

Mise en évidence du potentiel thérapeutique de l'adiponectine et de son rôle dans les effets antidépresseurs de l'environnement enrichi

Sarah Nicolas

► To cite this version:

Sarah Nicolas. Mise en évidence du potentiel thérapeutique de l'adiponectine et de son rôle dans les effets antidépresseurs de l'environnement enrichi. Médecine humaine et pathologie. Université Côte d'Azur, 2018. Français. NNT : 2018AZUR4019 . tel-01865840

HAL Id: tel-01865840 https://theses.hal.science/tel-01865840

Submitted on 2 Sep 2018

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.







THÈSE DE DOCTORAT

Mise en évidence du potentiel thérapeutique de l'adiponectine et de son rôle dans les effets antidépresseurs de l'environnement enrichi

Sarah NICOLAS

Institut de Pharmacologie Moléculaire et Cellulaire

Présentée en vue de l'obtention
du grade de docteur en Sciences de la vie et
de la Santé – mention : InteractionsDevant le jury, com
Dr. Nora ABROUS,
D.R. INSERM, Neur
Pr. Denis DAVID,
P.U. Université Paris
Dr Agnès PETIT-PAITELDoutenue le : 20 Mars 2018Devant le jury, com
Dr. Nora ABROUS,
Dr. Stéphane HUNG

Devant le jury, composé de : Dr. Nora ABROUS, D.R. INSERM, Neurocentre Bordeaux Pr. Denis DAVID, P.U. Université Paris-Sud Pr. René GARCIA, P.U. Université Côte d'Azur Dr. Stéphane HUNOT, D.R. CNRS, ICM Paris Dr. Serge LUQUET, D.R. CNRS, Université Paris-Diderot

Mise en évidence du potentiel thérapeutique de l'adiponectine et de son implication dans les effets antidépresseurs de l'environnement enrichi.

Thèse soutenue le 20 Mars 2018,

Devant le jury composé de :

Président du jury :

Pr. René GARCIA, P.U. Université Côte d'Azur

Rapporteurs :

Pr. Denis DAVID, P.U. Université Paris-Sud

Dr. Stéphane HUNOT, D.R. CNRS, ICM Paris

Examinateurs :

Dr. Nora ABROUS, D.R. INSERM, Neurocentre Bordeaux

Dr. Serge LUQUET, D.R. CNRS, Université Paris-Diderot

Directrices de thèse :

Dr. Joëlle CHABRY, D.R. INSERM, Université Côte d'Azur

Dr. Agnès PETIT-PAITEL, C.R. CNRS, Université Côte d'Azur

"Research is to see what everybody has seen

and think what nobody has thought."

Albert Szent-Györgyi - 1957

REMERCIEMENTS

Je remercie les membres du jury d'avoir accepté d'évaluer mon travail et d'être présent à ma soutenance de thèse. Messieurs les **Pr Denis David** et **Dr Stéphane Hunot**, je vous remercie de l'honneur que vous m'avez fait d'évaluer mon manuscrit. Je remercie également le **Dr Nora Abrous** et le **Dr Serge Luquet** d'avoir accepté d'examiner mon travail de thèse et le **Pr René Garcia**, d'avoir accepté d'être le président de ce jury. Je tiens également à exprimer toute ma reconnaissance au Pr René Garcia pour la confiance qu'il m'a accordé durant mon doctorat en me confiant des enseignements en Neurosciences. Merci de cette opportunité de découvrir le métier d'enseignant-chercheur d'une des meilleures façons qu'il soit. Cette expérience n'a fait que confirmer mon souhait de continuer dans cette voie.

Je remercie chaleureusement mes directrices de thèse, **Joëlle** et **Agnès.** Merci de votre confiance, votre encadrement et formation tout au long de ces 4 ans. Merci pour votre soutien indéniable depuis le début, des auditions pour la bourse MENRT aux demandes de financements pour la 4^{ème} année, et aujourd'hui encore vous m'aidez à prendre mon envol avec les demandes de bourses pour mon *futur* post-doc. Merci de m'avoir laissé partir en congrès, et encouragé à participer à la semaine du cerveau, et même faire *Ma Thèse en 180s* ! Vous m'avez initié au métier de chercheur en me faisant découvrir, à travers de nombreuses digressions, toutes les facettes du métier.

Alice, je te remercie pour ta présence réconfortante pendant ces quatre années. Ton optimisme et ta capacité à relativiser ont réussi à dédramatiser les quelques moments difficiles de la vie de laboratoire dont j'ai été témoin. De plus je garderai à jamais en mémoire l'incroyable solo de trompette que tu as réalisé en direct sur le parking de l'institut pour mon anniversaire. Merci !

A **Nicole**, qui m'a encadré au cours de mes stages de BTS et qui a su déceler en moi des capacités de chercheur alors que je m'orientais vers une carrière de technicienne. C'est grâce à ses encouragements que je me suis engagée dans cette voie et que j'en suis là aujourd'hui. Merci.

Je tiens à remercier le **Dr. Catherine Heurteaux**, de m'avoir accueilli dès le master 2 et de m'avoir permis de réaliser une thèse dans son équipe. Je vous remercie pour la bienveillance et générosité dont vous avez fait preuve durant mon doctorat. Je remercie également **Cathy** qui m'a formé aux joies de la culture primaire. Merci pour ta disponibilité, ta réactivité et ton dynamisme, surtout lors de nos journées OGD, c'était du sport ! **Carine** merci pour tes conseils lors de mes débuts en immunohistochimie, mais aussi de ta bonne humeur et ton placard à provisions ! Je tiens à remercier également tous les membres de l'équipe qui m'ont accompagné en contribuant au bon déroulement de mon doctorat, **Marc, Mariel et Alaeddine.**

Merci à **Gérard Lambeau** pour l'accueil dans son équipe pour cette fin de thèse. Merci **Christine, Barbara, Joana, Kristel, Vesna, Guillaume et Maël** pour votre gentillesse et bienveillance, je ne suis pas arrivée dans votre équipe dans la meilleure des périodes pour moi, alors merci !

Je tiens également à remercier toutes les personnes avec qui j'ai eu la chance de collaborer ces quatre années en commençant par la plateforme cytométrie/microscopie. Julie merci pour ta disponibilité et ton rire communicatif, Fred merci pour ta patience et pour les différentes formations de microscopie. Sophie, merci pour ton enthousiasme et ton dynamisme, je sais maintenant que nous avons le pouvoir de rendre des cerveaux transparents et de les marquer ! Merci également à la plateforme génomique/protéomique, Delphine et Anne-Sophie merci pour votre large contribution aux manips AdipoRon. Nathalie merci pour ton aide lors de mes problèmes rencontrés avec le Light Cycler. Je remercie également Franck pour sa contribution aux illustrations de mon manuscrit et à ma présentation. Thomas, merci pour nos nombreuses discussions lorsque nous partagions le bureau et tes conseils éclairés sur les tests comportementaux. Enfin je tenais à remercier le personnel de l'animalerie et particulièrement Alain et Lucien pour leur gentillesse.

Un grand merci à mes « camarades de galère » (même si certains ont déjà quitter le navire). Vous côtoyer a pimenté ma thèse... Par contre je ne peux pas trop m'étaler ici, car j'ai un bon de commande uniquement pour l'impression d'un manuscrit de 265 pages. Alors pour faire court : Mélanie, ta présence et le soutien (psychologique et technique) que tu m'as apportée m'ont été très précieux, tout cela s'ajoute aux nombreux instants musicaux que nous avons partagé et à notre passion commune pour la bière ! Merci pour tout. Miled, ta présence au labo m'assurait la possibilité d'utiliser un fer à lisser à tout moment, alors merci pour ta disponibilité « Thank you » ! **Pierre,** je ne suis pas sûre de vouloir te remercier car tu as fini la bouteille de Get avant de partir en post-doc et tu ne l'as pas remplacé... Olivier, mon co-équipier de la team « aerobic clini », merci pour tous ces moments sérieux et surtout moins sérieux au labo ! Dire que tu m'as fait courir 2 semimarathons, dois-je vraiment te remercier pour cela ? Clara, par chance l'amabilité de ton chien ne reflète pas ta personnalité ! Merci de ta présence et ton enthousiasme, surtout ces derniers mois, c'est important de se serrer les coudes quand on fait partis de la « team Jules Ferry ». Pour rester dans la « team JF » merci Nicolas pour les nombreuses conversations, pauses café et sorties ski... mais aussi les apéros à Antibes ou au Fut et à mesure ! Céline merci de m'avoir transmis tout ton savoir en histologie, et pour ta disponibilité ! Merci pour ton rire qui traverse le couloir et suffit à remonter le moral ! Hadi quel chemin nous avons parcouru depuis la licence, merci pour ces moments partagés. Céline pour nos nombreuses conversations professionnelles et extraprofessionnelles, merci Narvalo ! Katharina merci pour tes « free hugs » et ta générosité en chocolat, j'ai toujours pu trouver du réconfort à ton bureau !

Merci aussi à mes ami(e)s en dehors de l'institut, plus ou moins éloigné(e)s géographiquement, qui ont su ne pas me haïr lorsque je ne donnais plus de nouvelles pendant plusieurs mois consécutifs, et qui malgré cela ont continué à être présent !

Un grand merci à **ma famille** qui a été d'un soutien sans faille et qui m'a permis de réaliser tout ce que j'ai toujours voulu que ce soit personnellement et professionnellement. Si j'ai pu réaliser ce doctorat dans de bonnes conditions (enfin pas forcément au niveau physique) c'est grâce à vous, et aux valeurs et à l'éducation que vous m'avez transmises. Merci.

Pour finir, **Nicolas**, pas de chance il ne me reste qu'une ligne, mais de toute façon tu sais déjà tout alors je vais faire court : Merci.

RESUME

La dépression est une pathologie multifactorielle induisant des troubles psychiques et physiques très handicapants pour le patient. De nouvelles thérapies visant à enrichir l'environnement des patients par des activités physiques, sociales et cognitives aident à la rémission en complément des traitements pharmacologiques. Cependant les bases moléculaires sousjacentes aux bénéfices observés dans ces nouvelles thérapies sont méconnues. C'est dans ce contexte qu'au laboratoire nous avons étudié les effets de ces thérapies *via* la mise en place d'un modèle murin d'environnement enrichi (EE).

L'objectif de ma thèse a été d'évaluer les effets antidépresseurs de l'EE sur un modèle murin de dépression induite pharmacologiquement et d'identifier une nouvelle cible thérapeutique dans le traitement de la dépression. J'ai montré que l'administration chronique de corticostérone induit un état dépressif et une neuroinflammation qui peuvent être réversés par l'EE. De plus, mes travaux ont mis en évidence une hormone du tissu adipeux, l'adiponectine (ApN), comme étant un acteur clef des effets bénéfiques de l'EE. J'ai montré que l'hébergement en EE augmente la concentration d'ApN dans le liquide cérébro-spinal (LCS) et qu'au niveau central l'ApN était capable de limiter l'activation de la microglie ce qui conduisait à une réduction de la neuroinflammation. Par ailleurs, la caractérisation de souris n'exprimant pas l'ApN (ApN-/-) a montré que ces souris présentaient une plus grande susceptibilité aux symptômes dépressifs que les souris « sauvages ». De plus, ces souris ont une neuroinflammation exacerbée et sont insensibles en partie aux effets bénéfiques de l'EE. Par la suite, je me suis intéressée à la voie de signalisation de l'ApN impliquée dans ses effets anti-inflammatoires. L'ApN a 2 récepteurs (AdipoR1 et AdipoR2) qui sont exprimés dans le cerveau. Mon travail a montré que l'ApN inhibe l'activation de la microglie en se liant à son récepteur AdipoR1 ce qui conduit à une réduction de la sécrétion de cytokines pro-inflammatoires. Par la suite, j'ai testé l'effet de l'AdipoRon, un agoniste des récepteurs de l'adiponectine, sur des souris traitées par la corticostérone. J'ai montré que l'AdipoRon s'opposait aux effets de la corticostérone sur l'état « dépressif » des souris. Mon travaille suggère que les effets antidépresseurs de l'AdipoRon sont dus à sa pléiotropie car il agit simultanément sur différents systèmes altérés dans la dépression dont la neurogenèse hippocampique, la neurotransmission sérotoninergique et la neuroinflammation.

Pour conclure mes travaux de thèse mettent en avant les effets bénéfiques de l'EE sur la dépression et la neuroinflammation. De plus, ils identifient l'ApN et sa voie de signalisation comme de nouvelles cibles prometteuses dans le traitement de la dépression.

Mots clefs : Dépression, Environnement enrichi, Adiponectine, Neuroinflammation, AdipoRon

ABSTRACT

Major depression is a complex disorder characterized by behavioral and cognitive impairments triggered by various factors including genetic predispositions, stress and environment. The pathophysiology of depression is poorly understood. Numerous evidence suggests that neuroinflammation is associated with depression. Alternative therapeutic strategies are needed and "positive" life experiences could be an efficient way to help the remission of the disorder. To study the potential antidepressant effects of such "positive" living conditions, we used the enriched environment (EE) paradigm on mice.

The aim of our work was to fully characterize the antidepressant and anti-inflammatory effects of EE in a well-characterized murine model of depression-like behavior induced by long-term administration of corticosterone. We showed that EE efficiently reverses the anxiety/depressionlike state of mice and reduces neuroinflammation. Moreover, we identified the adipokine Adiponectin as a key player in the beneficial effects of EE. We reported that increased levels of Adiponectin in the brain led to microglia phenotype and activation state regulation, thus reducing global brain inflammation in mice. Indeed, the anti-inflammatory and antidepressants effects of EE are abolished in Adiponectin deficient mice. We demonstrated that anti-inflammatory actions of Adiponectin on microglia is mediated through the Adiponectin Receptor 1. Both Adiponectin receptors (1 and 2) are present in the brain, with AdipoR1 being more pronounced. Those results highlight the key role of the adiponergic system in the treatment of psychiatric disorders. Therefore, we tested the effect of AdipoRon, a potent Adiponectin receptors 1 and 2 agonist on corticosteronetreated mice. AdipoRon successfully reversed the corticosterone-induced depression-like state in mice. AdipoRon exerted its pleiotropic actions on various systems including hippocampal neurogenesis, serotonergic neurotransmission and neuroinflammation, which can explain its antidepressant properties.

Together, our findings bring insight into the beneficial effects of "positive" life experiences in depression and neuroinflammation, highlight the pivotal role of Adiponectin pathway and emphasizes that AdipoRon or other Adiponectin receptor agonist may constitute a promising novel antidepressant.

REM	IERCIEMENTS	5
RESU	JME	8
ABST	TRACT	9
ABRE	EVIATIONS	15
LISTE	E DES FIGURES	16
LISTE	E DES TABLEAUX ET BOX	17
LA D	EPRESSION	19
- I.	DEFINITION ET PREVALENCE	19
П.	Comorbidites	21
	II.A. L'anxiété	21
	II.B. Le syndrôme métabolique	
	II.B.1. Définition	
	II.B.2. Liens entre dépression et syndrôme métabolique	
Ш.	Origines	24
	III.A. Facteurs Génétiques	
	III.B. Facteurs Environmentaux.	
IV.	MODIFICATIONS NEURO-ANATOMIQUES ET BIOLOGIQUES	26
	IV.A. Neuro-anatomie	
	IV.A.1. Les anomalies corticales	
	IV.A.1.i. Le cortex préfrontal	
	IV.A.1.ii. Le cortex cingulaire antérieur	
	IV.A.1.iii. L'insula	28
	IV.A.2. Les anomalies du système limbique	29
	IV.A.2.i. L'hippocampe	29
	IV.A.2.ii. L'amygdale	
	IV.A.2.iii. L'hypothalamus	
	IV.B. Les Monoamines	30
	IV.B.1. La Noradrénaline	
	IV.B.2. La Dopamine	
	IV.B.3. La Sérotonine	
	IV.C. L'axe HPA	37
	IV.C.1. Définition	
	IV.C.2. Dans la dépression	
	IV.D. La Neuroplasticité	40
	IV.D.1. Définition	40

	IV.D.2. Dans la dépression	
	IV.E. L'inflammation	43
	IV.E.1. La réponse inflammatoire locale et systémique en périphérie	
	IV.E.1.i. L'immunité Innée et adaptative	
	L'immunité innée	44
	L'immunité adaptative	45
	IV.E.1.ii. La réaction inflammatoire locale et systémique	45
	IV.E.1. La Neuroinflammation	46
	IV.E.1.i. Définition	46
	IV.E.1.ii. Les médiateurs cellulaires et moléculaires	
	La microglie	
	Les astrocytes	51
	Médiateurs moléculaires	52
	IV.E.1.iii. Neuroinflammation et dépression	53
	IV.F. La voie des kynurénines	55
	IV.F.1. Définition	
	IV.F.2. Dans la dépression	56
V.	ETUDE DE LA DEPRESSION AU LABORATOIRE	57
	V.A. Evaluer l'état dépressif chez un animal	57
	V.A.1. Les Symptômes : un challenge entre modélisation et évaluation	57
	V.A.2. Marqueurs biologiques de la dépression	61
	V.A.2.i. Dysfonction de l'axe HPA	61
	V.A.2.ii. Les monoamines	61
	V.A.2.iii. Altérations anatomiques et neurotrophiques	61
	Changements morphologiques	61
	Modifications neuronales	61
	Marqueurs biologiques	62
	V.A.2.iv. La Neuroinflammation	62
	V.B. Différents Modèles murins de dépression	62
	V.B.1. Les modèles génétiques et transgéniques	63
	V.B.1.i. Les modèles génétiques	63
	Les souris Rouen	63
	Flinders Sensitive Line (FSL)	63
	V.B.1.ii. Les Modèles Transgéniques	64
	Modèles basés des altérations monoaminergiques	64
	Modèles basés sur les altérations de l'axe HPA	64
	Modèles basés sur des altérations des facteurs neurotrophiques	65
	V.B.2. Les modèles induits	65
	V.B.2.i. Les modèles de lésion	65
	V.B.2.ii. Les modèles pharmacologiques	65
	V.B.2.iii. Les modèles comportementaux	
	V.B.3. Autres modèles de dépression	
	V.B.3.i. L'Adiponectine	

	V.B.3.ii. la neuroinflammation	67
	V.C. Identifier de nouvelles cibles thérapeutiques	67
L'EN	VIRONNEMENT ENRICHI	69
Т.	GENERALITES	69
	I.A. Le modèle murin d'Environnement enrichi	69
	I.B. Effets périphériques et centraux	70
	I.B.1. En condition physiologique	70
	I.B.2. En condition pathologique	71
п.	EFFETS DE L'ENVIRONNEMENT ENRICHI SUR LES ALTERATIONS LIEES A LA DEPRESSION	72
	II.A. Les monoamines	72
	II.B. L'axe HPA	73
	II.C. La Neuroplasticité	74
	II.D. La Neuroinflammation	76
	II.E. La voie des kynurénines	77
ш.	CONCLUSION SUR LES EFFETS PLEITROPES DE L'ENVIRONNEMENT ENRICHI	78
L'AD		79
	L'ADIRONIECTINE ALE LIEN ENTRE DERRESSION, INELAMMATION ET SYNDROME METADOLIOUE	70
	L'ADIPONECTINE : LE LIEN ENTRE DEPRESSION, INFLAMMATION ET SYNDROME METABOLIQUE	79
	I.A. Structure de L'adiponectine	79
	I.B. Recepteurs et voies de signalisation de l'Adiponectine	80
	I.B.1. Recepteurs	80 82
	I C. Fonctions de l'Adinonectine	82
	I.C.1. En périphérie	84
	I.C.2. Au niveau central	85
	I.C.2.i. En condition physiologique	85
	I.C.2.ii. Dans la dépression	85
П.	LA PLEIOTROPIE DES DIFFERENTES FORMES DE L'ADIPONECTINE RETROUVEE DANS UNE MOLECULE :	
ι'A	DIPORON	87
	II.A. Structure et signalisation	87
	II.B. Effets connus de l'adiporon	88
OBJE	CTIFS	90
RÉSL	JLTATS	93
ART	TICLE 1: N EUROGENESIS-INDEPENDENT ANTIDEPRESSANT-LIKE EFFECTS OF ENRICHED ENVIRONMENT ARE	
DEP	PENDENT ON ADIPONECTIN	94

Contexte	
Résultats	94
Conclusion	
ARTICLE 1	
ARTICLE 2 : ENRICHED ENVIRONMENT DECREASES MICROGLIA AND BRAIN MACROP	PHAGES INFLAMMATORY
PHENOTYPES THROUGH ADIPONECTIN-DEPENDENT MECHANISMS: RELEVANCE TO D	DEPRESSIVE-LIKE BEHAVIOR113
Contexte	
Résultats	
Conclusion	
ARTICLE 2	115
ARTICLE 3 : GLOBULAR ADIPONECTIN LIMITS MICROGLIA PRO-INFLAMMATORY PHE	ENOTYPE THROUGH AN
AdipoR1/NF-κB signaling pathway.	
Contexte	
Résultats	
Conclusion	
ARTICLE 3	
ARTICLE 4 - ADIPORON, AN ADIPONECTIN RECEPTOR AGONIST ACTS AS AN ANTIDE	PRESSANT AND METABOLIC
REGULATOR IN A MOUSE MODEL OF DEPRESSION	
Contexte	
Résultats	
Conclusion	
ARTICLE 4	
DISCUSSION ET PERSPECTIVES	
CONCLUSION	
ANNEXE	203
L'ADIPONECTINE : UN ANTIDEPRESSEUR ENDOGENE ?	
CD8+ T CELLS ARE ESSENTIAL FOR THE EFFECTS OF ENRICHED ENVIRONMENT ON HI	PPOCAMPO-DEPENDENT
BEHAVIOR, HIPPOCAMPAL NEUROGENESIS AND SYNAPTIC PLASTICITY	219
Résumé	219
RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES	

ABREVIATIONS

3OH-KYN: 3-Hydroxy-Kynurénine 5-HIAA : 5-HydroxyIndole Acétique 5-HT: 5-hydroxytryptamine, sérotonine **ACTH :** Adreno-Cortico-Tropic Hormone AdipoR : Adiponectin Receptor **AMPK :** Adenosine Monophosphate Protein Kinase **ApN**: Adiponectine ApNg : Adiponectine Globulaire **APPL1 :** Adaptor Protein Phosphotyrosine Leucine zipper1 AVC : Accident Vasculaire Cérébral **BDNF**: Brain-Derived Neurotrophic Factor **BHE :** Barrière Hémato Encéphalique BrdU: 5-bromo-2'-deoxyuridine CCA : Cortex Cingulaire Antérieur CMH : Complexe Majeur d'Histocompatibilité **COMT**: Catéchol-O-methyltransferase **CPF**: Cortex Préfrontal **CRH**: Cortico-Releasing Hormone **DA**: Dopamine **DAMP** : Danger-associated molecular patterns DAT : Transporteur de la dopamine DCX : Double Cortine DOPA : L-Dihydroxyphénylalanine DSM : Diagnostic and Statistical Manual of Mental Disorders **EE**: Environnement Enrichi EGF: Epidermal Growth Factor ES : Environnement Standard FGF: Fibroblast Growth Factor FSL : Flinders Sensitive Line **FST :** Forced Swim Test **GABA**: Acide Gamma-Aminobutyrique GCL : Granule Cells Layer GCs: Glucocorticoïdes **GDNF**: Glial-Cell-Derived Neurotrophic factor **GR**: Récepteurs aux Glucocorticoïdes **HFD** : High Fat Diet HPA : Hypothalamic-Pituitary-Adrenal **HPLC :** *High Performance Liquid Chromatography* ICV : Intra-Cérébro-Ventriculaire IDO: indoleamine-2,3-dioxygénase **IFN**: Interferon **IGF**: Insulin Growth Factor IL- : InterleukineiMAO : Inhibiteur des Monoamines oxydases IMC : Indice de Masse Corporelle INPES : Institut national de prévention et d'éducation pour la santé IP: Intra-Péritonéal IRMf : Imagerie par Résonnance Magnétique Fonctionnelle ISRS : Inhibiteurs Sélectifs de la Recapture de la Sérotonine

ISRSN: Inhibiteurs Sélectifs de la Recapture de la Sérotonine et de la Noradrénaline **IV**: Intraveineux JC : Jésus-Christ **KAT**: Kvnurénine Aminotransférase KMO: kynurénine-3-monooxygénase KO: Knock-Out **KYN**: Kynurénine KYNA : Acide Kynurénique LCS : Liquide Cérébro Spinal LH: Learned Helplessness LPS: Lipopolysaccharide MAO: Monoamines oxydases **MCV** : Maladies Cardiovasculaires MHPG: 3-Methoxy-4-hydroxyphenylglycol **MR**: Récepteurs aux Minéralocorticoïdes **NA**: Noradrénaline **NAD**: Nicotinamide Adénine Dinucléotide **NAT**: Transporteur de la noradrénaline NeuN: Neuronal Nuclei **NF-κB** : Nuclear Factor-kappa B NGF: Nerve Growth Factor NMDA : acide N-méthyl-D-aspartique **NO**: Oxyde Nitrique **NSF**: Novelty Suppressed Feeding NT: Neurotransmetteur NTS : Noyau du Tractus Solitaire **OCV**: Organes Circumventriculaires **OMS**: Organisation Mondiale de la Santé p38-MAPK : p38-Mitogen-activated protein Kinase **PAMP**: Pathogen-associated molecular patterns **PGC-1** α : PPAR-Gamma Coactivator 1α PGE2: Prostaglandines E2 PI3K : Phosphoinositide 3-kinase **PPAR :** Peroxisome Proliferator-Activated Receptor **PRR**: Pattern Recognition Receptors **PVN:** Paraventricular Nucleus **QUIN :** Acide Quinolinique **RCPG**: récepteur couplés aux protéines G **S1P**: sphigosine-1-phosphate SERT : Transporteur de la sérotonine SGZ: Sub Granular Zone SIRT1: Sirtuine 1 SM : Syndrôme métabolique **SNC** : Système Nerveux Central SVZ: Sub Ventricular Zone **TCA**: Tricyclic Antidepressant **TGF**: Tumor Growth Factor TLR : Toll-Like Receptor **TNF**: Tumor Necrosis Factor TrkB: Tropomyosin receptor kinase B **TRP**: Tryptophane **TST**: Tail Suspension Test **UCMS :** Unpredictable Chronic Mild Stress **VEGF :** Vascular Endothelial Growth Factor VIH : Virus de l'Immunodéficience Humaine WT: Wild Type

LISTE DES FIGURES

Figure 1 : Prévalence du nombre de personnes diagnostiquées dépressives dans le monde 20
Figure 2 : Structures impliquées dans l'étiologie de la dépression
Figure 3 : Régulation de l'humeur : importance des monoamines (Guiard, 2011)
Figure 4 : Synthèse des catécholamines (Noradrénaline, Dopamine et Adrénaline)
Figure 5 : Circuits des monoamines impliqués dans la dépression
Figure 6 : Synthèse de la sérotonine
Figure 7 : L'axe HPA
Figure 8 : La neurogenèse hippocampique 40
Figure 9 : Voies d'accès des cytokines pro-inflammatoires au système nerveux central
Figure 10 : Cascade d'activation de la microglie 50
Figure 11 : Métabolisme de la kynurénine 55
Figure 12 : Représentation d'une cage standard et d'une cage d'environnement enrichi
Figure 13 : Effet de l'exercice sur l'expression des KAT dans la réponse au stress
Figure 14: Structure de l'adiponectine et de ses multimères
Figure 15 : Voies de signalisation de l'adiponectine
Figure 16 : Structure chimique de l'AdipoRon
Figure 17 : Schéma illustrant les effets de l'environnement enrichi contre les comportements anxio- dépressifs induits par le stress
Figure 18 : Représentation schématique des mécanismes d'action de l'adiponectine globulaire sur la microglie

LISTE DES TABLEAUX ET BOX

Tableau 1 : Classification des différents « états d'activation microgliale »,	. 51
Tableau 2 : Classification des différents états astrocytaires.	. 52
Tableau 3 : Modélisation des symptômes dépressifs chez la souris	. 57
Tableau 4 : Effets de l'environnement enrichi sur différentes neuropathologies	. 72
Tableau 5 : Différentes fonctions de l'adiponectine en périphérie	. 84

Box 1. Les traitements antidépresseurs pharmacologiques	36
Box 2. Les médiateurs moléculaires de la réponse inflammatoire/neuroinflammatoire	47
Box 3. Les différents tests comportementaux utilisés pour évaluer la dépression chez la souris	59
Box 4. Les traitements antidépresseurs non-pharmacologiques	68

LA DEPRESSION

Dépression, du latin impérial depressio « abaissement, renfoncement ».

Bien que souvent considérée comme un mal moderne, la dépression est décrite depuis bien longtemps ; dès le Vème siècle avant Jésus-Christ (JC), Hippocrate évoquait déjà la « mélancolie ». La symptomatologie dépressive a parcouru les siècles sous différentes appellations. Ainsi, au 1er siècle avant JC parlait-on de fatigue de vivre ou « Tædium Vitae ». 500 ans plus tard c'est le terme de négligence « acedia » qui touchera les moines et sera qualifié de péché capital. Au XVIIème siècle le mal prendra le nom de « Paresse », transformant ainsi ce péché théologique en péché devant la société. Au cours du XIXème siècle, Chateaubriand, Musset ou encore Baudelaire dans son recueil de poèmes « Les fleurs du mal » décrivaient la dépression comme étant leur « spleen », la qualifiant déjà de « Mal du siècle ». C'est au XX^{ème} siècle, avec les débuts de la psychiatrie que ce « mal » deviendra « maladie » et que la « mélancolie » sera remplacée par « dépression ». Jusqu'en 1970, la dépression était un symptôme qui pouvait se découvrir chez tout individu, dans toute pathologie. C'est en 1980 que la terminologie associée à la dépression évolue et qu'elle entre dans le DSM-III (Diagnostic and Statistical Manual of Mental Disorders) comme étant une maladie à part entière nommée « Trouble dépressif majeur ».

I. DEFINITION ET PREVALENCE

De 2005 à 2015, le nombre de personnes touchées par cette maladie a augmenté de plus de 18% selon l'Organisation Mondiale de la Santé (OMS). Aujourd'hui la dépression majeure touche plus de 300 millions de personnes dans le monde ce qui fait d'elle la 1ère cause de morbidité et d'invalidité. En 2010, l'INPES (Institut National de Prévention et d'Education pour la Santé) a évalué la prévalence de la dépression en France à 7%. La dépression concerne tous les âges, toutes les ethnies et toutes les catégories socioprofessionnelles sans discernement. Elle affecterait deux fois plus de femmes que d'hommes (Ferrari et al., 2013).

Le tableau clinique de la dépression majeure est caractérisé par l'expression de plusieurs symptômes physiologiques et psychologiques. La 5ème et dernière version du DSM (DSM-V, 2013), décrit que le patient doit présenter au moins 5 symptômes, incluant obligatoirement l'humeur dépressive ou l'anhédonie, parmi les 9 critères caractéristiques de la pathologie. Ces symptômes doivent être ressentis tous les jours, et pendant au moins 2 semaines consécutives. Ils ne doivent pas être la conséquence d'une prise de médicament ou d'une autre substance. Les 9 critères caractéristiques de la dépression sont les suivants :

- Humeur dépressive
- Perte d'intérêt ou de plaisir général (anhédonie)
- Perte ou gain de poids significatif
- Insomnie ou hypersomnie
- Agitation ou ralentissement psychomoteur
- Fatigue ou perte d'énergie
- Sentiment de dévalorisation et de culpabilité excessive ou inappropriée
- Difficultés de penser, de se concentrer, ou indécisions
- Pensées récurrentes de mort ou de suicide

Ces symptômes empêchent les individus atteints de poursuivre leur activité professionnelle ou d'avoir une vie sociale satisfaisante. Environ 10% des patients atteints de dépression majeure feront une tentative de suicide.





Les pays en rouges ont les taux les plus élevés et ceux en bleu les taux les plus faibles. D'après (Ferrari et al., 2013) Malgré la définition du DSM-V, de nombreuses erreurs de diagnostic sont encore dénombrées du fait de la complexité de la maladie qui s'exprime de manières différentes d'un individu à l'autre, notamment dans la variabilité de l'intensité des épisodes dépressifs et de la symptomatologie. Ainsi, l'erreur de diagnostic parfois très difficile à éviter peut conduire des personnes dépressives à ne pas pouvoir recourir aux soins et d'autres, non affectées par la dépression, se voient prescrire des antidépresseurs inutiles. A ces erreurs de diagnostic s'ajoutent le manque de ressources, la pénurie de personnels soignants et la stigmatisation sociale associée aux troubles mentaux. C'est ainsi que seule la moitié des personnes affectées par la dépression bénéficient des traitements actuellement disponibles qui de surcroit présentent des inconvénients majeurs :

- Traitement au long cours, conduisant à des problèmes d'inobservance thérapeutique, qui compte parmi les raisons principales dans l'absence de résultat
- Nombreux effets secondaires indésirables (dépendance, insomnie, prise de poids, nausée...)
- Inefficacité chez environ 30% des patients
- Rechute fréquente (2/3 des personnes traitées)

Ces échecs thérapeutiques mènent à la chronicisation de la maladie, une situation très préjudiciable pour le patient, son entourage et la société. Il est donc urgent d'identifier de nouvelles cibles thérapeutiques et traitements non-pharmacologiques pour soigner cette pathologie. L'impact considérable de la dépression dans le monde (*Figure 1*) fait d'elle l'objet de nombreuses recherches afin d'en comprendre les causes et les mécanismes cellulaires et moléculaires. Mais la comorbidité de la dépression avec d'autres pathologies psychiatriques ou non rends son étude d'autant plus complexe.

