 mg/kg i.p. in 0.2 ml, time between injections: 6 h; (−)-nicotine hydrogen tartrate salt, SIGMA, France; Figure 3a). Control mice were injected with NaCl 0.9% following the same schedule.

Behavioral Tests

Body weight, food, and water consumption. The weight of mice and food/fluid intake during the 24-h period were monitored throughout the experiments.

Locomotor activity. A system that automatically analyzes locomotor activity of mice in a cage similar to their home cage (Activmeter, Bioseb, France) was used to record the total distance traveled (in cm) by the mice during 16 min. This system consists of a transparent plastic cage (17 × 21 × 14 cm) and uses cage vibrations to measure locomotion.

Elevated plus maze. Anxiety-related behavior was examined in the elevated plus maze (EPM) test (Walf and Frye, 2007). The arms (two open without walls and two enclosed by 45 cm high walls) were 30 cm long, 6 cm wide, and raised off the floor by 50 cm. Each animal was placed in the center square of the apparatus facing a closed arm and was allowed to move freely for 5 min. The test was recorded with a video camera and analyzed using the Ethovision system (video-tracking, Noldus, Paris, France). The parameter used to assess anxiety-related behavior was the percentage of time spent in the open arms during the 5 min.

Forced swim test. We adapted the forced swim test (FST) method from Porsolt *et al* (1977). Each mouse was placed into a beaker (height 26 cm, diameter 18 cm) containing water at a temperature of 32 ± 2 °C and a depth of 17 cm so that the mouse could neither escape nor touch the bottom. Each test lasted 6 min and was video recorded for subsequent scoring by a blind observer of the latency before the first episode of immobility and the total time spent immobile. Mice were considered immobile when they ceased struggling and remained floating motionless in the water for at least 2 s.

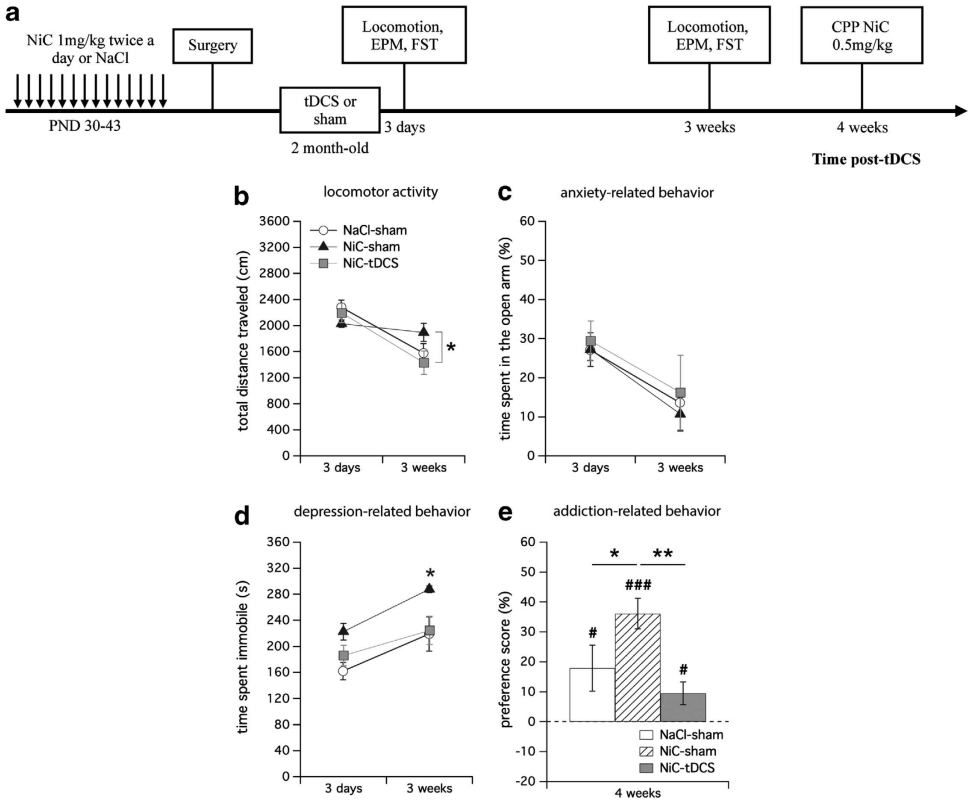


Figure 3 Experiment 2. (a) Experimental design. Adolescent mice were treated twice a day for 14 consecutive days with nicotine (1 mg/kg i.p.) postnatal day (PND) 30–43. Control mice were injected with NaCl 0.9% following the same schedule. Nicotine and NaCl-treated animals were submitted to repeated anodal tDCS or sham stimulations for five days (PND 60–64). Animals were then tested for locomotor activity, anxiety- and depression-related behaviors, and for their sensitivity to the rewarding effects of nicotine. CPP, conditioned place preference; EPM, elevated plus maze; FST, forced swim test; NiC, nicotine. NaCl-sham ($N=10$), NiC-sham ($N=9$), NiC-tDCS ($N=10$). (b) Effect of nicotine exposure during adolescence and subsequent repeated anodal tDCS on locomotor activity, (c) anxiety-related behavior, (d) depression-related behaviors, and (e) addiction-related behavior 3 days and 3-4 weeks following the last electrical stimulation. $^{*}p<0.05$ and $^{**}p<0.01$ *vs* NaCl-sham or as indicated, $^{\#}p<0.05$ and $^{\#\#\#}p<0.001$ *vs* 0%.

Novel object recognition task. Two objects (figurines) with different forms and colors were used for the experiments. There were two copies of each object. A preliminary test was carried out to verify there was no preexisting preference for any of the figurines. Mice were habituated to the empty test arena (diameter: 47 cm) 10 min per day for four consecutive days before the object recognition test. During the exposure phase, two identical copies of the sample object were placed in the arena, and mice were allowed to explore the objects for 10 min. After an intertrial interval of 2 min in the home cage, mice were placed again in the test arena for 5 min (test phase). During this phase, the arena contained one object used in the exposure phase and one novel object. The arena and objects were wiped down with 70% ethanol between trials to minimize olfactory cues. Novel object exploration during the test phase was determined as the percentage of time spent with the nose not more than 1 cm away from the novel object divided by the total time spent to explore the two objects. The test was recorded with a video camera and analyzed using the Ethovision system.

Morris water maze. A circular pool (diameter: 130 cm, height: 30 cm) was filled to a depth of 10 cm with water ($32\pm2\,^{\circ}C$) and placed in a room with visual cues. Over three consecutive days, mice were given 12 training trials per day. A clear platform (diameter: 9 cm) was placed at the midpoint of one quadrant, submerged 0.5 cm below the water surface, and fixed in the same place throughout the training trials. The point of entry of the mouse into the pool was randomized. When a mouse located the platform, it was allowed to remain on it for 20 s. If the mouse could not locate the platform within 60 s, it was gently navigated to the platform and remained on it for 20 s. The parameter evaluated was the latency to find the hidden platform in seconds. A test trial was then carried out 2 and 5 days after the last training trial. During the test trial, the platform was removed, and mice were allowed to swim freely for 60 s. The percentage of time spent in the target quadrant (containing the hidden platform during the training trials) was recorded and compared with 25%. The test was monitored using the Ethovision system.

Nicotine-induced conditioned place preference. The conditioned place preference apparatus consists of two main compartments linked by a corridor displaying each different features: visual (wall patterns) and tactile (floor texture). On day 1 (pre-conditioning), mice were placed in the corridor and allowed free access to the compartments for 10 min. The time spent in each compartment was recorded using the

Ethovision system. On days 2–4 (conditioning phase) mice received injections of nicotine (0.5 mg/kg, i.p.) or vehicle and were immediately confined into one of the two conditioning compartments for 15 min (drug pairing was biased to the least preferred chamber). On day 5 (post-conditioning), mice were once again allowed free access to the compartments for 10 min. Percentage of time spent in the drug-paired compartment was calculated during the pre-conditioning and the post-conditioning phases as follows: drug-paired compartment (s)/(drug-paired compartment (s) + NaCl-paired compartment (s)) × 100. The preference score was determined as the difference between the percentages of time spent in the drug-paired compartment during the post-conditioning and pre-conditioning sessions.

Statistical Analysis

The results were expressed as mean ± SEM. Significance was set at $p \leqslant 0.05$. Repeated analysis of variance (ANOVA) was used to analyze body weight, food/fluid consumption, locomotor activity, anxiety-, and depression-related behaviors with group as between-subject variable (experiment 1: sham, tDCS; experiment 2: NaCl-sham, NiC-sham, Nic-tDCS) and time as within-subject variable (3 days, 3 weeks). Repeated ANOVA was also used to analyze long-term spatial memory in experiment 1 with tDCS as between-subject variable (sham, tDCS) and time as within-subject variable (D1, D2, D3; D5, D8). Student's *t*-test (experiment 1) or one-way ANOVA (experiment 2) was used to analyze addiction-related behavior at 3 days, 4, or 5 weeks. Newman–Keuls *post hoc* tests were used to describe differences between individual groups. Student's *t*-tests were also used to compare the means of each group with a standard value (ie, 0% for the conditioned place preference, 50% for the novel object recognition task, and 25% for the test trial in the Morris water maze).

RESULTS

Experiment 1

Body weight, locomotor activity, and anxiety-related behavior. tDCS had no impact on body weight or on food and fluid consumption 3 days and 3 weeks after the last electrical stimulation (data not shown). Neither locomotor activity (total distance traveled during 16 min, Figure 2b), nor anxiety-related behavior (percentage of time spent in the open arm of the EPM during 5 min, Figure 2c) was affected by tDCS. Although tDCS caused a slight drop in anxiety-related behavior (Figure 2c), this effect was not significant (ANOVA tDCS effect: $F(1,14) = 1.93$, $p = 0.19$; time effect: $F(1,14) = 1.57$, $p = 0.23$; tDCS x time interaction: $F(1,14) = 0.11$, $p = 0.74$).

Depression-related behaviors. In the FST, tDCS differently affected the latency before the first immobility (Figure 2d, left) and the immobility time (Figure 2d, right) depending on the time post stimulation (ANOVA tDCS x time interaction: $F(1,14) = 7.67$, $p < 0.05$ and $F(1,14) = 7.14$, $p < 0.05$, respectively). *Post hoc* Newman–Keuls analysis revealed that, relative to sham controls, tDCS significantly increased the latency before the first immobility (Figure 2d, left, $^{**}p < 0.01$) and decreased immobility time (Figure 2d, right, $^{*}p < 0.05$) 3 weeks after the last stimulation, but not after 3 days (all $p > 0.05$). The sham group was affected by the repetition of the test as evidenced by a significant decrease in the latency before the first immobility and increase in the time spent immobile between 3 days and 3 weeks ($^{\circ\circ}p < 0.01$, Figure 2d). A complementary experiment with a different batch of mice tested only 3 weeks after the last stimulation confirmed the antidepressive-like property of tDCS in the FST (data not shown).

Addiction-related behavior. Nicotine (0.5 mg/kg) induced a significant place preference in the sham group 3 days ($p < 0.01$ *vs* 0%, Figure 2e) and 5 weeks ($p < 0.01$ *vs* 0%) following sham stimulations. Animals submitted to repeated anodal tDCS also displayed a place preference for nicotine 3 days after the last stimulation ($p < 0.05$ *vs* 0%). However, 3 weeks after the last stimulation, the preference score for nicotine was not significantly different from 0% ($p = 0.23$). Student's *t*-test did not reveal a significant direct difference between sham and tDCS groups.

Working memory. The percentage of exploration of the novel object during the test phase was not significantly different from 50% in the sham group, indicating that animals did not differentiate the novel object from the object already presented with an intertrial interval of 2 min (sham group: $p = 0.68$ *vs* 50%, Figure 2f). In contrast, mice exposed to active tDCS explored significantly more the novel object than the object already presented (tDCS group: $p < 0.001$ *vs* 50%).

Long-term spatial memory. There was only a trend for a beneficial global effect of tDCS on learning performances (ANOVA tDCS effect: $F(1,14) = 3.95$, $p = 0.07$, Figure 2g, left). This effect was reflected in the test trials in which both groups spent significantly more time (compared to 25%) in the quadrant associated with the platform (target quadrant) than in the other quadrants at day 5 (all $p < 0.05$) but not at day 8 when only the tDCS group performed well (sham $p = 0.35$, tDCS $p < 0.01$ *vs* 25%; Figure 2g, right). Repeated ANOVA, however, did not reveal any significant effect of tDCS on spatial memory in the test trials (ANOVA tDCS effect: $F(1,14) = 0.03$, $p = 0.86$, time effect: $F(1,14) = 2.23$, $p = 0.16$, tDCS x time interaction: $F(1,14) = 0.17$, $p = 0.68$).