II. COMORBIDITES

La comorbidité correspond à la présence simultanée ou non, d'au moins 2 pathologies (ou plus). Ce phénomène est très fréquent dans le cas des maladies psychiatriques comme la dépression. De plus, la dépression peut être une comorbidité d'autres pathologies, en effet des individus souffrant d'un cancer, ou de problèmes cardiaques ont un risque plus élevé de développer un trouble dépressif qu'une personne saine.

II.A.L'ANXIETE

L'anxiété, qui est une émotion proche de la peur, est importante dans l'adaptation aux problèmes de la vie et aux interrogations de chaque individu. Pourtant, l'anxiété peut devenir une maladie lorsque celle-ci devient irrationnelle et invalidante. C'est ce que l'on observe dans le cas de phobies ou de crises de panique. La dépression et l'anxiété partagent certains symptômes comme la diminution de la concentration et les troubles du sommeil et de l'alimentation, malgré leurs similitudes, et une tendance à les confondre, ces 2 pathologies sont distinctes et nécessitent un traitement pharmacologique différent. Néanmoins, l'anxiété reste un symptôme fréquent de la dépression. Au cours de leur vie, plus de 60% des personnes souffrants d'un trouble anxieux feront une dépression et à l'inverse plus de 15% des personnes dépressives développeront un trouble anxieux (Murphy et al., 2004). Alors que l'anxiété est, comme la dépression, une affection psychiatrique, d'autres pathologies touchant le système périphérique et en particulier le métabolisme sont des comorbidités de la dépression. Ces différentes dérégulations métaboliques peuvent être regroupées sous le terme de syndrôme métabolique.

II.B.LE SYNDROME METABOLIQUE

Le syndrome métabolique (SM) est le facteur de risque principal des maladies cardiovasculaires (MCV). D'après l'OMS, les MCV sont la première cause de mortalité dans le monde, ce qui fait d'elles un enjeu de santé publique majeur tout comme la dépression avec laquelle elles sont étroitement liées (Hryhorczuk et al., 2013).

II.B.1. DEFINITION

Le syndrome métabolique est un ensemble d'anomalies biologiques et cliniques qui correspondent plutôt à un état pré-pathologique qu'à une pathologie en elle-même. Généralement le SM est considéré comme la co-occurrence d'une obésité (graisse viscérale), d'une dyslipidémie (taux anormaux de cholestérol et/ou triglycérides), d'une hyperglycémie (intolérance au glucose), d'une insulino-résistance et d'hypertension, tous étant un facteur de risque pour des maladies cardio-vasculaires. De façon intéressante, l'inflammation périphérique chronique aurait un rôle dans la mise en place du SM (Weisberg et al., 2003). Le syndrôme métabolique étant associé à la dépression dans différentes méta-analyses (Pan et al., 2008; Takeuchi et al., 2009; Vancampfort et al., 2014), l'inflammation périphérique pourrait être le lien entre le syndrome métabolique et la dépression.

II.B.2. LIENS ENTRE DEPRESSION ET SYNDROME METABOLIQUE

L'obésité est l'une des caractéristiques du SM. Comme la dépression, l'origine de l'obésité est multifactorielle (Guyenet and Schwartz, 2012). Des études épidémiologiques associent fréquemment l'obésité avec des troubles psychopathologiques (Pinna et al., 2016). Par ailleurs, une méta-analyse a mis en évidence une association bidirectionnelle entre dépression et obésité : au cours de leur vie les personnes obèses ont 55% de risque de développer une dépression et les personnes dépressives ont 58% de risque de devenir obèses (Luppino FS, 2010). Aujourd'hui l'incidence de la dépression chez les personnes obèses est d'environ 30% (Lasselin and Capuron, 2014). Par la suite, une étude a montré une corrélation entre l'Indice de Masse Corporelle (IMC), et des altérations neuro-anatomiques concernant certaines zones affectées également dans la dépression comme le cortex préfrontal et orbitofrontal (Opel et al., 2015). L'IMC permet d'estimer la corpulence d'une personne, c'est un standard dans l'évaluation du surpoids, quand il est supérieur à 30 la personne est considérée comme obèse. Plus l'IMC est élevé, plus les patients dépressifs présentent une élévation des marqueurs de l'inflammation plasmatiques et plus leur activité psychomotrice en est affectée (Goldsmith et al., 2016) (Hidese et al., 2018).

L'obésité n'est pas le seul facteur associé à la dépression, puisque les personnes obèses sans dérégulations métaboliques ont moins de risque de développer une dépression que des personnes atteintes SM (Hamer et al., 2012; Jokela et al., 2014). En comparaison à la population générale, les personnes dépressives présentent un IMC élevé et un tour de taille augmenté associé à une forte adiposité viscérale, une hyperlipidémie, de l'hypertension, qui sont des critères du SM (Ludescher et al., 2011; Vancampfort et al., 2014; Veen et al., 2009).

Même si cela paraît moins évident que les liens entre la dépression et l'obésité, il existe tout de même des interactions entre les autres facteurs du SM et la dépression. Par exemple, le risque de développer du diabète est augmenté de 60% chez les personnes souffrant de dépression (Rotella and Mannucci, 2013). De plus, les patients dépressifs présentent souvent une altération du métabolisme du glucose (Golden et al., 2008; Hamer et al., 2011). Une méta-analyse a montré des liens entre l'insulino-résistance et la pathologie dépressive (Kan et al., 2013). Enfin, la dépression est connue pour avoir des effets neuroendocriniens (dérégulation de l'axe HPA et du système nerveux sympathique) ce qui pourrait influencer la mise en place du SM en affectant directement l'accumulation de tissu adipeux, le métabolisme glucidique et la régulation de la pression artérielle (Anagnostis et al., 2009; Jantaratnotai et al., 2017). Réciproquement, le SM pourrait également être un facteur de risque de développer la dépression. Par exemple, l'élévation des cytokines proinflammatoires retrouvée dans le SM (Eckel et al., 2005) est aussi impliquée dans le développement de la dépression (Schiepers et al., 2005). D'autres facteurs comme l'homéostasie glucidique et l'augmentation de l'oxydation sont retrouvés dans la pathophysiologie de la dépression (McIntyre et al., 2007). De plus, les altérations vasculaires causées par le SM pourraient induire des dommages vasculaires au niveau cérébral (au niveau de la BHE) pouvant induire des symptômes dépressifs (Alexopoulos et al., 1997; Vykoukal and Davies, 2011).

Ainsi, la comorbidité de la dépression avec d'autres pathologies rend son diagnostic et son traitement complexes, c'est pourquoi il est aussi important de comprendre parfaitement l'origine de l'apparition de cette pathologie pour traiter au mieux les patients.

De nos jours, il est encore difficile d'expliquer quelles sont les causes de la dépression. La dépression peut être causée par des facteurs génétiques, environnementaux (maladie, perte d'un travail, décès d'un proche...) ou encore apparaître de manière inexpliquée. De plus, de nombreuses études ont permis de montrer que la prise de traitements antidépresseurs ne permettait pas un retour « à la normale » de l'activité cérébrale malgré un rétablissement émotionnel et comportemental. En effet, le cerveau d'un patient « guéri » qui a été traité par antidépresseurs présente des différences d'activités en comparaison à un cerveau sain, suggérant ainsi l'implication d'autres mécanismes biologiques dans la dépression. C'est la raison pour laquelle il existerait un fort taux de rechute dans cette pathologie lorsque le traitement est arrêté de façon précoce (Willner et al., 2013). Alors que l'aspect multifactoriel de la dépression qui semble maintenant une évidence rend son étude difficile, de nombreux travaux ont permis d'incriminer certains facteurs clefs impliqués dans le développement de cette pathologie.

III.A. FACTEURS GENETIQUES

De nombreux travaux montrent le caractère héréditaire de la dépression, suggérant que certains gènes pourraient être responsables de l'apparition ou de la prédisposition au syndrome. Une personne dont l'un des parents fait, ou a fait, une dépression a 2 à 4 fois plus de risque d'avoir un épisode dépressif au cours de sa vie. Dans certaines populations, quelques polymorphismes génétiques ont été identifiés comme pouvant être corrélés à la dépression, notamment dans le gène codant pour le récepteur 5-HT2C (B Lerer, 2001), le gène du transporteur de la sérotonine (Blanca Gutierrez, 1998) ou encore le gène codant pour le promoteur de la monoamine oxydase A (Flint and Kendler, 2014). Une méta-analyse parue dans le journal *Nature Genetics* a permis d'associer 17 polymorphismes nucléotidiques à un trouble dépressif majeur dans la population Européenne (Hyde et al., 2016). Ces données soulignent l'importance de continuer la recherche de gènes de susceptibilité pour anticiper l'apparition d'épisode dépressif chez les personnes dîtes « à risque ».

III.B. FACTEURS ENVIRONMENTAUX

Les facteurs externes socio-économiques représentent tous les événements de la vie d'un individu qui peuvent prédisposer ou déclencher la pathologie. L'abus de substances comme l'alcool et les psychotropes, est un exemple de facteur environnemental associé à la dépression. Le stress tient une place de premier plan parmi ces facteurs. Les événements traumatisants, comme la perte d'un être cher ou un accident, sont souvent associés à un stress aigu qui peut provoquer un épisode dépressif. De même un stress chronique qui dure sur le long terme, des difficultés conjugales, le chômage ou une maladie peuvent mener à une dépression. Ces 20 dernières années, l'évolution des technologies et l'avènement d'internet ont fait apparaître de nouveaux facteurs environnementaux pouvant mener à une dépression. L'amélioration des télécommunications ouvre la possibilité d'être constamment connecté, cette « sur-connexion » empêche des individus de « décrocher » du travail le weekend ou en vacances, provoquant une impression de pression constante. Ces personnes ne se déconnectant jamais du travail amènent le stress de celui-ci dans leur vie personnelle, faisant croître l'état de stress, induisant sur le long terme des épisodes dépressifs ou un « burn-out ». De plus, les progrès technologiques dans la communication (apparition des smartphones) sont associés à de nombreux effets néfastes. Les smartphones ouvrent la possibilité de communiquer avec tout le monde, à n'importe quel moment et dans n'importe quel endroit, mais tout cela de manière virtuelle. Les conséquences d'une vie virtuelle « trop fournie » entraînent une vie réelle appauvrie, conduisant les personnes à s'isoler et potentiellement à développer une dépression. Ces dernières années sont apparues des cures de « detox » digitales pour prévenir des effets néfastes de la surconnexion (Jauréguiberry, 2013). Le terme de « detox » dérive des « cures de désintoxications » dédiées aux personnes souffrant d'addiction aux substances psychotropes. D'ailleurs ces personnes souffrant d'une addiction ont plus de chance de développer une dépression (Grant, 1995). De plus, l'accès facilité à un grand nombre d'informations et de distractions par internet ou par la télévision a augmenté la sédentarité, et par conséquent l'obésité (Althoff et al., 2017), celle-ci étant étroitement liée à la dépression. Une exposition prolongée face aux écrans a modifié les habitudes et la qualité du sommeil (Lewis et al., 2017), ce qui a un effet direct sur tous nos rythmes biologiques provoquant des dérèglements hormonaux pouvant conduire à la dépression. Dans la population générale, environ 30% des personnes souffrent d'insomnie. Chez les patients dépressifs, la proportion de malades souffrant d'insomnie est de 90% (Motivala et al., 2005). Au-delà des éléments environnementaux qui sont incontrôlables/imprévisibles (chômage, maladie ou événement traumatisant), il n'y a plus de doute aujourd'hui quant à l'impact de l'alimentation, la

qualité du sommeil et le manque d'activité physique dans le développement de troubles dépressifs (Lopresti et al., 2013; Sánchez-Villegas A, 2009).

Au-delà de leur « mauvais rôle » dans l'augmentation du nombre de personnes dépressives, les progrès technologiques ont tout de même permis d'améliorer les techniques d'imagerie médicale et d'améliorer les méthodes d'analyses dans les laboratoires. De plus, les progrès dans la télécommunication ont facilité les collaborations internationales, les échanges entre patients, médecins et chercheurs. Ainsi, sur les 20 dernières années, l'imagerie médicale a permis d'identifier de nouveaux acteurs dans l'étiologie de la dépression, notamment des modifications fonctionnelles et anatomiques dans le cerveau de patients atteint de dépression.

IV. MODIFICATIONS NEURO-ANATOMIQUES ET BIOLOGIQUES

La dépression affecte notre organisme à différents niveaux. Elle est associée des dysfonctionnements biologiques, anatomiques, cellulaires et moléculaires, qui se retrouvent aussi bien en périphérie qu'au niveau du système nerveux central (SNC).

IV.A. NEURO-ANATOMIE

Parmi les structures affectées par la dépression se trouvent l'hippocampe, le cortex cingulaire, le cortex préfrontal, le cortex temporal (le droit majoritairement), le striatum ou encore l'amygdale. Les principales observations concernant ces zones ont été réalisées sur des patients *post-mortem*, où une diminution de leur taille a été observée. Depuis le début des années 2000, les progrès en imagerie ont permis de confirmer ces observations. Non seulement la diminution de la taille de ces zones a été confirmée, mais également leur dysfonctionnement a été mis en évidence par imagerie par résonance magnétique fonctionnelle (IRMf). L'implication du cortex préfrontal, du cortex cingulaire, de l'amygdale, du thalamus et du striatum dans le processus dépressif a été confirmée chez l'animal de laboratoire. Leurs lésions entraînent un phénotype dépressif chez les rongeurs (Klein et al., 2010; Kuter et al., 2011; Matheus et al., 2016).

Cependant, certaines observations faites chez les modèles animaux ne sont pas retrouvées chez l'Homme. Aujourd'hui, les données de la littérature convergent uniquement vers les aires corticales et limbiques comme étant affectées dans la pathologie dépressive.

IV.A.1. LES ANOMALIES CORTICALES

Les anomalies corticales observées lors d'une dépression sont situées au niveau du cortex préfrontal (dorsolatéral et ventromédian), le cortex orbitofrontal, le cortex cingulaire antérieur et l'insula (*Figure 2*).

IV.A.1.i. LE CORTEX PREFRONTAL

Le cortex préfrontal (CPF) se situe en avant du cortex frontal. Divisé en 3 parties (dorsomédian, ventromédian, orbito-frontal), il est le siège des fonctions exécutives dites supérieures (cognitives, émotionnelles et comportementales). Il reçoit directement ou indirectement des informations de l'hypothalamus, du sous-thalamus, du mésencéphale, du système limbique et du cervelet, et est aussi interconnecté avec d'autres régions corticales. Dans la région latérale du CPF convergent des informations de natures visuelles, auditives et somatiques alors que la région orbitomédiale reçoit des informations olfactives, gustatives en plus des informations auditives. Globalement, le cortex préfrontal latéral collecte les informations sensorielles, les organise et exécute des actions dirigées vers un but, tandis que le cortex orbitomédial gère les réactions émotionnelles. Le CPF est impliqué dans de nombreuses fonctions : la partie médiane est associée à l'élaboration de processus cognitifs complexes (planification et raisonnement). La zone orbitofrontale est en lien avec le système limbique et contrôle les processus affectifs et motivationnels. La partie ventrale du CPF est nécessaire pour la génèse des émotions, en particulier des émotions sociales. Et la partie dorsale est quant à elle impliquée dans le contrôle cognitif et la maintenance d'informations issues de la mémoire de travail. Lors d'IRMf de patients dépressifs, une réduction du flux cérébral sanguin au niveau du CPF dorsolatéral est observée ce qui traduit une diminution de l'activité et du métabolisme. A l'inverse, au niveau du CPF ventromédian, c'est une augmentation du débit sanguin et donc une hyper activation du métabolisme qui est constatée (Oakes et al., 2017).

IV.A.1.ii. LE CORTEX CINGULAIRE ANTERIEUR

Le cortex cingulaire antérieur (CCA) joue un rôle d'interface entre l'émotion et la cognition. C'est lui qui participe à la transformation de nos sentiments en intentions jusqu'à l'action. Le CCA est divisé en 2 parties, une ventrale et une dorsale. La partie ventrale est impliquée dans l'aspect affectif des émotions, elle est connectée au système limbique (amygdale, thalamus et hippocampe) et également au CPF ventromédian, l'impliquant dans la régulation des réponses émotionnelles. Le

CCA dorsal quant à lui est associé à l'aspect cognitif des émotions. Le CCA est associé à la physiopathologie de la dépression, une diminution de son activité est également observée lors d'IRMf chez les patients dépressifs. Cela est à mettre en parallèle avec la diminution de la taille du CCA mise en évidence par l'étude *post-mortem* de patients dépressifs (Eric J. Nestler and Monteggia, 2002).

IV.A.1.iii. L'INSULA

L'insula est située dans les replis du cortex cingulaire. L'insula permettrait de produire un contexte émotionnel en adéquation avec une expérience sensorielle donnée. Elle est associée aux processus de douleur mais aussi à des émotions comme la colère, la peur, le dégoût, la tristesse ou la joie. L'insula reçoit des entrées sensorielles homéostatiques par l'intermédiaire du thalamus qu'elle retransmet à des structures du système limbique comme l'amygdale, le striatum ou encore le cortex orbitofrontal. Chez les patients dépressifs, il existe une hypersensibilité de l'insula face à des stimuli négatifs et une réduction du volume cérébral dans cette région (Sprengelmeyer et al., 2011).



Figure 2 : Structures impliquées dans l'étiologie de la dépression

IV.A.2. LES ANOMALIES DU SYSTEME LIMBIQUE

Le système limbique a été identifié dans les années 1930 comme jouant un rôle dans la gestion des émotions. Depuis, d'autres fonctions vitales lui ont été associées comme l'apprentissage, l'olfaction, le contrôle du système endocrinien, les comportements alimentaires et le système nerveux autonome. Le système limbique est localisé au niveau subcortical, il est composé de l'hippocampe, l'amygdale, le fornix, le gyrus cingulaire, l'hypothalamus, les corps mamillaires et le thalamus antérieur.

IV.A.2.i. L'HIPPOCAMPE

L'hippocampe est une structure impliquée dans les processus de mémorisation, d'apprentissage et de navigation spatiale. Situé dans le lobe temporal médian, il possède des connexions avec le septum, l'hypothalamus, le thalamus antérieur, lui rôle un rôle dans le comportement émotionnel. Des études ont montré que la partie ventrale de l'hippocampe régule les émotions alors que la partie dorsale est impliquée dans les fonctions cognitives comme l'apprentissage et la mémoire spatiale (Fanselow, 2010). Les personnes atteintes de dépression présentent un volume hippocampique réduit. A l'inverse, un traitement par antidépresseurs permet un retour « à la normale » du volume de l'hippocampe. De plus, une hypoactivité a été mise en évidence par IRMf au niveau de l'hippocampe. Les signes cliniques et les dysfonctionnements mnésiques sont en corrélation avec la diminution du volume de l'hippocampe. Des études réalisées sur des cerveau *post-mortem* ont montré que la diminution de la taille de l'hippocampe n'était pas liée à une perte de neurones mais plutôt à une diminution de leur taille et à une perte de dendrites (Czeh and Lucassen, 2007). Aujourd'hui, il est encore difficile de statuer si la réduction du volume hippocampique est une conséquence de la dépression ou une cause de celle-ci.

IV.A.2.ii. L'AMYGDALE

L'amygdale est localisée au niveau de la région interne du lobe temporal. Elle est impliquée dans le contrôle des émotions et la réponse au stress. Une augmentation du flux cérébral sanguin et du métabolisme a été observée dans cette zone chez des patients dépressifs, reflétant son hyperactivation (Price and Drevets, 2010). Dans le cadre d'un traitement antidépresseur efficace, une régulation de l'activation de l'amygdale a été observée, suggérant un effet inhibiteur de la prise chronique d'antidépresseurs sur les fonctions de l'amygdale.

IV.A.2.iii. L'HYPOTHALAMUS

Les symptômes neurovégétatifs de la dépression comme les troubles de l'appétit, du sommeil et du comportement sexuel laissent penser que l'hypothalamus est aussi impliqué dans la pathogenèse de la dépression, sans que son rôle ne soit encore totalement validé. Tout d'abord, l'hypothalamus fait partie de l'axe HPA (détaillé dans le chapitre **III.C.**), qui est hyperactivé chez un grand nombre de patients déprimés. De plus, une étude en *post-mortem* montre par exemple une augmentation du nombre de neurones exprimant la vasopressine et l'ocytocine, qui sont des neuropeptides impliqués respectivement dans l'homéostasie hydrique et le comportement social. Cette augmentation de neurones exprimant ces neuropeptides serait synonyme d'une hyperactivation de l'hypothalamus (Lucassen et al., 1997). De plus, de faibles taux d'ocytocine sont retrouvés chez des femmes souffrant de dépression post-partum (Scantamburlo et al., 2007). Ce sous-type de dépression majeure, n'affectant que les femmes, a une prévalence de plus de 10% (Le Strat et al., 2011). Enfin, les troubles du sommeil ont été associés à un déficit en mélatonine chez les patients déprimés (Rahman et al., 2010). La mélatonine est une hormone régulant les rythmes chronobiologiques qui est sécrétée la nuit par l'hypophyse. L'hypophyse reçoit des afférences de l'hypothalamus qui est responsable de son activité sécrétrice.

D'une manière générale, le cortex et l'hippocampe sont associés aux troubles cognitifs retrouvés dans la pathologie, comme les troubles mnésiques, le sentiment d'inutilité ou de culpabilité pouvant aller jusqu'aux pensées suicidaires. Le striatum et l'amygdale sont impliqués dans la mémoire émotionnelle ce qui les associe à l'anhédonie, à la diminution de la motivation et l'augmentation de l'anxiété. Enfin, l'hypothalamus serait associé aux troubles des comportements fondamentaux. Les interactions très étroites entre les différents circuits neuronaux de ces différentes régions cérébrales laissent entendre qu'un jour, un circuit neuronal propre à la dépression pourrait être identifié. Cependant, les données actuelles ne permettent pas de distinguer l'implication d'une voie plutôt qu'une autre.

IV.B. LES MONOAMINES

Certaines anomalies biologiques peuvent être la cause de l'apparition des symptômes dépressifs. L'hypothèse neurobiologique la plus courante est l'hypothèse monoaminergique décrite dans les années 50 (Krishnan and Nestler, 2008). Elle est fondée sur l'idée que la dépression est due

à une déficience centrale de monoamines, une classe de neurotransmetteurs comprenant la noradrénaline (NA), la dopamine (DA) et la sérotonine (5-hydroxytryptamine, 5-HT) (*Figure 5*). Par ailleurs, les connaissances d'aujourd'hui sur les systèmes de neurotransmission ont permis d'associer chacun des comportements et symptômes observés chez des patients dépressifs à des déficits en neurotransmetteurs (*Figure 3*).



Figure 3 : Régulation de l'humeur : importance des monoamines (Guiard, 2011)

La théorie des monoamines dériva de l'observation que l'administration d'un traitement de l'hypertension, à base de racine de *Rauwolfia serpentina*, agissant en réduisant les niveaux des monoamines dans l'espace synaptique, induisait chez les patients un état dépressif (Richard M Quetsch, 1959). En condition physiologique, après leur synthèse au niveau de la synapse, les monoamines sont stockées dans des vésicules pré-synaptiques. Les monoamines libérées dans la fente synaptique, sous l'effet d'un influx nerveux (potentiel d'action), se fixent sur leurs récepteurs localisés sur les membranes pré- et post-synaptiques. La plupart des récepteurs spécifiques des monoamines sont des récepteurs couplés aux protéines G (RCPG). Leur activation entraîne l'ouverture de canaux ioniques ou module l'activité d'enzymes membranaires ou intracellulaires. L'action des monoamines est achevée par leur recapture puis leur recyclage ou leur dégradation soit dans le neurone soit dans les cellules gliales à proximité. Deux enzymes sont primordiales dans la dégradation des monoamines, la catéchol-O-methyltransferase (COMT) et les monoamines oxydases (MAO). L'hypothèse d'une perturbation du système monoaminergique dans la dépression est soutenue par l'augmentation des niveaux synaptiques des monoamines lors d'un traitement antidépresseur (Willner et al., 2013).

IV.B.1.LA NORADRENALINE

La synthèse de NA a lieu majoritairement dans des neurones dont les corps cellulaires se trouvent au niveau du Locus Coeruleus. La NA est une catécholamine, elle est issue de la synthèse de la DA à partir de la tyrosine (*Figure 4*). Les neurones NA projettent du Locus Coeruleus vers l'hippocampe, le cortex enthorinal, le thalamus et le néocortex (Dermietzel., 2007). La NA possède différents types de récepteurs adrénergiques classés en 3 familles distinctes : $\alpha 1$, $\alpha 2$ et β . Ce sont tous des RCPG. Plusieurs études ont démontré l'implication du système noradrénergique dans la pathologie dépressive. Une étude montre une diminution des taux du MHPG (3-Methoxy-4hydroxyphenylglycol, qui est un métabolite de la NA) dans le liquide cérébrospinal (LCS) et dans les urines de patients dépressifs (Schatzberg, 1995). D'autres travaux ciblant les récepteurs noradrénergiques ont mis en évidence une diminution de la réponse aux agonistes, suggérant une diminution de la densité en récepteurs noradrénergiques au niveau central. Ces résultats ont été confirmés par des études en *post-mortem* mettant en évidence une baisse du nombre de récepteurs noradrénergiques dans différentes aires cérébrales (Klimek V and Stockmeier CA, 1999). Enfin, l'augmentation pharmacologique des taux de NA au niveau central aurait un effet antidépresseur



Figure 4 : Synthèse des catécholamines (Noradrénaline, Dopamine et Adrénaline).

La Tyrosine est transformée en L-Dihydroxyphénylalanine (DOPA) par la Tyrosine Hydroxylase. La DOPA est ensuite convertie en dopamine par la DOPA décarboxylase. La dopamine peut être convertie en Noradrénaline par la dopamine- β -hydroxylase. Enfin, l'adrénaline est obtenue après méthylation de l'amine primaire de la noradrénaline par la phentolamine-méthyltransférase.

IV.B.2.LA DOPAMINE

La DA est une catécholamine, sa synthèse se fait à partir de la tyrosine (*figure 4*). La DA est principalement synthétisée dans les neurones de la substance noire et de l'aire tegmentale ventrale. Les neurones dopaminergiques de la substance noire projettent vers le striatum alors que ceux de l'aire tegmentale ventrale projettent majoritairement vers le noyau accumbens et le cortex préfrontal (Oades, 1986). La DA est impliquée dans les circuits de la récompense ; son déficit est associé à l'anhédonie et la diminution de la motivation observées chez les personnes dépressives (Moret and Briley, 2011). Les récepteurs dopaminergiques sont des RCPG. Ils sont classés en 2 groupes : D1-Like et D2-Like, associés aux protéines Gs et Gi, et donc respectivement associés à une activation et une inhibition.



Figure 5 : Circuits des monoamines impliqués dans la dépression.

A : Noradrénaline, B : Dopamine, C : Sérotonine, D : Superposition des 3 circuits.

Différentes études ont souligné le rôle du système dopaminergique dans la pathogenèse de la dépression. La concentration de DA pourrait être altérée comme le suggère une étude réalisée sur une cohorte de patients dépressifs montrant une diminution de la concentration d'acide homovanillique, un produit issu de la métabolisation de la DA, dans le LCS (Willner, 1995). De même, chez des patients dépressifs, l'expression des récepteurs dopaminergiques au niveau central pourrait être diminuée car ils sont moins sensibles à l'injection d'agonistes dopaminergiques que des sujets sains (Post RM, 1978). L'augmentation pharmacologique de la DA dans le cerveau a un effet antidépresseur et à l'inverse l'utilisation d'inhibiteurs de la biosynthèse des catécholamines induit des symptômes dépressifs (Pitchot W, 2001). Enfin, un grand nombre de personnes atteintes de la maladie de Parkinson - une maladie neurodégénérative caractérisée par la destruction des neurones à dopamine de la substance noire du cerveau - souffrent de dépression (Yapici Eser et al., 2017), renforçant l'hypothèse d'une implication de la DA dans le développement de troubles dépressifs.

IV.B.3. LA SEROTONINE

Dans le système nerveux central, la première source de sérotonine se trouve au niveau du noyaux du raphé. Les neurones sérotoninergiques projettent du raphé vers les noyaux caudés, le putamen, le pallidum, l'amygdale, le prosencéphale limbique et le néocortex (Steinbusch, 1981). En périphérie, la 5-HT est synthétisée au niveau de l'intestin, dans les cellules entérochromaffines. La 5-HT est produite à 80% dans les intestins et à 20% dans le système nerveux central. Elle est synthétisée à partir du tryptophane (TRP) (*figure 6*), qui est un acide aminé essentiel uniquement apporté par l'alimentation. La 5-HT possède de nombreux récepteurs, ils sont classés dans 7 familles allant du 5-HT1 au 5-HT7. Parmi ces 7 familles, seule la famille 5-HT3 appartient aux récepteurs ionotropiques, les autres sont des RCPG.

Depuis plus de 50ans, l'efficacité d'utilisation des Inhibiteurs sélectifs de la recapture de la sérotonine ISRS (**Box1**) dans le traitement de la dépression confirme l'implication du système sérotoninergique dans la dépression. Des travaux ont mis en évidence qu'une diminution de l'apport nutritionnel en TRP induisait des symptômes dépressifs chez des patients traités par antidépresseurs (Sánchez-Villegas A, 2009). D'autres travaux ont permis d'incriminer la 5-HT dans la pathogenèse de la dépression.


Par exemple, il a été observé une diminution de la concentration d'un métabolite de la 5-HT, le 5-HydroxyIndole Acétique (5-HIAA) au niveau du LCS de patients dépressifs (Maes, 1995). De plus, une diminution de la liaison du récepteur 5-HT1a a été mise en évidence par des techniques d'imagerie (Scanner) ou en post-mortem, traduisant des altérations au niveau du récepteur 5-HT1A (Lanzenberger et al., 2013).

du

5-

en

Malgré cela, l'hypothèse monoaminergique à elle seule ne suffit pas à expliquer l'origine de la dépression. En effet, de nombreuses preuves incriminant d'autres facteurs ont été mises en évidence. Par exemple, si les ISRSs augmentent les niveaux de 5-HT au niveau de la fente synaptique en quelques heures, ils ne conduisent à des effets bénéfiques qu'après plusieurs semaines (environ 4) d'administration quotidienne (Manji HK, 2001). De plus, les différents antidépresseurs peuvent induire une dépendance et sont associés à de nombreux effets indésirables. La prise d'antidépresseurs nécessite parfois une surveillance stricte du régime alimentaire et le contrôle de la prise d'autres médicaments. De plus, l'inefficacité totale ou partielle des traitements pharmacologiques (box 1) chez certains patients (plus de 30%) souligne l'existence d'autres facteurs dans le développement des troubles dépressifs. Depuis les 30 dernières années, la dépression est considérée comme une pathologie multifactorielle (Ortega Millán A, 1981). C'est pourquoi la recherche d'autres facteurs génétiques ou environnementaux s'est accentuée. Une meilleure compréhension des différents facteurs impliqués dans la pathogenèse de la dépression permettrait d'améliorer considérablement la prise en charge et le traitement des patients.

Box 1. Les traitements antidépresseurs pharmacologiques

La classe pharmacologique des antidépresseurs repose principalement sur leurs mécanismes d'action qui sont hétérogènes. Cependant leur finalité est d'augmenter la neurotransmission au niveau du SNC, en inhibant soit la dégradation ou la recapture des NTs soit en ciblant les récepteurs synaptiques.

1. Les inhibiteurs de la recapture de la NA et de la 5-HT : Les tricycliques (TCA) :

Ces AD dérivent tous d'une seule et unique molécule : l'imipramine. Nommés ainsi du fait de leur structure, ces AD bloquent la recapture de la NA et de la 5-HT sans effet sur les autres étapes du métabolisme de ces amines. Ces sont les AD de référence dans la prise en charge des dépressions sévères. Toutefois, ces antidépresseurs présentent fréquemment des effets indésirables liés aux effets sur les systèmes de neurotransmission de la dopamine, l'histamine et de l'acétylcholine. lls induisent des effets neuropsychiques (délires, confusion, saute d'humeur), atropiniques (sécheresse buccale, constipation), cardio-vasculaires (arythmies) et endocriniens (troubles sexuels). Exemple : L'imipramine ou la Doxepine

2. Les inhibiteurs de la monoamine oxydase (iMAOs) :

La monoamine oxydase (MAO) est une enzyme intracellulaire, retrouvée sur la membrane des mitochondries dans le système nerveux mais également dans le foie et les intestins. On distingue 2 formes de MAO, la MAO-A spécifique de la NA et de la 5-HT et la MAO-B spécifique de la phénylethylamine.

Les irréversibles et non sélectifs (IMAO)

Ils inhibent les 2 enzymes MAO et d'autres enzymes du métabolisme pendant plusieurs semaines (3/4) ce qui induit de forts effets indésirables comme de la tachycardie, des bouffées de chaleur, une constipation, des insomnies, des céphalées sévères et des troubles de l'humeur. Les contre-indications sont nombreuses et les effets inhibiteurs sont prolongés même après arrêt du traitement. C'est l'une des raisons pour lesquelles ces antidépresseurs ne sont presque plus prescrits. *Exemple : L'iproniazide*

Les réversibles et sélectifs (IMAO-A)

Ils ont été développés après la découverte des 2 formes de MAO. Ils sont réversibles et spécifiques de la MAO-A, réduisant considérablement les effets indésirables. Ils provoquent uniquement des troubles digestifs et des céphalées. Leur effet antidépresseur est dépourvu d'effet sédatif, rendant son efficacité comparable à celle des TCA. *Exemple : le moclobemide*

3. Les inhibiteurs sélectifs de la recapture de la sérotonine (ISRS) :

Les ISRS ciblent également la neurotransmission. Cependant ils ont moins d'effets indésirables que les TCA et les IMAOs et tout en étant efficace sur une plus grande proportion de patient. S'ils sont sélectifs du système de recapture de la 5-HT (SERT) ils présentent néanmoins des effets sur les autres systèmes de neurotransmission. C'est pourquoi quelques effets indésirables leur sont associés comme des troubles digestifs et de la libido. L'arrêt de la prise d'ISRS doit être progressive pour éviter un syndrome de sevrage. *Exemple : la fluoxetine ou la paroxétine*

4. Les antagonistes de la recapture de la sérotonine et de la noradrénaline (ISRSN) :

Leur action est similaire à celle des TCA. Ils inhibent à la fois la recapture de la 5-HT et de la NA avec des effets sérotoninergiques qui sont moins importants que ceux des ISRS. Leur efficacité est comparable aux ISRS et les effets indésirables sont moindres (troubles digestifs et parfois insomnie).

Exemple : le minalcipran et la venlafaxine

5. Les tétracycliques :

Leur mécanisme d'action ne cible pas la régulation de la concentration des neurotransmetteurs, mais l'activité de leur récepteur en inhibant l'effet de la sérotonine. Ce sont principalement des antagonistes des récepteurs α 2-adrénergiques ou sérotoninergiques (5-HT2 et 5-HT3). Ils sont d'ailleurs souvent utilisés en complément des ISRS et ISRSN et présentent peu d'effets secondaires.

Exemple : la miansérine et la mirtazapine

6. Les antidépresseurs multimodaux/multicibles :

Ils ont une action multimodale comme la Vortioxetine qui inhibe le SERT et est un antagoniste des récepteurs $5-HT_{3-7-10}$, un agoniste partiel du $5-HT_{1B}$ et agoniste du $5-HT_{1A}$. Ils peuvent également avoir une action multicibles comme l'Agomélatine qui est un agoniste des récepteurs de la mélatonine et antagoniste des récepteurs $5-HT_{2C}$.

IV.C.L'AXE HPA

La capacité de l'organisme à répondre aux nécessités environnementales et à s'adapter à des événements stressants imprévus est sous la dépendance d'un système particulier : l'axe hypothalamo-hypophyso-surrénalien ou axe HPA pour « Hypothalamic-Pituitary-Adrenal » (Manji HK, 2001). L'axe HPA permet l'intégration de signaux sensoriels au niveau du système nerveux central. Cette intégration conduit à la coordination des réponses comportementales, autonomes et endocrines permettant le maintien de l'homéostasie.

IV.C.1. DEFINITION

L'activation de l'axe HPA dans un contexte physiologique se fait de manière autonome, selon un rythme circadien, mais également en réponse à des changements de l'homéostasie induits par exemple par le manque de sommeil ou un besoin en glucose. De plus, l'exposition à un stress, qu'il soit physique (changement homéostatique comme une hypoxie, une hémorragie ou un changement de température) ou bien psychologique (peur ou stress social) engendre une forte activation de l'axe HPA (Tsigos C, 2002).



En condition physiologique, un stimulus stressant (physique ou psychologique) provoque la libération de corticolibérine (ou CRH), une neurohormone produite par les neurones du noyau paraventriculaire (PVN) de l'hypothalamus. La CRH stimule au niveau de l'hypophyse la libération dans la circulation sanguine d'ACTH (Adreno Corticotropic hormone) qui induit la synthèse des corticostéroïdes par les glandes surrénales et leur sécrétion dans la circulation sanguine (*Figure 7*). Le corticostéroïde le plus important chez l'Homme est le cortisol, son équivalent chez le rongeur est la corticostérone.

Les corticostéroïdes – ou glucocorticoïdes (GCs) - agissent sur leurs tissus cibles en se liant à 2 types de récepteurs nucléaires retrouvés en périphérie et dans le cerveau : les récepteurs de type I (récepteurs aux minéralocorticoïdes, MR) et de type II (récepteurs aux glucocorticoïdes, GR). Dans le cerveau, les MR sont majoritairement retrouvés au niveau de l'hippocampe et de l'amygdale tandis que les GR sont ubiquitaires (Joels et al., 2008). Les MR ont une affinité pour les GCs environ 10 fois supérieure à celle des GR. Etant donné ces affinités, les GCs se lient majoritairement aux MR lorsqu'ils sont sécrétés en faible quantité alors que la saturation des GR n'a lieu que lors d'hypersécrétion des GCs (après un stress ou pendant la phase active du rythme circadien par exemple). Ainsi, la liaison des GCs aux GR produit la plupart des effets physiologiques connus permettant la réponse à un stress. Cette réponse rassemble les adaptations psychologiques, biologiques et comportementales. Malgré leur distribution différente dans le cerveau, les MR et GR sont exprimés dans l'hippocampe, l'hypophyse et l'hypothalamus où ils contribuent à la régulation de l'activité de l'axe HPA. En effet, à partir d'un certain seuil, l'augmentation de la concentration plasmatique des GCs exerce un rétrocontrôle négatif sur l'axe HPA. Cette inhibition se produit au niveau de l'hippocampe et de l'hypothalamus où les GCs inhibent la sécrétion de CRH et au niveau de l'hypophyse où ils inhibent la sécrétion d'ACTH, permettant un retour à des taux basaux de GCs au bout d'un certain temps. L'activité de l'axe HPA est donc sujette à un contrôle étroit afin de maintenir une certaine homéostasie des GCs et d'assurer une adaptation au stress (Oitzl MS, 1997). Cependant un stress chronique sollicitant exagérément l'axe HPA peut conduire à des dysfonctionnements comme ceux observés chez les patients souffrant de dépression (Anacker et al., 2011).

IV.C.2. DANS LA DEPRESSION

Plus de 50% des personnes atteintes de dépression présentent des anomalies de l'axe HPA et le pourcentage atteint 80% concernant les personnes souffrant de dépression sévère. Chez les

personnes dépressives, le rétrocontrôle de l'axe HPA est altéré. Un stress prolongé provoque une augmentation de la concentration de GCs et une surexposition aux corticoïdes qui conduit à une diminution de la sensibilité des GR au niveau de l'hippocampe. Cette désensibilisation provoque une levée de l'inhibition de l'hippocampe sur l'axe HPA et donc une augmentation des GCs circulants (Stetler and Miller, 2011). Cette défaillance du rétrocontrôle conduit à une hypercortisolémie chez plus de la moitié des patients déprimés (Zunszain et al., 2011). L'excès de GCs cause des dommages au niveau des neurones hippocampiques, inhibe la neurogenèse et conduit plus spécifiquement une perte des épines dendritiques (Czeh and Lucassen, 2007). De plus, une hypertrophie de l'hypophyse et des glandes surrénales est observée chez les personnes atteintes de dépression (Pariante, 2009). D'autres études ont confirmé des altérations de l'axe HPA dans la pathologie dépressive. Par exemple, une augmentation de la concentration en CRH et une diminution de l'expression des récepteurs au CRH dans le cerveau ont été mises en évidence.

Si les traitements pharmacologiques actuels ont pour cible principale certains systèmes de neurotransmission, leur effet peut être dépendant de l'axe HPA. Par exemple, des patients ne répondant pas à la fluoxetine ont des taux d'ACTH supérieurs à la normale alors que ceux répondant aux traitements n'ont pas de différence dans leur taux d'ACTH en comparaison aux contrôles (Young et al., 2004). Cependant, la prise d'antidépresseurs normalise les niveaux de GCs dans la circulation sanguine (Pariante, 2009).

D'autres constats ont permis de renforcer la théorie des GCs pour expliquer l'établissement de la dépression. En effet, la dérégulation de l'axe HPA est observée dans la maladie de Cushing. Cette pathologie décrite en 1932 par Harvey Cushing est caractérisée par un excès de sécrétion de cortisol par les glandes surrénales. Plus de 60% des patients atteints de ce syndrome souffrent également de dépression. Aujourd'hui les conditions de l'hyper activation de l'axe HPA dans la dépression ne sont pas clairement identifiées. Il est tout de même possible d'associer hyperactivité de l'axe HPA à un certain nombre de symptômes de la dépression, mais également à la durée de la pathologie et aux séquelles somatiques observées. Cette nouvelle hypothèse concernant l'axe HPA a permis de faire évoluer la recherche de nouvelles cibles contre la dépression, en envisageant de cibler la fonction des GR et la synthèse de cortisol (Holsboer, 2000). Les traitements développés dans ce but se sont jusqu'à présent révélés inefficaces (Blasey et al., 2009) (Kling MA, 2009), soulignant l'intérêt de rechercher d'autres approches pour cibler l'axe HPA.

IV.D. LA NEUROPLASTICITE

IV.D.1. DEFINITION

La neuroplasticité, ou plasticité neuronale est la capacité du cerveau à remodeler ses connexions, remanier ses circuits nerveux, remplacer des neurones, sous l'action de certaines voies de signalisation et de l'expression de gènes comme les neurotrophines, des facteurs de croissance stimulant la synaptogenèse et la neurogenèse. La neurogenèse hippocampique est active tout au long de la vie chez l'Homme. Chez le rongeur, il existe 3 régions du cerveau où la neurogenèse adulte a été démontrée. La zone sous-granulaire (SGZ) (*Figure 8*) du gyrus denté de l'hippocampe, la zone sous-ventriculaire (SVZ) du ventricule latéral et plus récemment l'hypothalamus (Kokoeva et al., 2005; Migaud et al., 2010). Les nouveaux neurones de la SVZ migrent jusque dans le bulbe olfactif où ils deviendront des interneurones, ceux de la SGZ migrent dans la couche granulaire du gyrus denté pour devenir des neurones matures (Samuels BA, 2011).



Figure 8 : La neurogenèse hippocampique.

La neurogenèse hippocampique a lieu dans la SGZ. Les neurones immatures vont ensuite migrer jusqu'à la GCL (Granule Cells Layer). La combinaison de plusieurs marqueurs est utilisée en immunohistochimie pour différencier les différents stades cellulaires d'après Miller, 1988 #725. Les cellules progénitrices en prolifération sont *identifiables par le BrdU (5-bromo-2'-deoxyuridine)* seul, les neurones en cours de maturation par le *double marquage BrdU + DCX (DoubleCortine) et les* neurones matures par la colocalisation BrdU + NeuN (Neuronal Nuclei).

Différents facteurs biologiques peuvent réguler positivement ou négativement la neurogenèse chez adulte. Parmi ceux la régulant positivement, on retrouve des facteurs (neuro)trophiques ou encore des neurotransmetteurs. Les facteurs neurotrophiques sont décrits dans l'étiologie de la dépression depuis plus de 20 ans (Ronald S. Duman, 1997). Dans un premier temps, ces facteurs étaient uniquement décrits pour réguler la croissance et la différentiation neuronale durant le développement, cependant ils sont aujourd'hui reconnus comme des régulateurs de la plasticité et de la survie des neurones et de la glie chez l'adulte. Dans la famille des facteurs de croissance contrôlant la plasticité cérébrale, les premiers mis en évidence ont été l'Epidermal Growth Factor (EGF) et le Fibroblast Growth Factor (FGF-2) (Reynolds and Weiss, 1996) pour leur

capacité à promouvoir la prolifération des cellules progénitrices neurales. Depuis, l'Insuline Growth Factor (IGF) a été décrite pour stimuler la neurogenèse chez le rat adulte (Aberg et al., 2000). Le Vascular Endothelial Growth Factor (VEGF) qui est une protéine angiogénique, a des propriétés neurotrophiques : son administration intracérébroventriculaire (ICV) à des rats adultes stimule a neurogenèse hippocampique (Jin et al., 2002). De plus, sa sécrétion étant induite par plusieurs classes d'antidépresseurs, le VEGF pourrait participer aux mécanismes par lesquels ces traitements augmentent la neurogenèse (Fournier and Duman, 2012). Enfin, l'administration in vivo de Brain-Derived Neurotrophic Factor (BDNF) ou d'un adénovirus codant pour le BDNF augmente la neurogenèse chez un modèle de rat d'Accident Vasculaire Cérébral (AVC) (Larsson et al., 2002). A l'inverse, la réduction de la sécrétion du BDNF (par mutation génétique) diminue la survie des neuroblastes (Chen et al., 2008). Ces molécules, agissent localement sur les cellules et en synergie avec d'autres signaux moléculaires ou cellulaires dont les neurotransmetteurs. Des projections dopaminergiques et sérotoninergiques sont retrouvées au niveau du gyrus denté. Différents travaux ont montré qu'une activation des récepteurs dopaminergiques (Van Kampen et al., 2004) ou sérotoninergiques (Banasr et al., 2004) soit par de la DA ou 5HT, respectivement, soit par des agonistes, induisait la neurogenèse. D'autres neurotransmetteurs sont impliqués dans la stimulation de la neurogenèse comme l'acétylcholine (Mohapel et al., 2005) et le glutamate (Baskys et al., 2005). A l'inverse, l'activation des récepteurs de l'acide gamma-aminobutyrique (GABA) limite la prolifération en bloquant le cycle cellulaire des neuroblastes (Liu et al., 2005). L'Oxyde Nitrique (NO) a également un effet inhibiteur sur la neurogenèse, en partie en inhibant la sécrétion d'EGF, son action pouvant être bloquée par l'utilisation d'inhibiteur de la NO synthase (Torroglosa et al., 2007). De plus, l'inhibition de la neurogenèse peut être induite par des facteurs environnementaux comme le stress (Tanapat et al., 1998), qui est également un facteur de déclenchement de la pathologie dépressive.

IV.D.2. DANS LA DEPRESSION

L'hypothèse de la neurogenèse suggère que la dépression serait en partie causée par une diminution de la capacité du cerveau à produire de nouveaux neurones (Jacobs BL, 2000). Cette théorie s'est construite sur le fait que les patients dépressifs présentent une diminution du volume de l'hippocampe par rapport à des sujets sains (Sheline et al., 1996). Cette atrophie peut être en partie reversée par un traitement antidépresseur (Matthew J. Kempton, 2011). Ces différentes observations n'ont pas permis de clarifier définitivement les raisons de cette perte de volume. Cependant deux hypothèses permettraient toutefois de l'expliquer.

La première hypothèse est que cette réduction de volume serait liée au stress et à l'effet néfaste d'une trop grande quantité de glucocorticoïdes sur le cerveau. En effet, le stress induit une élévation du taux des corticoïdes induisant un remodelage des structures cellulaires, une rétraction des dendrites, une diminution de la neurogenèse et l'arrêt du cycle cellulaire dans le gyrus denté, voire la perte des cellules gliales. Par ailleurs, l'utilisation d'un antagoniste des GR lève l'inhibition de la neurogenèse induite par la corticostérone chez le rat (Mayer et al., 2006). Dans le modèle murin de dépression basé sur une administration chronique de corticostérone, une diminution de la neurogenèse qui peut être reversée par l'administration de fluoxetine est observée (David et al., 2009). Une ablation des glandes surrénales chez le rat permet d'augmenter le nombre de nouveaux neurones au niveau du gyrus denté (Cameron and Gould, 1994), confirmant le rôle régulateur de l'axe HPA sur la neurogenèse hippocampique. Parallèlement à l'hyperactivation de l'axe HPA, l'hypothèse neurotrophique permettrait également d'expliquer l'arrêt de la neurogenèse chez les patients dépressifs.

Cette théorie est basée sur le fait qu'une déficience en facteurs neurotrophiques contribuerait aux dommages hippocampiques observés chez les patients dépressifs et qui pourraient être reversés par les traitements antidépresseurs stimulant la production de facteurs neurotrophiques. Par exemple, chez la souris, un stress prolongé induisant un état dépressif est associé à une diminution du BDNF dans le cerveau (Berry et al., 2012). De même, la sécrétion de BDNF est diminuée lorsque la concentration en glucocorticoïdes augmente (Sapolsky, 2000). A l'inverse, sa sécrétion au niveau de l'hippocampe est augmentée par des traitements chroniques aux antidépresseurs chez les rongeurs (les TCA et les ISRS) (Balu et al., 2008). Cependant, la genèse de souris portant une invalidation conditionnelle du gène codant pour le BDNF a révélé que sans traitement antidépresseur, ces souris KO n'ont pas une sensibilité exacerbée à la dépression comparée au souris sauvages. En revanche, si un traitement antidépresseur est efficace chez les souris sauvages, il ne l'est pas chez les souris BDNF KO. Ceci suggère que la diminution chez l'adulte du BDNF n'est pas suffisante pour déclencher une dépression, mais que celui-ci joue un rôle important dans l'efficacité de certains traitements antidépresseurs (Monteggia et al., 2007). De plus, les souris ayant une déficience au niveau d'un des promoteurs du BDNF, le promoteur-IV présentent un phénotype dépressif (Sakata et al., 2010). Ainsi, l'inhibition de la neurogenèse par diminution de l'expression de BDNF pourrait participer à l'atrophie observée au niveau de l'hippocampe chez les individus dépressifs. Par ailleurs, ces corrélations sont également observées chez l'Homme. Il existe notamment une corrélation entre l'augmentation du BDNF par les antidépresseurs au niveau de l'hippocampe et en périphérie, avec l'apparition des effets bénéfiques du traitement (Deuschle et

al., 2013). Une étude a montré une diminution de BDNF et de son récepteur (TrkB) dans l'hippocampe et le sang de patients souffrant de dépression majeure (Castren and Rantamaki, 2010). De plus, une augmentation de la prolifération neuronale au niveau de l'hippocampe est observée chez des patients traités par des antidépresseurs (ISRS et TCA) (Boldrini et al., 2009). En plus d'être associé à des dysfonctionnements de l'hippocampe, l'élévation des taux de GCs sanguins induit une augmentation de l'expression des cytokines pro-inflammatoires ce qui contribue au maintien de l'état inflammatoire aussi bien en périphérie qu'au niveau du système nerveux central (Munhoz et al., 2010).

IV.E. L'INFLAMMATION

La relation entre les maladies psychiatriques et le système immunitaire a été observée pour la première fois par un psychiatre autrichien : Julius Wagner-Jauregg. En 1887, il observa que chez des patients souffrant de « paralysie générale », qui est une atteinte neurologique tardive de la syphilis - une infection sexuellement transmissible contagieuse, due à une bactérie - les poussées de fièvre amélioraient leur état mental. Il était alors convaincu qu'une « thérapie par la fièvre » pouvait être efficace dans le traitement de la neurosyphilis. Trente ans plus tard, Wagner-Jauregg rencontra un patient souffrant de malaria - une maladie infectieuse, due à un parasite - dont le symptôme principal est l'apparition d'une fièvre récurrente. Il injecta le sang de ce patient à 9 autres patients atteints de neurosyphilis, qui développèrent tous la malaria. Suivant cette infection, 1 des patients mourut de la malaria, 2 n'eurent aucun changement, 3 virent leur état s'améliorer et les 3 derniers furent guéris des 2 pathologies par la forte fièvre provoquée par l'inoculation du parasite de la malaria. La fièvre étant une des premières réponses inflammatoires, ces résultats suggèrent l'existence d'un lien entre le système immunitaire et les fonctions cérébrales. Au vu de ces résultats, il continua sa « thérapie par la malaria » sur des centaines de personnes atteintes de « paralysie générale » furent traitées dans le monde (Wagner-Jauregg and Bruetsch, 1946). En attendant l'avènement de la pénicilline, cette thérapie par la fièvre était un pilier thérapeutique contre la paralysie générale. Julius Wagner-Jauregg reçut le Prix Nobel de médecine en 1927 pour « découverte du potentiel thérapeutique de la malaria pour traiter les paralysies associées à la démence » (Raju, 1998). Il a posé les bases dans la considération des maladies psychiatriques comme étant des maladies physiques et surtout leur interaction avec le système immunitaire, qui demeurent pertinentes à ce jour.

Le cerveau a été considéré pendant longtemps comme un site immuno-privilégié (Medawar, 1948). Il possède son propre système de défense qui se met rapidement en alerte en cas de lésion ou d'entrée d'un agent infectieux et est protégé par la barrière hémato-encéphalique (BHE) qui limite les échanges neuro-immunologiques de part et d'autre de celle-ci. Néanmoins le cerveau contient des cellules immunitaires comme les macrophages, au niveau des méninges et des plexus choroïdes (Dantzer et al., 2008). La perturbation de la BHE permet aussi aux cellules hématopoïétiques de quitter la circulation sanguine pour pénétrer le parenchyme cérébral. De plus, une étude parue en 2015 dans le journal *Nature* a mis en évidence un système de vaisseaux lymphatiques bordant le sinus veineux permettant ainsi le passage de cellules immunitaires (Louveau et al., 2015). Les mécanismes cellulaires contrôlant les entrées-sorties des cellules immunitaires du SNC restent cependant peu documentées.

IV.E.1. LA REPONSE INFLAMMATOIRE LOCALE ET SYSTEMIQUE EN PERIPHERIE

Avant de décrire l'état inflammatoire observé au niveau du cerveau chez des patients souffrant de dépression, il est important de comprendre le fonctionnement du système immunitaire et de la réponse inflammatoire en général. La réponse inflammatoire correspond aux réactions dédiées à la lutte contre une infection, une blessure ou une lésion, c'est-à-dire : l'entrée d'un pathogène (virus, bactérie...) dans l'organisme. La fonction du système immunitaire est de maintenir l'intégrité de l'organisme en discriminant le « soi » du « non-soi ». Il doit donc d'une part reconnaître et tolérer les cellules de l'organisme (du « soi ») et éliminer les pathogènes portant des antigènes du « non-soi ». La réponse immunitaire est caractérisée par l'activation de 2 composantes qui agissent en synergie : l'immunité innée et l'immunité adaptative.

IV.E.1.i. L'IMMUNITE INNEE ET ADAPTATIVE

L'immunité innée

C'est la première ligne de défense observée lors d'une agression. Son action est immédiate et nonspécifique, c'est à dire qu'elle ne nécessite pas de contact préalable avec l'agent pathogène. Les principaux types cellulaires de l'immunité innée sont les cellules phagocytaires mononuclées (monocytes et macrophages) ou polynuclées (neutrophiles) qui sont capables de capturer et détruire les éléments du « non-soi » par phagocytose. Ces cellules sont compétentes pour développer une réponse innée impliquant des récepteurs de la famille des Pattern Recognition Receptors (PRR). Parmi ces récepteurs se trouve le Toll-Like Receptor (TLR). Lors d'une blessure ou d'une infection, le TLR reconnait soit des motifs moléculaires associés à des agents infectieux ; « Pathogen-associated molecular patterns » (PAMP) (Janeway, 1989), soit des tissus ou cellules endommagés ; « Danger-associated molecular patterns » (DAMP) (Matzinger, 2002). Le système immunitaire inné peut donc reconnaître à la fois des pathogènes exogènes mais également des signes de dangers endogènes issus de cellules endommagées. Quelques minutes suffisent après l'identification du PAMP ou DAMP pour déclencher une réponse immunitaire. Le premier rôle de cette réponse est d'éliminer les pathogènes ou cellules lésées par phagocytose puis de présenter les antigènes issus des pathogènes aux cellules impliquées dans l'immunité adaptative : les lymphocytes (Bruce Alberts, 2002).

L'immunité adaptative

Lorsque l'infection perdure et n'est pas résolue par la réponse innée, la réponse immunitaire adaptative prend le relai. Cette réponse est spécifique d'un antigène et peut être qualifiée soit de réponse humorale soit de réponse cellulaire. En périphérie, la réponse humorale est orchestrée par les lymphocytes B, ils sont capables de produire des anticorps spécifiques des antigènes induisant ainsi la destruction du pathogène et la mise en place d'une mémoire immunitaire. La réponse cellulaire est quant à elle réalisée par les lymphocytes T cytotoxiques (Tc CD8+) et auxiliaires (Th, CD4+). Les Tc sont capables d'éliminer directement les cellules infectées alors que les Th vont sécréter des protéines solubles activant d'autres cellules immunitaires (Medzhitov, 2007).

IV.E.1.ii. LA REACTION INFLAMMATOIRE LOCALE ET SYSTEMIQUE

Aulus Cornelius Celsus décrivit les 4 signes de l'inflammation dès le 1er siècle avant JC : *rubor et tumor cum calor et dolor* (rougeur et tuméfaction avec chaleur et douleur) et en 1858 Rudolph Virchow ajouta le 5ème signe : *functio laesa* (perte de fonction) dans la description. Au niveau **local**, la réponse inflammatoire se caractérise par une vasodilatation, une perméabilisation des capillaires sanguins, un flux sanguin augmenté et un recrutement des leucocytes (lymphocytes, cellules phagocytaires mono- et poly-nucléées). La liaison de ces cellules aux antigènes de l'agent étranger induit d'abord une phagocytose puis la synthèse et libération de molécules inflammatoires (chimiokines et cytokines, **Box2**). La réaction inflammatoire **systémique** correspond à l'ensemble des réponses de l'organisme permettant de limiter la propagation de l'agent infectieux. Les cytokines libérées localement vont être distribuées dans tout l'organisme grâce à la circulation sanguine et entraîner des modifications systémiques. On retrouve parmi ces modifications une augmentation de l'hématopoïèse, une diminution de la néoglucogenèse et de la concentration plasmatique en nutriments et en protéines. Toutes ces modifications métaboliques, avec la perte

de poids associée, seraient un processus d'adaptation de l'individu afin de diminuer l'énergie nécessaire à la recherche de nourriture en conséquence de l'inflammation (Cuthbertson, 1982). Cette théorie fait d'ailleurs écho à celle du « sickness behavior » ou « comportement lié à la maladie » que je détaillerai dans la prochaine partie.

IV.E.1.LA NEUROINFLAMMATION

Comment l'inflammation en périphérie peut-elle influencer le fonctionnement cérébral ? Alors que le cerveau a longtemps été considéré comme un organe immunologiquement privilégié grâce à la BHE particulièrement imperméable aux cellules immunes, des études de neuroimmunologie ont montré qu'une infection est souvent associée à des changements comportementaux regroupés sous le terme de « comportement lié à la maladie » (Sickness Behavior) (Dantzer, 2001).

IV.E.1.i. DEFINITION

L'état de « sickness behaviour » correspond entre autres à un ensemble des symptômes tels la fatigue, l'anorexie, le manque de motivation, la sensibilité à la douleur, le manque de sociabilité et l'humeur dépressive. Cet état de maladie correspond à une réorganisation des priorités de l'organisme afin de combattre rapidement l'infection, d'ailleurs il se dissipe très rapidement après la guérison. L'ensemble de ces fonctions comportementales sont contrôlées par le cerveau suggérant qu'il existe un dialogue entre la réaction immunitaire se produisant en périphérie et le SNC (Dantzer et al., 2008). Pourtant, les cytokines sont des protéines larges qui ne sont pas capables de traverser passivement la BHE pour induire directement une réponse immunitaire au niveau central. Plusieurs mécanismes ont été décrits pour expliquer le lien entre les cytokines produites en périphérie et celles qui sont produites au niveau du SNC (*Figure 9*).

Au niveau du SNC, ce sont les astrocytes et la microglie qui participent à la réponse immunitaire. Lorsque le SNC est infecté, ou lorsque des cytokines passent dans le cerveau, la microglie activée va d'une part exprimer des molécules de surfaces et d'autre part libérer des cytokines et des chimiokines. Cette réaction va induire le recrutement des lymphocytes T, des monocytes et des neutrophiles qui traversent la BHE pour atteindre le site de lésion (Olson et al., 2001) (Czigner et al., 2007). La réaction inflammatoire englobant l'activation de la microglie et des astrocytes, et la libération accrue de facteurs inflammatoires, est appelée **Neuroinflammation**.

Box 2. Les médiateurs moléculaires de la réponse inflammatoire/neuroinflammatoire

Ces médiateurs spécifiques peuvent exercer des fonctions différentes qui permettent le contrôle du processus inflammatoire. Les 2 grandes classes de médiateurs sont les chimiokines et les cytokines. Compte tenu de leur nombre important, les principaux médiateurs rencontrés lors de la neuroinflammation sont présentés ci-dessous.

1. Les chimiokines

Ce sont de petites molécules chimiotactiques, sécrétées par différents types cellulaires, qui induisent la migration des cellules immunitaires vers le site de lésion. Elles participent au recrutement des lymphocytes, macrophages et cellules dendritiques au niveau du SNC. On dénombre une 50aine de chimiokines (Laing and Secombes, 2004) et une 20aine de récepteurs associés (Bacon et al., 2002). Parmi les nombreux couples ligands/récepteurs associés aux cellules microgliales, CCL2/CCR2 et CX3CL1/CX3CR1 sont impliqués dans l'activation et la migration des cellules immunes du cerveau (Cardona et al., 2006; Cazareth et al., 2014).

2. Les cytokines

Ce sont des glycoprotéines membranaires sécrétées par des cellules immunitaires (par ex: macrophages, microglie) et non-immunitaires (astrocytes, neurones), permettant aux cellules de communiquer entre elles. Elles agissent selon différents modes d'action : autocrine, paracrine ou endocrine, par liaison à des récepteurs spécifiques. Produites lors d'une réponse inflammatoire, elles activent les cellules immunitaires et permettent leur recrutement au niveau du site de lésion (Woodcock and Morganti-Kossmann, 2013). On distingue les cytokines pro- et anti-inflammatoires.

Les cytokines pro-inflammatoires

Sécrétées quelques minutes après la lésion, elles participent au développement de la réponse inflammatoire en induisant l'expression de molécules d'adhésion et la synthèse de chimiokines, permettant ainsi la migration des cellules immunitaires (Engelhardt and Ransohoff, 2005).

L'Interleukine-1 β (IL-1 β)

Elle est majoritairement, et très rapidement sécrétée par les macrophages (en périphérie) et les cellules microgliales (SNC) (Davies et al., 1999). Sa liaison sur son récepteur, IL-1R1, induit l'activation des voies de signalisation du *Nuclear-Factor-Kappa B* (NFκB) et du *Mitogen-Activated Protein Kinase* (MAPK), conduisant à la transcription de gènes codant pour des protéines de l'immunité innée.

L'interleukine-6 (IL-6)

Elle est sécrétée par plusieurs types cellulaires, dont les leucocytes et les neurones. La voie de signalisation activée par la liaison de l'IL-6 sur son récepteur, l'IL-6R, est la voie JAK-STAT, conduisant également à la transcription de gènes cibles de l'immunité (Hunter and Jones, 2015).

Tumor Necrosis Factor- α (TNF- α)

Produit en partie par les leucocytes et astrocytes, il possède 2 types de récepteurs, le TNF-RI et le TNF-RII, dont l'activation induit des processus diamétralement opposés : la mort et la survie cellulaire. Son rôle principal réside dans le recrutement et l'activation des macrophages et des lymphocytes sur le site infectieux (Probert, 2015).

Interferon-gamma (INFγ)

Secrété par les lymphocytes T, NK, B et les cellules présentatrices d'antigène, sa liaison à son récepteur active la voie JAK-STAT, MAPK et NF κ B. l'IFN γ permet de lutter contre les infections virales, parasitaires ou bactériennes et est impliqué dans les processus d'immuno-surveillance.

Les cytokines anti-inflammatoires

Sécrétées également lors d'une lésion, ces cytokines participent au retour à un état physiologique.

L'interleukine-4 (IL-4)

Sécrétée par une partie des lymphocytes T (Th2), et par les granulocytes. L'IL-4 joue un rôle dans des fonctions immunitaires et non-immunitaires. Son récepteur, de haute affinité, est présent en faible quantité sur de nombreuses cellules comme les Lymphocytes T et B, les monocytes ou encore les cellules endothéliales. L'IL-4 qui module la production de cytokines présente généralement des propriétés anti-inflammatoires (Paul, 2015).

L'interleukine-10 (IL-10)

Produite par de nombreuses cellules, sa liaison sur son récepteur, l'IL-10R, inhibe les voies NF κ B et MAPK, bloquant ainsi l'action de cytokines pro-inflammatoires (O'Farrell et al., 1998). De plus, elle induit la sécrétion de l'antagoniste d'IL-1 β , l'IL-1Ra (Receptor Antaognist), limitant l'action de l'IL-1 β .

En concentrations physiologiques les cytokines pro-inflammatoires ont un effet trophique sur les neurones, elles augmentent la neurogenèse et améliorent les fonctions cognitives (Villanueva, 2013). Néanmoins, lorsqu'elles atteignent des concentrations élevées (en cas de pathologies) elles deviennent neurotoxiques (Bernardino et al., 2008)



<u>Figure 9 :</u> Voies d'accès des cytokines pro-inflammatoires au système nerveux central. Adapté de (Capuron and Miller, 2011)

<u>A gauche :</u> La voie humorale : Les cytokines périphériques atteignent le cerveau par certaines régions perméables de la BHE via des transports actifs mais aussi en diffusant au niveau des Organes Circumventriculaires (OCV). Les cytokines activeraient les cellules microgliales et les macrophages périvasculaires situés à proximité des zones de perméabilité. De plus, il a également été démontré que les cytokines périphériques induisent au niveau des OCV la synthèse de 2nd messagers comme les prostaglandines (PGE2) et le NO qui vont agir sur des cibles cérébrales spécifiques.