Experiment 2

Locomotor activity and anxiety-related behavior. Locomotor activity in adults tended to be affected differently by the group depending on the time post stimulation (ANOVA group x time interaction: $F(2,26) = 3.09$, $p = 0.06$, Figure 3b). *Post hoc* Newman–Keuls analysis indicated that tDCS significantly reduced locomotor activity in nicotine-treated animals 3 weeks after the last stimulation (NiC-sham *vs* NiC-tDCS, $p < 0.05$). The percentage of time spent in the open arm of the EPM after nicotine withdrawal was not affected by the group (ANOVA group effect: $F(2,26) = 0.27$, $p = 0.77$, group × time interaction: $F(2,26) = 0.05$, $p = 0.95$, Figure 3c).

Depression-related behaviors. The time spent immobile in the FST during adulthood was significantly affected by the experimental conditions (ANOVA group effect: $F(2,26) = 4.66$, $p < 0.05$, Figure 3d). *Post hoc* Newman–Keuls analysis revealed that nicotine exposure during adolescence increased the time spent immobile in the FST during adulthood (NaCl-sham *vs* NiC-sham, $p < 0.05$). Exposure to repeated tDCS normalized this parameter (NiC-sham *vs* NiC-tDCS, $p < 0.05$, NaCl-sham *vs* NiC-tDCS, $p = 0.51$). When time was taken into consideration, tDCS significantly reduced the immobility in nicotine-pretreated animal only 3 weeks after the stimulation (NaCl-sham *vs* NiC-sham, $p < 0.05$ and NiC-sham *vs* NiC-tDCS at 3 weeks, $p < 0.05$). Three weeks after the stimulation, animals exposed to nicotine during adolescence and stimulated during the withdrawal period did not differ from animals never exposed to nicotine and not stimulated (NiC-tDCS *vs* NaCl-sham, $p = 0.98$).

Addiction-related behavior. As in experiment 1, injections of nicotine (0.5 mg/kg, i.p) induced a place preference in the sham group never exposed to nicotine (NaCl-sham, $p < 0.05$ *vs* 0%, Figure 3e). Exposure to nicotine during adolescence robustly increased the place preference induced by nicotine in adults (ANOVA group effect: $F(2,26) = 5.21$, $p < 0.05$; Nic-sham *vs* NaCl-sham, $p < 0.05$; *vs* 0%, $p < 0.001$). tDCS significantly reduced nicotine-induced place preference in nicotine-pretreated animals (NiC-sham *vs* Nic-tDCS, $p < 0.01$). Animals exposed to nicotine during adolescence and stimulated during the withdrawal period did not differ from animals never exposed to nicotine and not stimulated (Nic-tDCS *vs* 0%, $p < 0.05$; NiC-tDCS *vs* NaCl-sham, $p = 0.32$).

DISCUSSION

The present study is the first to show that repeated anodal tDCS over the frontal lobe induces long-lasting modulation of the behavior in mice. Notably, tDCS decreases abnormal behaviors associated with abstinence in an animal model of chronic nicotine consumption. These results provide important preclinical evidence for the use of electrical brain stimulation in promoting smoking cessation and potentially ameliorating other addiction-related behaviors in dependent patients (Boggio *et al*, 2009; Fregni *et al*, 2008).

There is a growing body of evidence to suggest that tDCS has an antidepressant effect in humans (for review see Brunoni *et al*, 2012; Nitsche *et al*, 2009), but, to the best of our knowledge, this has never been shown in an animal model. Our study demonstrates that repeated anodal tDCS *per se* produces significant antidepressant-like effects in mice in the most frequently used test of learned helplessness (3 weeks after the stimulations). This effect seems relatively specific as body weight, food/drink consumption, locomotor activity, and anxiety-related behavior were unaffected both 3 days and 3 weeks following the treatment. It is known that the 'acute' physiological effects of a single tDCS session are not limited to modulation of cortical excitability during stimulation and may outlast the stimulation period by several minutes or even hours (Bindman and Richardson, 1969; Nitsche *et al*, 2003; Nitsche and Paulus, 2000; Ohn *et al*, 2008); however, the long-lasting effects of repeated stimulation on behavior have never been reported before. The effects of such repeated sessions of anodal tDCS on the immobility in the FST were present at 3 weeks but absent 3 days after the last stimulation. Interestingly, this delayed response is reminiscent of the delayed therapeutic onset of antidepressants typically reported in humans (Lam, 2012). However, in rodents, the behavioral effects of antidepressant drugs (eg, selective serotonine reuptake inhibitors, SSRIs) are usually observed acutely after a single injection, suggesting different mechanisms of action between SSRI antidepressants and tDCS.

Repeated anodal tDCS had minimal impact on spatial learning and memory in the Morris Water Maze. Conversely, our stimulation protocol significantly improved mice performance in a working memory task. This result is in accordance with a growing number of studies, indicating an improvement of working memory by anodal tDCS (Boggio *et al*, 2006; Fregni *et al*, 2005; Ohn *et al*, 2008). In a recent work, Zaehle *et al* (2011) studied working memory function in humans several minutes after a single tDCS over the DLPFC (15 min, 1mA) in combination with neurophysiological methods. Working memory was improved, and oscillatory brain activity was affected, as evidenced by amplified oscillatory power in the theta and alpha bands after the stimulation. Our study assessed for the first time the impact of repeated anodal tDCS (2 sessions per days, 5 consecutive days) and demonstrates that this protocol has long-lasting beneficial consequences in working memory of mice for at least 4 weeks. Longer time points remain to be tested to determine more precisely the duration of this effect.

Antidepressants can be used to facilitate smoking cessation (Hughes *et al*, 2007). What about tDCS? Chronic exposure to nicotine during adolescence induces depression-related behavior in adult rats (1 month after nicotine withdrawal (Iniguez *et al*, 2009)). Interestingly, Iniguez *et al* (2009) demonstrated that the altered behaviors observed after nicotine withdrawal can be prevented in rats by either subsequent re-exposure to nicotine or antidepressant treatment (fluoxetine or bupropion; 10 mg/kg). Similarly, our results show that mice exposed to nicotine during adolescence display increased immobility time in the FST after nicotine withdrawal. In agreement with the previous work, this alteration was normalized by our repeated anodal tDCS protocol. Our study also shows that exposure to nicotine during adolescence dramatically increases nicotine-induced place preference (0.5 mg/kg) in adult mice, an effect that was completely abolished by the electrical stimulations.

In the brain, nicotine binds to nicotinic cholinergic receptors, which are ligand-gated ion channels that normally bind acetylcholine. Stimulation of nicotinic cholinergic receptors is known to evoke dopamine release in the cortical and subcortical dopaminergic systems, which are critical for the reinforcing effects of nicotine. This effect can be direct *via* the activation of dopaminergic neurons or indirect *via* the stimulation of other neurotransmitters' release including glutamate. Animal experiments have shown that descending pathways from the frontal cortex modulate the release of dopamine in subcortical areas such as the striatum (Karreman and Moghaddam, 1996; Taber

and Fibiger, 1993, 1995). There is evidence that this occurs both directly via glutamatergic corticostriatal projections (Taber and Fibiger, 1995) and indirectly through an effect on mesostriatal dopamine neurons in the midbrain (Karreman and Moghaddam, 1996). As a possible mechanism of action, we hypothesize that anodal tDCS could promote a direct or indirect modulation of subcortical dopamine release involved in nicotine addiction. However, to definitively conclude that tDCS impacts nicotine consumption, it will be necessary to substantiate our findings in an intravenous self-administration paradigm.

Important questions remain to be answered, such as whether tDCS effects are specific for the reinforcing effect of nicotine, whether it would also work for other drugs of abuse (eg, alcohol, psychostimulants), and whether it affects the response to natural rewards (eg, sexual activity, appetite). Our preliminary data suggest that the reinforcing effect of food is not altered by transcranial stimulations (no change in food/fluid consumption), but more detailed work is necessary to address this question. A limit in our work is that all of our experiments were carried out in female mice; therefore, additional studies are warranted to determine if our findings can be extrapolated to male mice. A final important consideration is the equivalence of our stimulation paradigm in animal *vs* humans. Indeed, our stimulation protocol (time, length, repetition) is the same as the one used in clinical trials, but the intensity is lower: 0.2 mA *vs* 2 mA. However, in our animal model, the current density is much more elevated due to the small size of the electrode (57.1 *vs* 0.57 A/m^2 for clinical trials). This is of importance because the area stimulated by the current might be significantly different in mice and in humans, in particular if the size of the brain is taken into account. Future studies will need to determine the minimal amount of current necessary in our model to maintain the efficiency in alleviating abnormal behaviors associated with chronic nicotine consumption, to explore the importance of the polarity, and to assess whether the effects are specific to the area stimulated or simply due to a generalized stimulation of the mouse brain.

Taken together, our findings indicate that (1) our tDCS protocol results in behavioral outcomes similar to the ones observed in clinical trials, (2) exposure to nicotine during adolescence promotes abnormal behaviors during adulthood (depressive-like behavior, increase in the rewarding effect of nicotine), and (3) that this detrimental effect might be prevented by repeated anodal tDCS treatment. Our results also highlight the time dependence of the tDCS effects, which seems to be more prominent 3 weeks after the last tDCS session. On the basis of the research presented here, our experimental animal model provides a framework to investigate the effects of tDCS on smoking craving and, more importantly, to explore the neurobiological changes that underlie the beneficial effects of tDCS on this and other addiction-related behaviors.

FUNDING AND DISCLOSURE

This work was supported in part by the 'Institut de Recherche Scientifique sur les Boissons' IREB (VVW), the University of Franche-Comté (VVW), and the city of Besançon (SP, VVW).

ACKNOWLEDGEMENTS

We thank Patrice Andrieu for excellent technical assistance and for his illustration of the tDCS device (Figure 1), Marie-Ange Bolard for animal care, and Adriana Caballero for proofreading and editing the manuscript. We are grateful to Jean-Pierre Darnis (Dixi Medical, Besançon, France) for the help in the development of the electrodes for tDCS in mice and to Heinz Steiner for helpful advice and comments.

REFERENCES

Bindman LJ, Lippold OC, Redfearn JW (1964). The action of brief polarizing currents on the cerebral cortex of the rat (1) during current flow and (2) in the production of long-lasting after-effects. *J Physiol* **172**: 369–382.

Bindman LJ, Richardson HC (1969). Persisting changes in the firing pattern of single cortical units responding at short latency to weak somatic stimuli in the anaesthetized rat. *J Physiol* **202**: 53P–55P.

Boggio PS, Ferrucci R, Rigonatti SP, Covre P, Nitsche M, Pascual-Leone A *et al* (2006). Effects of transcranial direct current stimulation on working memory in patients with Parkinson's disease. *J Neurol Sci* **249**: 31–38.

Boggio PS, Liguori P, Sultani N, Rezende L, Fecteau S, Fregni F (2009). Cumulative priming effects of cortical stimulation on smoking cue-induced craving. *Neurosci Lett* **463**: 82–86.

Brody AL, Mandelkern MA, London ED, Childress AR, Lee GS, Bota RG *et al* (2002). Brain metabolic changes during cigarette craving. *Arch Gen Psychiatry* **59**: 1162–1172.

Brunoni AR, Ferrucci R, Fregni F, Boggio PS, Priori A (2012). Transcranial direct current stimulation for the treatment of major depressive disorder: a summary of preclinical, clinical and translational findings. *Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry* **39**: 9–16.

Due DL, Huettel SA, Hall WG, Rubin DC (2002). Activation in mesolimbic and visuospatial neural circuits elicited by smoking cues: evidence from functional magnetic resonance imaging. *Am J Psychiatry* **159**: 954–960.

Feil J, Zangen A (2010). Brain stimulation in the study and treatment of addiction. *Neurosci Biobehav Rev* **34**: 559–574.

Ferrucci R, Bortolomasi M, Vergari M, Tadini L, Salvoro B, Giacopuzzi M *et al* (2009). Transcranial direct current stimulation in severe, drug-resistant major depression. *J Affect Disord* **118**: 215–219.

Fraser PE, Rosen AC (2012). Transcranial direct current stimulation and behavioral models of smoking addiction. *Front Psychiatry* **3**: 79.

Fregni F, Boggio PS, Nitsche M, Bermpohl F, Antal A, Feredoes E *et al* (2005). Anodal transcranial direct current stimulation of prefrontal cortex enhances working memory. *Exp Brain Res* **166**: 23–30.

Fregni F, Liguori P, Fecteau S, Nitsche MA, Pascual-Leone A, Boggio PS (2008). Cortical stimulation of the prefrontal cortex with transcranial direct current stimulation reduces cue-provoked smoking craving: a randomized, sham-controlled study. *J Clin Psychiatry* **69**: 32–40.

Hughes JR, Stead LF, Lancaster T (2007). Antidepressants for smoking cessation. *Cochrane Database Syst Rev* CD000031. doi:10.1002/14651858.CD000031.pub3.

Iniguez SD, Warren BL, Parise EM, Alcantara LF, Schuh B, Maffeo ML *et al* (2009). Nicotine exposure during adolescence induces a depression-like state in adulthood. *Neuropsychopharmacology* **34**: 1609–1624.

Karreman M, Moghaddam B (1996). The prefrontal cortex regulates the basal release of dopamine in the limbic striatum: an effect mediated by ventral tegmental area. *J Neurochem* **66**: 589–598.

Lam RW (2012). Onset, time course and trajectories of improvement with antidepressants. *Eur Neuropsychopharmacol* **22**(Suppl 3): S492–S498.

Liebetanz D, Fregni F, Monte-Silva KK, Oliveira MB, Amancio-dos-Santos A, Nitsche MA *et al* (2006). After-effects of transcranial direct current stimulation (tDCS) on cortical spreading depression. *Neurosci Lett* **398**: 85–90.

Liebetanz D, Koch R, Mayenfels S, Konig F, Paulus W, Nitsche MA (2009). Safety limits of cathodal transcranial direct current stimulation in rats. *Clin Neurophysiol* **120**: 1161–1167.

McBride D, Barrett SP, Kelly JT, Aw A, Dagher A (2006). Effects of expectancy and abstinence on the neural response to smoking cues in cigarette smokers: an fMRI study. *Neuropsychopharmacology* **31**: 2728–2738.

Nitsche MA, Boggio PS, Fregni F, Pascual-Leone A (2009). Treatment of depression with transcranial direct current stimulation (tDCS): a review. *Exp Neurol* **219**: 14–19.

Nitsche MA, Nitsche MS, Klein CC, Tergau F, Rothwell JC, Paulus W (2003). Level of action of cathodal DC polarisation induced inhibition of the human motor cortex. *Clin Neurophysiol* **114**: 600–604.

Nitsche MA, Paulus W (2000). Excitability changes induced in the human motor cortex by weak transcranial direct current stimulation. *J Physiol* **527**(Pt 3): 633–639.

O'Brien CP (2008). Review. Evidence-based treatments of addiction. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci* **363**: 3277–3286.

Ohn SH, Park CI, Yoo WK, Ko MH, Choi KP, Kim GM *et al* (2008). Time-dependent effect of transcranial direct current stimulation on the enhancement of working memory. *Neuroreport* **19**: 43–47.

Paxinos G, Franklin K (2001). *The mouse brain in stereotaxic coordinate*, 2nd edn. Academic Press.

Porsolt RD, Le Pichon M, Jalfre M (1977). Depression: a new animal model sensitive to antidepressant treatments. *Nature* **266**: 730–732.

Purpura DP, McMurtry JG (1965). Intracellular Activities and evoked potential changes during polarization of motor cortex. *J Neurophysiol* **28**: 166–185.

Rigonatti SP, Boggio PS, Myczkowski ML, Otta E, Fiquer JT, Ribeiro RB *et al* (2008). Transcranial direct stimulation and fluoxetine for the treatment of depression. *Eur Psychiatry* **23**: 74–76.

Stagg CJ, Nitsche MA (2011). Physiological basis of transcranial direct current stimulation. *Neuroscientist* **17**: 37–53.

Stead LF, Lancaster T (2012). Combined pharmacotherapy and behavioural interventions for smoking cessation. *Cochrane Database Syst Rev* **10**: CD008286.

Taber MT, Fibiger HC (1993). Electrical stimulation of the medial prefrontal cortex increases dopamine release in the striatum. *Neuropsychopharmacology* **9**: 271–275.

Taber MT, Fibiger HC (1995). Electrical stimulation of the prefrontal cortex increases dopamine release in the nucleus accumbens of the rat: modulation by metabotropic glutamate receptors. *J Neurosci* **15**(5 Pt 2): 3896–3904.

Walf AA, Frye CA (2007). The use of the elevated plus maze as an assay of anxiety-related behavior in rodents. *Nature Protocols* **2**: 322–328.

Wilson SJ, Sayette MA, Fiez JA (2004). Prefrontal responses to drug cues: a neurocognitive analysis. *Nat Neurosci* **7**: 211–214.

Zaehle T, Sandmann P, Thorne JD, Jancke L, Herrmann CS (2011). Transcranial direct current stimulation of the prefrontal cortex modulates working memory performance: combined behavioural and electrophysiological evidence. *BMC Neurosci* **12**: 2.

C Article 2 - *Transcranial direct current stimulation produces long-lasting attenuation of cocaine-induced behavioral responses and gene regulation in corticostriatal circuits*

Addiction Biology

SSA SOCIETY FOR THE STUDY OF ADDICTION

ORIGINAL ARTICLE

doi:10.1111/adb.12415

Transcranial direct current stimulation produces long-lasting attenuation of cocaine-induced behavioral responses and gene regulation in corticostriatal circuits

Solène Pedron[1], Joel Beverley[2], Emmanuel Haffen[1,3], Patrice Andrieu[1], Heinz Steiner[2] & Vincent Van Waes[1]

EA 481 Laboratory of Integrative and Clinical Neuroscience, University of Franche-Comté/SFR FED 4234, COMUE Bourgogne/Franche-Comté, France[1], Department of Cellular and Molecular Pharmacology, The Chicago Medical School, Rosalind Franklin University of Medicine and Science, North Chicago, IL, USA[2] and INSERM CIC-IT 808 Clinical Investigation Centre for Innovative Technology, University Hospital of Besançon, France[3]

ABSTRACT

Transcranial direct current stimulation (tDCS) is a non-invasive method to modulate cortical excitability. This technique is a promising emerging tool to treat several neuropathologies, including addiction. We have previously shown in mice that repeated tDCS normalizes pathological behaviors associated with chronic nicotine exposure. Here, we evaluated, in adult female mice, the impact of tDCS on cocaine-induced behavior and gene regulation in corticostriatal circuits implicated in psychostimulant addiction. Anodal tDCS was applied transcranially over the frontal cortex. Three weeks after repeated tDCS, we investigated the induction of a gene expression marker (*Zif268*) by cocaine (25 mg/kg) in 26 cortical and 23 striatal regions using *in situ* hybridization histochemistry. We also assessed place preference conditioning by cocaine (5, 10 and 25 mg/kg). tDCS pretreatment increased basal expression and attenuated cocaine (25 mg/kg)-induced expression of *Zif268* in specific corticostriatal circuits. Cocaine-induced locomotor activation (25 mg/kg) and place preference conditioning (5 and 25 mg/kg) were also reduced. These results demonstrate that tDCS can attenuate molecular and behavioral responses to cocaine for several weeks. Together, our findings provide pre-clinical evidence that such electrical brain stimulation may be useful to modify the psychostimulant addiction risk.

Keywords Cocaine, conditioned place preference, corticostriatal circuits, gene expression, neuromodulation, tDCS.

Correspondence to: Vincent Van Waes, EA481 Laboratory of Integrative and Clinical Neuroscience, University of Franche-Comté, UFR Sciences et Techniques, 2 Place Leclerc, 25030 Besancon Cedex, France. E-mail: vincent.van_waes@univ-fcomte.fr

INTRODUCTION

Transcranial direct current stimulation (tDCS) is a non-invasive and painless neuromodulatory technique that uses weak constant electrical current to stimulate specific areas of the cerebral cortex. During the last decade, tDCS has emerged as a successful approach to alleviate symptoms of various psychiatric and neurological conditions, including depression (e.g. Brunoni *et al.* 2012; Berlim, Van den Eynde, & Daskalakis 2013; Kuo, Paulus, & Nitsche 2014), memory disorders (e.g. Bennabi *et al.* 2014) and addiction (Feil & Zangen 2010). For example, studies found that repeated tDCS over the prefrontal cortex decreased craving for, and the consumption of, cigarettes (Fregni *et al.* 2008; Boggio *et al.* 2009; Fecteau *et al.* 2014) and alcohol (Boggio *et al.* 2008; Klauss *et al.* 2014) in chronic users. The mechanisms underlying these behavioral modifications are unknown. We recently developed an animal model for tDCS (Pedron *et al.* 2014) to investigate the neuronal processes affected by this technique. Consistent with the above clinical findings, our early work shows that repeated tDCS for five days in mice has antidepressant-like properties, improves working memory and decreases nicotine-induced place preference conditioning, three weeks after tDCS (Pedron *et al.* 2014).

The potential effects of tDCS in cocaine addiction remain poorly explored (Conti & Nakamura-Palacios 2014). However, reduced cocaine craving has been reported after another kind of non-invasive cortical stimulation, repeated transcranial magnetic stimulation (rTMS) (Camprodon *et al.* 2007; Politi *et al.* 2008), suggesting that modifying cortical activity may also alter psychostimulant-induced processes. The mechanisms

© 2016 Society for the Study of Addiction

underlying these effects of tDCS or rTMS, and whether or not other subcortical addiction-related brain structures are also impacted, remain unclear.

It has been shown that corticostriatal circuits play a critical role in several aspects of addiction, including abnormal reward processing, habit formation and compulsive behavior (Berke & Hyman 2000; Everitt & Robbins 2005; Wise 2009). A large literature implicates changes in gene regulation in specific corticostriatal circuits in addiction (Renthal & Nestler 2008). Among the many genes affected by psychostimulants such as cocaine in the cortex and striatum is *Zif268* (Steiner & Van Waes 2013), which encodes a transcription factor (Knapska & Kaczmarek 2004) that is critical for cocaine-induced behavioral changes (Lee *et al.* 2005; Valjent *et al.* 2006; Theberge *et al.* 2010)

In the present study, we determined, in mice, whether tDCS can modify cocaine-induced behavior and/or normal or cocaine-induced gene regulation in the cortex and striatum, using *Zif268* as a gene regulation marker. Our mapping study also assessed the spread of such molecular changes across different corticostriatal circuits.

MATERIALS AND METHODS

Subjects

Swiss female mice (8 weeks at the beginning of tDCS; Janvier, France) were housed 8–10 per cage under standard laboratory conditions (12:12-hour light/dark cycle; lights on at 7:00 am) with food and water available *ad libitum*. Prior to the surgery, mice were allowed 1 week of acclimation, during which they were repeatedly handled. In experiment 1 (locomotor activity, gene expression), animals were divided into eight experimental groups: Sham-Veh (Vehicle) ($N = 8$), tDCS-Veh ($N = 6$), Sham-5 (Cocaine 5 mg/kg, i.p.) ($N = 9$), tDCS-5 ($N = 10$), Sham-10 (Cocaine 10 mg/kg) ($N = 9$), tDCS-10 ($N = 10$), Sham-25 (Cocaine 25 mg/kg) ($N = 8$) and tDCS-25 ($N = 8$). In experiment 2 (place preference conditioning by cocaine), animals were divided into eight groups: Sham-Veh ($N = 8$), tDCS-Veh ($N = 10$), Sham-5 ($N = 14$), tDCS-5 ($N = 12$), Sham-10 ($N = 14$), tDCS-10 ($N = 14$), Sham-25 ($N = 13$) and tDCS-25 ($N = 12$). All procedures met the NIH guidelines for the care and use of laboratory animals and were approved by the University of Franche-Comté Animal Care and Use Committee (CEBEA-58).