<u>A droite :</u> La voie neurale : Les cytokines périphériques atteignent des afférences nerveuses, comme le nerf vague lors d'infections abdominales ou viscérales. Ces afférences relaient l'information au niveau du cerveau via l'activation du Noyau du Tractus Solitaire (NTS) et l'Aera Postrema qui est une zone particulièrement chémosensible située en dehors de la BHE.

IV.E.1.ii. LES MEDIATEURS CELLULAIRES ET MOLECULAIRES

Rudolf Virchow découvre en 1846 une substance interstitielle au niveau du cerveau qui n'est pas nerveuse et qu'il baptise névroglie. Depuis leur mise en évidence, elles ont longtemps été qualifiées de cellules inactives du SNC, réduites au rôle de cellules nourricières des neurones. Aujourd'hui, les données de la littérature leur donnent un rôle plus important. La microglie et les astrocytes sont décrits comme étant les types cellulaires participant à la neuroinflammation, mais également comme des collaborateurs essentiels dans le développement neuronal et synaptique (Bessis et al., 2007; Clarke and Barres, 2013).

La microglie

En 1897, Ramon y Cajal publia le 1er article consacré aux « neuroglies » dans lequel il émettait l'hypothèse que ces cellules permettaient la préservation des circuits neuronaux et évitaient des contacts « inappropriés ». Il faudra attendre 1919 pour que Pío del Río-Hortega décrive précisément la microglie et les astrocytes dans l'ouvrage « El tercer elemento de los centros nerviosos » grâce à une technique de marquage au carbonate d'argent (selon (Tremblay et al., 2015)). Aujourd'hui, la microglie est largement étudiée. Il est établi qu'elle est capable d'autorenouvèlement lui permettant de maintenir son « pool » et de répondre à des demandes ponctuelles. La microglie a pour origine les précurseurs du sac vitellin, indépendamment de celles des autres cellules immunitaires douées de phagocytose (Ginhoux et al., 2010; Schulz et al., 2012). On retrouve des cellules microgliales dans tout le parenchyme cérébral. Le rôle physiologique de la microglie est le maintien des fonctions du SNC (Ransohoff and Perry, 2009; Sierra et al., 2010; Tremblay et al., 2011) ainsi que le contrôle continu de l'homéostasie cérébrale grâce à ses ramifications (Nimmerjahn et al., 2005; Ransohoff and Perry, 2009). En effet, les grandes ramifications et le petit corps cellulaire de la microglie qui sont caractéristiques de son état « nonactivé », lui permettent une couverture de contact importante pour remplir son rôle de senseur et ainsi limiter la formation de connexions synaptiques surnuméraires et d'éliminer les débris cellulaires issus de la formation des réseaux neuronaux en continu.

La microglie exprime tous les PRR identifiés à ce jour, lui offrant ainsi la possibilité de détecter toutes les perturbations de son environnement, synonymes de pathologie (Hanke and Kielian, 2011). En cas de pathologie, lorsque la microglie rentre dans un état « activé », elle adopte une forme moins ramifiée avec un grand corps cellulaire et se met à proliférer. Ces changements morphologiques sont accompagnés de changements phénotypiques appelés activation microgliale (*Figure 10*). En effet, la microglie se met à phagocyter des débris cellulaires et à exprimer certains gènes conduisant à la sécrétion de nombreuses molécules ; Parmi lesquelles, de nombreuses cytokines (pro ou anti inflammatoires), des chimiokines, des facteurs de croissances (BDNF, NGF...), des molécules neurotoxiques et des enzymes (Kreutzberg, 1996). La microglie activée exprime des marqueurs de surface comme les molécules du Complexe Majeur d'Histocompatibilité (CMH) de classe I et II et des marqueurs phénotypiques des macrophages tels F4/80, CD11b, CD68 et CD80 (Kettenmann et al., 2011) et des récepteurs aux chimiokines.



Figure 10 : Cascade d'activation de la microglie – D'après London et al., 2013

(a) La microglie résidente provient du sac vitellin et est douée d'auto-renouvèlement. (b) En condition physiologique la microglie scanne constamment son environnement grâce à ses ramifications. Elle participe à la maintenance des synapses (c) et de la neurogenèse (d) en sécrétant des facteurs de croissance (e). Après reconnaissance d'un signal de danger, la microglie se rétracte, devient ronde et active (f). Un signal court ou modéré induit une réponse neuroprotectrice de la microglie qui va phagocyter les débris (g), sécréter des facteurs de croissance et participer à la remyélinisation (h) et soutenir la régénération (i). Un signal intensif ou chronique va rendre la microglie neurotoxique. (j) Elle va produire des radicaux libres, des protéases, des cytokines pro-inflammatoires qui vont endommager l'activité neuronale. (k) Cette activation microgliale va attirer des monocytes dérivés du sang (qui peuvent devenir des macrophages in situ). (l) Ils vont sécréter des cytokines anti-inflammatoire et des facteurs associés à la résolution de la réponse immunitaire comme le récepteur Mrc1 (Mannose Receptor C-type 1) et l'arginase 1 (ARG1) et promouvoir la neuroprotection et le renouvellement cellulaire, ces fonctions ne pouvant être remplies par la microglie sous ces conditions.

L'état d'activation est dépendant du type, de la durée et de l'intensité du stimulus déclencheur. En effet, de la même façon que les macrophages, la microglie peut entrer dans différents états d'activation (Hanisch, 2013). Par souci de simplification, seuls les 2 états « majoritaires » classifiés en M1 et M2 sont présentés dans le tableau 1.

Cette plasticité permet à la microglie de s'adapter et de participer au mieux aux réponses immunitaires (Orihuela R, 2015). Il est nécessaire de noter que ces états d'activation ne sont pas des types cellulaires distincts mais qu'ils constituent les 2 pôles d'un spectre d'états entre lesquels les cellules microgliales évoluent en fonction de leur environnement. Tableau 1 : Classification des différents « états d'activation microgliale », Adapté de (London et al., 2013)

Etat	M1	M2		
Nom	Activation classique	Activation alternative : réparation	Activation alternative : régulation	
Nom alternatif		Réparation tissulaire et cellulaire	Anti-inflammatoire	
Stimulus	IFN- $oldsymbol{\gamma}$, TNF $oldsymbol{lpha}$	IL-4, IL-13	IL-10, Glucocorticoïdes	
Source stimulus	Lymphocytes Th1, Natural Killer	Lymphocytes Th2, granulocytes participants à la réponse innée	Macrophages	
Sécrétion Microglie	IL-1 β , TNF α , IL-6, IL-23 et radicaux libres oxygénés	Composants de la matrice extracellulaire, Arginase 1, Chitinase	TGF β , IL-10	
Protéines de surface	CMH II	Récepteur Mannose (CD206)	Récepteurs aux Minéralocorticoïdes	
Fonctions	Phagocytose des pathogènes, présentation des antigènes aux lymphocytes, dommages collatéraux	Réparation tissulaire et cellulaire, phagocytose, augmentation du remodelage de la matrice extracellulaire	Inhibition de l'inflammation, phagocytose	

Les astrocytes

En 1893, Michael Von Lenhossek décrivit des cellules en forme d'étoiles observées au niveau du cerveau qu'il appela astrocytes. Les astrocytes sont la plus grande fraction des cellules gliales, on compte environ 1,5 astrocytes pour 1 neurone dans le cortex humain. Ce chiffre varie en fonction de l'aire cérébrale : il y a par exemple, plus d'astrocytes dans le cortex cérébral et moins dans le cervelet. Ces cellules, d'origine neuroectodermique, ont été considérées pendant de nombreuses années comme étant la « glue » (D'ailleurs le mot *glia* vient du grec et signifie glue) qui réalisait le maintien des neurones dans le cerveau (Kuffler, 1967).

L'expansion de la recherche sur les astrocytes ces 20 dernières années a permis de leur découvrir d'autres fonctions. Les astrocytes sont notamment capables de communiquer entre eux et avec les autres cellules du SNC au travers de variations de concentration calcique intracellulaire appelées « Vagues Calciques » (Haydon, 2001). De plus, ils sont impliqués dans le traitement de l'information, qui est une fonction historiquement associée aux neurones (Nedergaard et al., 2003). Enfin, il est clairement établi aujourd'hui qu'ils participent à la redistribution du potassium pendant l'activité neuronale, au recyclage du glutamate et du GABA à la synapse suivi de la synthèse de leur précurseur, ou encore au maintien de l'intégrité de la BHE (Ransom et al., 2003). D'ailleurs, les

astrocytes font partie de la « synapse tripartite », cette synapse composée des neurones pré- et post-synaptique est aussi en interaction avec des astrocytes (Perez-Alvarez and Araque, 2013) où ils participent au recyclage des NTs. D'autres rôles leur ont été attribués plus récemment comme la régulation de la synaptogenèse et de la neurogenèse (Gomez-Casati et al., 2010). La gamme des fonctions astrocytaires connue à ce jour conduit à penser que ces cellules peuvent aussi avoir un rôle clef dans certains états pathologiques. En effet, les astrocytes sont capables de répondre rapidement aux affections du SNC, par le phénomène appelé astrogliose. Comme pour la microglie, la réponse astrocytaire dépend du type et de la durée du stimulus. Lors d'un dommage modéré ou diffus, les astrocytes deviennent de type « réactifs-hypertrophiés » alors qu'en réponse à un dommage plus sévère (ischémie ou inflammation) les astrocytes adoptent un état « réactif formant des cicatrices ». Les caractéristiques de ces 2 états sont listées dans le tableau ci-dessous.

Etat	Astrocyte réactif hypertrophié	Astrocyte réactif formant des cicatrices
Prolifération	Non	Oui
Migration	Non	Oui
Réaction	Maintien de l'homéostasie au niveau des synapses en changeant l'expression de certains transporteurs (ions et neurotransmetteurs)	Contenir l'inflammation au niveau de la zone endommagée, nettoyer les débris cellulaires, neutraliser le pathogène
Durée de la réaction	Réversible si résolution du problème	Permanente
Interaction	Identique : Neurones et vaisseaux sanguins	Nouveaux partenaires : Cellules immunitaires, fibroblastes et vaisseaux sanguins

Tableau 2 : Classification des différents états astrocytaires. D'après (Khakh and Sofroniew, 201	15)
--	-----

Médiateurs moléculaires

En plus des cytokines et des chimiokines (**box2**) il existe d'autres médiateurs moléculaires de l'inflammation comme par exemple les médiateurs lipidiques. Parmi eux, les prostaglandines (PGE2) (*Figure 9*) qui sont des composés chimiotactiques pour les macrophages qui vont induire une vasodilatation et augmenter la perméabilité des vaisseaux. Les radicaux libres sont également des produits et médiateurs de l'inflammation. Les phénomènes de phagocytose augmentent la consommation d'oxygène et donc la formation de radicaux libres oxygénés (superoxyde O2⁻, peroxyde d'hydrogène H2O2, radicaux hydroxyles OH⁻). Leur toxicité vient de leur capacité à désorganiser les membranes et favoriser la cytolyse. L'inflammation augmente l'activité de la NO synthase et donc la production de NO. Le NO a un rôle vasodilatateur et microbicide mais il peut s'avérer neurotoxique à de fortes concentrations.

IV.E.1.iii. NEUROINFLAMMATION ET DEPRESSION

C'est en 1991 que pour la première fois l'inflammation et la pathophysiologie de la dépression ont été associées. En effet, il a été observé que l'injection d'IL-1 β par intraveineuse (iv) à des volontaires sains induit les symptômes psychiques de la dépression mais aussi des anormalités biologiques sont aussi observées (Smith, 1991). A la suite de ces premières observations, d'autres travaux mettent en évidence une association entre des modifications inflammatoires et la dépression (Kim and Maes, 2003). Par exemple, l'injection d'IFN γ en cas de traitement d'infection virale, induit fréquemment des troubles dépressifs (Asnis and De La Garza, 2005). Le système immunitaire joue, comme l'axe HPA, un rôle dans l'intégration de signaux et la communication d'informations dans l'organisme. Il constitue une interface entre l'organisme et les stimuli extérieurs, lui permettant de s'adapter à son environnement. Les données reliant l'inflammation à la dépression majeure proviennent d'observations concernant 1) les cellules gliales, 2) le stress oxydatif, 3) l'altération de la BHE et 4) les niveaux d'expression de cytokines pro- et anti-inflammatoires.

Des observations *post-mortem* mettent en évidence une perte de cellules astrocytaires chez l'Homme au niveau du cortex cingulaire antérieur, l'amygdale et du cortex préfrontal (Altshuler et al., 2010; Cotter et al., 2005; Cotter et al., 2001; Miguel-Hidalgo et al., 2000; Rajkowska, 2000). Ces données ont été confirmées chez le rongeur où une diminution similaire est observée chez les rats Wistar-Kyoto – connu pour avoir un comportement dépressif – dans les mêmes aires cérébrales que chez les humains (Gosselin et al., 2009). De plus, détruire l'intégrité des cellules astrogliales en injectant de l'Acide L-alpha-aminoadipique, un agent toxique pour les cellules astrogliales, induit des symptômes dépressifs chez le rat (Banasr and Duman, 2008). Enfin, la perte astrocytaires entraine un déséquilibre à la synapse tripartite causée par une augmentation du glutamate et en conséquence une excitotoxicité, néfaste pour la survie neuronale (Rudy et al., 2015).

Le stress oxydatif correspond à un état où l'excès d'agents oxydants induit des dommages ou modifie l'activité biologique de macromolécules comme les lipides, les protéines ou l'ADN. Cet excès peut venir d'une augmentation de production d'oxydants ou une diminution de leur élimination, ou encore une défense anti-oxydante défectueuse. Le cerveau est l'un des organes les plus sensible au stress oxydant. Car 1) il est riche à la fois en acide gras peroxydables (car il est composé d'acides gras polyinsaturés), et en minéraux comme le fer et le cuivre capables d'induire leur peroxydation, 2) il a de grands besoins en oxygène tout en étant limité en mécanismes antioxydants (Ng et al., 2008; Scapagnini et al., 2012). Dans le cerveau de patients dépressifs, une

augmentation des produits issus de la peroxydation des lipides et des métabolites du NO, ainsi qu'une diminution d'antioxydants (glutathion) ont été mises en évidence par une étude *postmortem* soulignant la présence d'un stress oxydatif dans la pathologie (Scapagnini et al., 2012). Dans un modèle de stress imprédictible (chapitre V.B.2) la souris dépressive présente une augmentation du métabolisme du NO au niveau cérébral qui peut être reversée par un traitement antidépresseur à la fluoxetine (Isingrini et al., 2012). Les mécanismes sous-jacents à l'augmentation du stress oxydatif dans la dépression sont encore méconnus. Cependant, il est avéré qu'un stress oxydatif continu peut impacter négativement l'endothélium et engendrer un dysfonctionnement de la BHE.

La BHE permet le maintien du statut « immuno-privilégié » du cerveau, en limitant l'entrée de médiateurs inflammatoires comme les cytokines, ou d'anticorps (Abbott et al., 2006). L'intégrité de la BHE semble compromise chez les patients déprimés qui présentent un ratio LCS/Sérum d'albumine élevé (Shalev et al., 2009) traduisant une augmentation de la perméabilité de la BHE à l'albumine qui est normalement exclusivement sérique. Le stress oxydatif et l'altération de la BHE ont souvent été liés à l'augmentation de cytokines pro-inflammatoires dans de nombreuses pathologies, y compris la dépression.

Les cytokines pro-inflammatoires IL-1 β , IL-6 et TNF- α sécrétées majoritairement par la microglie favorisent l'inflammation délétère. A l'inverse, les anti-inflammatoires IL-4 et IL-10 sécrétées par les astrocytes (mais aussi les lymphocytes) peuvent contenir cette inflammation (Haroon et al., 2012). L'IL-4 et IL-10 peuvent même induire le passage de la microglie d'un stade M1 à un stade M2 neuroprotecteur. Chez les patients dépressifs, le nombre d'astrocytes et de lymphocytes semble diminuer (Raison et al., 2010), alors qu'une augmentation de cytokines pro-inflammatoires est observée dans le sérum (Janelidze et al., 2011; Liu et al., 2012b). De façon intéressante, les niveaux de cytokines sont réduits chez les patients guéris par traitements antidépresseurs ou par électroconvulsivothérapie. A l'inverse, lorsque ces traitements sont inefficaces, les taux de cytokines restent élevés (McNally et al., 2008). L'augmentation de l'axe HPA et en particulier du GR (Pace et al., 2007). De plus la neurogenèse est souvent inversement corrélée aux taux des cytokines pro-inflammatoires et à la neuroinflammation (Myint and Kim, 2014). L'augmentation d'IL-1 β , IL-6 et TNF- α est associée à une diminution de la prolifération et de la survie neuronale (Mouihate, 2014) (Keohane et al., 2010; Kuzumaki et al., 2010).

Enfin, la balance entre les cytokines pro- et anti-inflammatoires influence le métabolisme du tryptophane en augmentant l'activité d'une de ces enzymes clés : l'indoleamine-2,3-dioxygénase

(IDO) et induisant ainsi l'augmentation de la transformation du TRP en kynurénine (Muller and Schwarz, 2007) au détriment de la production de 5-HT.

IV.F. LA VOIE DES KYNURENINES

Le détournement du métabolisme du tryptophane par l'augmentation de la neuroinflammation explique en partie le déficit sérotoninergique observé chez les patients souffrant de dépression. La voie de la kynurénine (KYN), qui est initiée par l'enzyme IDO est une des voies métaboliques du TRP qui est également un élément clef de la synthèse de la 5-HT.

IV.F.1. DEFINITION

Le but du métabolisme du tryptophane par la voie des kynurénines a longtemps été considéré comme étant la synthèse du Nicotinamide Adénine Dinucléotide (NAD+). C'est en 1978 que d'autres fonctions ont été associées à cette voie métabolique. En effet, il a été mis en évidence que la kynurénine et ses métabolites avaient des propriétés convulsivantes chez la souris (Lapin, 1978). Dans les années 90, des études chez des personnes infectées par le VIH ont montré que la voie des kynurénines est régulée par le système immunitaire et en particulier par l'IFN γ (Fuchs et al., 1991). Depuis, de nombreuses publications ont démontré un contrôle de l'inflammation sur le métabolisme de la KYN, y compris dans des maladies psychiatriques (Strasser et al., 2017). La KYN est la voie majoritaire de métabolisation (*Figure 11*) non-protéique du TRP (Takikawa et al., 1986).



Figure 11 : Métabolisme de la kynurénine

La première étape de cette dégradation permet la formation de kynurénine par l'enzyme IDO (Schwarcz and Du, 1991). La Kynurénine peut alors à son tour être dirigée vers 2 voies différentes. Une première où la kynurénine-3-monooxygénase (KMO) transforme la kynurénine en 3-Hydroxy-Kynurénine (3OH-KYN) qui va produire des radicaux libres neurotoxiques ou être métabolisée en Acide Quinolinique (QUIN), un agoniste des récepteurs NMDA à l'activité excitotoxique. L'autre voie est dépendante de la Kynurénine Aminotransférase (KAT) qui va métaboliser la kynurénine en acide kynurénique (KYNA), un métabolite antagoniste des récepteurs NMDA aux propriétés neuroprotectrices (Connor et al., 2008).

IV.F.2. DANS LA DEPRESSION

De nombreuses pathologies neurodégénératives, comme la maladie de Parkinson ou d'Huntington, sont associées à des taux élevés de 3-OH-Kyn et d'acide quinolinique (QUIN) dans le cerveau (Ogawa et al., 1992; Reynolds and Pearson, 1989). De plus, la 3OH-Kyn augmente l'activité des MAOs ce qui pourrait l'impliquer dans la diminution des taux de 5-HT observés chez les personnes souffrant de dépression. En parallèle, des taux élevés de QUIN ont été retrouvés au niveau du gyrus cingulaire antérieur des patients dépressifs (Steiner et al., 2011). Le QUIN et la 3OHkyn sont augmentés dans le sérum de patients souffrants de dépression et dont le traitement antidépresseur a échoué (Savitz et al., 2015). De fortes concentrations de QUIN au niveau du SNC induisent des réactions d'apoptose des astrocytes (Lee et al., 2010). Ceci pourrait expliquer en partie la diminution du nombre de cellules astrocytaires décrite dans la partie précédente. De plus, la microglie exprime la KMO et donc produit des métabolites neurotoxiques alors que les astrocytes expriment la KAT conduisant à la métabolisation du KYNA qui est neuroprotecteur (Dantzer et al., 2011). Ce déséquilibre dans le métabolisme de la kynurénine tendant à l'augmentation de métabolites neurotoxiques (Muller and Schwarz, 2008) pourrait être associé à la diminution de l'intégrité neuronale observée chez les personnes souffrant de dépression. Certaines cytokines proinflammatoires comme le TNF- α et l'IFN γ augmentent l'activité de l'IDO alors que des cytokines antiinflammatoires (IL-4) ont tendance à inhiber son activité (Grohmann et al., 2003). Enfin, une étude clinique récente a établi un lien entre les troubles du sommeil chez des patients dépressifs et une diminution du ratio KYNA/QUIN (Cho et al., 2017).

Ainsi, la dépression regroupe un grand nombre de symptômes, très variables d'un individu à un autre, rendant à la fois l'étude de ses facteurs de risque mais également la recherche de nouveaux traitements difficiles. C'est pourquoi le développement de modèles animaux permettant de reproduire – *au moins en partie* - les symptômes et mécanismes de la dépression représente un enjeu capital dans la découverte de nouvelles cibles pharmacologiques ou de nouvelles approches thérapeutiques.

V.A. EVALUER L'ETAT DEPRESSIF CHEZ UN ANIMAL

Les critères utilisés pour évaluer une dépression sont hétérogènes et parfois opposés chez l'Homme (ex : perte ou gain de poids, insomnie ou hypersomnie). De plus, il est difficile de quantifier dans le détail l'état psychologique des animaux de laboratoire. Malgré une démonstration de l'empathie chez la souris (Watanabe, 2011), il est difficile d'imaginer qu'ils aient des pensées suicidaires, ce qui en plus est impossible à évaluer chez eux. Cependant, il existe une batterie de tests permettant d'évaluer le désespoir et la résignation des animaux, l'anxiété, le retrait social ou encore l'anhédonie, qui sont certains symptômes liés à la dépression. Ces tests permettent aussi d'évaluer les effets antidépresseurs de certaines molécules.

V.A.1.LES SYMPTOMES : UN CHALLENGE ENTRE MODELISATION ET EVALUATION

Les différents symptômes de la dépression d'après le DSM-V et la possibilité ou non de leur modélisation chez l'animal sont résumés dans le tableau 3 ci-dessous :

Symptômes du DSM-V	Phénotype chez la souris	Evaluation du phénotype	
Humeur déprimée	Non modélisable	/	
Perte d'intérêt et de plaisir	Anhédonie	Autostimulation intracrâniale	
dans les activités du quotidien		Préférence au sucrose	
Perte ou gain de poids	Identique à l'Homme	Pesée	
Insomnie ou hypersomnie	Architecture anormale du	Actimétrie,	
	sommeil	électroencéphalographie	
Agitation ou ralentissement	Locomotion anormale	Actimétrie, Openfield, Rotarod	
psychomoteur			
Fatigue ou perte d'énergie	Locomotion anormale et	Tapis roulant, rotarod,	
Démotivation	comportement social altéré	électroencéphalographie éveillée	
		construction de nid	
Diminution de la	Mémoires de travail et	Labyrinthe de Barnes, piscine de	
concentration, indécision	spatiale altérées	Morris, le labyrinthe en Y	
Pensées suicidaires	Non modélisable	/	
Faible estime de soi,	Non modélisable	/	
culpabilité			

	Tableau 3 :	Modélisation	des	symptômes	dépressifs	chez la	a souris.
--	-------------	--------------	-----	-----------	------------	---------	-----------

Symptômes annexes	Phénotypes chez la souris	Evaluation du phénotype
Diminution de l'hygiène	Absence de toilettage	Splash Test, toilettage et aspect du pelage en général
Anxiété	Comportement anxieux	Openfield, Light/Dark test, Labyrinthe en croix surélevé, NSF, enfouissement d'objet
Interactions sociales	Modification de la sociabilité	Test des interactions sociales
Désespoir	Résignation	FST, TST et LH

Adapté et complété d'après (Cryan and Mombereau, 2004; Dedic N, 2011)

Parmi les tests cités ci-dessus seuls seront détaillés ceux utilisés au cours de mes travaux de thèse

dans la Box 3.

Box 3. Les différents tests comportementaux utilisés pour évaluer la dépression chez la souris.

1. La résignation :

FST – Forced Swim Test ou test de la nage forcée

Une souris est placée dans un cylindre en verre rempli d'eau à $23^{\circ}C \pm 0,5^{\circ}$ pendant 6min. L'animal ne pouvant s'échapper, la mesure du temps d'immobilité des 4 dernières minutes est considéré comme un index de l'état de résignation de la souris (Porsolt, 1979).



LH – Learned Helplessness ou résignation apprise

La souris est déposée dans un compartiment dont le sol est relié à un générateur délivrant des chocs électriques (0,3mA). Pendant 4 jours consécutifs, la souris reçoit pendant 1h des chocs électriques non évitables. Le 5^{ème} jour, jour du test, une porte s'ouvre au moment du choc offrant à l'animal la possibilité de s'échapper. Quand la souris s'échappe les chocs s'arrêtent. La latence d'échappement et le nombre d'échappements sont comptabilisés comme étant deux index de résignation de la souris (Seligman and Beagley, 1975).



TST – Tail Suspension Test ou test de la suspension par la queue

La souris est suspendue par la queue à l'aide d'un ruban adhésif pendant 6min. Le temps d'immobilité des souris dans cette situation contraignante et stressante qui reflète leur état de résignation est mesuré (Steru et al., 1985).



2. L'anxiété :

Openfield ou champ ouvert

Ce test crée un conflit pour la souris entre la motivation d'explorer et la peur provoquée par un environnement anxiogène (champ ouvert et fortement éclairé). Grâce à un logiciel de suivi des animaux on mesure pendant 10min les déplacements de la souris dans une enceinte carrée fortement éclairée. Un animal ayant tendance à longer les bords et rester dans un coin sera considéré comme anxieux en comparaison à un animal passant du temps au centre (Gentsch et al., 1981).



NSF – Novelty Suppressed Feeding ou nourrissage supprimé par la nouveauté

Ce test est aussi basé sur une situation conflictuelle : la faim et la peur de s'aventurer dans un lieu fortement éclairé. Un morceau de nourriture est placé au centre d'une enceinte carrée recouverte de sciure et fortement éclairée. Les souris sont mises à jeun environ 16h avant le test. Ensuite la souris est déposée dans un coin de la boîte et le temps qu'elle met à aller manger la croquette de l'animal est chronométré. Plus celui-ci est long plus l'animal est considéré comme anxieux (Bodnoff et al., 1988).



Light/Dark Test ou boite claire/obscure

Comme pour l'openfield, ce test est basé sur le conflit : exploration/milieu anxiogène. La souris est déposée dans une enceinte divisée en 2 : une partie est vivement éclairée et l'autre complètement sombre. L'animal est déposé dans la partie éclairée puis pendant 5min on compte le nombre d'entrées et le temps passé dans la zone éclairée. Un animal anxieux aura tendance à rester caché dans la zone sombre (Aulich, 1976).



3. Altérations psychomotrices :

Rotarod

Ce test permet d'évaluer la coordination motrice et l'équilibre des rongeurs. Il consiste à placer des souris sur un cylindre en rotation les forçant à se déplacer pour ne pas tomber. Il se déroule en 2 étapes. D'abord l'habituation sur l'axe à une vitesse constante (10 tours/min sur 5 min) 2 fois dans la même journée. Le lendemain se déroule le test, où les souris sont soumises à une vitesse croissante (de 10 à 40 tours/min en 5min). La durée du déplacement forcé est enregistrée et le test s'arrête lorsque l'animal tombe ou s'accroche au cylindre faisant au moins 2 tours consécutifs sans effort (Jones and Roberts, 1968).

4. Perte d'intérêt/retrait social :

Préférence au sucrose

Ce test permet d'évaluer l'anhédonie des animaux. Le choix de boire de l'eau ou de l'eau sucrée (2% sucrose) est donné à la souris pendant sa phase active. La préférence au sucrose ($\frac{Vol.Sucrose 2\% bu}{Vol.total bu}$) donne un indice de d'anhédonie (Papp et al., 1991)



Test des interactions sociales ou test des 3 chambres

Ce test permet d'évaluer la sociabilité des rongeurs. Il se déroule en 3 sessions de 5min, la 1ère est une phase d'habituation où l'animal explore les 3 compartiments de l'appareil. Lors de la 2^{nde} étape, une souris « inconnue » de même âge, même sexe et même souche, est placée dans un des compartiments dans une cage de treillis métallique permettant les interactions. Lors de la 3^{ème} phase, on rajoute une 2^{ème} souris « inconnue » dans le compartiment opposé dans le même type de cage. A chacune des étapes les temps passés dans chacun des compartiments sont chronométrés. Pour l'étape #1, l'expérimentateur vérifie que la souris ne présente pas de préférence de place. En comparant les temps passés dans le compartiment vide et contenant la souris « étrangère », ce test évalue la sociabilité des animaux (étape #2) ; l'étape #3 permet d'estimer l'intérêt pour la nouveauté sociale (Moy et al., 2004).



V.A.2.MARQUEURS BIOLOGIQUES DE LA DEPRESSION

Au-delà des nombreuses possibilités d'analyse offertes par les tests comportementaux, il est également possible d'étudier les modifications anatomiques et biologiques associées à la dépression chez les modèles animaux. Une liste non exhaustive des autres caractéristiques « quantifiables » de la dépression dans des modèles animaux est répertoriée ci-dessous :

V.A.2.i. DYSFONCTION DE L'AXE HPA

La dérégulation de l'axe HPA peut être mesurée chez les rongeurs par une augmentation plasmatique des taux de corticostérone et d'ACTH. Il est également possible de mesurer l'augmentation des taux de CRH plasmatique et central (hypothalamus et hippocampe).

V.A.2.ii. LES MONOAMINES

La technique de microdialyse *in vivo* et les biopsies *post-mortem* des zones d'intérêt (hippocampe, raphé dorsal, cortex préfrontal...) couplées aux techniques d'HPLC et/ou de spectrométrie de masse permettent de quantifier les taux de neurotransmetteurs (5-HT, DA, NA) au niveau du SNC.

V.A.2.iii. ALTERATIONS ANATOMIQUES ET NEUROTROPHIQUES

Changements morphologiques

Les techniques d'imagerie ou l'autopsie permettent d'évaluer la taille des différentes zones cérébrales pouvant être affectées dans la dépression (hippocampe, amygdale, cortex préfrontal).

Modifications neuronales

Le nombre de connexions synaptiques et l'aspect des dendrites peuvent être observés par des techniques d'imagerie confocale sur coupes de cerveau. Il est possible également de faire de l'électrophysiologie *in vivo* pour percevoir les anomalies de fonctionnement neuronal sur animal vigile. De plus, l'électrophysiologie *ex-vivo* sur tranche de cerveau permet d'étudier la plasticité synaptique par des techniques de patch-clamp afin d'apprécier les propriétés électrochimiques des neurones.

Marqueurs biologiques

Les taux de BDNF, VEGF, NGF et d'autres facteurs trophiques peuvent être quantifiés dans le plasma, et dans le cerveau (ARNm ou protéines). La prolifération et la différenciation neuronale par des techniques d'immunomarquage (BrdU ou Ki67).

V.A.2.iv. LA NEUROINFLAMMATION

Enfin, l'état inflammatoire peut être évalué en périphérie (plasma) ou au niveau du SNC (dans le LCS ou dans des zones du SNC comme l'hippocampe, l'hypothalamus ou le cortex préfrontal) par la mesure de cytokines anti et pro-inflammatoires et de leurs messagers (q-PCR).

V.B. DIFFERENTS MODELES MURINS DE DEPRESSION

Le large éventail des symptômes liés à la dépression rend complexe le développement de modèles animaux de laboratoire. Reproduire une pathologie humaine multifactorielle comme la dépression comportant différents aspects du comportement humain chez la souris est difficile, c'est pourquoi différents modèles regroupant un ou plusieurs aspects de la pathologie ont été développés. Ces modèles animaux permettent l'étude de certains aspects et/ou de certains mécanismes moléculaires de la pathologie mais aucun à ce jour ne récapitule toutes les facettes de la dépression. En connaissance des limites des modèles expérimentaux, l'étude de la dépression nécessite donc d'utiliser plusieurs de ces modèles pour avoir une vision intégrative de ces différentes composantes.

Il existe de nombreux modèles caractérisés participant à l'amélioration de nos connaissances de la pathophysiologie de diverses maladies psychiatriques. Cependant, un consensus complet sur les conditions nécessaires à la création d'un modèle animal valide fait toujours défaut dans ce domaine de recherche. A l'heure actuelle, les 3 critères définis en 1969 par McKinney sont largement utilisés (McKinney and Bunney, 1969). Ces critères incluent la validité étiologique, la validité apparente et la validité prédictive.

La validité étiologique : C'est le critère le plus compliqué à valider car il nécessite que les symptômes observés chez l'animal soient induits par les mêmes mécanismes biologiques que ceux décrits chez l'Homme. Ainsi le modèle consisterait à reproduire des mécanismes qui induisent la dépression chez l'Homme chez l'animal pour le rendre dépressif (Nestler and Hyman, 2010). La difficulté réside d'une part, dans le fait que les mécanismes biologiques de la dépression ne sont pas tous parfaitement décrits, et d'autre part d'un risque de négliger l'influence des facteurs environnementaux participant à l'origine de la dépression.