Surgery

A tubular plastic jack (internal diameter: 2.1 mm) was surgically fixed onto the skull one week before the stimulation protocol began (Fig. 1a). Animals were anesthetized with ketamine hydrochloride/xylazine (80/12 mg/kg; i.p.) and were placed in a stereotaxic apparatus. The center of the plastic jack was positioned over the left frontal cortex 1 mm rostral and 1 mm left of bregma (Fig. 2) and fixed with a coating of glass ionomer cement (GC Fuji I, Leuven, Belgium)

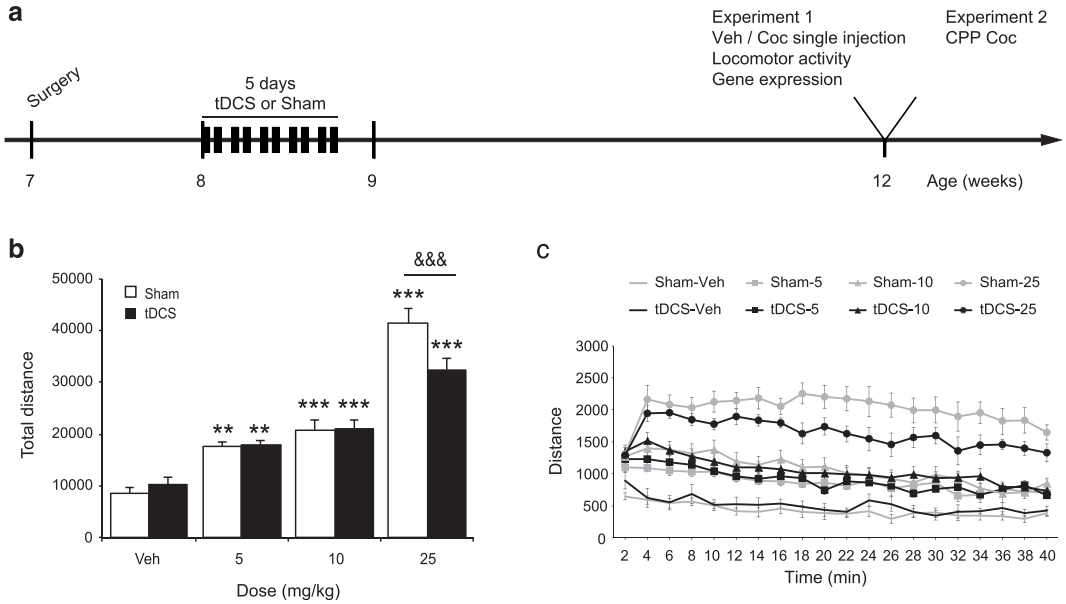


Figure 1 (a) Experimental design (experiments 1 and 2). CPP: conditioned place preference test (b) Total distance traveled (mean ± SEM, in cm) in a novel open field is shown for animals that were subjected to tDCS (twice daily, 5 days) or Sham stimulation and, 3 weeks after stimulation, received an injection of cocaine (Coc) (5, 10 or 25 mg/kg) or vehicle (Veh), followed by the 40-min behavioral test. (c) Time course of the distance traveled is given for each group. ** $p < 0.01$ and *** $p < 0.001$, *versus* respective control group (Sham-Veh or tDCS-Veh); &&& $p < 0.001$, Sham-25 *versus* tDCS-25. $N = 6$–10 per group

© 2016 Society for the Study of Addiction

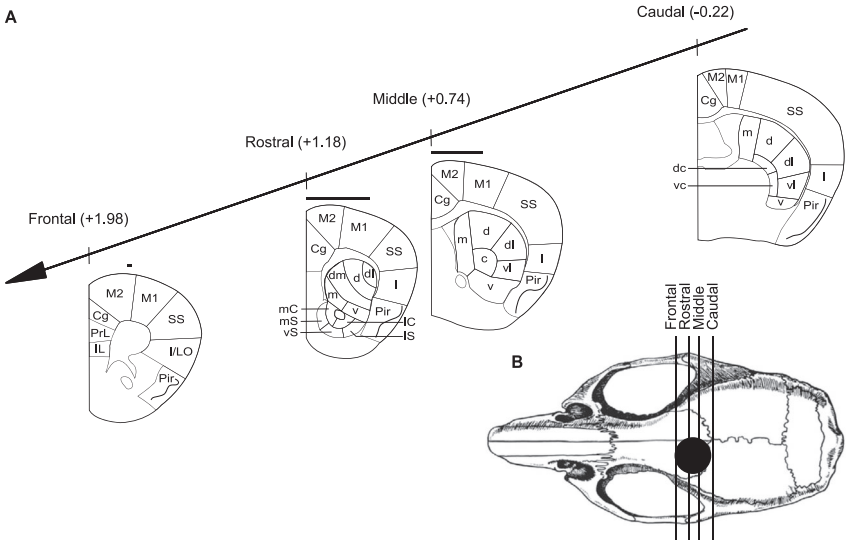


Figure 2 (a) Schematic illustration of the 26 cortical areas (Paxinos & Franklin 2001) and the 23 striatal sectors (mostly defined by their predominant cortical inputs, Willuhn *et al.* 2003) used to measure *Zif268* expression. Gene expression was assessed in coronal sections from four rostrocaudal levels: frontal, rostral, middle and caudal (ranging from approximately +1.98 to −0.22 mm relative to bregma; Paxinos & Franklin 2001). Horizontal black lines indicate the position of the anode. Cortical areas (from medial to lateral): IL, infralimbic; PrL, prelimbic; Cg, cingulate; M2, secondary motor; M1, primary motor; SS, somatosensory; I/LO, insular/lateral orbital; I, insular; Pir, piriform. Striatal sectors: m, medial; dm, dorsomedial; d, dorsal; dl, dorsolateral; dc, dorsal central; c, central; vc, ventral central; vl, ventrolateral; v, ventral. Nucleus accumbens: mC, medial core; lC, lateral core; mS, medial shell; vS, ventral shell; lS, lateral shell. (b) The center of the stimulation electrode (anode, filled circle) was positioned over the left frontal cortex 1 mm rostral and 1 mm left of bregma. The anode (diameter: 2.1 mm) had a contact area of 3.5 mm^2, and the cathode (rubber-plate electrode, 9.5 cm^2) was positioned onto the ventral thorax (not shown). A 2 × 20 minutes/day constant current of 0.2 mA, with a linear fade in/fade out of 10 seconds, was applied transcranially using a direct current stimulator (DC-Stimulator Plus), on 5 consecutive days. The position of the assessed brain sections (frontal to caudal) relative to the stimulation electrode is also shown

(Pedron *et al.* 2014). After surgery, all animals were allowed to recover for 1 week before undergoing tDCS. During this period and tDCS, mice were placed in individual cages.

Stimulation protocol

The plastic jack was filled with saline (NaCl 0.9 percent) to establish a contact area of 3.5 mm^2 with the skull. The stimulation electrode (anode, diameter: 2.1 mm; DIXI Medical, Besançon, France) was then screwed into the jack. A larger conventional rubber-plate electrode (cathode, 9.5 cm^2; Physiomed Elektromedizin AG, Schnaittach, Germany) served as the counterelectrode and was placed onto the ventral thorax (Pedron *et al.* 2014). On 5 consecutive days, an anodal constant current (0.2 mA; 2 × 20 minutes/day, 5 hour interstimulation interval) was applied transcranially over the frontal cortex, using a DC-Stimulator Plus (NeuroConn, Ilmenau, Germany) with a linear fade in/fade out (10-second ramp). Animals were awake and restrained during tDCS to prevent possible interactions between tDCS effects and anesthetic drugs. The design of the custom-made restraining box is shown in Pedron *et al.* 2014. Control (Sham) animals were subjected to the same procedure (surgery, restraining box, electrode connected to the jack), except the current was not delivered.

Our protocol of stimulation was chosen based on earlier clinical studies (Rigonatti *et al.* 2008; Boggio *et al.* 2009; Ferrucci *et al.* 2009), as well as our previous work in mice (Pedron *et al.* 2014). We evaluated effects on behavior and gene expression three weeks after tDCS ended, because this time window showed robust effects of tDCS on behavior (Pedron *et al.* 2014).

Experiment 1: Locomotor activity and gene expression

Drug treatment and behavioral testing

Three weeks after the last tDCS session, animals received a single injection of either cocaine (5, 10 or 25 mg/kg in 0.02 percent ascorbic acid, i.p.,1 ml/kg, Sigma-Aldrich, France) or vehicle. Immediately after the injection, the animal was placed in a circular open-field (diameter 47 cm) for 40 minutes in low-light conditions (40 lux). Locomotor activity was analyzed using a video-tracking system (Ethovision, Noldus, France). The parameter assessed was the distance traveled in the open-field. The mice were then killed with CO_2. The brain was rapidly removed, frozen in isopentane cooled on dry ice and stored at −30°C until cryostat sectioning.

© 2016 Society for the Study of Addiction

Tissue preparation and in situ hybridization histochemistry

Only the mice treated with cocaine 25 mg/kg or vehicle were used in the gene expression study. Coronal sections (12 µm) were thaw-mounted onto glass slides (Superfrost/Plus, Daigger, Wheeling, IL, USA), dried on a slide warmer and stored at −30°C. In preparation for the *in situ* hybridization histochemistry, the sections were fixed in 4 percent paraformaldehyde/0.9 percent saline for 10 minutes at room temperature, incubated in a fresh solution of 0.25 percent acetic anhydride in 0.1 M triethanolamine/0.9 percent saline (pH 8.0) for 10 minutes, dehydrated, defatted for 2 × 5 minutes in chloroform, rehydrated and air-dried. The slides were then stored at −30°C until hybridization. An oligonucleotide probe (48-mer, Invitrogen, Rockville, MD, USA) was labeled with [α-^{33}P]-dATP, as described earlier (Van Waes *et al.* 2014). The probe had the following sequence: *Zif268* (Egr1), complementary to bases 352–399, GenBank accession number M18416. One hundred microliters of hybridization buffer containing labeled probe (~3 × 10^6 cpm) was added to each slide. The sections were coverslipped and incubated at 37°C overnight. After incubation, the slides were first rinsed in four washes of 1X saline citrate (150 mM sodium chloride, 15 mM sodium citrate), and then washed three times for 20 minutes each in 2X saline citrate/50 percent formamide at 40°C, followed by two washes of 30 minutes each in 1X saline citrate at room temperature. After a brief water rinse, the sections were air-dried and then apposed to X-ray film (BioMax MR-2, Kodak, Rochester, NY, USA) for 6 days.

Analysis of autoradiograms

Gene expression in the cortex was measured in a total of 26 regions (infralimbic, prelimbic, cingulate, secondary motor, primary motor, somatosensory, lateral orbital, insular and piriform, based on Paxinos & Franklin 2001, in coronal sections from four rostrocaudal levels: frontal, approximately at +1.98 mm relative to bregma; rostral, +1.18 mm; middle, +0.74 mm; and caudal, −0.22 mm, Fig. 2a). Striatal gene expression was determined at the rostral, middle and caudal levels in a total of 23 sectors mostly defined by their predominant cortical inputs (Willuhn, Sun, & Steiner 2003). Eighteen of these sectors represented the caudate-putamen (medial, dorsomedial, dorsal, dorsolateral, dorsal central, central, ventral central, ventrolateral, ventral) and five the nucleus accumbens (medial core, lateral core, medial shell, ventral shell and lateral shell, Fig. 2a) (Van Waes *et al.* 2010).

Hybridization signals on film autoradiograms were measured by densitometry (ImageJ, Wayne Rasband, Bethesda, MD, USA). The films were captured using a light table (Northern Light, Imaging Research, St. Catharines, Ontario, Canada) and a Sony CCD camera (Imaging Research). The 'mean density' value of a region of interest was measured by placing a template over the captured image. Mean densities were corrected for background by subtracting mean density values measured over white matter (corpus callosum) of the same hemisphere. Values from corresponding regions in the two hemispheres were averaged when no significant differences in the patterns of *Zif268* induction by tDCS or cocaine were detected between the left (stimulated) and right (contralateral) sides. The illustrations of film autoradiograms displayed in Fig. 3 are computer-generated images, and are contrast-enhanced. The maximal hybridization signal is black.

Experiment 2: Place preference conditioning by cocaine

Animals performed the conditioned place preference (CPP) test three weeks after tDCS, as previously described (Pedron *et al.* 2014). Three doses of cocaine were tested (5, 10 or 25 mg/kg in 0.02 percent ascorbic acid, i.p.). Two groups that received vehicle injections in both compartments were used as controls (Sham-Veh and tDCS-Veh).

Briefly, the CPP apparatus consists of two main compartments linked by a corridor displaying each different features: visual (wall patterns) and tactile (floor texture). On day 1 (pre-conditioning, D1), mice were placed in the corridor and allowed free access to the compartments for 10 minutes. The time spent in each compartment was recorded using the Ethovision system. On days 2–4 (conditioning phase) mice received an injection of cocaine or vehicle (one of each per day, interval between the injections: 6 hours) and were immediately confined into one of the two conditioning compartments for 15 minutes (drug pairing occurred in the least preferred compartment). On day 5 (post-conditioning, D5), mice were again allowed free access to both compartments for 10 minutes, without drug treatment. The percentage of time spent in the drug-paired compartment was calculated for the pre-conditioning (D1) and the post-conditioning (D5) phases as follows: drug-paired compartment (second) / (drug-paired compartment + vehicle-paired compartment (second)) × 100. A significant increase in the percentage of time spent in the drug-paired compartment between the pre-conditioning session (D1) and the post-conditioning session (D5) indicates that the substance induces a place preference.