La validité apparente : Ce critère est validé lorsque l'animal possède des symptômes identiques à ceux observés chez l'Homme. Ces symptômes peuvent être d'ordre biochimique, anatomique, neuropathologique ou encore comportemental.

La validité prédictive : Ce critère renvoie à la capacité du modèle animal à répondre positivement à un traitement pharmacologique ayant déjà fait ses preuves.

En résumé, plus le modèle animal proposé valide de critères, plus il sera pertinent pour l'étude de certains aspects de la dépression chez l'Homme (Chadman et al., 2009).

Je présenterai dans cette partie une liste non exhaustive de modèles murins de troubles anxiodépressifs.

V.B.1. LES MODELES GENETIQUES ET TRANSGENIQUES

V.B.1.i. LES MODELES GENETIQUES

Les souris Rouen

Ces souris sont issues d'un programme de recherche de l'Université de Rouen. A partir de la souche de souris CD1, les chercheurs ont sélectionné les animaux ayant les temps d'immobilité les plus élevés - *index de résignation*- dans le TST (**cf Box.4**) puis les ont reproduits entre eux. Après 14 générations, les chercheurs ont obtenu des souris présentant différentes caractéristiques du tableau clinique de la dépression de façon stable. Ces souris sont résignées, présentent une anhédonie, des troubles du sommeil et du rythme circadien, une augmentation des taux de corticostérone plasmatique et une hyperexcitabilité des neurones 5-HT. Enfin, leur comportement « dépressif » est amélioré par l'administration d'antidépresseurs (El Yacoubi et al., 2003).

Flinders Sensitive Line (FSL)

Les personnes dépressives sont plus sensibles aux agents cholinergiques que les personnes saines (Janowsky et al., 1994). Des rats Sprague-Dawley ont été sélectionnés sur leur sensibilité vis-à-vis d'un agent anti-cholinestérase. Les animaux les plus sensibles ont été croisés entre eux, donnant la souche FSL. Ces rats présentent un état résigné, une diminution des interactions sociales, une anhédonie et une diminution de la synthèse de la 5-HT. De plus, les rats FSL sont sensibles au traitement antidépresseur (Overstreet et al., 1995).

V.B.1.ii. LES MODELES TRANSGENIQUES

Les animaux transgéniques sont des outils puissants pour étudier l'implication de gènes spécifiques dans une pathologie particulière. Aujourd'hui, les 3 théories les plus étudiées dans l'étiologie de la dépression ont conduit à la « création » de souris transgéniques qui présentent des mutations dans les voies des monoamines, de l'axe HPA, des neurotrophines (Urani et al., 2005).

Modèles basés des altérations monoaminergiques

Les systèmes de recapture des monoamines ont été les premières cibles dans l'établissement de souris KO. Ainsi, les premiers modèles générés ont plus participé à la compréhension des mécanismes associés à l'établissement de la dépression plutôt qu'au criblage de molécules antidépressives. Par exemple, les souris KO pour le transporteur de la DA (DAT) présentent une hyper-locomotion, une diminution de la résignation et une diminution de l'anhédonie (Perona et al., 2008). Les souris KO pour le transporteur de la NA (NAT) sont moins résignées, ont une diminution de l'anhédonie, et sont moins susceptibles de développer une « dépression » à la suite d'un stress (Haenisch et al., 2009). En revanche, les souris KO pour le transporteur de la 5-HT (SERT) présentent un phénotype anxio-dépressif et sont hypersensibles au stress. Elles présentent un excès de 5-HT pendant le développement et une forte déplétion de 5-HT à l'âge adulte (Bengel et al., 1998). Ceci suggère que l'absence de SERT entraîne une déplétion de 5-HT induisant un état dépressif (Gross et al., 2002). Les récepteurs des monoamines ont également été ciblés dans l'élaboration de souris transgéniques. Les souris KO pour le récepteurs 5-HT1A présentent un comportement de type anxieux et une dérégulation de l'axe HPA (Gross et al., 2000; Sibille et al., 2000). Les souris KO pour le récepteur α 2 adrénergique ont un comportement anxio-dépressif et un rythme circadien altéré (Schramm et al., 2001).

Modèles basés sur les altérations de l'axe HPA

Il était évident, dans l'étude de mécanismes concernant l'axe HPA dans la dépression, de cibler un des acteurs majeurs : la CRH. Ici aussi les souris transgéniques ont permis de confirmer le rôle du système de la CRH dans la pathophysiologie de la dépression. En effet, les souris KO pour le récepteur à la CRH (CRHR1-KO) présentent une absence de réponse de l'axe HPA c'est à dire aucune modification des taux de GCs, face à un stress. Ces souris ont une activité locomotrice augmentée et montrent une diminution des comportements anxieux (Sillaber et al., 2002). Les souris KO pour la CRH, bien que viables, ne présentent aucune différence comportementale par rapport à des souris sauvages dans des tests de dépression (Muglia et al., 1995). A l'inverse, la surexpression de

la CRH induit des comportements anxieux mais également des taux élevés de corticostérone et d'ACTH plasmatiques (Stenzel-Poore et al., 1996).

Modèles basés sur des altérations des facteurs neurotrophiques

Les souris KO pour le BDNF et son récepteur TRKB ne sont pas viables (Conover et al., 1995). Les souris hétérozygotes pour les 2 gènes présentent un phénotype identique aux souris sauvages (MacQueen et al., 2001). En revanche, la création de souris invalidées pour le gène codant le BDNF sélectivement au niveau hippocampique a permis de démontrer son implication dans les effets antidépresseurs des ISRS puisque chez ces souris KO, les ISRS n'ont pas d'effet (Monteggia et al., 2004). Enfin, l'inactivation d'un des promoteurs (le IV) de l'expression du BDNF induit également des comportements de type anxio-dépressifs (Sakata et al., 2010).

V.B.2. LES MODELES INDUITS

V.B.2.i. LES MODELES DE LESION

L'ablation des bulbes olfactifs chez le rat et la souris induit un comportement de type « dépressif » (Leonard and Tuite, 1981). La bulbectomie olfactive provoque des dérégulations de l'axe hypothalamus-système limbique avec des conséquences comportementales, neurochimiques, neuroendocrines et neuroimmunes très similaires à celles observées chez les patients dépressifs (Song and Leonard, 2005).

V.B.2.ii. LES MODELES PHARMACOLOGIQUES

Ils sont basés sur l'administration de substances induisant à moyen ou long terme un état de type dépressif. Parmi les différents modèles existants, le modèle de dépression par administration au long cours de corticostérone est le modèle d'étude utilisé pendant ce travail de thèse. L'augmentation des taux de GCs chez les patients dépressifs a été modélisée chez le rongeur par des injections répétées de corticostérone, par implantation de pastilles de corticostérone souscutanées, ou par son administration dans l'eau de boisson, ce qui induit sur le long terme des comportements de type anxio-dépressifs (Donner et al., 2012; Kalynchuk et al., 2004; van Donkelaar et al., 2014). Ce modèle induit des modifications neurochimiques et comportementales étroitement liées à la dépression. De plus, les effets du traitement chronique par la corticostérone sont reversés par un traitement antidépresseur (David et al., 2009). Mes travaux de thèse ont également contribué à apporter des précisions sur ce modèle récemment accepté, en démontrant notamment que l'administration chronique de corticostérone dans l'eau de boisson induit des comportements anxio-dépressifs, une altération de la neurogenèse et une neuroinflammation.

V.B.2.iii. LES MODELES COMPORTEMENTAUX

Le stress chronique à l'origine de la dépression peut être modélisé chez l'animal par l'enchaînement d'événements stressants qui induisent un comportement anxio-dépressif. Parmi les nombreux modèles utilisés, le modèle de stress chronique modéré et imprédictible « Unpredictable Chronic Mild Stress » (UCMS) a été développé en 1981 (Katz et al., 1981). Le protocole UCMS repose sur l'exposition quotidienne sur plusieurs semaines à des facteurs stressants différents. Ainsi l'animal peut être confronté à une privation de nourriture, puis d'eau, la lumière allumée pendant 24h, l'inondation de la litière...etc. L'animal développe des symptômes « dépressifs » comme l'anhédonie, une perte de poids et d'appétit, une dérégulation de l'axe HPA et une diminution des taux de cytokines anti-inflammatoires (IL-10 et TGF- β au niveau de la rate et du SNC (hippocampe, hypothalamus et cortex) (You et al., 2011). Un autre modèle couramment utilisé est celui de la « défaite sociale ». Ce modèle utilise un conflit social comme événement stressant. Le rongeur est introduit dans une cage avec un autre rongeur dominant et agressif où il sera « attaqué et vaincu ». Ceci est reproduit pendant plusieurs jours avec différents animaux dominants. Ce modèle induit une activation de l'axe HPA, de l'anhédonie, une aversion sociale, de l'anxiété, une dérégulation des rythmes circadiens, une perte de poids et une diminution des fonctions immunitaires (Bohus et al., 1993) (Martinez et al., 1998). Étonnamment, ce modèle n'induit pas de phénotype de type dépressif chez les femelles et les animaux juvéniles limitant son utilisation aux mâles adultes (Penka et al., 2004).

V.B.3.AUTRES MODELES DE DEPRESSION

V.B.3.i. L'ADIPONECTINE

La comorbidité entre les troubles métaboliques et la dépression encourage la recherche dans l'étude de molécules aux effets pléiotropes au niveau du SNC et de la périphérie. L'adiponectine dont les différentes fonctions seront détaillées plus loin, semble être un candidat intéressant car les souris KO pour l'adiponectine présentent des symptômes anxio-dépressifs et une neuroinflammation exacerbée. Ces phénotypes peuvent être reversés par l'administration d'adiponectine (Guo et al., 2017; Liu et al., 2012a; Yau et al., 2014) ou l'hébergement en environnement enrichi (EE).

V.B.3.ii. LA NEUROINFLAMMATION

L'injection périphérique de cytokines pro-inflammatoires ou d'un composant de la paroi bactérienne des bactéries Gram négatif, le lipopolysaccharide (LPS) engendre une réaction inflammatoire systémique et cérébrale. Cette réaction engendre des modifications comportementales appelées « sickness behaviour », largement étudiées dans la littérature (Dantzer, 2004). Une injection intra-péritonéale de LPS chez la souris est suivie d'une augmentation (- de 24h) des cytokines pro-inflammatoires dans le cerveau et du comportement de résignation, d'anhédonie et une aversion sociale (Salazar et al., 2012). Par ailleurs, un traitement journalier par la fluoxetine les 3 jours précédant l'injection de LPS permet d'inhiber l'apparition du « sickness behaviour » (Cohn et al., 2012).

V.C.IDENTIFIER DE NOUVELLES CIBLES THERAPEUTIQUES

A l'heure où les traitements pharmacologiques ne sont plus suffisamment efficaces, les traitements non-pharmacologiques sont de plus en plus sollicités (**box 4**). L'impact du style de vie étant devenu un facteur dans le déclenchement de la maladie, de nombreux travaux portent sur les effets d'un mode de vie sain sur la rémission des patients. Par exemple, une étude a montré que l'exercice physique a des effets antidépresseurs qui sont comparables aux médicaments dans le cas de dépression faible à modérée. Concernant les dépressions sévères, l'exercice améliore l'état des patients en complément d'un traitement médicamenteux (Peter J. Carek, 2011). De plus, les thérapies visant à augmenter les activités physiques (Lynette L. Craft, 2004), sociales (Jerome Sarris, 2014) et cognitives des patients (Rodrigo T. Lopes, 2014) ont déjà fait leurs preuves dans le traitement des troubles dépressifs. Alors, identifier les mécanismes moléculaires et cellulaires sous-jacents aux bénéfices observés dans ces thérapies serait prometteur dans l'identification d'une nouvelle cible thérapeutique. Ces thérapies sont modélisables chez le rongeur grâce à l'hébergement en « environnement enrichi » (EE). Ce modèle a été développé dans de nombreux laboratoires de recherche dont le nôtre et j'ai étudié ses mécanismes moléculaires et cellulaires au cours de ma thèse.

Box 4. Les traitements antidépresseurs non-pharmacologiques Ils sont utilisés soit en complément des traitements pharmacologiques soit lorsque ceux-ci ne sont pas efficaces.

1. Traitements invasifs

La neurochirurgie lésionnelle

- Capsulotomie antérieure : Lésion des fibres connectant les cortex orbitomédian, ventromédian et le gyrus cingulaire antérieur au thalamus, à l'hippocampe et à l'amygdale.

- Cingulotomie antérieure : Lésion dans le gyrus cingulaire, bloquant ainsi le passage de l'information entre le thalamus et le cortex.

- Tractotomie sous-caudée : Lésion sous la tête du noyau caudé ventral.

- Leucotomie limbique : combinaison de la cingulotomie et de la tractotomie.

Ces techniques ont déjà fait leurs preuves, elles sont tout de même associées à des effets secondaires (gain de poids, changement de personnalité) en plus des risques encourus pendant l'anesthésie.

La stimulation du nerf vague

Cette technique consiste en la stimulation électrique par intermittence du nerf vague gauche. Cette stimulation active le système limbique qui est impliqué dans le contrôle des comportements (émotion, veille/sommeil, sexuel...). En effet, les afférences vagales font synapse dans le noyau du tractus solitaire qui relaie l'information à de nombreuses structures incluant l'hypothalamus, l'hippocampe, les noyaux du raphé, l'amygdale et le thalamus. Malgré son efficacité certaine, ce traitement reste lourd à mettre en place.

La stimulation cérébrale profonde

Cette méthode consiste en l'implantation d'électrodes au niveau de l'aire tegmentale ventrale et du noyau accumbens. Ces électrodes sont reliées à un boîtier placé au niveau de la clavicule et qui émet régulièrement des impulsions électriques (60 à 130HZ, pendant 60 à 200µs de 2 à 10 volts).

2. Traitements non-invasifs

La psychothérapie

La psychothérapie permet aux patients de travailler sur les aspects psychologiques et sociaux associés à leur dépression (identification des causes). C'est un processus long qui peut nécessiter plusieurs années mais pouvant apporter au patient une certaine amélioration.

La luminothérapie

Cette thérapie est généralement utilisée pour les dépressions saisonnières associées à un manque de lumière (par exemple pendant l'hiver). Cette thérapie est basée sur le principe que le métabolisme de la mélatonine est dérégulée chez les patients souffrant de dépression. Ainsi, en stimulant par la lumière les cellules de la rétine le matin, il y a inhibition de la transformation de la sérotonine en mélatonine. Ainsi la luminothérapie régule l'horloge biologique, améliore le réveil et la vigilance et augmente le niveau de sérotonine au niveau du cerveau.

L'électroconvulsivothérapie

Egalement appelée traitement par électrochocs, l'électroconvulsivothérapie est l'une des méthodes les plus efficace. Elle est réservée aux patients dépressifs récidivants et résistants aux autres traitements. Cette technique consiste en l'application de stimulation électriques sur le crâne du patient sous anesthésie. Cette stimulation de faible intensité déclenche une crise d'épilepsie. Ce traitement s'étale sur plusieurs semaines (6-8) à raison de 2/3 séances par semaines. Bien qu'efficace ce traitement engendre des pertes de mémoires transitoires.

La stimulation magnétique transcrânienne

Cette technique consiste en l'application d'une impulsion magnétique à travers le crâne qui est indolore, le patient peut ainsi rester éveillé. Le champ magnétique est appliqué au niveau du cortex préfrontal. Celui-ci va modifier l'activité électrique des neurones et suivant sa fréquence induire soit une inhibition soit une activation de ceux-ci. Ce traitement est bien toléré et présente peu d'effets secondaires.

Associer la prise d'antidépresseurs pharmacologiques avec une psychothérapie et des séances d'électroconvulsivothérapie reste à ce jour la combinaison la plus efficace pour soigner la dépression.

L'ENVIRONNEMENT ENRICHI

I. GENERALITES

C'est en 1947 que Donald Hebb décrivit pour la première fois les effets d'un enrichissement de l'environnement sur des performances cognitives. En effet, il avait remarqué que des rats de laboratoire hébergés chez lui en tant qu'animaux de compagnie de ses enfants, trouvaient une solution à des tests comportementaux plus rapidement que les rats restés dans leur cage au laboratoire (Hebb, 1947). Qu'avaient ces rats par rapport à ceux restés dans leur cage au laboratoire ? Un environnement physique et social plus riche, apportant de la nouveauté et donc stimulant leur cerveau. Depuis, de nombreux travaux ont mis en lumière les bénéfices apportés par l'environnement enrichi (EE) aussi bien en périphérie qu'au niveau du système nerveux central. Une étude parue en 2011 a mis en évidence les effets antidépresseurs de l'EE (Jha et al., 2011), offrant ainsi une opportunité de découvrir de nouvelles cibles moléculaires contre la dépression en étudiant les mécanismes stimulés par cet environnement. Avant de rentrer dans les détails des travaux effectués sur les effets de l'EE sur la dépression, il est important de définir le modèle de l'environnement enrichi.

I.A.LE MODELE MURIN D'ENVIRONNEMENT ENRICHI

Le concept d'enrichissement de l'environnement n'existe qu'en comparaison aux conditions de vie « standard » dans lesquelles les animaux de laboratoire vivent habituellement (*Figure 12*). La mise en place d'un protocole d'EE n'est pas standardisée d'un laboratoire à un autre, malgré cela, l'EE correspond toujours à des conditions dans lesquelles les animaux sont exposés à un niveau élevé de stimulations cognitives, motrices et sociales (Slater and Cao, 2015). En EE, les animaux sont communément élevés dans de grandes cages agrémentées d'objets de différentes formes, couleurs et matières. Ces différents objets sont changés régulièrement afin de conserver un niveau élevé de stimulation cognitive. De plus, on retrouve en EE au moins une roue d'exercice permettant d'offrir une activité physique - volontaire - aux animaux. Enfin, les animaux sont hébergés par groupe de 12-15, et disposent d'abris et matériaux de nidification, permettant de favoriser les interactions sociales et d'établir une hiérarchisation naturelle. Vivre dans un EE fournit les conditions optimales pour une stimulation complète du cerveau (Sale et al., 2009) et induit de nombreux effets en périphérie, notamment sur le système immunitaire et sur le métabolisme.



Figure 12 : Représentation d'une cage standard et d'une cage d'environnement enrichi.

I.B. EFFETS PERIPHERIQUES ET CENTRAUX

I.B.1.EN CONDITION PHYSIOLOGIQUE

A l'état physiologique, l'EE n'affecte pas le système cardiovasculaire, en particulier au niveau de la fréquence cardiaque et de la pression artérielle chez le rongeur (Toni A Azar, 2012). En revanche, l'EE augmente la masse musculaire (Cao et al., 2011) et réduit la taille et le nombre des cellules adipeuses (Stanford and Goodyear, 2016). Une étude récente a également montré les effets d'un hébergement en EE sur la réponse immunitaire. En effet, 2 semaines d'EE seraient suffisantes pour diminuer le taux de mortalité suite à une septicémie (Brod et al., 2017) suggérant une amélioration du système immunitaire par l'EE.

Au niveau cérébral, en condition physiologique, l'EE augmente l'épaisseur du cortex, l'arborisation dendritique, la taille et le nombre de synapses (Henriette van Praag, 2000) et la neurogenèse hippocampique (Hosseiny et al., 2015; Kempermann et al., 1997). D'un point de vue moléculaire, l'EE augmente l'expression de facteurs trophiques comme le Brain-Derived Neurotrophic Factor (BDNF) (Falkenberg et al., 1992), le Nerve Growth Factor (NGF) (Pham et al., 1999) ou encore le Glial-Cell-Derived Neurotrophic factor (GDNF) (Young et al., 1999). Les effets comportementaux de l'EE réunissent l'amélioration des performances cognitives, mnésiques, affectives et motrices (Fares et al., 2013; Prusky et al., 2000; Sale et al., 2004; Simonetti et al., 2009).
Toutefois, il existe une variabilité dépendante du fond génétique, de l'âge, et du sexe des animaux mais aussi du type et de la durée de l'EE (Leal-Galicia et al., 2008).

I.B.2.EN CONDITION PATHOLOGIQUE

Les effets anti-inflammatoires de l'EE ont déjà été démontrés de manière directe ou indirecte. Par exemple, l'hébergement en EE induit la rémission de cancer de type mélanome et cancer du côlon (Cao et al., 2010) suggérant une modulation de la réponse immunitaire par l'EE s'opposant à l'évolution d'un cancer (Pang and Hannan, 2010). Sur un autre modèle de cancer, le carcinome mammaire, l'EE diminue le développement de la tumeur en inhibant les mécanismes oxydatifs associés à l'inflammation et en réduisant la prolifération des cellules cancéreuses (Nachat-Kappes et al., 2012). Deux semaines d'hébergement en EE suffisent à améliorer la réponse inflammatoire dans 2 modèles d'inflammation aigue, la péritonite induite par le zymosan et le modèle de ligature cæcale. En effet, dans les 2 modèles d'infection, les animaux hébergés en EE ont plus de macrophages mobilisés sur le site infectieux et ces macrophages ont une augmentation de leur capacité phagocytaire. Les animaux auraient donc une meilleure capacité à éliminer les infections (Brod et al., 2017). L'EE renforcerait donc les défenses naturelles de l'animal, lui donnant ainsi des « armes » face à différentes pathologies.

Comme décrit précédemment, l'EE induit diverses variations de la structure et de la fonction cérébrale. Ces modifications permettent le renforcement des connexions entre neurones. Ceci permet au cerveau d'être plus efficace en condition physiologique et de recruter des réseaux neuronaux alternatifs en cas de pathologie (Mandolesi et al., 2008) (Nithianantharajah et al., 2009). Cette meilleure capacité d'adaptation du cerveau dépendante de l'environnement pourrait être l'un des mécanismes qui expliquerait pourquoi l'enrichissement rendrait le cerveau plus résistant dans le cas de pathologies (Alzheimer, Parkinson) ou de dommages physiques (AVC). Cette théorie est particulièrement employée dans le cas de pathologies associées à des troubles cognitifs (Valenzuela and Sachdev, 2006), de plus elle est dépendante de facteurs génétiques mais aussi environnementaux. De nombreux travaux ont déjà montré les bénéfices d'un enrichissement de l'environnement sur ces diverses pathologies neurodégénératives (Tableau 4)

Je me concentrerai dans ce manuscrit sur les effets de l'EE sur les anomalies retrouvées dans la dépression, qui sont au centre de mon travail de thèse.

Tableau 4 : Effets de l'environnement enrichi sur différentes neuropathologies.

Pathologie	Effets comportementaux	Effets cellulaires	Effets moléculaires	Ref
Maladie d'Huntington	Apparition retardée des symptômes moteurs ; Amélioration de la mémoire spatiale	Perte du volume cortical et striatal diminuée, neurogenèse augmentée, diminution de la taille des agrégats	Augmentation de l'expression de BDNF et DARP-32, augmentation de l'expression des récepteurs aux canabinoïdes.	1,2,3
Maladie d'Alzheimer	Amélioration de l'apprentissage et de la mémorisation	Diminution de Aβ, augmentation de la prolifération neuronale mais pas de la survie	inution de Aβ, augmentation de la lifération neuronale mais pas de la survie Augmentation de l'expression de la synaptophysine et du NGF	
Maladie de Parkinson	Récupération des fonctions motrices	Diminution de la perte des neurones dopaminergiques et du transporteur DAT	Augmentation de l'expression de GDNF	7,8
Sclérose latérale amyotrophique	Retard dans l'apparition des symptômes moteurs	/	/	9
L'épilepsie	Résistance aux crises, diminution du déficit en mémoire spatiale et activité exploratoire	Diminution de l'apoptose et augmentation de la neurogenèse	Augmentation de l'expression de BDNF, GDNF, pCREB, HOMER1A et ERG1	10,11
Les accidents vasculaires cérébraux	Amélioration de la récupération post-AVC des capacités motrices et cognitives	Augmentation de la densité des épines dendritiques, diminution du volume de l'infarct, augmentation des progéniteurs neuronaux et astrocytaires	Augmentation de l'expression de BDNF, NGF, augmentation de l'expression des GR et MR	12,13,14
Syndrôme de l'X fragile	Amélioration des comportements exploratoires	Augmentation du nombre de synapse, du nombre de connexions synaptique, et maturation des épines dendritiques	Augmentation de l'expression de mGluR1	15

1 (van Dellen et al., 2000) ; 2(Hockly et al., 2002) ; 3 (Spires et al., 2004) ; 4 (Arendash et al., 2004) ; 5 (Jankowsky et al., 2005) ; 6 (Lazarov et al., 2005) ; 7 (Faherty et al., 2005) ; 8(Jadavji et al., 2006) ; 9 (Sorrells et al., 2009) ; 10 (Deborah Young, 1999) ; 11 (Auvergne et al., 2002) ; 12 (Johansson and Ohlsson, 1996) ; 13 (Farrell et al., 2001) ; 14 (Gobbo and O'Mara, 2004) ; 15 (Restivo et al., 2005)

II. EFFETS DE L'ENVIRONNEMENT ENRICHI SUR LES ALTERATIONS LIEES A LA DEPRESSION

L'environnement enrichi a permis d'enrichir nos connaissances sur les mécanismes biologiques observés dans la dépression. Certains des effets de l'EE sont identiques à ceux induits par les traitements pharmacologiques (Box 1) et non pharmacologiques (Box 4). Cela confirme l'intérêt des méthodes thérapeutiques visant à enrichir l'environnement des patients dépressifs et ouvre un nouveau champ exploratoire vers la découverte de mécanismes moléculaires et cellulaires antidépresseurs différents des cibles des traitements actuels. Mentionnée au début de l'introduction, la cible principale des traitements pharmacologiques utilisés aujourd'hui est la neurotransmission monoaminergique et celle-ci est améliorée par un enrichissement de l'environnement.

II.A. LES MONOAMINES

Les effets de l'EE sur la neurotransmission ont été largement étudiés, en particulier la neurotransmission de la noradrénaline, dopamine, sérotonine, acétylcholine, GABA/glutamate et des opioïdes. Ayant précédemment décrit l'impact de la dépression sur les systèmes de neurotransmission de la NA, DA et 5-HT, il est central de comprendre comment l'EE agit sur ces 3 systèmes qui présentent une forte diminution d'activité dans la pathologie dépressive. Cette diminution peut être causée par différents facteurs comme une baisse du précurseur du neurotransmetteur, une baisse des récepteurs post-synaptiques ou encore une baisse de la libération des neurotransmetteurs. Par ses multiples effets, l'EE pourrait aller à l'encontre de ces déficits.

L'EE améliore le fonctionnement de ces différents systèmes, dans des conditions physiologiques ou pathologiques. Par exemple, un hébergement en EE augmente la concentration en NA dans le cerveau de souris en condition physiologique (Fumie Naka, 2002). En condition de stress social, l'EE permet d'augmenter la libération de NA au niveau du cortex préfrontal (Brenes et al., 2008). Les effets de l'EE sur la DA sont multiples ; l'EE augmente le nombre de neurones dopaminergiques (Aumann et al., 2013), diminue l'expression du transporteur de la dopamine au niveau du cortex préfronal dans un contexte de dépendance à une drogue (Wooters et al., 2011) et enfin l'EE augmente la quantité de dopamine dans le milieu extra-cellulaire au niveau du noyau accumbens (Segovia et al., 2010). En ce qui concerne l'effet de l'EE sur le système sérotoninergique, les nombreuses études réalisées sur des modèles expérimentaux différents identifient toutes un renforcement de la neurotransmission

sérotoninergique par l'EE. Par exemple, dans un modèle murin de stress post-traumatique, l'EE augmente les quantités de 5-HT dans la fente synaptique et de récepteurs 5-HT1a au niveau postsynaptique (Ragu Varman and Rajan, 2015). Chez le rat, une corrélation a été établie entre les effets antidépresseurs de l'EE dans le FST et les niveaux de 5-HT retrouvés au niveau du noyau accumbens et de l'hippocampe (Sequeira-Cordero et al., 2014).

De plus, l'effet de l'EE sur le métabolisme des monoamines a été confirmé dans différentes espèces animales, y compris chez les espèces non-mammifères. Par exemple, chez la dorade royale, un enrichissement de l'environnement augmente le métabolisme de la DA et de la 5-HT (Batzina et al., 2014).

Pour finir, dans un modèle de défaite sociale chez la souris, l'EE a un effet antidépresseur et anxiolytique, il a été observé à la fois une augmentation des taux de monoamines et également une diminution des concentrations de corticostérone circulantes (McQuaid et al., 2013a). Cette diminution de la concentration en corticostérone traduit une diminution de l'activation de l'axe corticotrope, un autre mécanisme observé chez les personnes traitées par les antidépresseurs pharmacologiques actuels, dont le fonctionnement est aussi amélioré par l'EE.

II.B. L'AXE HPA

L'environnement enrichi a un effet bénéfique sur les dérèglements de l'axe HPA observés dans différentes maladies touchant le système nerveux central. Par exemple, dans le cadre de la maladie de Huntington où l'axe HPA est hyper activé, l'EE induit un retour à la normale de son activité (Du et al., 2012). Dans le cadre de la dépression, et en particulier dans un modèle de rat de dépression induite par stress chronique, l'EE est capable d'avoir des effets antidépresseurs en restaurant les niveaux d'expression des récepteurs GR et MR dans l'hippocampe (Laviola et al., 2008). Dans un autre modèle de dépression basé sur un stress prénatal, les rats adolescents mis en EE présentent une diminution de la concentration en corticostérone par rapport à celle des rats élevés en conditions standards, qui reflète une diminution de l'hyper-réactivité de l'axe HPA dans la condition EE (Morley-Fletcher S, 2003). L'hébergement en EE réduit aussi les taux de corticostérone chez des souris ayant subi un protocole d'UCMS et améliore l'efficacité d'un traitement par la fluoxetine (Branchi et al., 2013) (Vega-Rivera et al., 2016). Dans un autre modèle de défaite sociale, l'hébergement en EE réduit les taux de corticostérone et l'expression de la CRH au niveau de l'hippocampe (McQuaid et al., 2013b).

Pour autant, le développement récent des recherches sur l'EE, n'a pas encore permis d'identifier ni les mécanismes par lesquels l'EE permet de normaliser l'axe HPA, ni une molécule clef associée à ce retour « à la normale ». Seules la diminution de corticostéroïdes circulants et la régulation de l'expression des GR et MR ont été constatées. De façon intéressante, le retour « à la normale » de l'axe HPA en EE est, dans tous les cas, associé à une augmentation de la neurogenèse hippocampique.

II.C. LA NEUROPLASTICITE

La neurogenèse hippocampique jouerait un rôle important dans la mise en place des effets antidépresseurs des traitements actuels. Elle est d'ailleurs devenue une cible privilégiée dans le développement de nouveaux traitements antidépresseurs. Comme l'hébergement en l'EE stimule aussi la neurogenèse, il serait intéressant d'identifier le ou les mécanismes sous-jacents à l'augmentation de la neuroplasticité et des facteurs neurotrophiques induite par l'EE.

Les effets de l'EE sur la neurogenèse en condition physiologique ont été décrits dans la 1ère partie de ce chapitre. En conditions pathologiques, les bénéfices comportementaux, cellulaires et moléculaires apportés par l'EE (tableau 4) sont, pour la majeure partie, liés à l'augmentation de la neurogenèse et à la sécrétion de facteurs trophiques (BDNF, GDNF ou NGF). Les travaux listés dans le tableau 4 sont parus à partir des années 2000. Ils portent principalement sur des maladies neurologiques en excluant les maladies mentales comme la dépression, la schizophrénie ou encore le trouble bipolaire.

C'est à partir de 2003 qu'ont été publiés les premiers travaux concernant les effets neurogéniques de l'exercice physique, qui est une composante de l'EE, dans un contexte de stress/dépression (Greenwood et al., 2003). Une autre étude réalisée sur des souris ayant de faibles taux d'IGF circulante, et présentant un phénotype anxio-dépressif, a montré que l'exercice physique restaure partiellement la neurogenèse et le comportement dépressif des souris (Trejo et al., 2008). Ceci suggère l'implication des facteurs neurotrophiques dans l'établissement des effets bénéfiques de l'exercice physique sur la prolifération et la survie neuronale, et confirme la nécessité d'intégrer les autres composants de l'EE à l'exercice physique, c'est-à-dire la stimulation cognitive et sociale pour obtenir un bénéfice maximal. Il s'ensuivit alors de nombreux travaux sur différents modèles d'anxiété/dépression dans le paradigme de l'environnement enrichi.

Malgré les différences expérimentales notables dans la plupart de ces travaux, comme la durée d'hébergement, la qualité et la quantité des stimuli, le nombre d'animaux par cage, leur sexe et la souche utilisée, la majorité des études ont des conclusions allant dans le même sens : l'EE a un effet antidépresseur qui est corrélé à une augmentation de la prolifération neuronale. En effet, trois semaines d'hébergement en EE suffisent à augmenter la neurogenèse et l'expression de protéines associées à la fonction synaptique (PSD95 et Synapsine) chez des rats présentant un comportement résigné suite à l'utilisation d'un protocole de résignation apprise (Sifonios et al., 2009). Dans un modèle d'induction d'un état de stress post-traumatique chez le rat, 3 semaines d'hébergement en EE permettent de restaurer la neurogenèse est un mécanisme indispensable pour que l'EE ait des effets antidépresseurs sur le modèle d'exposition chronique à un stress social (Schloesser et al., 2010). Dans un modèle d'UCMS chez le rat, 19 jours d'hébergement en EE induisent des effets antidépresseurs en partie en augmentant la neurogenèse et la sécrétion de BDNF et VEGF (Seong et al., 2018). Dans le même modèle, reproduit chez la souris, l'hébergement en EE sur 6 semaines augmente à la fois la prolifération et la survie neuronale (Tanti et al., 2013).

L'environnement enrichi qui a donc des effets neurogéniques dans des modèles de dépression induite par des interventions comportementales exerce aussi ses effets bénéfiques dans des modèles d'animaux génétiquement modifiés. Par exemple, l'abolition du contrôle de l'expression du BDNF par le promoteur IV est acceptée comme modèle murin de dépression. Dans ce modèle de souris génétiquement modifiées, l'hébergement en EE réduit leur état dépressif en stimulant notamment la neurogenèse (Jha et al., 2011).

La stimulation de la neurogenèse ne semble pas être le seul mécanisme par lequel l'EE exerce ses effets bénéfiques sur l'apprentissage et les comportements anxio-dépressifs. En effet, dans un modèle murin d'inhibition de la prolifération cellulaire (par rayon X + administration de methylazoxymethanol un agent cytostatique), l'EE conserve, malgré ces conditions expérimentales, ses effets sur l'apprentissage et sur l'anxiété (Meshi et al., 2006). Dans le cadre de mon doctorat, nous avons également démontré qu'il existait des mécanismes dépendants et indépendants de la neurogenèse, stimulés par l'EE. Ces mécanismes décrits dans la partie « résultats » du manuscrit soulignent la capacité de l'EE à cibler différents systèmes, au niveau central et en périphérie, pour exercer ses effets bénéfiques.

II.D. LA NEUROINFLAMMATION

Un article publié en 2012 dans la revue *Brain Behavior and Immunity* confirme l'effet antiinflammatoire de l'EE sur le dialogue entre immunité périphérique et SNC. En effet, l'infection périphérique par le virus de la grippe induit une forte inflammation systémique mais aussi centrale. La neuroinflammation est corrélée avec la baisse d'expression ses facteurs neurotrophiques hippocampiques qui est associée à des dysfonctions cognitives. L'hébergement en EE pendant 4 mois en parallèle de l'infection virale permet d'améliorer les fonctions cognitives des animaux et de diminuer l'expression des cytokines pro-inflammatoires (IL-1 β , IL-6, TNF- α) et donc la neuroinflammation hippocampique (Jurgens and Johnson, 2012).

Dans des modèles d'inflammation exclusivement localisée dans le SNC, reproduisant notamment certaines pathologies neurodégénératives, l'hébergement en EE aurait aussi des effets bénéfiques et anti-inflammatoires. Dans un modèle murin de la maladie d'Alzheimer (TgCRND8), quatre mois d'hébergement en EE diminueraient significativement l'apparition des plaques séniles. De plus, l'analyse par microarray des cerveaux des souris a montré une concomitance de la diminution de l'expression de gènes pro-inflammatoires et de l'augmentation de l'expression de gènes anti-inflammatoires (Ambree et al., 2006). D'autres travaux sur le même modèle montrent que l'EE diminue les processus pro-oxydatifs connus pour être délétères dans la maladie d'Alzheimer et qu'à l'inverse il stimule les défenses anti-oxydantes. Ceci est révélé par la diminution d'espèce réactives de l'oxygène et du nitrogène mais également la diminution de l'expression de médiateurs pro-inflammatoires et pro-oxydants et des caspases apoptotiques (Herring et al., 2010).

Alors qu'il n'existe que très peu d'études sur les effets de l'EE sur la neuroinflammation et la dépression, une partie de mon travail de thèse, détaillée dans la partie « résultats », a démontré que l'EE a des effets anti-inflammatoires dans le modèle de dépression induite par administration chronique de corticostérone. Ces résultats s'accordent avec une publication de 2013 qui décrit des effets antidépresseurs et anti-inflammatoires de l'EE dans un modèle murin de stress chronique modéré et imprédictible. Cette étude montre que 4 semaines d'hébergement en EE permettent de diminuer l'expression d'IL-6 et du récepteur à l'IL-1 β au niveau de l'hippocampe (McQuaid et al., 2013a). De façon intéressante, d'autres données associées à cette publication montrent qu'en plus d'avoir un effet antiinflammatoire, l'EE diminue les concentrations circulantes de corticostérone et l'expression de la CRH.

Ceci suggère que les effets anti-inflammatoires de l'EE dans des conditions de dépression pourraient passer par une régulation de l'axe HPA.

II.E.LA VOIE DES KYNURENINES

A ce jour, il n'existe pas de publications démontrant des effets de l'EE sur le métabolisme de la kynurénine. En revanche, un papier publié en 2014 dans la revue *Cell* montre qu'en périphérie, l'activation de la voie des kynurénines par l'exercice volontaire se fait *via* le facteur de transcription PGC-1 α (PPARGC-1 α ou Peroxisome Proliferator-Activated Receptor Gamma Coactivator 1 α) dans le muscle squelettique. Cet activateur de transcription est connu pour réguler des gènes du métabolisme. Contrairement à l'inactivité physique qui réprime l'expression de PGC-1 α , l'exercice physique augmente son expression et par conséquent l'activation de la KAT et la métabolisation de la kynurénine en acide kynurénique (KYNA) qui au contraire aurait des propriétés neuroprotectrices (*Figure 13*). C'est pourquoi, les souris faisant de l'exercice résisteraient mieux que les souris inactives face au « stress » induit par le protocole d'UCMS (Agudelo et al., 2014).



Figure 13 : Effet de l'exercice sur l'expression des KAT dans la réponse au stress.

En condition de stress, le foie augmente la conversion du tryptophane (TRP) en KYN. L'exercice physique augmente l'expression de PGC-1 α qui va augmenter l'expression des KATs et la conversion de la KYN en KYNA. A l'inverse, un style de vie sédentaire inhibe l'expression de PGC-1 α , il y a donc moins de KATs exprimées et la KYN synthétisée par le foie peut atteindre en grande quantité le cerveau, être métabolisés en QUIN ou 3-OH et avoir des effets neurotoxiques pouvant accentuer la dépression. D'autres travaux ont également démontré les effets de l'exercice sur le métabolisme de la kynurénine chez la souris. Par exemple, la natation inhibe l'activité de l'IDO au niveau du SNC et diminue le ratio KYN/TRP dans l'hippocampe et le cortex préfrontal (Souza et al., 2017). Une autre publication montre que l'exercice volontaire réduit le ratio KYNA/3-OH-kyn dont l'augmentation est retrouvée en cas de dégénérescence liée à l'âge (Lee et al., 2017). Bien que peu nombreuses, ces études montrent que l'exercice, qui est une composante de l'EE, agit également sur la voie des kynurénines.

III. CONCLUSION SUR LES EFFETS PLEITROPES DE L'ENVIRONNEMENT ENRICHI

Nous avons vu dans cette partie que l'EE agit de façon synergique au niveau du système nerveux central et en périphérie. L'EE serait capable d'induire un rétablissement des différentes fonctions altérées chez les individus souffrant de dépression. De plus, l'EE n'induit pas d'effets secondaires indésirables et n'est pas invasif. C'est donc un excellent vecteur à la fois de traitement et de recherche intégrant l'aspect multifactoriel de la dépression dont le traitement nécessite de développer des molécules agissant sur plusieurs systèmes simultanément (Millan, 2006). En considérant les propriétés pléiotropes de l'EE, il est envisageable d'identifier de nouvelles cibles thérapeutiques ciblant des mécanismes impliqués dans l'établissement de la dépression. Au vu de la forte interaction entre les dérégulations métaboliques, l'inflammation et la dépression, étudier le tissu adipeux apparaît intéressant pour identifier une nouvelle cible thérapeutique dans le traitement de la dépression. Cet organe endocrine joue un rôle essentiel dans le contrôle de nombreuses réponses métaboliques mais peut également être influencé par différents facteurs biologiques. Le tissu adipeux et les hormones qu'il sécrète contrôlent : la prise alimentaire (Henry and Clarke, 2008), la réponse inflammatoire et la sécrétion de cytokines (Trotti et al., 2001) et le métabolisme des lipides (Winand et al., 1974). A l'inverse, son activité peut être régulée par l'axe HPA et les GCs (Fain, 2013). De plus, l'EE a un effet positif sur différents paramètres de la dépression et sur le tissu adipeux. En effet, comme décrit précédemment, l'EE est capable d'induire la conversion du tissu adipeux blanc en tissu adipeux brun (Cao et al., 2011). Enfin, différentes études ont mis en évidence un lien entre les faibles taux d'adiponectine, qui est une hormone principalement sécrétée par le tissu adipeux, et l'apparition d'un épisode dépressif (Narita et al., 2006) mais également entre des variant génétiques de l'adiponectine et l'incidence de l'obésité et du diabète (Gable et al., 2006). Cela confirme l'intérêt de s'intéresser de plus près aux modifications biologiques liées à l'adiponectine en conditions de dépression et d'environnement enrichi.

L'ADIPONECTINE

. L'ADIPONECTINE : LE LIEN ENTRE DEPRESSION, INFLAMMATION ET SYNDROME METABOLIQUE

Les mécanismes biologiques sous-jacents aux liens entre dépression et syndrome métabolique restent aujourd'hui peu explorés. L'adiponectine, est connue pour ses propriétés anti-inflammatoires et antiathérogènes. Les taux d'adiponectine circulante sont inversement proportionnels avec l'établissement d'un syndrome métabolique (Chen et al., 2017) et la dépression (Leo et al., 2006). Il semble donc exister une interdépendance entre syndrome métabolique, l'hypoadiponectinémie et dépression.

I.A. STRUCTURE DE L'ADIPONECTINE

C'est au milieu des années 90 que l'adiponectine a été identifiée presque simultanément par 4 groupes de recherche indépendants ce qui a conduit cette protéine de 244 acides aminés à être « baptisée » de différentes façons. Ses premiers noms ont été : Acrp30 (adipocyte complement-related protein of 30 kDa) (Scherer et al., 1995), apM1 (AdiPose Most abudant gene transcript 1) (Maeda et al., 1996), AdipoQ (Hu et al., 1996) et GBP28 (Gelatin-binding Protein of 28 kDa) (Nakano et al., 1996). L'adiponectine possède une extrémité C-terminale possédant un domaine globulaire « C1q-like » et une extrémité N-terminale possédant un domaine collagène. Elle présente une homologie structurale avec facteur du complément 1q (C1q) et d'autres similitudes avec des protéines comme le collagène VIII et X (Okamoto et al., 2000). Si l'adiponectine est sécrétée majoritairement par le tissu adipeux, elle peut aussi être exprimée par dans une moindre mesure par les muscles squelettiques, les cardiomyocytes (Pineiro et al., 2005) ou encore les ostéoblastes (Lee et al., 2006). Elle est sécrétée dans la circulation plasmatique sous forme de multimères, assemblés grâce au domaine collagène pour ainsi former 3 principales formes circulantes (*Figure 14*). Dans le plasma, elle existe sous 4 formes différentes :

- Une forme correspondant à un fragment protéolytique ne comportant que la partie globulaire (adiponectine globulaire ApNg) servant à la formation des trimères.
- Une forme de faible poids moléculaire (trimère LMW)
- Une forme de poids moléculaire intermédiaire (hexamère) qui correspond à la dimérisation de trimères grâce à la formation d'un pont disulfure.
- Une forme de haut poids moléculaire (High Molecular Weight HMW) qui correspond à l'oligomérisation en polymères de 12 à 18 sous unités.



Figure 14: Structure de l'adiponectine et de ses multimères.

Les formes hexamèriques et HMW sont majoritaires dans le plasma alors que la forme globulaire n'y est retrouvée qu'en faible quantité (Fruebis et al., 2001). Chez l'Homme la concentration d'adiponectine dans le LCS est 1000 fois inférieure à celle du plasma (Kos et al., 2007; Kusminski et al., 2007). Chez la souris, la concentration d'adiponectine dans le LCS correspond à seulement 1-4% de l'adiponectine plasmatique (Ahima, 2006). Son ARNm n'est retrouvé dans le SNC chez l'Homme qu'au niveau de l'hypophyse (Rodriguez-Pacheco et al., 2007). En revanche, chez la souris et le poulet son ARNm a été détecté dans des extraits de cerveaux totaux (Hoyda et al., 2007; Maddineni et al., 2005). De plus, nous avons montré que l'ARNm de l'ApN n'est pas exprimé par les neurones corticaux en culture primaire et très faiblement par les astrocytes et la microglie (résultats personnels non publiés). La sécrétion d'adiponectine est régulée par différents mécanismes faisant intervenir d'autres molécules au niveau transcriptionnel mais aussi traductionnel. Parmi ces régulateurs, le stress oxydatif, l'IL-6 et le TNF α qui ont une action inhibitrice sur sa sécrétion et les voies de PPAR (Peroxisome Proliferator-Activated Receptor) ou SIRT1 (Sirtuine 1) qui ont un effet activateur (Phillips and Kung, 2010). Les différents effets de l'adiponectine passent par sa liaison sur au moins trois récepteurs distincts.

I.B. RECEPTEURS ET VOIES DE SIGNALISATION DE L'ADIPONECTINE

I.B.1.RECEPTEURS

L'adiponectine exerce ses fonctions *via* sa fixation sur les récepteurs AdipoR1 et AdipoR2 (Adiponectin Receptor) et *via* la T-Cadherine qui a été identifiée comme récepteur spécifique des

formes de haut et moyen poids moléculaire (Hug et al., 2004). Les récepteurs AdipoR1 et AdipoR2 appartiennent à la famille des récepteurs à 7 domaines transmembranaires malgré leur topologie membranaire inversée puisqu'ils ont une leur extrémité intracellulaire qui est N-terminale et l'extracellulaire est C-terminale. De plus, la signalisation associée à l'activation de ces récepteurs n'a aucune similitude avec celle des RCPG.

En périphérie, les récepteurs AdipoR1 et AdipoR2 sont exprimés dans le foie, le pancréas, le muscle, les leucocytes et le tissu adipeux. AdipoR1 est majoritairement exprimé dans les muscles cardiaque et squelettique et induit la phosphorylation de l'AMPK alors que AdipoR2 est plutôt exprimé dans le foie où il va majoritairement activer PPAR α (Buechler et al., 2010). De plus, ces 2 récepteurs participent à l'oxydation des acides gras et la captation du glucose par l'adiponectine (Kadowaki and Yamauchi, 2005). L'adiponectine se lie aussi à la T-Cadhérine. Ce 3ème « récepteur » a été mis en évidence en 2004 et semble être spécifique des formes hexamèriques et HMW (Hug et al., 2004). La T-cadhérine ne partage pas de similitudes structurales avec les AdipoRs puisqu'elle ne possède ni de domaine transmembranaire ni de domaine intracellulaire (Takeuchi et al., 2007). La T-cadhérine est très exprimée au niveau vasculaire et en moindre mesure au niveau musculaire. L'absence d'expression de ce récepteur ailleurs et sa conformation suggèrent qu'elle a un rôle de protéine liant l'adiponectine plutôt que récepteur de celle-ci (Takeuchi et al., 2007).

L'expression des AdipoRs au niveau central a été étudiée des modèles animaux à l'Homme. Les AdipoRs ont été détectés chez la souris dans l'hypothalamus, le tronc cérébral, les cellules endothéliales mais aussi dans des extraits de cerveaux totaux ou d'hypophyse (pour revue, (Thundyil et al., 2012)). La réponse des récepteurs est fonction de la forme de l'adiponectine qui s'y fixe. D'ailleurs, au niveau central, il semblerait que les formes de petit poids moléculaire soient majoritaires, en effet, seules ces formes ont été détectées dans le LCS chez l'Homme et la souris (Escobar-Morreale et al., 2006; Glintborg et al., 2008). Alors que les effets de l'adiponectine en périphérie sont principalement orchestrés par les formes de haut poids moléculaire, il semblerait que les formes de petit poids moléculaire, il semblerait que les formes de petit poids moléculaire, il semblerait que les formes de petit poids moléculaire, il semblerait que les formes de petit poids moléculaire, il semblerait que les formes de petit poids moléculaire, il semblerait que les formes de petit poids moléculaire soient responsables des effets au niveau central (Hattori et al., 2007; Haugen and Drevon, 2007; Palanivel et al., 2007).

I.B.2.VOIES DE SIGNALISATION

La liaison de l'adiponectine sur ses récepteurs entraîne majoritairement l'activation de l'AMPK (Adenosine Monophosphate Protein - Kinase) et de PPAR α (Peroxisome Proliferator-activated Receptor-Alpha). L'AdipoR1 active principalement la voie de l'AMPK dans le muscle et l'AdipoR2 la voie PPAR α dans le foie. D'autres voies de signalisation sont également décrites, comme celles impliquant les céramides, JNK (c-Jun N-Terminal Kinase), p38-MAPK (p38-Mitogen-activated protein Kinase) ou encore la voie de NF- κ B (Nuclear Factor-kappa B) (Tang et al., 2005; Yamauchi et al., 2003). La protéine adaptatrice « Adaptor Protein, phosphotyrosine interacting with PH domain and Leucine zipper 1» ou APPL1, a aussi été décrite comme participant à la transduction du signal directement après fixation de l'adiponectine sur un des AdipoRs (Deepa and Dong, 2009; Mao et al., 2006) (*Figure 15*).

L'AMPK est une sérine/thréonine kinase retrouvée dans de nombreux tissus, comme le muscle cardiaque, l'hypothalamus, le foie, le pancréas ou le tissu adipeux. L'activation de l'AMPK dépend de la concentration intracellulaire du ratio AMP/ATP (Snehalatha et al., 2003). L'AMPK régule l'homéostasie énergétique au niveau du foie et du muscle en inhibant la synthèse de substrats lipidiques et glucidiques et en favorisant leur utilisation (Andreelli et al., 2006; Civitarese et al., 2006). Son activation est également impliquée dans les effets vasodilatateurs de l'adiponectine sur les cellules de l'endothélium vasculaire et au niveau du cœur (Kobayashi et al., 2004). De plus, l'AMPK stimule la captation et l'oxydation des acides gras au niveau des muscles cardiaques et squelettiques. Sa présence au niveau de l'hypothalamus lui confère un rôle également dans la prise alimentaire et l'apport énergétique. Aussi, l'AMPK joue un rôle important dans la régulation du métabolisme énergétique, grâce à ses effets périphériques et centraux.

La phosphorylation de l'AMPK entraîne l'inhibition de la voie de NF-κB qui est associé à la surexpression de la superoxyde dismutase manganèse (mnSOD) et de la nitrique oxyde synthase inductible (iNOS). Ces deux enzymes, participant à l'élimination des radicaux libres et la protection contre le stress oxydatif, justifient comment l'adiponectine peut avoir un effet antioxydant. D'ailleurs, les autres effets de l'adiponectine sur le contrôle de l'inflammation sont orchestrés par l'activation par APPL1 de la voie PI3K-Akt (phosphoinositide 3-kinase – Akt) (Chandrasekar et al., 2008) ou de l'inhibition par APPL1 de la voie NF-κB (Tomizawa et al., 2008).

Les PPAR sont des récepteurs nucléaires, appartenant à une famille regroupant les récepteurs aux hormones thyroïdiennes et stéroïdiennes, à la vitamine D3 et aux rétinoïdes. Chez l'Homme, ils existent sous 3 isoformes : α , β et γ , qui ont une distribution tissulaire et des fonctions différentes. PPAR α est retrouvé majoritairement dans le foie, le muscle, le rein et le cœur. Son activation par l'adiponectine va entraîner une régulation des gènes associés au métabolisme lipidique, en particulier la régulation des peroxysomes et l'induction du catabolisme des lipides (Ferre, 2004).

Les kinases MAPK appartiennent à une famille de protéines constituée de 3 sous familles : les kinases ERK (Extracellular signal-Regulated Kinases), les kinases JNK et les kinases p38. L'activation de la voie p38MAPK par l'adiponectine augmente l'absorption du glucose.

Les céramides sont des lipides composés d'une base à longue chaîne (sphingosine) liée à un acide gras par une liaison amide. Grâce à l'action de la céramidase et de la sphingosine kinase, les céramides donnent de la sphingosine-1-phosphate (S1P). Les 2 ont respectivement un rôle dans la résistance à l'insuline et dans l'inhibition de l'apoptose.



<u>Figure 15 :</u> Voies de signalisation de l'adiponectine

Adapté du site **www.biomol.com**.

I.C.FONCTIONS DE L'ADIPONECTINE

Les différentes voies de signalisations cellulaires et la distribution de ses récepteurs confèrent à l'adiponectine des effets pléiotropes.

I.C.1.EN PERIPHERIE

Les différentes actions de l'adiponectine sont résumées dans le tableau 5 ci-dessous.

Tissus / Organes	Récepteurs	Voies de signalisation	Effets Biologiques	Ref
Muscle squelettique	AdipoR1 AdipoR2 T-Cadhérine	AMPK PPARα NF-κΒ	 ↗ Oxydation des acides gras ↗ Synthèse protéique 	(1) (2) (3)
Foie	AdipoR1 AdipoR2	AMPK PPARα Céramides	 ↗ Oxydation des acides gras ↘ Synthèse des acides gras ↗ Sensibilité à l'insuline ↘ Production du glucose 	(1) (4) (5)
Cœur	AdipoR1 T-Cadhérine	AMPK Céramides	Protection cardio-vasculaire	(6)
Vaisseaux Sanguins	AdipoR1 T-Cadhérine	АМРК	Action anti-inflammatoire et anti- athérogène	(6)
Pancréas	AdipoR1 AdipoR2	AMPK Céramides	 ↗ Sécrétion d'insuline ↘ Apoptose induite par les acides gras 	(7) (8)
Tissus Reproducteurs	AdipoR1 AdipoR2	?	Production de progestérone et d'oestradiol	(1)

Tahlaau 5 ·	Différentes	fonctions	do l'adi	nonectine e	n nórinhória
Tableau J.	Differences	IUTICUUTS (uciaui	ponecune e	in peripitette.

(1)(Brochu-Gaudreau et al., 2010) ; (2)(Fruebis et al., 2001) ; (3)(Yamauchi et al., 2001) ; (4)(Combs et al., 2001) ; (5)(Awazawa et al., 2011) ; (6)(Guerre-Millo, 2008) ; (7)(Kharroubi et al., 2003) ; (8)(Okamoto et al., 2008)

Par ailleurs, il a récemment été montré que l'ApN induisait l'inhibition de la transmigration des lymphocytes T vers des tissus lésés en stimulant la sécrétion d'un « *PEPtide Inhibitor of Trans-Endothelial Migration* » (PEPITEM) par les lymphocytes B. L'absence de ce PEPITEM entraine une infiltration lymphocytaire exagérée et néfaste (Chimen et al., 2015). Enfin, les multiples rôles de l'adiponectine peuvent l'impliquer dans l'apparition ou le traitement éventuel maladies liées au syndrome métabolique comme l'obésité, l'insulino-résistance et la dyslipidémie.

I.C.2. AU NIVEAU CENTRAL

L'origine de l'adiponectine et ses fonctions dans le cerveau ont été des sujets très débattus, mais sa présence au niveau du SNC a été démontrée à plusieurs reprises (Psilopanagioti et al., 2009).

I.C.2.i. EN CONDITION PHYSIOLOGIQUE

En 2004, des travaux ont rapporté la détection d'adiponectine dans le LCS de souris C57BL/6J après une injection par voie intraveineuse. Les auteurs ont également démontré qu'une injection intracérébroventriculaire (ICV) d'adiponectine exerce le même effet qu'une injection intraveineuse sur la diminution des taux de glucose et de lipide dans le sang et sur le poids des animaux (Qi et al., 2004). Cependant, ces premiers résultats sont en contradiction avec 2 articles parus en 2006 concluant que l'adiponectine n'est pas capable de franchir la BHE (Pan et al., 2006; Spranger et al., 2006). Un an plus tard, une étude montre qu'une injection périphérique d'adiponectine permet une activation de l'AMPK au niveau de l'hypothalamus ce qui augmente la prise alimentaire et diminue la dépense énergétique (Kubota et al., 2007). Il est alors proposé que l'adiponectine soit une molécule de signalisation moléculaire avec une double action : périphérique et centrale.

I.C.2.ii. DANS LA DEPRESSION

Le lien entre adiponectine et dépression n'a pas été clairement prouvé. Il existe une corrélation inverse entre l'état dépressif et les taux circulants d'adiponectine. Cette corrélation a été démontrée dans une cohorte mixte (Leo et al., 2006), chez les adolescents (Mamalakis et al., 2006), chez les personnes âgées (Diniz et al., 2012) où les différences semblent être plus prononcées chez l'homme que chez la femme (Jeong et al., 2012). Cependant, d'autres travaux invitent à modérer ces résultats en rapportant que les taux d'adiponectine sont inchangés chez des hommes atteins de dépression sévère (Su et al., 2011) alors qu'ils sont augmentés chez des femmes souffrant de dépression post-partum (Yildiz et al., 2017). L'effet des traitements antidépresseurs sur l'adiponectine est aussi encore débattu. Une étude a montré qu'à la suite d'un traitement antidépresseur efficace, les taux d'adiponectine étaient augmentés (Narita et al., 2006). D'autres travaux ont montré qu'un traitement antidépresseur, qu'il soit efficace ou non, n'impacte pas les taux d'adiponectine (Weber-Hamann et al., 2007). Les résultats opposés retrouvés dans ces différentes études restent matière à débat car les conditions expérimentales de ces études comportent de nombreuses variables, notamment une grande diversité des cohortes étudiées (âge, sexe, IMC et traitement).

Chez les animaux de laboratoire, malgré le faible nombre de publications concernant les effets de l'adiponectine sur la dépression, toutes les études donnent des résultats concordants. En 2012, une publication parue dans le journal PNAS révèle par différentes techniques que l'adiponectine est liée à la dépression. En effet, les taux plasmatiques d'adiponectine sont réduits dans un modèle murin de stress social. De plus, des souris hétérozygotes pour le gène de l'adiponectine ont un comportement dépressif (aversion sociale, et désespoir) et présentent une dérégulation de l'axe HPA. Enfin, l'injection en ICV d'anticorps neutralisant l'adiponectine induit des comportements anxio-dépressifs. A l'inverse, injecter de l'adiponectine en ICV produit des effets antidépresseurs. Ainsi, cette publication met en lumière le rôle crucial de l'adiponectine dans la résistance contre la dépression (Liu et al., 2012a). Récemment, des travaux ont montré l'inhibtion de l'axe PPAR α -Adiponectine dans le modèle d'UCMS chez la souris (Guo et al., 2017). D'autres études ont été réalisées sur des modèles de rats et présentent des résultats similaires. En effet, l'analyse par microarray d'hippocampes issus de rats FSL présente une diminution de l'expression du gène de l'adiponectine en comparaison à des rats ne présentant pas de symptômes dépressifs (Wilhelm et al., 2013). De plus, des rats soumis au modèle de CMS présentent une diminution des taux plasmatique d'adiponectine (Magdy et al., 2017). Pour finir, une étude a mis en évidence l'adiponectine comme étant une molécule clef dans l'établissement des effets antidépresseurs de l'exercice physique (Yau et al., 2014). De plus, dans le cadre de ma thèse nous avons montré qu'une partie des effets antidépresseurs de l'EE dépendaient de l'adiponectine, je développerai ce travail dans la partie « résultats » de mon manuscrit.

Ces différentes données ne font que confirmer l'intérêt d'étudier l'adiponectine et le système adiponergique dans la recherche d'un traitement contre la dépression et les pathologies associées. A ce jour, la pharmacologie de l'adiponectine et de ses récepteurs reste peu développée, alors que l'identification d'un agoniste des récepteurs de l'adiponectine capable de mimer les effets des différentes formes de l'adiponectine offrirait sans doute de nouvelles opportunités dans le traitement des maladies aux multiples symptômes comme la dépression.

II. LA PLEIOTROPIE DES DIFFERENTES FORMES DE L'ADIPONECTINE RETROUVEE DANS UNE MOLECULE : L'ADIPORON

Dans ce contexte, mes travaux de thèse se sont centrés sur l'étude des effets d'un agoniste chimique des récepteurs de l'adiponectine : l'AdipoRon.

II.A. STRUCTURE ET SIGNALISATION

L'AdipoRon 2-(4-benzoylphenoxy)-N-(1-benzylpiperidin-4-yl) acétamide (*Figure* 16) a été caractérisé en 2013 par une équipe Japonais. Ces chercheurs ont réalisé un criblage haut-débit avec pour critère de séléction: la phosphorylation de l'AMPK et la perte de cette fonction en absence des AdipoRs sur des myotubes (la lignée C2C12). Ils ont discriminé les molécules restantes sur leur affinité vis à vis des AdipoRs. (Okada-Iwabu et al., 2013). Ainsi l'adipoRon est capable de lier et d'activer les récepteurs AdipoR1 et AdipoR2. Les constantes de dissociation de l'adipoRon pour l'adipoR1 et l'adipoR2 sont respectivement de 1,8uM et de 3,1uM. D'abord testé sur des myotubes (C2C12) en culture, l'adipoRon est capable d'activer la voie AMPK mais également d'augmenter l'expression de PGC1- α , de façon dose dépendante. In vivo, l'injection intraveineuse (50mg/kg) d'adipoRon active la voie AMPK dans le muscle squelettique et dans le foie. De plus, l'administration par voie orale (50mg/kg) d'adipoRon exerce des effets similaires. Il est décrit que l'adipoRon active à la fois la voie AdipoR1 – AMPK – PGC1 α mais aussi AdipoR2- PPAR α . Afin de confirmer la spécificité de l'effet de l'adipoRon, les mêmes travaux ont été réalisés sur des souris doubles KO pour AdipoR1 et AdipoR2 où les effets de l'administration de l'adipoRon sont abolis.

Figure 16 : Structure chimique de l'AdipoRon.

L'adipoRon étant capable d'activer les mêmes voies de signalisation que l'adiponectine, l'intérêt s'est porté sur sa capacité à reproduire les effets de l'adiponectine dans des conditions pathologiques.

II.B. EFFETS CONNUS DE L'ADIPORON

Les effets de l'adipoRon ont été depuis sa caractérisation largement étudiés dans le cas de pathologies métaboliques essentiellement. Par exemple, comme l'adiponectine, l'adipoRon améliore l'insulinorésistance, la dyslipidémie et la tolérance au glucose dans un modèle de souris développant un diabète de type 2 et de l'obésité. De plus, l'adipoRon rallonge l'espérance de vie des souris nourries avec un régime hyper-lipidique et améliore leur condition physique (Okada-Iwabu et al., 2015; Okada-Iwabu et al., 2013). L'adipoRon a également un effet anti-diabétogène sur les souris nourries avec un régime hyper-lipidique (Wang et al., 2017b). De plus, l'adipoRon semble avoir des effets hépato-protecteurs dans un modèle d'inflammation du foie, en réduisant l'infiltration des macrophages et l'expression de cytokines pro-inflammatoires (TNF- α , IL-1 β et IL-6) (Wang et al., 2016). En ce qui concerne les effets vasculaires, l'adipoRon induit une vasorelaxation au niveau des artères situées dans les muscles lisses (Hong et al., 2016) et inhibe l'apparition d'athérosclérose dans un modèle murin de la pathologie (Sun et al., 2017). De plus, il favorise l'angiogenèse et la migration cellulaire in vitro (Malih et al., 2017). Dans un modèle d'accident cardiovasculaire, l'utilisation d'adipoRon diminue le stress oxydatif et l'apoptose (Zhang et al., 2015).

Au moment de la rédaction de ce manuscrit, il n'existait qu'une publication parue en 2016 sur les effets de l'adipoRon au niveau central. Dans un modèle de peur-conditionnée, les auteurs ont montré que l'AdipoR2 est nécessaire dans les processus de d'extinction de la peur, qui est un processus clef dans les thérapies contre le stress post-traumatique. L'injection d'adipoRon permet via AdipoR2 une extinction plus rapide de la peur dans ce paradigme (Zhang et al., 2016).

En conclusion, il est intéressant de noter que chacune des pathologies périphériques ciblées par l'adipoRon rentre dans le tableau clinique du syndrome métabolique. Ainsi l'adipoRon semble remplir son rôle d'agoniste des récepteurs de l'adiponectine en périphérie mais ses effets au niveau central n'ont été que très peu étudié. À la vue de l'implication de l'adiponectine dans la pathologie dépressive, il était alors envisageable que l'adipoRon ait des effets bénéfiques contre la dépression. Son étude dans ce contexte pathologique a constitué une partie centrale de mon travail de thèse présenté ci-après.

OBJECTIFS

Les antidépresseurs pharmacologiques actuels qui sont efficaces dans environ 70% des cas présentent des inconvénients majeurs dont les nombreux effets secondaires et la durée de traitement nécessaire à leur efficacité. Pour améliorer les conditions de vie des patients résistants aux antidépresseurs classiques, des alternatives sont aujourd'hui proposées en complément de la pharmacopée classique. Parmi ces approches, des thérapies visant à augmenter les activités cognitives, physiques et sociales des patients sont mises en place. Dans environ 70% des cas, ces thérapies améliorent l'état de santé des patients et limitent la rechute. En laboratoire, ces conditions de vie « stimulantes » sans être stressantes peuvent être reproduites par l'enrichissement de l'environnement de vie des rongeurs. Découvrir et comprendre quels sont les mécanismes protecteurs stimulés par ces thérapies offre une opportunité de découvrir de nouvelles cibles moléculaires et d'envisager de nouvelles stratégies thérapeutiques contre la dépression.