Statistical analysis

The results were expressed as mean ± standard error of the mean. Significance was set at $p \leq 0.05$. For locomotor

© 2016 Society for the Study of Addiction

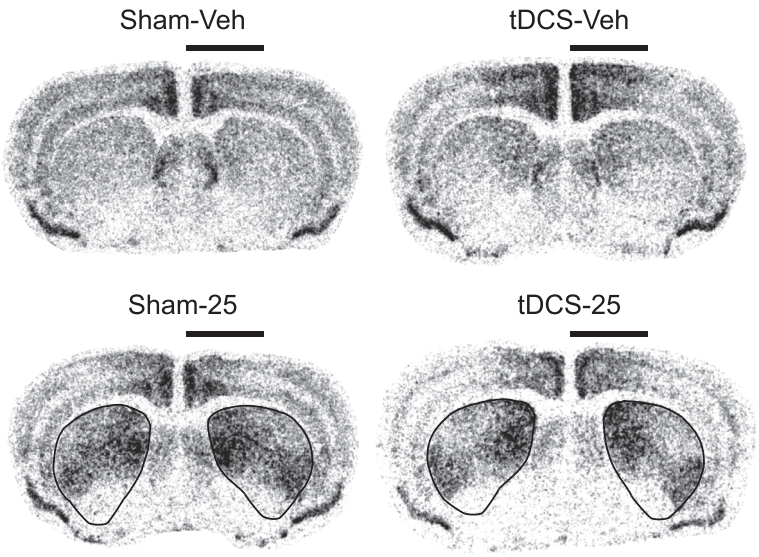


Figure 3 Illustrations of film autoradiograms depict *Zif268* expression in coronal sections from the middle striatum in Sham or tDCS mice treated with vehicle (Veh) or cocaine (25 mg/kg, i.p.). Horizontal black lines illustrate the position of the anode. The maximal hybridization signal is in black

activity two-factor ANOVAs with factors drug (Veh, 5, 10, 25) and stimulation (Sham, tDCS) were performed. To compare *Zif268* densities, we first used three-factor ANOVAs (one ANOVA per cortical area or striatal sector) with factors drug (Veh, 25), stimulation (Sham, tDCS) and side of the brain (right, left; within factor). Then, for the averaged values (right/left hemisphere), two-factor ANOVAs were performed with factors drug and stimulation. Finally, for the CPP experiment, we performed for each dose (0, 5, 10 and 25 mg/kg) two-factor ANOVAs with factor stimulation (Sham, tDCS) and time (pre-(D1), post-(D5) conditioning; within factor). Newman–Keuls post-hoc tests were used to describe differences between individual groups (Statistica, StatSoft, USA). For illustrations of topographies (maps, Figs 4a and 5a), the increase in gene induction (*versus* respective control group) in a given region was expressed as the percentage of the maximal increase observed (% max). The regional distribution of *Zif268* induction in the cortex and striatum was compared by Pearson's correlations, for different experimental conditions.

RESULTS

Experiment 1: Locomotor activity and gene expression

tDCS attenuated cocaine-induced locomotor activity for the highest dose of cocaine

Cocaine increased locomotor activity in both Sham and tDCS mice (Drug effect: $F(3,59) = 80.97$, $p < 0.001$; Fig. 1b,c, Newman–Keuls post-hoc analyses ** $p < 0.01$ and *** $p < 0.001$ *versus* respective control group (Sham-Veh or tDCS-Veh)). tDCS had a differential effect on locomotor activity depending on the dose of cocaine tested (tDCS × drug interaction: $F(3,59) = 3.87$, $p < 0.05$). Newman–Keuls post-hoc analyses revealed that tDCS alone had no effect on locomotor activity (tDCS-Veh *versus* Sham-Veh, $p = 0.50$). For the lower doses, tDCS had also no impact on cocaine-induced locomotor activity (tDCS *versus* Sham: 5 mg/kg, $p = 0.84$; 10 mg/kg, $p = 0.93$). However, tDCS reduced cocaine-induced locomotor activity for the highest cocaine dose tested (25 mg/kg, $p < 0.001$).

No asymmetrical effects of tDCS or cocaine on Zif268 expression in the left versus right hemisphere

Although the stimulation electrode was positioned asymmetrically on the skull (1 mm left of bregma, Fig. 2b), there was no difference between the left (stimulated) and right (contralateral) hemisphere in the expression of *Zif268*, with or without cocaine (Fig. 3). That is, for each area of cortex and striatum, there was no significant interaction with the hemisphere (right or left). Values from corresponding regions in the two hemispheres were therefore averaged for the rest of the study.

tDCS increased basal Zif268 expression

Three weeks after tDCS, vehicle-treated animals subjected to tDCS displayed enhanced expression of *Zif268* compared to sham controls in the striatum (Figs 3 and 4, supplementary Table 2) and to a lesser degree in the cortex (supplementary Table 1). Among the cortical areas, a statistically significant increase was seen in the

© 2016 Society for the Study of Addiction

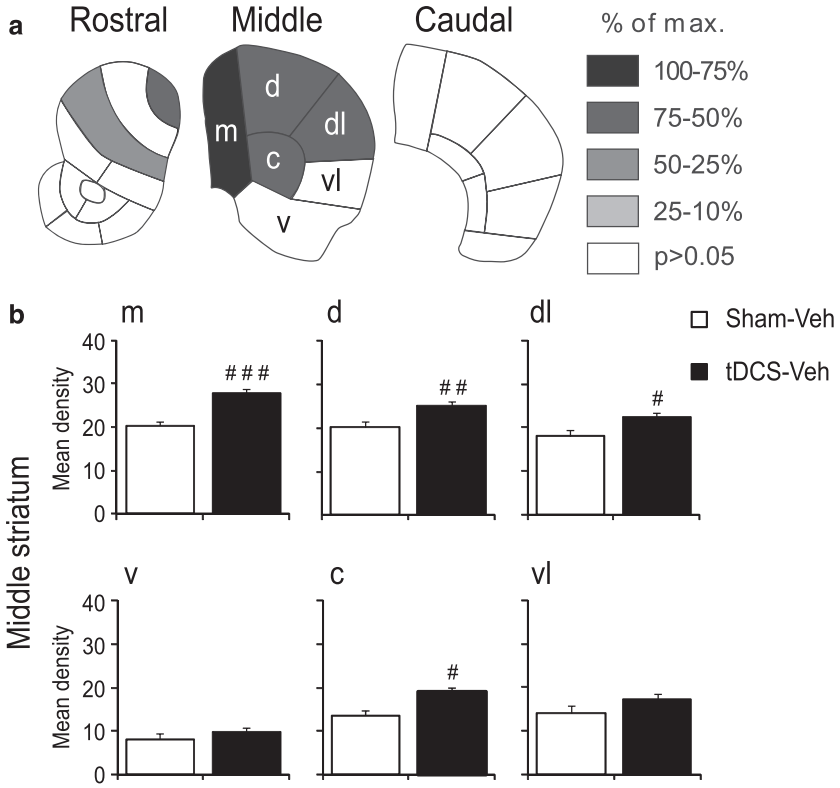


Figure 4 Topography of tDCS-induced *Zif268* expression in the striatum (in vehicle-treated mice). (a) Maps depict the distribution of increases in *Zif268* expression at the rostral, middle and caudal levels of the striatum, 3 weeks after tDCS and following the behavioral test (ipsi- and contralateral values averaged). The values (difference tDCS-Veh minus Sham-Veh) are expressed relative to the maximal increase observed (% of maximum). Sectors with significant differences ($p < 0.05$) are shaded as indicated. Sectors without significant effect are in white. (b) Mean density values (mean ± SEM) for *Zif268* expression in Sham (white) and tDCS (black) mice 3 weeks after tDCS and following the behavioral test are depicted for the six middle striatal sectors. $^{\#}$ $p < 0.05$, $^{\#\#}$ $p < 0.01$, and $^{\#\#\#}$ $p < 0.001$, *versus* Sham-Veh. $N = 6$–8 per group

piriform cortex on rostral, middle and caudal levels ($p < 0.05$) and in the cingulate cortex (frontal level, $p < 0.05$; supplementary Table 1). A similar tendency was also present in the motor cortex (M1 and M2 on the middle level, $p = 0.06$ and 0.07, respectively), in the infralimbic and prelimbic cortices on the frontal level (each $p = 0.07$) and in the cingulate cortex on the rostral level ($p = 0.07$; supplementary Table 1).

The striatum was more affected by tDCS than the cortex. In tDCS-treated animals, significantly increased *Zif268* expression was observed on the levels situated under the electrode (i.e. in rostral and middle sections, Fig. 4a and b, supplementary Table 2), in dorsal sectors of the striatum (rostral: dorsolateral and dorsomedial; middle: medial, dorsal, dorsolateral and central). Notably, tDCS had no significant effect in the nucleus accumbens (supplementary Table 2).

tDCS attenuated cocaine-induced Zif268 expression

Because significant differences were observed between Sham and tDCS groups in vehicle-treated animals (Fig. 4), the effects of cocaine were expressed relative to the values in the respective Veh control groups (the supplementary Tables 1 and 2 present the absolute values for comparison). In Sham animals, the single cocaine injection induced a minor but statistically significant increase in *Zif268* mRNA expression in a few areas of the cortex (frontal: cingulate; middle: M1, M2; $p < 0.05$, supplementary Table 1), with similar tendencies in other areas. In the striatum, cocaine produced a more robust augmentation in *Zif268* expression on all three rostrocaudal levels (Figs 3 and 5, supplementary Table 2). A significant increase in *Zif268* mRNA levels was observed in 15 of the 23 sectors (Fig. 5a). Gene induction varied considerably between different striatal regions. The most robust increase was observed on the middle (Fig. 5b) and caudal levels, in striatal sectors that receive cingulate, motor and sensorimotor cortical inputs (i.e. middle: medial, dorsal, central and lateral sectors; caudal: dorsal sector, Willuhn *et al.* 2003). In contrast, in accordance with previous findings in the rat (Unal *et al.* 2009), the nucleus accumbens displayed modest or no drug effects. Cocaine significantly increased *Zif268* expression only in the lateral shell ($p < 0.05$).