Le premier objectif de mon travail de thèse qui a donné lieu à la publication n°1 était double : 1) déterminer le **potentiel antidépresseur d'un modèle murin d'environnement enrichi** (EE) dans un modèle de dépression induite pharmacologiquement par administration chronique de corticostérone dans l'eau de boisson. 2) Disséquer les **mécanismes moléculaires impliqués dans l'effet antidépresseur de l'EE**. Pour cela j'ai mis en place ces deux modèles au laboratoire pour répondre aux questions suivantes :

- Quels sont les effets comportementaux liés à la dépression induite par une administration orale chronique de corticostérone ?
- Quel est l'effet basal de l'EE, mis en place au laboratoire, au niveau comportemental, cellulaire et moléculaire ?
- Quel est le potentiel antidépresseur et anti-neuroinflammatoire de l'hébergement en EE dans le modèle murin de dépression induite par la corticostérone ?
- Cette approche permet-elle d'identifier un nouveau mécanisme impliqué dans les effets bénéfiques de l'EE ?

Cette dernière question a été le cœur du deuxième objectif de mon travail de thèse est nous avons centré notre étude sur le système adiponectine pour les raisons suivantes. L'adiponectine (ApN)

qui est retrouvée en faible quantité chez les patients dépressifs possède des propriétés antiinflammatoires en périphérie. L'inflammation centrale participerait à la dépression, alors que l'EE qui est antidépresseur aurait des propriétés anti-inflammatoires. Aussi le 2^{ème} objectif de mon projet a été de **déterminer si l'ApN participe aux mécanismes antidépresseurs et anti-inflammatoires de l'EE.** Pour y répondre nous avons étudié les questions suivantes :

- L'ApN est-elle un facteur clef des effets antidépresseurs de l'EE ?
- L'ApN est-elle un facteur clef des effets anti-inflammatoires de l'EE ?
- Les propriétés antidépressives de l'ApN sont-elles associées à ses propriétés antiinflammatoires ?
- Les cellules microgliales, chef d'orchestre de la réponse inflammatoires au niveau central sontelles la cible des effets anti-inflammatoires de l'EE et de l'ApN ?
- Quelle est la voie de signalisation moléculaire activée par l'adiponectine globulaire réduisant la réponse inflammatoire au niveau du SNC et en particulier sur la microglie ?

Cette deuxième partie qui a conduit aux articles n°2 et 3 nous a permis de confirmer le potentiel anti-neuroinflammatoire de l'ApN et d'identifier l'AdipoR1 comme étant le récepteur clé dans les effets anti-inflammatoires de l'ApN sur la microglie. Le système « adiponergique » semble donc être une cible prometteuse dans le traitement de maladies neuropsychiatriques ayant une composante inflammatoire comme la dépression. De ce fait, le 3^{ème} objectif de mon travail de thèse a été d'étudier l'intérêt de **l'adipoRon, un agoniste des récepteurs à l'adiponectine comme nouveau traitement antidépresseur.** Pour ce 3^{ème} objectif nous avons répondu à ces différents points :

- L'administration chronique ou aiguë d'AdipoRon a-t-elle un effet antidépresseur dans différents modèles murins de dépression ?
- L'adipoRon est-il capable de traverser la BHE et d'avoir des effets sur la neuroinflammation, la neurogenèse et le métabolisme de la 5-HT dans le modèle de dépression induite par la corticostérone ?
- L'adipoRon peut-il avoir des effets bénéfiques sur des composantes du syndrome métabolique ?

Ces objectifs ont donné lieu à des articles publiés ou soumis dans des revues internationales à comité de lecture et font l'objet d'un dépôt de brevet européen. Ces articles sont résumés et listés dans la partie « résultats » de mon manuscrit.

RÉSULTATS

ARTICLE 1: NEUROGENESIS-INDEPENDENT ANTIDEPRESSANT-LIKE EFFECTS OF ENRICHED ENVIRONMENT ARE DEPENDENT ON ADIPONECTIN

<u>Nicolas S</u>, Veyssière J, Gandin C, Zsürger N, Pietri M, Heurteaux C, Glaichenhaus N, Petit-Paitel A, Chabry J. **Psychoneuroendocrinology.** 2015 Apr 9;57:72-83. doi:10.1016/j.psyneuen.2015.03.017.

CONTEXTE

Nous avons vu dans l'introduction que les taux d'adiponectine circulante semblent corrélés à l'état dépressif. L'adiponectine (ApN) est impliquée dans l'établissement des effets antidépresseurs de l'exercice physique. L'activité physique est une composante essentielle de l'hébergement en environnement enrichi (EE). L'EE a aussi des effets antidépresseurs dans le modèle d'UCMS. L'objectif de cette première étude a été d'étudier le possible rôle de l'ApN dans les effets antidépresseurs de l'EE sur un modèle murin de dépression induite pharmacologiquement par administration chronique de corticostérone.

RESULTATS

En comparant les conditions hébergement EE aux conditions standard (ES) de laboratoire, nous avons démontré par des études comportementales (FST, NSF, Light&Dark, LH...) que l'EE a des effets anxiolytiques et antidépresseurs (*figure 1*). De plus, l'EE stimule la neurogenèse hippocampique des animaux sains comme de ceux rendus « dépressifs » par l'administration chronique de corticostérone (CORT) (*Figure 4 A, B*). Dans ces modèles, les taux plasmatiques des différentes formes d'ApN mesurés par ELISA sont inchangés quelques soient les conditions (*Figure 2A*). En revanche, une augmentation de la concentration des formes de petit et moyen poids molécules d'ApN est observée au niveau central dans la condition EE+CORT (*Figure 2B*), contribuant possiblement aux effets antidépresseurs de l'EE. En effet l'injection ICV d'ApN globulaire (ApNg) diminue le temps d'immobilité de souris contrôles ou « dépressives », évalué 2h après injection dans le test de la nage forcée (FST) (*Figure 2C*). Pour caractériser l'importance de l'ApN dans les effets antidépresseurs de l'EE, nous avons étudié si les effets antidépresseurs de l'EE étaient abolis chez les déficientes en adiponectine (ApN^{-/-}). Les analyses comportementales ont mis en avant que l'EE conserve ses effets antidépresseurs sur les ApN^{-/-} dans des tests dépendants de la neurogenèse comme le NSF et le LH. A l'inverse, les souris ApN^{-/-} ne bénéficient plus des effets antidépresseurs de l'EE dans des tests indépendants dans le neurogenèse

comme le FST, le Light&Dark et l'openfield (*Figure 3*). De plus, l'EE augmente la neurogenèse hippocampique des souris ApN^{-/-} comme des souris WT (*Figure 4 C*). Ces résultats suggèrent que l'ApN est impliquée dans les effets de l'EE indépendants de la neurogenèse. L'augmentation de la concentration des formes de faibles poids moléculaires de l'ApN dans le LCS suggère que dans la condition EE+CORT le passage de l'ApN au travers de la BHE est favorisé. Le passage de l'ApN au travers de la BHE étant controversé, nous avons évalué l'effet antidépresseur de l'injection IV de l'ApNg chez des souris ApN^{-/-} dans le FST en fonction des conditions d'hébergement (ES ou EE) avec CORT. L'injection périphérique d'ApN induit des effets antidépresseurs uniquement dans la condition EE+CORT (*Figure 5 A*). De plus, ces effets sont corrélés à une stimulation de l'activation neuronale identifiée par des études immunohistochimiques par marquage C-Fos dans l'hypothalamus (*Figure 5 B, C*).

CONCLUSION

Ces résultats montrent pour la première fois que les effets antidépresseurs de l'EE s'étendent à un autre modèle de dépression que nous avons induite pharmacologiquement par un traitement CORT. L'EE entraîne l'augmentation dans le LCS de la concentration d'ApN qui possède des effets antidépresseurs. La contribution de l'ApN dans les effets antidépresseurs de l'EE serait d'importance dans les effets indépendants de la neurogenèse, phénomène auquel elle ne semble pas contribuer. Par ailleurs, nous avons montré que la stimulation de la neurogenèse induite par l'EE serait contrôlée en partie par les lymphocytes T CD8+ confirmant un mode de régulation complexe impliquant un dialogue entre système immunitaire et système nerveux central. Ces travaux auxquels j'ai contribué ont fait l'objet d'un article publié en 2017 (Annexe 1).

Enfin, nos résultats suggèrent que l'EE favoriserait le passage de l'ApN du sang vers le LCS dans certaines conditions pathologiques. Au niveau central, les effets de l'ApN sont rapides, puissants et indépendants de la neurogenèse hippocampique. L'effet de l'ApN impliquerait l'activation des neurones hypothalamiques, suggérant une possibilité de modulation du fonctionnement de l'axe HPA par l'ApN. Nos résultats suggèrent que l'ApN est un facteur clé de communication entre les organes périphériques et le cerveau et un intermédiaire important des effets bénéfiques de l'EE sur la régulation de l'humeur. L'ApN possédant des propriétés anti-inflammatoires en périphérie, nous avons ensuite testé l'hypothèse selon laquelle elle agirait sur le cerveau notamment en limitant la neuroinflammation.

ARTICLE 1



Available online at www.sciencedirect.com







Neurogenesis-independent antidepressant-like effects of enriched environment are dependent on adiponectin



Sarah Nicolas^{a,b}, Julie Veyssière^{a,b}, Carine Gandin^{a,b}, Nicole Zsürger^{a,b,1}, Mariel Pietri^{a,b}, Catherine Heurteaux^{a,b}, Nicolas Glaichenhaus^{a,b}, Agnès Petit-Paitel^{a,b}, Joëlle Chabry^{a,b,*}

^a Institut de Pharmacologie Moléculaire et Cellulaire, Unité Mixte de Recherche 7275, Centre National de la Recherche Scientifique 660, route des lucioles, 06560 Valbonne, France ^b Université de Nice Sophia Antipolis, 28, avenue Valrose, 06103 Nice, France

Received 8 December 2014; received in revised form 24 February 2015; accepted 21 March 2015

KEYWORDS

Adiponectin; Anxiety; Depression; Enriched environment; Behavior; Neurogenesis Summary Environmental enrichment (EE) that combines voluntary physical exercise, sensory and social stimuli, causes profound changes in rodent brain at molecular, anatomical and behavioral levels. Here, we show that EE efficiently reduces anxiety and depression-like behaviors in a mouse model of depression induced by long-term administration of corticosterone. Mechanisms underlying EE-related beneficial effects remain largely unexplored; however, our results point toward adiponectin, an adipocyte-secreted protein, as a main contributor. Indeed, adiponectin-deficient (adipo $^{-/-}$) mice did not benefit from all the EE-induced anxiolytic and antidepressant-like effects as evidenced by their differential responses in a series of behavioral tests. Conversely, a single intravenous injection of exogenous adiponectin restored the sensitivity of $adipo^{-/-}$ mice to EE-induced behavioral benefits. Interestingly, adiponectin depletion did not prevent the hippocampal neurogenesis induced by EE. Therefore, antidepressant properties of adiponectin are likely to be related to changes in signaling in the hypothalamus rather than through hippocampal-neurogenesis mechanisms. Additionally, EE did not modify the plasma levels of adiponectin but may favor the passage of adiponectin from the blood to the cerebrospinal fluid. Our findings provide advances in the understanding of the anxiolytic and antidepressant-like effects of EE and highlight adiponectin as a pivotal mediator. © 2015 Elsevier Ltd. All rights reserved.

* Corresponding author at: Institut de Pharmacologie Moléculaire et Cellulaire, 660 route des lucioles, Sophia Antipolis, 06560 Valbonne, France. Tel.: +33 4 93 95 77 48; fax: +33 4 93 95 77 08.

E-mail address: chabry@ipmc.cnrs.fr (J. Chabry).

¹ In memoriam to our friend and colleague.

http://dx.doi.org/10.1016/j.psyneuen.2015.03.017 0306-4530/© 2015 Elsevier Ltd. All rights reserved.

1. Introduction

In humans, psychologically stressful situations are major risk factors for appearance of anxiety and depression symptoms. Effective treatments mainly based on monoaminergic system regulation such as tricyclic antidepressants, monoamine oxidase inhibitors (MAOIs) and selective serotonin reuptake inhibitors (SSRIs) are available; however, about 40% of patients with depressive disorders are partially or completely resistant to treatments. Thus, identification of novel therapeutic targets is urgently needed.

Besides antidepressant drugs, other types of therapies for depression are frequently enforced including cognitivebehavioral therapies, dietary supplements and physical exercise. By themselves or in association with the usual medication, they can improve mood in people with mild to moderate depression and prevent relapse (Babyak et al., 2000). Little is known about the molecular basis underlying such beneficial effects. In animals, accumulating evidence indicates that environmental enrichment (EE) can mimic positive life experiences in humans. The EE model typically consists of housing rodents in enlarged groups in relatively spacious cages with a variety of objects frequently changed (e.g. running wheels, houses, tunnels, nesting material etc). EE causes an increase in hippocampal neurogenesis (Kempermann et al., 1997) and enhances learning and memory and neural plasticity (Hosseiny et al., 2014; Sale et al., 2009). EE also modulates the activity of the hypothalamo-pituitary-adrenal (HPA) axis through changes in neural circuitry in the hypothalamus (Cao et al., 2010). Recent studies demonstrated that EE reverses emotional disturbances in rodent models of neurological and psychiatric disorders including schizophrenia, depression and post-traumatic stress disorders (Takuma et al., 2011). Together, EE constitutes a suitable and relevant experimental model to decipher molecular events leading to specific and desirable changes and ultimately to the improvement of cerebral functions.

In rodents, EE has positive effects through alteration of numerous hormones and neurotransmitters including factors secreted by the adipose tissue, the adipokines (Cao et al., 2010). The most abundant adipokine, adiponectin, is released into the blood stream as full-length trimers, hexamers, high molecular weight (HMW) multimers and a globular fraction called globular adiponectin (Ouchi et al., 2003). It is primarily involved in inflammatory responses, energy expenditure and glucose and lipid homeostasis (Berg et al., 2002). Interestingly, adiponectin may have more widespread influence and functionality in the brain than previously thought (Arnoldussen et al., 2014). Indeed, the major isoforms of adiponectin receptors, adipoR1 and adipoR2, are expressed throughout the brain mainly in the hypothalamus, hippocampus and cortex (Kubota et al., 2007; Liu et al., 2012). Central actions of adiponectin have been reported including increase of oxygen consumption, thermogenesis (Qi et al., 2004) and regulation of food intake (Kubota et al., 2007). More recently, antidepressant-like properties have been ascribed to adiponectin likely through neurogenesisdependent pathways (Liu et al., 2012; Yau et al., 2014).

Glucocorticoids are the most commonly prescribed antiinflammatory/immunosuppressant medications worldwide; however, severe neuropsychiatric disorders including depression, suicide attempt, psychosis and panic disorder have been reported in association with glucocorticoid use (Judd et al., 2014). Hypercortisolism due to the unregulated activation of the hypothalamo-pituitary-adrenal (HPA) axis is thought to be involved in anxiety/depressive symptoms in humans. A wealth of information supports stress as a causal factor of depression, largely involving chronic stressrelated HPA dysregulation and toxicity from excessive glucocorticoid release (Lupien et al., 2009). Other theories posit that a down regulation of hippocampal neurogenesis underlies the disorder (Kempermann and Kronenberg, 2003). David and coll. have established a relevant model of anxiety/depressive-like state that mimics HPA dysfunction (David et al., 2009); it consisted in a continuous input of glucocorticoid (corticosterone) in the drinking water of mice for several weeks. In this model, the abolishment of hippocampal neurogenesis blocked the efficacy of the antidepressant fluoxetine in some, but not all, behavioral paradigms, indicating that antidepressants may act through both neurogenesis-dependent and -independent mechanisms (David et al., 2009).

Here, we investigate the possible beneficial effects of EE on depression- and anxiety-relevant behaviors using the mouse model described above. We show that EE efficiently reverses anxiety/depressive-like state induced by long-term exposure to corticosterone as evaluated using a panel of behavioral tests (i.e. open-field (OF), light and dark (L&D), forced swim test (FST), novelty suppressed feeding (NSF) and learned helplessness (LH) tests). Our results point toward adiponectin as a main mediator of the "positive stress" since adiponectin depletion results in a partial insensitivity to beneficial effects of EE likely through neurogenesis-independent mechanisms. Antidepressant properties of adiponectin may be linked to changes in signaling in brain areas other than the hippocampus, as neuronal activation was detected only in the hypothalamus after intravenous (i.v.) injection of exogenous adiponectin.

2. Materials and methods

2.1. Materials

Globular adiponectin and corticosterone immunoassay were purchased from Enzo Life Sciences, BrdU, paraformaldehyde, corticosterone and β -cyclodextrine from Sigma.

2.2. Mice

Four week-old male wt or adiponectin knockout (adipo^{-/-}) mice with the same C57BL/6J genetic background were randomly assigned into different treatment groups and housed at 22 °C with a 12-h light-dark cycle (lights on at 07:00) with free access to beverage and chow (A04, SAFE). Mice housed either in standard ''SE'' (six/cage of $32L \times 17W \times 15H$ cm i.e. $91 \text{ cm}^2/\text{mouse}$) or enriched environment ''EE'' (twelve/cage of $57L \times 40W \times 20H$ cm i.e. $190 \text{ cm}^2/\text{mouse}$) received corticosterone (35 mg/l dissolved in tap water containing $4g/l \beta$ -cyclodextrine) *ad libitum* or vehicle alone for six consecutive weeks. While the SE cages

contained sawdust only, the EE cages contained, in addition, two running wheels, tunnels, nests, scales, colored toys, hammocks and nesting materials; items were changed twice a week.

Animal procedures were conducted in compliance with the Institutional Animal Care and Use Committee of the University of Nice-Sophia Antipolis (permission number 010344.01 from the French ''Ministère de l'Enseignement Supérieur et de la Recherche'').

2.3. Behavioral studies

Before each trial, all devices were thoroughly cleaned with 70% ethanol and dried.

2.3.1. Open-field (OF) activity and light-dark (L&D) preference tests

Anxiety-like behavior was determined using the OF and L&D preference tests as previously described (Kinsey et al., 2007; Bailey et al., 2009; Wohleb et al., 2011). For the OF test, mice were placed in the corner of the test apparatus ($45L \times 45W \times 25H$ cm Plexiglas box) and activity was recorded for 5 min. Mice with anxiety-like behavior entered the center less often, delayed the first entry and spent less time in the center of the arena. For light and dark preference, the test apparatus ($40L \times 30W \times 25H$ cm) was divided into two equal zones with a doorway connecting the two sides. The light zone was very bright (200 lx) while the dark zone was protected from light by an opaque lid. To initiate testing, mice were placed into the light side and activity was recorded for 5 min. Anxiolytics have been found to increase time spent in the light zone.

2.3.2. Forced swim test (FST)

Mice were placed into glass buckets (20 cm diameter, 30 cm deep, filled with water $22 \degree C \pm 0.5 \degree C$). As described previously by (Porsolt et al., 1977), only the last 4 min were scored for immobility duration. A mouse was considered immobile when it remained floating in an upright position with only slight movements to keep its head above water (Pechnick et al., 2004).

2.3.3. Novelty suppressed feeding (NSF)

NSF is a conflict test that elicits competing motivations: the drive to eat and the fear of venturing into the center of the brightly lit arena. The testing apparatus consisted of a plastic box $(45L \times 45W \times 25H \text{ cm})$ with 2 cm of wooden bedding on the floor and a single pellet of food in the center. Mice were fasting for 20-h prior testing. At the time of testing, an animal was placed in a corner of the box, and the entire session was videotaped (i.e. 10 min period). The latency to eat (defined as the mouse sitting on its haunches and biting the pellet) was timed. Immediately after the test, food consumption was measured for 5 min as control for potential feeding differences.

2.3.4. Learned helplessness (LH)

Mice were placed into the shock chamber and exposed to inescapable shocks comprised of 360 footshocks (intensity: 0.3 mA, duration: 2 s, interval-episode: 10 s). The shock procedure was repeated four consecutive days. The fifth day,

learned helplessness was assessed by testing shuttle box performance with footshocks in each trial as followed (intensity: 0.3 mA, duration: maximum 24 s, inter-trial interval: 60 s). The parameter **escape latency** was recorded as the time needed to shuttle into the other compartment after onset of footshocks, and **failure** when no attempt to escape was made. Total time of testing for helplessness lasted about 20–24 min, the exact time period depending on the animal's ability to learn the paradigm. Control animals underwent the same handling and contextual procedures without receiving the footshocks.

2.3.5. Rotarod

The motor coordination was assessed using the rotarod test. Mice were placed on a rotating wheel for two 5 minhabituation phases on fixed rod (4rpm/min) 4h apart. Twenty-four hours later, the latency to fall was recorded on accelerating rod (from 4 to 40 rpm/min). The retention duration on the rod was an index of motor coordination.

All behavioral tests and biological analyses of blood and fecal samples were done after a 6-week period of housing. Individual cohorts of mice were subjected to i—BrDU injections, ii—feces, blood sampling and tissue collection, iii—CSF sampling, iv—behavioral tests (one test *per* day, order of testing: L&D, OF, rotarod, NSF and FST), v—tail flick and LH.

2.4. Measurement of adiponectin in CSF and plasma

Mice were anesthetized with an i.p. injection of sodium pentobarbital; then CSF $(2-5\,\mu l)$ was obtained by cisternal puncture. Blood was collected simultaneously from the heart. Adiponectin concentration was measured using the ALPCOTM immunoassay ELISA according to the manufacturer's protocol.

2.5. I.c.v. and systemic and injections of adiponectin

For i.c.v. injections, wt mice were anesthetized with a ketamine (100 mg/kg) and xylazine (10 mg/kg) mixture. The mouse was fixed thanks to ear bars on a stereotaxic apparatus (Kopf) on heating mat and the skull was exposed, then i.c.v. injections $(0.3 \mu g \text{ of adiponectin in } 2 \mu l \text{ of NaCl}$ 0.9% or vehicle alone) were performed using a Hamilton micro-syringe (cerebral lateral ventricle coordinates: -0.22 mm posterior and 1 mm lateral to the bregma; depth 2.0 mm) at $0.2 \,\mu$ l/min. To test the permeability of the BBB, globular adiponectin $(1 \text{ mg/kg}, 100 \mu \text{l})$ or NaCl 0.9% (100 μ l) was injected in the tail vein (i.v.) of vigil adipo^{-/-} mice. Based on previous reports (Kubota et al., 2007; Qi et al., 2004), the behavioral tests were performed 2 h postinjection. Then, perfusions were performed by intracardiac puncture of saline solution following by fixation with 3.2% paraformaldehyde. Brains were collected and prepared for paraffin inclusion prior immunochemistry studies.

2.6. cFos immunohistochemistry

Coronal sections (8 µm) from fixed and parafin-included brains were cut with a microtome (Leica), and then cFos immunohistochemistry was performed on free-floating slices. Briefly, sections were dehydrated through successive ethanol bath, then incubated in Tris 50 mM pH 8 containing proteinase K ($10 \mu g/ml$) for 30 min at 37 °C. The slides were rinsed in PBS, treated in PBS H₂O₂ 0.3% for 10 min, permeabilized in PBS Tween 0.3% for 10 min followed by a blocking step in PBS goat serum 2.5% for 2 h at room temperature prior incubation in the same buffer containing the rabbit anti-cFos antibody (1:150; Enzo) overnight at 4°C. The sections were incubated in biotin-conjugated species-specific secondary antibodies (1:400; Vector Laboratories) for 2 h followed by a peroxidase-avidin complex solution according to the manufacturer's protocol. The peroxidase activity of immune complexes was visualized with DAB staining using the VectaStain ABC kit (Vector Laboratories). Sections through the hypothalamus from five mice per treatment were examined using an Olympus microscope.

2.7. Hippocampal neurogenesis assay

During the third week of housing in SE or EE, mice were i.p. injected with BrdU (50 mg/kg of body weight) once a day for five consecutive days. Twenty-one days after the last injection of BrdU, mice were euthanized and transcardially perfused with cold PBS then fixed with 3.2% paraformaldehyde. Serial coronal brain sections were cut (40 μ m) throughout the hippocampus (from bregma 3.3 to 5.3) on a vibratome (Leica). Eight sections (one every fifth section) throughout the hippocampus were processed for BrdU immunohistochemistry. Briefly, floating slides were first incubated for 1h at room temperature in PBS containing 2.5% horse serum, overnight at 4°C with a mouse monoclonal anti-BrdU antibody (1:7500; Becton-Dickinson) and finally for 2 h in biotin-conjugated species-specific secondary antibodies. The DAB staining were performed as described above. BrdU-labeled cells in the subgranular layer (SGL) and granule cell layer (GCL) were counted in each section (n = 5 mice per group) at $40 \times$ magnification under a light microscope (Olympus). The total number of BrdU-positive cells per eight slices was multiplied by five to obtain the total number of cells per dentate gyrus.

2.8. Statistical analysis

Two-way analysis of variance (ANOVA) was performed using GraphPad Prism 4.0 software for treatment and environment effects, and when warranted, *post hoc* Bonferroni multiple comparisons were carried out. When the sample size was small ($n \le 12$) and/or when a normal distribution cannot be assumed, the appropriate non-parametric Kruskal–Wallis analysis was applied followed by a Mann–Whitney test for comparisons between two independent groups. Due to the lack of normal distribution, the data from NSF test were analyzed by a Kaplan–Meier followed by a Wilcoxon-Peto-Peto test to evaluate difference between groups. Results from data analysis were expressed as mean \pm standard error of

the mean (SEM). Statistical significance was set at * P < 0.05 and ** P < 0.01, *** P < 0.001.

3. Results

3.1. Behavioral effects of EE in a stress-related mouse model of anxiety and depression

Several studies have confirmed that long-term exposure to glucocorticoids induces anxiety and depressive-like states in rodents (Murray et al., 2008; David et al., 2009). We sought to investigate the potential beneficial effects of housing in an enriched environment (EE) on anxiety and depression-like states. To do so, C57BL/6J mice housed either in ''standard'' (SE) or EE conditions were exposed continuously to a low dose of corticosterone in drinking water for six weeks. At the end of the treatment, a set of standardized behavioral tests routinely used to evaluate the anxiety and depressive-like states in mice (David et al., 2009) was performed. We first assessed the anxiety behavior of SE-housed mice in both open-field (OF) and lightdark (L&D) paradigms (Crawley, 2008) (Fig. 1A and 1B, black bars). As expected, corticosterone-treated mice exhibited reduced time spent (Fig. 1A left), enhanced latency of first entry in the center of the arena as well as reduced time spent in the aversive lighted chamber of the L&D device (Fig. 1B right) compared to vehicle-treated mice indicating that corticosterone treatment had a marked effect on anxiety parameters. Interestingly, the anxiety phenotype was reversed by EE housing in both vehicle- and corticosteronetreated groups. A significant main effect of interaction between environment and treatment was measured for the time spent in the center of the OF (Fig. 1A; environment: $F_{1,34} = 7.9$; P = 0.01; treatment: $F_{1,34} = 6.92$; P = 0.012, interaction: $F_{1,34} = 5.29$; P = 0.03). No significant difference in locomotor activity was found between groups as measured by total distance traveled in the OF paradigm (data not shown). Long-term treatment with corticosterone did not alter the motor coordination as assessed by the retention time in the rotarod test (Fig. 1.C black bars; interaction: $F_{1,34}$ = 0.09; P = 0.82). Besides, EE-housed mice performed better in the rotarod since their retention time was higher than that of SE mice in both vehicle and corticosterone conditions (Fig. 1C). Altogether, we showed that EE housing prevents anxiety and strengthens motor coordination of mice in both basal and stress-induced conditions.

Second, we assessed the effect of chronic corticosterone treatment on depression-like behavior using the FST, the NSF and the LH paradigms. The FST is a wellstandardized paradigm to evaluate resignation and despair states in mice. We found first that corticosterone treatment had no effect in the immobility duration in the FST (Fig. 1D, *black dots*), and second that EE led to a significant decrease of this parameter independently of the treatment (Fig. 1D, *white dots*; interaction: $F_{1,73} = 1.65$; P = 0.2). In the NSF test, we found that chronic corticosterone treatment led to a significant increase in the latency to feed (Fig. 1E, Kaplan-Meier survival analysis, Wilcoxon-Peto-Peto test, * P < 0.05). EE housing significantly decreased the latency to feed of both vehicleand corticosterone-treated mice (Fig. 1E, *white dots*)



Fig. 1 Behavioral effects of a 6 week-period of EE housing in vehicle- and chronic corticosterone-treated wt mice. (A) Anxiety behavior of vehicle- (-) and corticosterone-treated (+) mice housed for 6 weeks either in SE (black) or EE (white) were assessed in the open-field test. Measured features are the time spent in the aversive center of the arena (*left*), the number of entries in the centre (*middle*) and the latency to first entry (*right*). Values plotted are means \pm SEM, n = 16-20 per group, (B) anxiety behavior was assessed in the light and dark paradigm by recording the time spent in the lighted aversive area. Data are the means \pm SEM, n = 16-20 per group, (C) the motor coordination was assessed by the time of retention on the rotarod

without affecting the home food consumption (Fig. S1). Mice were also tested in a learned helplessness (LH) paradigm, a depression model in which mice are exposed for four consecutive days to inescapable aversive electric footshocks (Chourbaij et al., 2005). On the day test, corticosteronetreated mice exhibited longer escape latency as compared to vehicle-treated mice housed in SE conditions (Fig. 1F, *left*). Over the time course of testing, EE housing shortened the latency to escape in corticosterone- and vehicletreated groups (Fig. 1F, left, environment: $F_{1,44}$ = 74.9; P = 0.001; treatment: $F_{1,44} = 89.2$; P = 0.001, interaction: $F_{1,44}$ = 4.3; P = 0.043). Long-term exposure to corticosterone significantly increased the number of failure to escape (Fig. 1F, right). Importantly, EE housing efficiently reduced this parameter with or without corticosterone treatment (Fig. 1F, right). To rule out pain sensitivity as a confounding factor in the learned helplessness test, mice were submitted to the tail-flick test enabling an assessment of acute pain. No difference in the latency of tail withdrawal was found between groups in the tail-flick test indicating that the pain sensibility was not altered by the treatment (Fig. S2).

Altogether, our data suggest that high levels of sensory and motor stimuli provided by EE prevent anxiety and depression-like states in a mouse model of depression.

3.2. Variation of adiponectin levels in plasma and CSF as a function of environmental conditions

We sought to examine whether environmental conditions modify adiponectin concentrations in blood and CSF. Concentrations of the total, high and mid/low oligomeric complexes of adiponectin were assayed in the plasma and CSF of control and long-term exposed-corticosterone mice housed either in SE or EE (Fig. 2). Neither housing conditions nor treatment modified the plasma concentration of adiponectin (Fig. 2A). In marked contrast, EE housing led to a four-fold increase in the concentration of total, and among them, mid/low forms of adiponectin in CSF of mice challenged by chronic corticosterone (Fig. 2B, white hatched bars) whereas no difference was measured in the CSF of vehicle-treated mice (Fig. 2B). Neither corticosterone treatment nor housing conditions resulted in alterations of the CSF concentration of high molecular complexes of adiponectin (Fig. 2B).

(means \pm SEM, n = 16-20 per group). Anxiety and depressivelike phenotypes of vehicle- (-) and corticosterone-treated (+) mice housed either in SE or EE were assessed by the time of immobility in the FST (D) and the latency to feed in the NSF (E). The NSF test was stopped after a 10 min-period. Each dot represents an animal; the horizontal bars are means. (F) Depressive-like behavior of vehicle- and corticosterone-treated mice housed either in SE or EE was assessed by the latency to escape an inescapable footshock in the LH test. The latency to escape in seconds is the mean of data for 5 consecutive sessions (*left*), the number of failure to escape was represented (*right*). Values are means \pm SEM (n = 12 per group). ns, non significant; * P < 0.05, ** P < 0.01; *** P < 0.001.

3.3. Behavioral effects of cerebral administration of exogenous adiponectin in the FST

We next investigated whether the direct administration of exogenous adiponectin into the brain could mimic the antidepressant-like effects of EE. I.c.v. injection of recombinant globular adiponectin to vehicle- and corticosterone-treated mice housed in SE significantly decreased immobility time in the FST suggesting an antidepressant-like effect (Fig. 2C). It is unlikely that the decrease of immobility time was due to an enhancement of



Fig. 2 Variation of adiponectin levels in plasma and CSF as a function of housing conditions and effect of cerebral administration of exogenous adiponectin on depression-like behavior. Concentrations of various forms of adiponectin in plasma (A) and CSF (B) of vehicle- and corticosterone-treated mice housed in SE or EE for 6 weeks. Values plotted are means \pm SEM (n = 10-12 per group); ns, non significant; * P < 0.05. (C) Depression-like behavior was assessed by the immobility time in the FST after i.c.v. injection of 0.3 µg of globular adiponectin in vehicle- or corticosterone-treated mice housed in SE N = 5-8 per group; Mann–Whitney for comparison between two groups; ns, non significant; * P < 0.05.

locomotor activity because performances on rotarod were unchanged after i.c.v. injection of adiponectin (data not shown).