© 2016 Society for the Study of Addiction

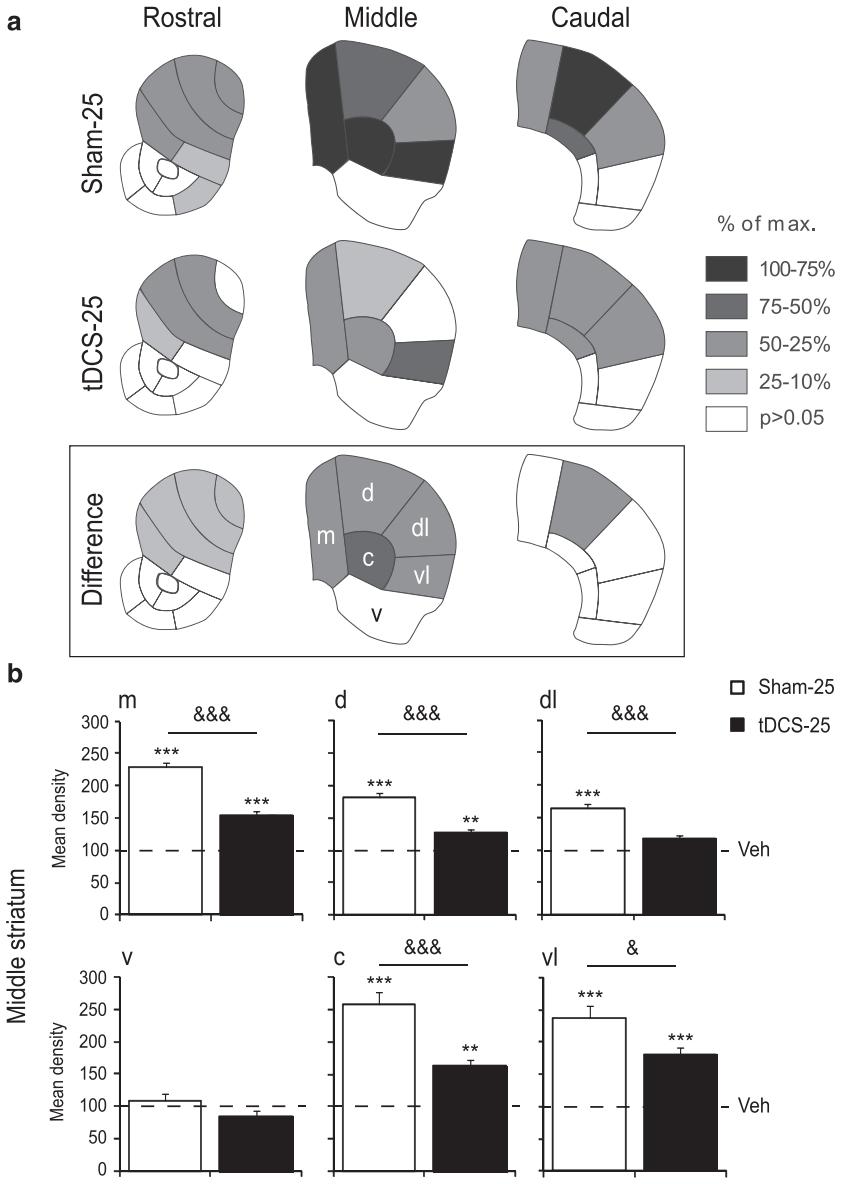


Figure 5 tDCS attenuates cocaine-induced *Zif268* expression in specific areas of the striatum. (a) Maps depict the distribution of *Zif268* expression induced by cocaine (25 mg/kg, i.p.; ipsi- and contralateral values averaged) at the rostral, middle and caudal levels of the striatum, for cocaine-treated Sham (Sham-25) and tDCS (tDCS-25) mice. The data are expressed relative to the maximal increase observed (% of maximum). Sectors with significant differences *versus* respective Veh controls (i.e. Sham-Veh or tDCS-Veh) are shaded as indicated. Sectors without significant effects are in white. The 'difference' (box) indicates significant differences in *Zif268* induction between cocaine alone (Sham-25) and tDCS + cocaine (tDCS-25) groups. (b) Mean density values (mean ± SEM) (expressed as percentage of respective control groups, Veh = 100 percent) for *Zif268* expression are depicted for the six middle striatal sectors. ** $p < 0.01$ and *** $p < 0.001$, *versus* respective Veh control group; $^{\&}$ $p < 0.05$ and $^{\&\&\&}$ $p < 0.001$, Sham-25 *versus* tDCS-25. $N = 6$–8 per group

In the tDCS group, cocaine had no significant effect on *Zif268* expression in the cortex. Thus, *Zif268* induction in the cingulate and motor cortex was prevented in animals that received tDCS three weeks before the cocaine treatment (supplementary Table 1). Consistent with this result, in tDCS-treated animals (tDCS-25), cocaine-induced *Zif268* expression in the striatum was markedly attenuated compared to the Sham control (Sham-25). This was reflected, for one, by a lower proportion of the 23 striatal sectors displaying significantly increased *Zif268* expression in the tDCS group than in the Sham group (relative data, 11 sectors *versus* 15 sectors; Fig. 5a, tDCS-25). Direct statistical comparisons showed that *Zif268* induction was significantly weaker in tDCS-25 animals in 10 striatal sectors (Fig. 5a, Difference and Fig. 5b). tDCS had no significant effect on cocaine-induced *Zif268* expression in the nucleus accumbens (Fig. 5a, Difference).

© 2016 Society for the Study of Addiction

Correlation analysis was used to compare tDCS- and cocaine-induced increases in *Zif268* expression between striatal sectors and their respective cortical input regions (see Cotterly *et al.* 2007; Van Waes *et al.* 2010; Willuhn *et al.* 2003; Yano & Steiner 2005 for more details). Our results for vehicle-treated mice show that, despite the modest effects in the cortex, tDCS-induced *Zif268* expression in the 23 striatal sectors was positively correlated with that in their anatomically connected cortical areas (Veh animals, $r = 0.415$, $p < 0.05$). Similarly, in these striatal sectors, the magnitude of the reduction in cocaine-induced gene expression produced by tDCS was highly correlated with that in their connected cortical input regions ($r = 0.627$, $p < 0.001$). Therefore, tDCS produced coordinated molecular changes in cortical and striatal nodes of specific corticostriatal circuits.

Experiment 2: Place preference conditioning by cocaine

tDCS abolished cocaine-induced place preference conditioning for 5 and 25 mg/kg

Vehicle injections did not produce any place preference (ANOVA all effects: $p > 0.05$, Fig. 6, Veh). In sham groups, cocaine induced a place preference with all doses tested (5 mg/kg: $p < 0.05$, 10: $p < 0.001$, 25: $p < 0,01$), in accordance with previous studies in mice (e.g. Zhang *et al.* 2002; Iniguez *et al.* 2015). In contrast, animals subjected to repeated anodal tDCS failed to show cocaine-induced place preference for the doses of 5 ($p = 0.98$) and 25 mg/kg ($p = 0.53$). Only the 10 mg/kg dose produced statistically significant place preference conditioning ($p < 0.001$, Fig. 6). For the dose of 25 mg/kg, the percentage of time spent in the drug-paired compartment on the post-conditioning day (D5) was significantly lower in tDCS than in sham mice ($p < 0.05$).

DISCUSSION

Our findings show that tDCS produces long-lasting modifications in behavioral responses and gene regulation in corticostriatal circuits induced by cocaine. Thus, repeated anodal tDCS over the frontal cortex increased 'basal' expression of the marker gene *Zif268* and attenuated cocaine-induced gene regulation, locomotion and place preference conditioning, three weeks after tDCS pretreatment.

Cortical and Subcortical Effects of tDCS in Vehicle Controls

One aim of this study was to determine possible tDCS effects on normal gene regulation (i.e. in vehicle controls) and to map the distribution of such effects in the cortex and striatum. Our findings in vehicle-treated mice show that repeated tDCS produced increased expression of *Zif268*, mostly in the striatum, three weeks after tDCS pretreatment. Future studies will have to determine whether these increased *Zif268* mRNA levels represented upregulated gene expression that endured for three weeks, or whether they reflected an altered responsiveness to experimental conditions such as handling or behavioral testing, or other neuronal changes (e.g. increased arousal; see Steiner & Van Waes 2013), in the affected corticostriatal circuits. Regardless of the underlying cause, these findings demonstrate long-lasting effects of tDCS on gene regulation in these circuits.

Although tDCS preferentially impacted dorsal striatal regions under the stimulation electrode, these effects were not strictly related to the position of the electrode. For one, gene regulation changes in striatum (and cortex) were symmetrically distributed in the two hemispheres, despite the asymmetrical electrode placement

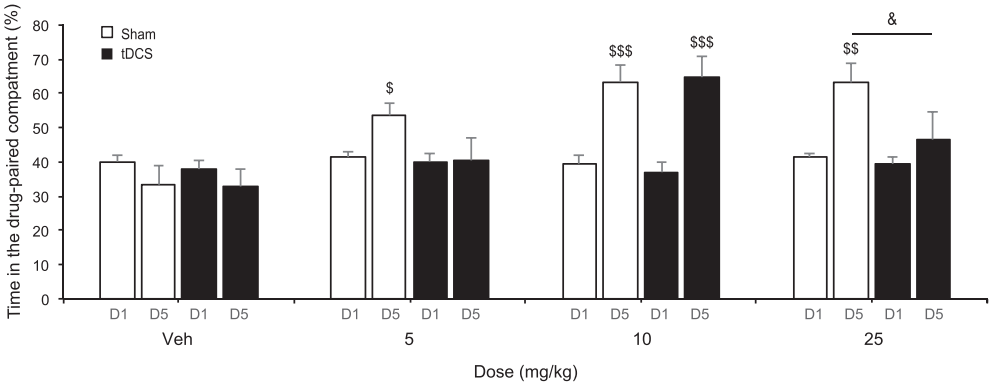


Figure 6 Conditioned place preference induced by cocaine (5, 10 or 25 mg/kg) or vehicle (Veh, control groups) 3 weeks after Sham (white) or tDCS (black) stimulation. A significant increase in the time spent in the drug-paired compartment between day 1 (D1, pre-conditioning session) and day 5 (D5, post-conditioning session) indicates that cocaine induced a place preference. For the Sham groups, cocaine induced a place preference with all doses tested. In contrast, in the tDCS groups, cocaine induced a place preference only with the 10 mg/kg dose. $^{\$}$ $p < 0.05$, $^{\$\$}$ $p < 0.01$, and $^{\$\$\$}$ $p < 0.001$, D1 *versus* D5; $^{\&}$ $p < 0.05$, Sham-25 D5 *versus* tDCS-25 D5. $N = 8$–14 per group

© 2016 Society for the Study of Addiction

(over left cortex). Moreover, in the cortex, the most robust increase in *Zif268* expression was present in the piriform (olfactory) cortex, a ventral brain region. In the striatum, regions on the middle level were considerably more affected than those on the rostral level, despite the similar position of these levels relative to the electrode placement. These findings indicate that specific neuronal circuits, rather than just proximal cortical and striatal tissues, are modified by tDCS. This conclusion is supported by our correlation analysis that showed that changes in gene expression were correlated between cortical areas and their connectionally (functionally) related striatal target sectors (Veh animals, $r = 0.415$, $p < 0.05$) (Willuhn *et al.* 2003) and that these effects preferentially occurred in sensorimotor circuits (Steiner & Van Waes 2013).

The finding that the asymmetrically positioned electrode produced bilaterally symmetrical gene regulation patterns (with and without cocaine) was somewhat unexpected. The contralateral cortical and striatal effects may have been mediated by the pronounced interhemispheric cortico-cortical and cortico-striatal projection systems. Alternatively, they may have resulted in part from bilateral current spread. tDCS is known to be less focal than rTMS (Nitsche *et al.* 2007; Miniussi *et al.* 2008), and the current may thus have spread over both hemispheres to some degree. However, the finding that distinct corticostriatal circuits were affected, without clear relationship to their distance from the electrode (see above), seems to argue against such a nonspecific effect as the sole factor. This is an important question that will have to be addressed in future studies.

Gene Regulation Effects of Cocaine are Attenuated by tDCS

The main goal of this study was to determine whether tDCS might modulate gene regulation by cocaine. Our results show diminished induction of *Zif268* by cocaine in cortex and striatum when examined three weeks after the repeated tDCS pretreatment. Again the magnitude of this effect was correlated between cortical regions and their striatal targets ($r = 0.627$, $p < 0.001$), indicating that specific circuits were affected. The tDCS-mediated decrease in gene induction was maximal in (but not limited to) sensorimotor and associative corticostriatal circuits, which are known to be involved in habit formation and compulsive aspects of drug taking (Everitt & Robbins 2005).

The basis for this altered gene regulation is presently unclear. Early studies in animals using direct current stimulation (current applied directly to the cortex) (Bindman, Lippold, & Redfearn 1964; Purpura & McMurtry 1965), as well as more recent data on tDCS in humans (Nitsche & Paulus 2000), suggest that anodal stimulation increases neuronal excitability, which may increase transmitter release in the striatum. Repeated tDCS may thus induce synaptic plasticity (Stagg & Nitsche 2011) that is usually associated with such changes in neuronal activity and their molecular sequelae, including altered gene regulation. Altered neuronal responsiveness in these corticostriatal circuits is consistent with the here observed reduced behavioral responses, which are modulated by neuronal activity in these circuits, including place preference conditioning (Ilango *et al.* 2014).

The acute induction of immediate-early genes such as *Zif268* by psychostimulants serves as a marker that predicts long-term neuroadaptations after repeated drug exposure, as this acute response is correlated with various neuronal changes after repeated drug treatments (Steiner & Van Waes 2013). However, *Zif268* is also directly implicated in various plasticity processes, including several long-term neurobehavioral changes induced by psychostimulants. For example, this transcription factor likely mediates some drug-induced neuroplastic changes (Knapska & Kaczmarek 2004). Indeed, previous work demonstrated that *Zif268* is critical for place preference conditioning by cocaine (Valjent *et al.* 2006) and for reconsolidation of cocaine memories (Lee *et al.* 2005; Theberge *et al.* 2010). *Zif268* also contributes to processes underlying cocaine-induced behavioral sensitization (Valjent *et al.* 2006).

Our present findings of an association between diminished *Zif268* induction and attenuated locomotor activity and place preference conditioning by cocaine are consistent with these earlier findings. Whether directly affecting the underlying neuronal mechanisms or serving as a marker, the attenuated *Zif268* response after repeated tDCS may indicate a 'protective' effect of tDCS against drug-induced neuronal changes subsequent to tDCS treatment.

Behavioral Effects of Cocaine are Attenuated by tDCS

The impact of tDCS on cocaine-induced behavioral effects was dependent on the dose of cocaine. For locomotor activity, the tDCS effect was selectively observed with the highest dose (25 mg/kg). It could be argued that an increase in focused stereotypies, which are associated with certain psychostimulants, might have contributed to the reduced locomotion in these animals. We did not measure stereotypies and, therefore, cannot rule out (or confirm) a contribution of tDCS-induced stereotypies. It is noteworthy that a previous study in female (but not male) rats found comparable amounts of stereotypies for cocaine doses of 10, 20 and 40 mg/kg (Walker *et al.* 2001), while our effect was observed for the dose of

© 2016 Society for the Study of Addiction

25 mg/kg only. Future studies will have to clarify how tDCS modulates cocaine-induced locomotor activity and/or stereotypies.

In the CPP paradigm, which aims to evaluate the motivational properties of cocaine, tDCS suppressed place preference conditioning for the lowest and highest dose of cocaine (5 and 25 mg/kg), but not 10 mg/kg. There is evidence that place preference conditioning by cocaine displays an inverted U-shaped dose–response function, such that very low or high doses of cocaine do not induce place preference (Hnasko, Sotak, & Palmiter 2007). The optimal dose of cocaine for inducing place preference in mice seems to be situated between 7.5 and 15 mg/kg (Hnasko *et al.* 2007). Therefore, the present tDCS treatment seems to have attenuated place preference conditioning for suboptimal doses of cocaine (5 and 25 mg/kg), but was not sufficient to modify place preference conditioning induced by an optimal dose (10 mg/kg).

Regarding the underlying mechanisms, cocaine-induced behavior in the CPP paradigm is determined by opponent processes ('rewarding' *versus* 'aversive' properties of the drug), which appear to have different neuronal substrates (Lammel *et al.* 2012). Thus, lower-dose conditioning (left limb of inverted U) is taken to reflect a rewarding effect of the drug, while upper-dose conditioning (right limb) is governed by increasing aversion. It is therefore tempting to speculate that tDCS may attenuate 'reward' and/or increase 'aversion' by (differentially) modifying their underlying neuronal systems. A potential beneficial effect of tDCS on addiction processes will have to be verified in other drug addiction-related paradigms such as the cocaine self-administration model.

CONCLUSIONS

Overall, our results indicate that repeated tDCS pretreatment produces long-lasting modifications in the molecular and behavioral sensitivity to cocaine, especially for a high dose (25 mg/kg). These findings suggest the intriguing possibility that tDCS pretreatment might attenuate the addiction liability of psychostimulants such as cocaine by attenuating the drugs' molecular impact. This technique of neuromodulation, which is non-invasive, easy to use and affordable, might therefore be useful as an intervention to protect vulnerable individuals from getting addicted.

Acknowledgements

This work was supported in part by the University of Franche-Comté (VVW) and the city of Besançon (SP, VVW), and by the National Institutes of Health Grant DA011261 (HS). We would like to thank Marie-Ange Bolard for animal care, Romain Monier and Aurélie Salvadori for excellent technical assistance, and Dr Adriana Caballero for proofreading and editing the manuscript. The authors declare no biomedical financial interests or potential conflicts of interests.

Conflicts of Interest

None

Author Contribution

VVW, HS and EH were responsible for the study concept and design. SP, JB and PA contributed to the acquisition of animal data. SP, VVW and HS assisted with data analysis and interpretation of findings. SP, VVW and HS drafted the manuscript. All authors critically reviewed content and approved final version for publication.

References

Bennabi D, Pedron S, Haffen E, Monnin J, Peterschmitt Y, Van Waes V (2014) Transcranial direct current stimulation for memory enhancement: from clinical research to animal models. Front Syst Neurosci 8:159.

Berke JD, Hyman SE (2000) Addiction, dopamine, and the molecular mechanisms of memory. Neuron 25:515–532.

Berlim MT, Van den Eynde F, Daskalakis ZJ (2013) Clinical utility of transcranial direct current stimulation (tDCS) for treating major depression: a systematic review and meta-analysis of randomized, double-blind and sham-controlled trials. J Psychiatr Res 47:1–7.

Bindman LJ, Lippold OC, Redfearn JW (1964) The action of brief polarizing currents on the cerebral cortex of the rat (1) during current flow and (2) in the production of long-lasting after-effects. J Physiol 172:369–382.

Boggio PS, Sultani N, Fecteau S, Merabet L, Mecca T, Pascual-Leone A, Basaglia A, Fregni F (2008) Prefrontal cortex modulation using transcranial DC stimulation reduces alcohol craving: a double-blind, sham-controlled study. Drug Alcohol Depend 92:55–60.

Boggio PS, Liguori P, Sultani N, Rezende L, Fecteau S, Fregni F (2009) Cumulative priming effects of cortical stimulation on smoking cue-induced craving. Neurosci Lett 463:82–86.

Brunoni AR, Ferrucci R, Fregni F, Boggio PS, Priori A (2012) Transcranial direct current stimulation for the treatment of major depressive disorder: a summary of preclinical, clinical and translational findings. Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry 39:9–16.

Camprodon JA, Martinez-Raga J, Alonso-Alonso M, Shih MC, Pascual-Leone A (2007) One session of high frequency repetitive transcranial magnetic stimulation (rTMS) to the right prefrontal cortex transiently reduces cocaine craving. Drug Alcohol Depend 86:91–94.

Conti CL, Nakamura-Palacios EM (2014) Bilateral transcranial direct current stimulation over dorsolateral prefrontal cortex changes the drug-cued reactivity in the anterior cingulate cortex of crack-cocaine addicts. Brain Stimul 7:130–132.

Cotterly L, Beverley JA, Yano M, Steiner H (2007) Dysregulation of gene induction in corticostriatal circuits after repeated

© 2016 Society for the Study of Addiction

methylphenidate treatment in adolescent rats: differential effects on zif 268 and homer 1a. Eur J Neurosci 25:3617–3628.

Everitt BJ, Robbins TW (2005) Neural systems of reinforcement for drug addiction: from actions to habits to compulsion. Nat Neurosci 8:1481–1489.

Fecteau S, Agosta S, Hone-Blanchet A, Fregni F, Boggio P, Ciraulo D, Pascual-Leone A (2014) Modulation of smoking and decision-making behaviors with transcranial direct current stimulation in tobacco smokers: a preliminary study. Drug Alcohol Depend 140:78–84.

Feil J, Zangen A (2010) Brain stimulation in the study and treatment of addiction. Neurosci Biobehav Rev 34:559–574.

Ferrucci R, Bortolomasi M, Vergari M, Tadini L, Salvoro B, Giacopuzzi M, Barbieri S, Priori A (2009) Transcranial direct current stimulation in severe, drug-resistant major depression. J Affect Disord 118:215–219.

Fregni F, Liguori P, Fecteau S, Nitsche MA, Pascual-Leone A, Boggio PS (2008) Cortical stimulation of the prefrontal cortex with transcranial direct current stimulation reduces cue-provoked smoking craving: a randomized, sham-controlled study. J Clin Psychiatry 69:32–40.

Hnasko TS, Sotak BN, Palmiter RD (2007) Cocaine-conditioned place preference by dopamine-deficient mice is mediated by serotonin. J Neurosci 27:12484–12488.

Ilango A, Kesner AJ, Keller KL, Stuber GD, Bonci A, Ikemoto S (2014) Similar roles of substantia nigra and ventral tegmental dopamine neurons in reward and aversion. J Neurosci 34:817–822.

Iniguez SD, Riggs LM, Nieto SJ, Wright KN, Zamora NN, Cruz B, Zavala AR, Robison AJ, Mazei-Robison MS (2015) Fluoxetine exposure during adolescence increases preference for cocaine in adulthood. Sci Rep 5:15009.

Klauss J, Penido Pinheiro LC, Silva Merlo BL, de Almeida Correia Santos G, Fregni F, Nitsche MA, Miyuki Nakamura-Palacios E (2014) A randomized controlled trial of targeted prefrontal cortex modulation with tDCS in patients with alcohol dependence. Int J Neuropsychopharmacol 17:1793–1803.

Knapska E, Kaczmarek L (2004) A gene for neuronal plasticity in the mammalian brain: *Zif268*/Egr-1/NGFI-A/Krox-24/TIS8/ZENK? Prog Neurobiol 74:183–211.

Kuo MF, Paulus W, Nitsche MA (2014) Therapeutic effects of non-invasive brain stimulation with direct currents (tDCS) in neuropsychiatric diseases. Neuroimage 85(Pt 3):948–960.

Lammel S, Lim BK, Ran C, Huang KW, Betley MJ, Tye KM, Deisseroth K, Malenka RC (2012) Input-specific control of reward and aversion in the ventral tegmental area. Nature 491:212–217.

Lee JL, Di Ciano P, Thomas KL, Everitt BJ (2005) Disrupting reconsolidation of drug memories reduces cocaine-seeking behavior. Neuron 47:795–801.

Miniussi C, Cappa SF, Cohen LG, Floel A, Fregni F, Nitsche MA, Oliveri M, Pascual-Leone A, Paulus W, Priori A, Walsh V (2008) Efficacy of repetitive transcranial magnetic stimulation/transcranial direct current stimulation in cognitive neurorehabilitation. Brain Stimul 1:326–336.

Nitsche MA, Paulus W (2000) Excitability changes induced in the human motor cortex by weak transcranial direct current stimulation. J Physiol 527(Pt 3):633–639.

Nitsche MA, Doemkes S, Karakose T, Antal A, Liebetanz D, Lang N, Tergau F, Paulus W (2007) Shaping the effects of transcranial direct current stimulation of the human motor cortex. J Neurophysiol 97:3109–3117.

Paxinos G, Franklin K (2001) *The Mouse Brain in Stereotaxic Coordinate*, 2nd edn. Academic Press: San Diego.

Pedron S, Monnin J, Haffen E, Sechter D, Van Waes V (2014) Repeated transcranial direct current stimulation prevents abnormal behaviors associated with abstinence from chronic nicotine consumption. Neuropsychopharmacology 39:981–988.

Politi E, Fauci E, Santoro A, Smeraldi E (2008) Daily sessions of transcranial magnetic stimulation to the left prefrontal cortex gradually reduce cocaine craving. Am J Addict 17:345–346.

Purpura DP, McMurtry JG (1965) Intracellular activities and evoked potential changes during polarization of motor cortex. J Neurophysiol 28:166–185.

Renthal W, Nestler EJ (2008) Epigenetic mechanisms in drug addiction. Trends Mol Med 14:341–350.

Rigonatti SP, Boggio PS, Myczkowski ML, Otta E, Fiquer JT, Ribeiro RB, Nitsche MA, Pascual-Leone A, Fregni F (2008) Transcranial direct stimulation and fluoxetine for the treatment of depression. Eur Psychiatry 23:74–76.

Stagg CJ, Nitsche MA (2011) Physiological basis of transcranial direct current stimulation. Neuroscientist 17:37–53.

Steiner H, Van Waes V (2013) Addiction-related gene regulation: risks of exposure to cognitive enhancers vs. other psychostimulants. Prog Neurobiol 100:60–80.

Theberge FR, Milton AL, Belin D, Lee JL, Everitt BJ (2010) The basolateral amygdala and nucleus accumbens core mediate dissociable aspects of drug memory reconsolidation. Learn Mem 17:444–453.

Unal CT, Beverley JA, Willuhn I, Steiner H (2009) Long-lasting dysregulation of gene expression in corticostriatal circuits after repeated cocaine treatment in adult rats: effects on zif 268 and homer 1a. Eur J Neurosci 29:1615–1626.

Valjent E, Aubier B, Corbille AG, Brami-Cherrier K, Caboche J, Topilko P, Girault JA, Herve D (2006) Plasticity-associated gene Krox24/*Zif268* is required for long-lasting behavioral effects of cocaine. J Neurosci 26:4956–4960.

Van Waes V, Beverley J, Marinelli M, Steiner H (2010) Selective serotonin reuptake inhibitor antidepressants potentiate methylphenidate (Ritalin)-induced gene regulation in the adolescent striatum. Eur J Neurosci 32:435–447.

Van Waes V, Vandrevala M, Beverley J, Steiner H (2014) Selective serotonin re-uptake inhibitors potentiate gene blunting induced by repeated methylphenidate treatment: *Zif268* versus Homer1a. Addict Biol 19:986–995.

Walker QD, Cabassa J, Kaplan KA, Li ST, Haroon J, Spohr HA, Kuhn CM (2001) Sex differences in cocaine-stimulated motor behavior: disparate effects of gonadectomy. Neuropsychopharmacology 25:118–130.

Willuhn I, Sun W, Steiner H (2003) Topography of cocaine-induced gene regulation in the rat striatum: relationship to cortical inputs and role of behavioural context. Eur J Neurosci 17:1053–1066.

Wise RA (2009) Roles for nigrostriatal—not just mesocorticolimbic—dopamine in reward and addiction. Trends Neurosci 32:517–524.

Yano M, Steiner H (2005) Methylphenidate (Ritalin) induces Homer 1a and zif 268 expression in specific corticostriatal circuits. Neuroscience 132:855–865.

Zhang Y, Mantsch JR, Schlussman SD, Ho A, Kreek MJ (2002) Conditioned place preference after single doses or "binge" cocaine in C57BL/6J and 129/J mice. Pharmacol Biochem Behav 73:655–662.

© 2016 Society for the Study of Addiction

SUPPORTING INFORMATION

Additional Supporting Information may be found in the online version of this article at the publisher's web-site:

Table 1 Effects of tDCS on basal and cocaine-induced *Zif268* expression in the cortex

Table 2 Effects of tDCS on basal and cocaine-induced *Zif268* expression in the striatum

© 2016 Society for the Study of Addiction

D Présentation du stimulateur Open-tES

Open tES: an open hardware Transcranial Direct Current Stimulation device designed for rodent research.

Julien Dimauro [1], Solène Pedron [1], Vincent Van Waes [1], Emmanuel Haffen [1,2], Patrice Andrieu [1]
1. EA 481 Laboratory of Integrative and Clinical Neuroscience, Besançon, France
2. INSERM CIC-IT 808 Clinical Investigation Centre for Innovative Technology, Besançon, France

Introduction

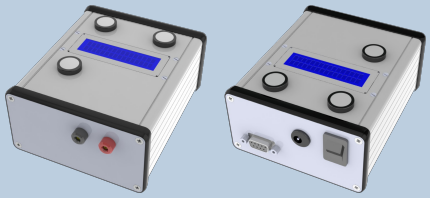
Transcranial Direct Current Stimulation (tDCS) is a portable, safe and noninvasive technique based on the delivery of weak direct current to the scalp with the aim of modulating cortical excitability. This kind of electrical stimulation has shown positive results in treatment of psychiatric disorders and gain in several cognitive domains[1]. However, the neurobiological basis of tDCS remains poorly understood. The use of animal models is therefore necessary to address this question[2]. There is currently no stimulator commercially available for rodent models. Here, we introduce Open-tES, a collaborative project consisting in tDCS device design suitable for rodents and licensed under a Creative Commons license (CC BY,SA 4.0)

Overall presentation

For tDCS, stimulation parameters are set on device (with keyboard and display)

- Current (from 10 to 250 µA, increment 1 µA)
- Duration (from 10 to 3600 s, increment 10 s)
- Fade in/out duration (from 2 to 60 s, increment 1 s)
- Impedance threshold (sound alarm)

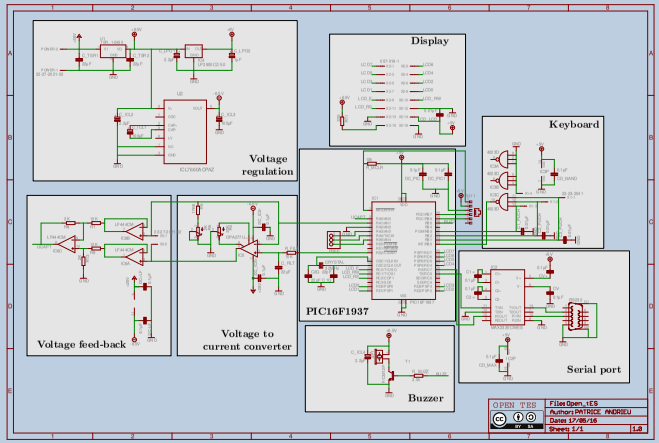
Stimulation can be manually stopped or paused.
For external triggering or other tDCS variants, the current can be controlled by computer.
In both cases, time remaining, voltage, current and impedance are displayed or can be acquired (via serial port).



Open-tES stimulator: front panel on the left and rear panel on the right.

Electronic design

The stimulator is based on microcontroller PIC16F1937 (`www.microchip.com`). Current is tune with Pulse Widht Modulation (PWM) module (10-bit) of the PIC. Keyboard, Display and buzzer are managed with Digital inputs/outputs. Voltage and current feedback are measured with A/D (10-bit) converter and USART module assumed the communication with computer.

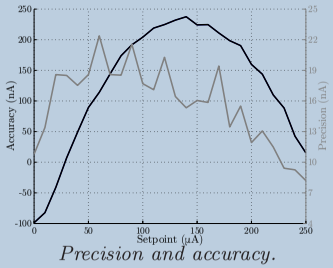


Global functionning of stimulator.

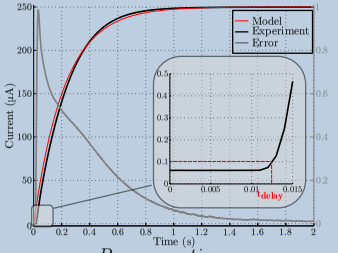
Characterization

Accuracy, precision and Response time

The accuracy range from −99 nA to 237.5 nA depending of current setpoint. The precision rises to 22 nA for a current setpoint of 70 µA and down to 8 nA for a current setpoint of 250 µA. We obtain a delay of 909 ± 6 ms to reach 99% of the setpoint value and 1580 ± 38 ms for 99.9% of the setpoint.



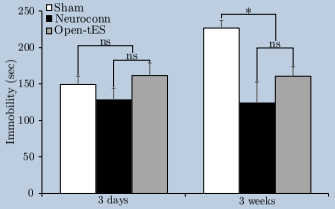
Precision and accuracy.



Response time.

Validation on rodent model

We have previously shown in mice with a NeuroConn DC-Stimulator (`www.neurocaregroup.com`), that repeated anodal tDCS over the frontal lobe decreases depressive-like behaviors[3]. We replicated this study with the Open-tES generator and compared the results. Three days after the end of stimulations, tDCS didn't have effect on immobility time whatever the generator used. However, tDCS significantly decreased immobility time after 3 weeks for both generators. No significant difference was observed between generators at 3 days and 3 weeks.



Imobility during FST. $*p < 0.05$

Discussion

Open-tES generator offers a low cost (around 300 €) alternative to commercial solution adapted to tDCS and variants research on rodent model. Creative Commons license and the sharing of project on GitHub allowing the improvement and reproduction of the generator by other researchers, isolated contributors or factories. Characterization and validation shows that this device is suitable for most of use.

Future prospects

Development is now focusing on simplification of the electronic design in order to reduce its cost and to facilitate its assembly. The next release will be supplied by a 9-volt battery (currently 28-volt power supply). We are looking for allowing tACS and variants.

References

[1] G. Tortella *et al.*, Transcranial direct current stimulation in psychiatric disorders, World Journal of Psychiatry (2015) .

[2] A. R. Brunoni *et al.*, Translational research in transcranial direct current stimulation (tDCS): a systematic review of studies in animals, Reviews in the Neurosciences (2011) .

[3] S. Pedron *et al.*, Repeated Transcranial Direct Current Stimulation Prevents Abnormal Behaviors Associated with Abstinence from Chronic Nicotine Consumption, Neuropsychopharmacology (2014) .

10^{th} FENS Forum of Neuroscience, Copenhagen 2016
Contact : patrice.andrieu@univ-fcomte.fr

Abréviations

AMPA α-amino-3-hydroxy-5-méthylisoazol-4-propionate

AVC Accident vasculaire cérébral

BDNF *Brain-Derived Neurotrophic Factor* Facteur neurotrophique dérivé du cerveau

BrdU Bromodésoxyuridine

CPFDL Cortex PréFrontal DorsoLatéral

CPP *Conditionned Place Preference*, Test de préférence de place conditionnée

ECT Électroconvulsivothérapie

EEG Électroencéphalographie

EPM *Elevated Plus Maze*, Labyrinthe en croix surélevée

fNIRS *Functional Near-Infrared Spectroscopy*, Imagerie spectroscopique proche infrarouge

FST *Forced Swim Test*, Test de la nage forcée (ou test de Porsolt)

GABA Acide Gamma-AminoButyrique

GAP-43 *Growth Associated Protein 43*

GRAP Groupe de Recherche sur l'Alcool et les Pharmacodépendances

Inserm Institut National de la Santé et de la Recherche Médicale

IRM Imagerie par Résonance Magnétique

MAP-2 *Microtubule-associated protein 2*

MWM *Morris Water Maze*, Test de la piscine de Morris

NMDA N-méthyl-D-aspartate

NSF *Novelty-Suppressed Feeding*, Inhibition néophobique de la prise alimentaire

OMS Organisation mondiale de la santé

OR *Object Recognition*, Test de reconnaissance d'objet

otDCS *oscillating transcranial Direct Current Stimulation* Stimulation transcrânienne par courant continu oscillatoire

PE Potentiel évoqué

PLT Potentialisation à long terme

SEM *Standard Error of the Mean*

tACS *transcranial Alternating Current Stimulation* Stimulation transcrânienne par courant alternatif

tDCS *transcranial Direct Current Stimulation* Stimulation transcrânienne par courant continu

tMS *transcranial Magnetic Stimulation* Stimulation magnétique transcrânienne

tPCS *transcranial Pulsed Current Stimulation* Stimulation transcrânienne par courant continu pulsé

TST *Tail Suspension Test*, Test de suspension par la queue

Zif268 *Zinc finger protein*

Résumé

La stimulation transcrânienne par courant continu (tDCS) est une technique de neuromodulation non invasive qui permet de modifier l'excitabilité corticale au moyen d'un faible courant électrique délivré à travers le crâne. Elle constitue une piste intéressante pour l'élaboration de nouveaux traitements de divers troubles psychiatriques ou neurologiques, mais les mécanismes qui sous-tendent ses effets sont méconnus. L'objectif de ma thèse a été d'évaluer chez la souris les comportements affectés par des sessions répétées de tDCS et d'étudier des pistes concernant ses mécanismes d'action.

Nous avons montré un effet bénéfique de la tDCS anodique au niveau du lobe frontal (2x20 minutes/jour à 0.2 mA, 5 jours consécutifs) sur les comportements associés à la dépression et sur la mémoire. Nous avons par ailleurs quantifié la prolifération cellulaire au niveau de l'hippocampe et montré que celle-ci est plus importante chez les souris stimulées, suggérant que la tDCS pourrait augmenter la neurogenèse hippocampique. Enfin, nos études sur des souris exposées à différentes drogues (nicotine, alcool, cocaïne) dévoilent que la tDCS diminue certains de leurs effets comportementaux (ex : valeur hédonique) et/ou moléculaires (ex : induction de *Zif268* dans les circuits cortico-striataux).

Nos résultats sont en adéquation avec les données cliniques recueillies chez l'Homme et soutiennent l'hypothèse que la tDCS pourrait être un traitement additionnel pour diverses pathologies. Ils ouvrent la voie à différentes études complémentaires, pour lesquelles notre modèle animal constitue un outil intéressant.

Mots-clés : stimulation transcrânienne par courant continu, souris, dépression, addiction, mémoire

Abstract

Transcranial direct current stimulation (tDCS) is a non-invasive neuromodulatory technique in which a low current is delivered *via* electrodes on the scalp to modulate cortical excitability. It is a promising tool in the treatment of various neurological and psychiatric illnesses, yet the mechanisms underlying its beneficial effects remain unknown.

The goal of my thesis was to describe the effects of repeated tDCS on behavior in mice, and to offer preliminary insights regarding the neurobiological mechanisms involved.

Our data indicate that repeated tDCS over the frontal lobe (0.2 mA, 2x20 min/day, 5 consecutive days) has antidepressant properties and improves memory. Interestingly, tDCS increased precursor cell proliferation in the hippocampus, suggesting that tDCS may increase neurogenesis levels in this brain area. Lastly, tDCS decreased the behavioral and/or the molecular effects of nicotine, alcohol and cocaine. For example, tDCS attenuated cocaine-induced *Zif268* expression in specific corticostriatal circuits.

Altogether, our findings provide pre-clinical evidence that tDCS could be a beneficial adjunct treatment for several psychiatric disorders. Our animal model will be useful to further investigate the mechanisms underlying the beneficial effects of tDCS on behavior.

Keywords: transcranial direct current stimulation, mice, depression, addiction, memory