3.4. Behavioral characterization of $adipo^{-/-}$ mice as a function of corticosterone treatment and environmental housing conditions

To investigate whether adiponectin plays a role in the antidepressant-like effects of EE, adipo-/- mice housed either in SE or EE were challenged with chronic corticosterone administration. The corticosterone treatment significantly increased anxiety and depression-like behaviors of $adipo^{-/-}$ mice when assessed in the open field (time spent and latency of first entry in the center, Fig. 3A left and right, respectively), light and dark (Fig. 3B) and LH paradigms (Fig. 3F). Surprisingly, EE housing has no effect on the performances of adipo-1- mice in the open field (i.e. two-way ANOVA; time spent in the aversive area; interaction: $F_{1,44} = 0.63$; P = 0.43; the number of entries; interaction: $F_{1.44} = 2.09$; P = 0.163; latency to first entry in the center of the arena; interaction: $F_{1.44} = 0.08$; P = 0.7; Fig. 3A) and in the light and dark test (i.e. time spent in the light area, interaction: $F_{1,44} = 0.5$; P = 0.48; Fig. 3B) as compared to SE. EE-housed performed better in the rotarod test than SE-housed adipo^{-/-} mice (Fig. 3C). Moreover, adipo^{-/-} mice exhibited similar performances in FST whatever the housing and treatment conditions (Fig. 3D; two-way ANOVA, interaction: $F_{1.44} = 0.012$; P = 0.9). In contrast, EE housing significantly decreased latency to feed in the NSF test (Fig. 3E; Kaplan-Meier for SE versus EE groups; P < 0.001 and P < 0.01 for vehicle- and corticosterone, respectively). In the LH test, latency to escape and the number of failure to escape were decreased in EE conditions independently of the treatment. Two-way ANOVA analysis revealed the lack of significant main effect for these latter parameters (latency to escape, interaction: $F_{1,44} = 1.2$; P = 0.23; number of failure to escape, interaction: $F_{1,44} = 1.0$; P = 0.31). In the tail-flick test, latencies of tail withdrawal were similar between adipo^{-/-} mouse groups (Fig. S2).

In summary, EE-housing prevented anxiety and depression-like behaviors in both wt and $adipo^{-/-}$ mice when assessed through the NSF and LH tests whereas it was found to be efficient only in wt mice when assessed through the open field, the light and dark and the FST (Table 1). These differences cannot be explained by differential metabolism of corticosterone between both mouse strains since fecal concentrations of corticosterone were similar in $adipo^{-/-}$ and wt mice whatever the housing conditions (Fig. S3; two-way ANOVA, interaction: $F_{1.36} = 0.21$; P = 0.65).

3.5. Adiponectin is not required for EE-induced hippocampal neurogenesis

To investigate the potential cellular mechanisms underlying the differential behavioral effects of EE in wt versus adipo^{-/-} mice, we next evaluated changes in adult hippocampal neurogenesis and neuronal survival (i.e. 21 days post-BrdU injections) (Fig. 4). First, we found that chronic corticosterone treatment decreased the number of BrdUpositive hippocampal cells in the dentate gyrus of wt and



Fig. 3 Role of adiponectin in mediating the behavioral effects of EE housing. Control (-) and chronically corticosterone-treated (+) adipo^{-/-} mice were submitted to a series of behavioral tests after a 6 week-period of SE (*dark grey*) or EE (*light grey*) housing in order to evaluate anxiety and depression-like phenotypes. (A) Measured features in the open field are the time spent in the aversive center of the arena (*left*), the number of entries (*middle*) and the latency to first entry in the centre (*right*). (B) Anxiety behavior was assessed by the time spent in the lighted aversive area of the light and

adipo^{-/-} mice (Fig. 4B; Mann–Whitney for vehicle versus cort groups; P < 0.001 and P = 0.02 for wt and adipo^{-/-} mice, respectively). Upon corticosterone exposure as well as in basal conditions, EE-housed wt mice exhibited a number of BrdU-positive hippocampal cells significantly higher than SE-housed mice (Fig. 4B; Mann–Whitney for SE versus EE groups; P < 0.01). A similar result was found in adipo^{-/-} mice (Fig. 4C; Mann–Whitney for SE versus EE groups; P < 0.01). A similar result was fere groups; P < 0.05 and P < 0.01 for vehicle and cort groups, respectively). Therefore, adiponectin deficiency did not affect EE-enhanced neuronal survival and neurogenesis.

3.6. Adiponectin enters the CSF from the blood circulation differentially as a function of housing conditions and mediates EE-induced antidepressive-like properties

In order to investigate the influence of housing conditions on central actions of circulating adiponectin, SE- and EE-housed adipo^{-/-} mice chronically treated with corticosterone were i.v. injected with exogenous adiponectin (Fig. 5). I.v. injection of adiponectin induced a significant decrease in the immobility time in EE-housed mice without major effects in SE-housed ones (Fig. 5A; Mann–Whitney for SE versus EE groups; ns, non significant for saline injections; P < 0.01 for adiponectin restored the sensitivity of adipo^{-/-} to beneficial effects of EE in the FST. No significant effect of adiponectin was found on locomotor activity as measured by rotarod performance whatever the housing conditions (Fig. 5B; Mann–Whitney for SE versus EE groups; P < 0.05 for saline and adiponectin injections).

Then, we chose to target the hypothalamus, a brain area strongly involved in HPA axis regulation (20) and expressing adiponectin receptors (Liu et al., 2012). We compared potential targets of exogenous adiponectin in hypothalamus of $adipo^{-/-}$ mice using cFos immunohistochemistry. Three hours post adiponectin i.v. administration, cFos-positive cells were detectable in hypothalamus of $adipo^{-/-}$ mice housed in EE but not or, to a lesser extend in SE (Fig. 5C and D; Mann–Whitney for SE *versus* EE; ** *P* < 0.01). No cFospositive immunoreactivity was observed in other brain area including hippocampus and cortex (data not shown). These results strongly suggest that plasma adiponectin enters the CSF differently depending on housing conditions and preferentially targets the hypothalamus.

dark paradigm. (C) The motor coordination was measured by the time of retention on the rotarod device. Depression-like behavior of adipo^{-/-} mice was assessed by the immobility duration in the FST (D) and the latency to feed in the NSF (E). (F) Depression-like behavior of SE- and EE-housed adipo^{-/-} mice was assessed by the latency to escape an inescapable footshock in the LH test upon chronic vehicle or corticosterone treatment. The escape latency is the mean of data for the entire session (*left*). The number of failure to escape during the entire session was represented (*right*). All values are mean \pm SEM (*n* = 12–14 *per* group); ns, non significant; **P* < 0.05, ***P* < 0.01; *** *P* < 0.001.

4. Discussion

Here, we used a well-characterized model of anxiety/ depressive-like model in mice consisting in a continuous input of glucocorticoids (David et al., 2009) in an attempt to further understanding and characterize the beneficial effects of EE. As a reliable readout of the anxiety/depression-like state, we performed a panel of behavioral tests generally used in the context of depression (FST, NSF and LH—David et al., 2009; Malberg and Duman, 2003; Revest et al., 2009; Santarelli et al., 2003) and anxiety studies (OF, L&D-David et al., 2009; Saxe et al., 2006). In all paradigms, a 6 week-period of EE housing successfully reversed the corticosterone-induced anxiety/depression in wt mice. The protocol of EE-housing set up appeared as efficient as antidepressant drugs like fluoxetine or imipramine when used in a similar anxiety/depression mouse model (David et al., 2009).

The FST is commonly used as a suitable assay for seeking antidepressants (Bogdanova et al., 2013); the immobility duration being an index of mouse "despair" or resignation (Porsolt et al., 1977). In agreement with a previous publication (Liu et al., 2012), we confirm the antidepressant properties of adiponectin since we show that a single i.c.v. injection of exogeneous adiponectin leads to a decrease in the immobility time in the FST test.

One of the major findings of our study is that adiponectin plays a pivotal role in mediating some but not all behavioral effects of EE. Both neurogenesis-dependent and -independent pathways are likely to be implemented to the achievement of antidepressant-like activity of EE. The current prevalent area in the depression research field largely focuses on "the neurogenic hypothesis", whereas little is known about the molecular mechanisms involved in the neurogenesis-independent pathways. However, because suppression of hippocampal neurogenesis does not always cause depression, it is still controversial whether new neurons are absolutely required for remission of the disease (Eisch and Petrik, 2012; Hanson et al., 2011). EE failed to produce anxiolytic and antidepressant actions in adipo^{-/-} mice when assessed through OF, L&D and FST; however it remained efficient when assessed through NSF and LH (Table 1). The efficacy of antidepressants in NSF and LH requires chronic administration and has been reported to be neurogenesis dependent (David et al., 2009; Malberg, 2004; Malberg and Duman, 2003; Santarelli et al., 2003). In other hand, OF, L&D and FST are behavioral assays that do not involved hippocampal neurogenesis mechanisms (David et al., 2009; Saxe et al., 2006). Thus, it is tempting to postulate that adiponectin mediates antidepressant properties of EE through neurogenesis-independent pathways. In accordance to this assumption, we showed that EE enhances to similar extents neurogenesis and survival of neural progenitors in the dentate gyrus of wt and adipo^{-/-} mice suggesting that adiponectin deficiency has no or minor impact on EE-induced neurogenesis. Our results may seem in disagreement with a recent publication showing that adiponectin may play a role in mediating the antidepressant effects of physical exercise through a neurogenesis-dependent pathway (Yau et al., 2014). However, although voluntary exercise is a major component of EE housing, this latter also provides high levels of sensory and exploratory stimuli as

Retention duration Rotarod Number of failures to escape Latency escape 0, no effect; \uparrow , increased parameter; \downarrow , decreased parameter. Ξ ß \sim Latency to feed ΥSF mmobility duration FST \sim mice in basal and corticosterone conditions. Time spent in the light Light & dark Summary of the effects assessed in multiple behavioral tests throughout the study. -atency to first entry 0 0 Number entries Behavioral effects of EE in wt and adipo $^{-/-}$ of Time spent Open field Versus the corresponding SE group. adipo^{-/-} adipo^{-/-} ¥ ¥ EE housing^a Table 1 Vehicle Cort

ø


Fig. 4 Neurogenesis in the dentate gyrus of the hippocampus is increased by EE in both $adipo^{-/-}$ and wt corticosterone-treated mice. (A) Representative photomicrographs of BrdU-labeled nuclei (*arrowheads*) of dentate gyrus slices from mouse brains as a function of the treatment and the housing conditions. Histograms presenting the mean number of BrdU-positive nuclei (\pm SEM) counted in the dentate gyrus from vehicle- (-) and corticosterone-treated (+) wt (B) or adipo^{-/-} mice (C) housed either in SE or EE. Mann–Whitney for comparison between groups; n=5 mice per group; ns, non significant; * P < 0.05, ** P < 0.001, *** P < 0.001.

well as social interactions. In this context, one can imagine that in our experimental conditions, other molecules than adiponectin specifically regulated by EE may increase hippocampal neurogenesis and could account for such discrepancies.

EE housing may produce more complex and subtle biological changes in multiple brain areas compared to physical exercise alone. To explore the mechanism underlying the neurogenesis-independent effects of EE, we focused on the hypothalamus, a brain structure involved in antidepressant action of fluoxetine (David et al., 2009) as well as in EE-induced behaviors (Cao et al., 2010). The ability of adiponectin to target and activate hypothalamus cells has been demonstrated previously using cFos immunoreactivity as marker (Qi et al., 2004). We explored the distribution of cFos-positive cells throughout the brain of SE and EE-housed mice 3h post i.v. injection of exogeneous globular adiponectin. We found that a single i.v. injection of adiponectin leads to a significant elevation of the number of adiponectin-activated neurons selectively in the hypothalamus from EE- compared to SE-housed adipo-/mice. Interestingly, both adipoR1 and adipoR2 have been detected in various brain areas including hypothalamus (Kubota et al., 2007; Liu et al., 2012). While adipoR1 binds to globular adiponectin with high affinity, adipoR2 has an intermediate binding affinity for both globular and fulllength adiponectin. The expression of adipoRs is regulated by numerous physiological and biological factors including circadian rhythm, feeding state, levels of circulating free fatty acids and insulin. Interestingly, voluntary exercise specifically up-regulates adipoR1 expression (Christiansen et al., 2010; Zeng et al., 2007). Nollet et al. (2012) suggested that the restoration of stress-related HPA axis defect by pharmacological blockade of the orexinergic system could induce antidepressant-like effects independently from a neurogenic action. Thus, one possibility is that adiponectin action may mediate the antidepressant-like effects of EE by modulating the activity of neural circuits in the hypothalamus rather than through a hippocampal neurogenesis-dependent pathway. By targeting hypothalamic cells, adiponectin could restore the functioning of the HPA axis and improve some depressive behaviors independently of hippocampal neurogenesis. Further experiments will be required to define whether and how adiponectin may modulate direct and/or indirect circuit connections between the hypothalamus and the brain areas implicated in mood disorders such as amygdala, hippocampus and dorsal raphe.



Effect of intravenous (i.v.) injections of exogenous Fig. 5 adiponectin in depression-like behavior and cFos immunostaining in the hypothalamus of $adipo^{-/-}$ mice. Depression-like behavior was assessed by the immobility time in the FST (A) and the motor coordination by the time of retention on the rotarod (B) 2h after i.v. injection of NaCl 0.9% (saline) or globular adiponectin $(1 \text{ mg/kg}, 100 \,\mu\text{l})$ in chronically corticosteronetreated $adipo^{-/-}$ mice housed either in SE or EE. N=6-7 per group; Mann-Whitney for comparison between groups; ns, non significant; * P < 0.05; ** P < 0.01. Series of photomicrographs (C) and quantification (D) showing the distribution of adiponectin-induced cFos-immunoreactivity (arrowheads) in coronal sections of hypothalamus from corticosterone-treated SE- and EE-housed adipo^{-/-} mice 3 h after i.v. injection of saline or adiponectin $(1 \text{ mg/kg}, 100 \mu \text{l})$. 3v, third ventricle; scale bar, 100 µm. Means of 4 coronal sections of hypothalamus counted per mouse \pm SEM; n = 5 mice per group; Mann–Whitney for comparison between groups; ** P < 0.01.

The adiponectin transport from the blood to the CSF seems to be modulated as a function of environmental conditions and/or psychological state. The fenestrated epithelium in close vicinity to the hypothalamus is a main site controlling the entry of molecules into the brain

(Schwartz and Porte, 2005). EE profoundly alters the function of endothelial cells (During and Cao, 2006) thus may alter the blood brain barrier (BBB) permeability, but it could also affect features of the cerebral blood circulation and/or permeability of glia limitans. The enhancement of the transport of adiponectin to the brain parenchyma could constitute a mechanism aimed at counteracting the deleterious effects on behavior produced by corticosterone challenging and drastic conditions such as chronic stress and HPA dysfunction. Supporting this idea, i.v. injection of adiponectin induced a decrease of the immobility time in the FST paradigm in EE- but not SE-housed adipo^{-/-} mice. This phenotype is unlikely to be caused by an indirect action of adiponectin on peripheral target tissues (e.g. muscles) since no change in locomotor activity performance was observed. Additionally, EE housing evoked an elevation of the low-MW adiponectin concentration in the CSF of EE-housed wt mice compared to SE. These data suggest that the enriched living conditions might favor the transport of low-MW adiponectin from the blood to the CSF.

Once synthesized and assembled in the secretory pathway of the adipocyte, adiponectin complexes circulate as biochemical distinct and stable entities with little evidence of interchange between the different forms including HMW species, hexamer (Mid MW), and trimer (Low MW) isoforms. The globular adiponectin, which forms only trimers, derives from the proteolytic cleavage of the full-length adiponectin. Whether or not the adiponectin and which species are able to cross the BBB remains a matter of controversy. In agreement with others (Qi et al., 2004), we showed that the mid/low adiponectin species are the only ones to be found in the CSF of wt mice. Moreover, we found that the level of total adiponectin was about 100 times lower in CSF than in the blood (Qi et al., 2004). Owing to possible blood contamination, the adiponectin concentration assay in brain areas is tricky and inconsistent. This reason prompted us to neglect this parameter despite previous report (Yau et al., 2014).

At odds with previous reports (Cao et al., 2010), no significant elevation of the blood adiponectin concentration was found in mice housed in EE *versus* SE. This could be explained by difference of diet, duration and/or age of mice at the onset of EE and alternatively by sensitivity of the adiponectin assays used. Nevertheless, the level of plasma adiponectin appears to be an unreliable biomarker of anxiety/depression state. It should be taken with caution, as it does not reflect faithfully the cerebral component of adiponectin. This may explain the discrepancies of the literature about plasma adiponectin concentration and anxiety/depression state in humans (Jeong et al., 2012; Diniz et al., 2012). Indeed, an association between circulating adiponectin levels and anxious and depressive symptoms has been proposed but so far with inconsistent results.

5. Conclusions

Altogether, our study defines adiponectin as a key molecule required for some of the anxiolytic and antidepressant effects of EE. Interestingly, our results also allow discriminating between adiponectin-independent antidepressant effects that involve hippocampal neurogenesis from other adiponectin-dependent effects of EE. These latter effects could involve the modulation of neuronal activity in the neural circuits of hypothalamus. Development of selective hypothalamic adipoR agonists may represent a promising alternative therapeutic strategy to treat depressive disorders.

Role of funding source

Fundings were from the Centre national de la Recherche Scientifique.

Conflict of interest statement

No conflict of interest.

Acknowledgments

We are grateful to Dr S. Martin for critically reviewing the manuscript and C. Widman for help in statistical analysis. Special thanks are due to Drs A. Guyon and T. Lorivel for fruitful discussions all along the accomplishment of this study. We are also grateful to Dr V. Bouet (Université de Caen Basse-Normandie, France) for advices on EE housing setting up and L. Relmy for taking care of mice.

Appendix A. Supplementary data

Supplementary data associated with this article can be found, in the online version, at http://dx.doi.org/10.1016/j.psyneuen.2015.03.017.

References

- Arnoldussen, I.A., Kiliaan, A.J., Gustafson, D.R., 2014. Obesity and dementia: adipokines interact with the brain. Eur. Neuropsychopharmacol. 24 (12), 1982–1999.
- Babyak, M., Blumenthal, J.A., Herman, S., Khatri, P., Doraiswamy, M., Moore, K., Craighead, W.E., Baldewicz, T.T., Krishnan, K.R., 2000. Exercise treatment for major depression: maintenance of therapeutic benefit at 10 months. Psychosom. Med. 62, 633–638.
- Bailey, M.T., Kinsey, S.G., Padgett, D.A., Sheridan, J.F., Leblebicioglu, B., 2009. Social stress enhances IL-1beta and TNF-alpha production by *Porphyromonas gingivalis* lipopolysaccharidestimulated CD11b+ cells. Physiol. Behav. 98, 351–358.
- Berg, A.H., Combs, T.P., Scherer, P.E., 2002. ACRP30/adiponectin: an adipokine regulating glucose and lipid metabolism. Trends Endocrinol. Metab. 13, 84–89.
- Bogdanova, O.V., Kanekar, S., D'Anci, K.E., Renshaw, P.F., 2013. Factors influencing behavior in the forced swim test. Physiol. Behav. 118, 227–239.
- Cao, L., Liu, X., Lin, E.J., Wang, C., Choi, E.Y., Riban, V., Lin, B., During, M.J., 2010. Environmental and genetic activation of a brain-adipocyte BDNF/leptin axis causes cancer remission and inhibition. Cell 142, 52–64.
- Chourbaji, S., Zacher, C., Sanchis-Segura, C., Dormann, C., Vollmayr, B., Gass, P., 2005. Learned helplessness: validity and reliability of depressive-like states in mice. Brain Res. Brain Res. Protoc. 16, 70–78.
- Christiansen, T., Paulsen, S.K., Bruun, J.M., Ploug, T., Pedersen, S.B., Richelsen, B., 2010. Diet-induced weight loss and exercise alone and in combination enhance the expression of adiponectin

receptors in adipose tissue and skeletal muscle, but only dietinduced weight loss enhanced circulating adiponectin. J. Clin. Endocrinol. Metab. 95, 911–919.

- Crawley, J.N., 2008. Behavioral phenotyping strategies for mutant mice. Neuron 57, 809–818.
- 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., Hen, R., 2009. Neurogenesis-dependent and -independent effects of fluoxetine in an animal model of anxiety/depression. Neuron 62, 479–493.
- Diniz, B.S., Teixeira, A.L., Campos, A.C., Miranda, A.S., Rocha, N.P., Talib, L.L., Gattaz, W.F., Forlenza, O.V., 2012. Reduced serum levels of adiponectin in elderly patients with major depression. J. Psychiatr. Res. 46, 1081–1085.
- During, M.J., Cao, L., 2006. VEGF, a mediator of the effect of experience on hippocampal neurogenesis. Curr. Alzheimer Res. 3, 29-33.
- Eisch, A.J., Petrik, D., 2012. Depression and hippocampal neurogenesis: a road to remission? Science 338, 72–75.
- Hanson, N.D., Owens, M.J., Nemeroff, C.B., 2011. Depression, antidepressants, and neurogenesis: a critical reappraisal. Neuropsychopharmacology 36, 2589–2602.
- Hosseiny, S., Pietri, M., Petit-Paitel, A., Zarif, H., Heurteaux, C., Chabry, J., Guyon, A., 2014. Differential neuronal plasticity in mouse hippocampus associated with various periods of enriched environment during postnatal development. Brain Struct. Funct., http://dx.doi.org/10.1007/s00429-014-0865-y.
- Jeong, H.G., Min, B.J., Lim, S., Kim, T.H., Lee, J.J., Park, J.H., Lee, S.B., Han, J.W., Choi, S.H., Park, Y.J., Jang, H.C., Kim, K.W., 2012. Plasma adiponectin elevation in elderly individuals with subsyndromal depression. Psychoneuroendocrinology 37, 948–955.
- Judd, L.L., Schettler, P.J., Brown, E.S., Wolkowitz, O.M., Sternberg, E.M., Bender, B.G., Bulloch, K., Cidlowski, J.A., Ronald de Kloet, E., Fardet, L., Joels, M., Leung, D.Y., McEwen, B.S., Roozendaal, B., Van Rossum, E.F., Ahn, J., Brown, D.W., Plitt, A., Singh, G., 2014. Adverse consequences of glucocorticoid medication: psychological, cognitive, and behavioral effects. Am. J. Psychiatry 171, 1045–1051.
- Kempermann, G., Kronenberg, G., 2003. Depressed new neurons— -adult hippocampal neurogenesis and a cellular plasticity hypothesis of major depression. Biol. Psychiatry 54, 499–503.
- Kempermann, G., Kuhn, H.G., Gage, F.H., 1997. More hippocampal neurons in adult mice living in an enriched environment. Nature 386, 493–495.
- Kinsey, S.G., Bailey, M.T., Sheridan, J.F., Padgett, D.A., Avitsur, R., 2007. Repeated social defeat causes increased anxiety-like behavior and alters splenocyte function in C57BL/6 and CD-1 mice. Brain Behav. Immun. 21, 458–466.
- Kubota, N., Yano, W., Kubota, T., Yamauchi, T., Itoh, S., Kumagai, H., Kozono, H., Takamoto, I., Okamoto, S., Shiuchi, T., Suzuki, R., Satoh, H., Tsuchida, A., Moroi, M., Sugi, K., Noda, T., Ebinuma, H., Ueta, Y., Kondo, T., Araki, E., Ezaki, O., Nagai, R., Tobe, K., Terauchi, Y., Ueki, K., Minokoshi, Y., Kadowaki, T., 2007. Adiponectin stimulates AMP-activated protein kinase in the hypothalamus and increases food intake. Cell Metab. 6, 55–68.
- Liu, J., Guo, M., Zhang, D., Cheng, S.Y., Liu, M., Ding, J., Scherer, P.E., Liu, F., Lu, X.Y., 2012. Adiponectin is critical in determining susceptibility to depressive behaviors and has antidepressantlike activity. Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 109, 12248– 12253.
- Lupien, S.J., McEwen, B.S., Gunnar, M.R., Heim, C., 2009. Effects of stress throughout the lifespan on the brain, behaviour and cognition. Nat. Rev. Neurosci. 10, 434–445.
- Malberg, J.E., 2004. Implications of adult hippocampal neurogenesis in antidepressant action. J. Psychiatry Neurosci. 29, 196–205.

- Malberg, J.E., Duman, R.S., 2003. Cell proliferation in adult hippocampus is decreased by inescapable stress: reversal by fluoxetine treatment. Neuropsychopharmacology 28, 1562–1571.
- Murray, F., Smith, D.W., Hutson, P.H., 2008. Chronic low dose corticosterone exposure decreased hippocampal cell proliferation, volume and induced anxiety and depression like behaviours in mice. Eur J Pharmacol. 583 (1), 115–127.
- Nollet, M., Gaillard, P., Tanti, A., Girault, V., Belzung, C., Leman, S., 2012. Neurogenesis-independent antidepressant-like effects on behavior and stress axis response of a dual orexin receptor antagonist in a rodent model of depression. Neuropsychopharmacology 37, 2210–2221.
- Ouchi, N., Kihara, S., Funahashi, T., Nakamura, T., Nishida, M., Kumada, M., Okamoto, Y., Ohashi, K., Nagaretani, H., Kishida, K., Nishizawa, H., Maeda, N., Kobayashi, H., Hiraoka, H., Matsuzawa, Y., 2003. Reciprocal association of C-reactive protein with adiponectin in blood stream and adipose tissue. Circulation 107, 671–674.
- Pechnick, R.N., Chesnokova, V.M., Kariagina, A., Price, S., Bresee, C.J., Poland, R.E., 2004. Reduced immobility in the forced swim test in mice with a targeted deletion of the leukemia inhibitory factor (LIF) gene. Neuropsychopharmacology 29, 770–776.
- Porsolt, R.D., Le Pichon, M., Jalfre, M., 1977. Depression: a new animal model sensitive to antidepressant treatments. Nature 266, 730-732.
- Qi, Y., Takahashi, N., Hileman, S.M., Patel, H.R., Berg, A.H., Pajvani, U.B., Scherer, P.E., Ahima, R.S., 2004. Adiponectin acts in the brain to decrease body weight. Nat. Med. 10, 524–529.
- Revest, J.M., Dupret, D., Koehl, M., Funk-Reiter, C., Grosjean, N., Piazza, P.V., Abrous, D.N., 2009. Adult hippocampal neurogenesis is involved in anxiety-related behaviors. Mol. Psychiatry 14, 959–967.

- Sale, A., Berardi, N., Maffei, L., 2009. Enrich the environment to empower the brain. Trends Neurosci. 32, 233–239.
- Santarelli, L., Saxe, M., Gross, C., Surget, A., Battaglia, F., Dulawa, S., Weisstaub, N., Lee, J., Duman, R., Arancio, O., Belzung, C., Hen, R., 2003. Requirement of hippocampal neurogenesis for the behavioral effects of antidepressants. Science 301, 805–809.
- Saxe, M.D., Battaglia, F., Wang, J.W., Malleret, G., David, D.J., Monckton, J.E., Garcia, A.D., Sofroniew, M.V., Kandel, E.R., Santarelli, L., Hen, R., Drew, M.R., 2006. Ablation of hippocampal neurogenesis impairs contextual fear conditioning and synaptic plasticity in the dentate gyrus. Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 103, 17501–17506.
- Schwartz, M.W., Porte Jr., D., 2005. Diabetes, obesity, and the brain. Science 307, 375–379.
- Takuma, K., Ago, Y., Matsuda, T., 2011. Preventive effects of an enriched environment on rodent psychiatric disorder models. J. Pharmacol. Sci. 117, 71–76.
- Wohleb, E.S., Hanke, M.L., Corona, A.W., Powell, N.D., Stiner, L.M., Bailey, M.T., Nelson, R.J., Godbout, J., Sheridan, J.F., 2011. β-Adrenergic receptor antagonism prevents anxiety-like behavior and microglial reactivity induced by repeated social defeat. J. Neurosci. 31, 6277–6288.
- Yau, S.Y., Li, A., Hoo, R.L., Ching, Y.P., Christie, B.R., Lee, T.M., Xu, A., So, K.F., 2014. Physical exercise-induced hippocampal neurogenesis and antidepressant effects are mediated by the adipocyte hormone adiponectin. Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 111, 15810–15815.
- Zeng, Q., Isobe, K., Fu, L., Ohkoshi, N., Ohmori, H., Takekoshi, K., Kawakami, Y., 2007. Effects of exercise on adiponectin and adiponectin receptor levels in rats. Life Sci. 80, 454-459.

SUPPLEMENTARY INFORMATION

Methods-

Tail-flick test- The days before the test, mice were habituated to be constrained using a cloth for one minute. The distal 3 cm of tail was submerged in the water bath at 48°C. The movement of the tail out of the water was recorded as the tail flick time in seconds.

Fecal sample collection and corticosterone assay- Two hours after lights turn on, mice were placed in individual plastic box until the faeces were produced (less than 10 min spent alone). The samples were collected into microcentrifuge tubes immediately dried using a vacuum concentrator then stored at - 80°C until assayed. Fecal corticosterone concentration was determined using an immunoassay ELISA according to the manufacturer's recommendation.

Figure legends-

Figure S1: Food consumption in SE-and EE-housed wt and adipo-/- mice. Immediately after the NSF test, the feeding of each mouse was assessed by returning the animal to an individual cage and measuring the amount of food consumed over a 5 minute period. Data are expressed as mg *per* g of mouse. Values plotted are mean ± SEM (n=12 *per* group), two-way ANOVA followed by a Bonferroni *post hoc* test; ns, non significant.

Figure S2 : Mice were submitted to the tail flick test as described in the *SI Materials and Methods*. The distal part of tail was submerged in the water bath at 48°C. The movement of the tail out of the water was recorded as the tail flick time in seconds. Values plotted are mean ± SEM (n=12 *per* group), two-way ANOVA followed by a Bonferroni *post hoc* test; ns, non significant.

Figure S3 : Concentration of corticosterone in feces of SE- and EE- housed wt and adipo-/- mice chronically treated with corticosterone for 6 weeks. All values plotted are mean ± SEM (n=12 *per* group), two-way ANOVA followed by a Bonferroni *post hoc* test; ns, non significant.



S1

S2

ARTICLE 2 : ENRICHED ENVIRONMENT DECREASES MICROGLIA AND BRAIN MACROPHAGES INFLAMMATORY PHENOTYPES THROUGH ADIPONECTIN-DEPENDENT MECHANISMS: RELEVANCE TO DEPRESSIVE-LIKE BEHAVIOR.

Chabry J, <u>Nicolas S</u>, Cazareth J, Murris M, Guyon A, Glaichenhaus N, Heurteaux C, Petit-Paitel A. Brain Behav Immun. 2015 Nov;50:275-87. doi: 10.1016/j.bbi.2015.07.018.

CONTEXTE

Les effets anti-inflammatoires de l'ApN ont été décrits en périphérie. Une inflammation est retrouvée au niveau central chez les personnes souffrant de dépression. L'EE a des effets antidépresseurs sur différents modèles murins de dépression et certains de ces effets bénéfiques sont dépendants de l'ApN. Dans la continuité de la publication précédente, et au vu des différentes données de la littérature, l'objectif de cette 2^{ème} étude a été de définir si les effets antidépresseurs de l'ApN étaient associés à des effets anti-inflammatoires de l'ApN au niveau central.

RESULTATS

Par la même approche expérimentale utilisant des souris sauvages (WT) et ApN ^{-/-}, nous avons comparé les effets de l'hébergement en EE et en SE, traitées ou non par la CORT (*Figure 1 A*). Nos résultats montrent que le traitement CORT induit une inflammation dans l'hippocampe et l'hypothalamus identifiée par une augmentation de l'expression des messagers codant pour les principales cytokines pro-inflammatoires (IL-1, IL-6, TNF α). L'EE s'oppose partiellement à cette neuroinflammation induite par la CORT (*Figure 1 B, C*). En combinant des approches de cytométrie en flux, de tris cellulaires, de q-PCR et de dosages des cytokines nous avons caractérisé l'état d'activation de la microglie dans les différentes conditions expérimentales. Le traitement CORT induit un état d'activation pro-inflammatoires et une diminution de marqueurs anti-inflammatoire (*Figure 2 et 3*). Pour caractériser la participation de l'ApN aux effets anti-inflammatoires de l'EE, nous avons réalisé des expériences similaires en utilisant des souris ApN^{-/-}. Les analyses des profils de cytométrie en flux montrent que la déficience en ApN induit un changement de sensibilité de la microglie et des macrophages infiltrant, qui dans la condition EE+CORT adoptent un profil pro-inflammatoire (*Figure 4*).

Les propriétés anti-inflammatoires de l'ApN sont confirmées par la capacité de l'injection ICV de l'ApNg à des souris élevées en condition ES+CORT à reproduire les effets biologiques de l'EE. L'injection ICV d'ApNg induit une diminution de l'expression et de la sécrétion des cytokines pro-inflammatoires et une augmentation de l'expression d'Arg1 et d'IL-10 dans la microglie (*Figure 5*).

CONCLUSION

Pour conclure, nous avons montré pour la première fois que les effets antidépresseurs de l'EE sont associés à une diminution de la neuroinflammation et que l'ApN apparaît comme un facteur clef dans les effets anti-inflammatoires de l'EE. L'EE peut reverser l'état pro-inflammatoire de la microglie induit par le traitement chronique par la corticostérone. Cet effet anti-inflammatoire étant dépendant en partie de l'ApN.

L'ensemble des résultats obtenus dans les articles 1 et 2 suggère que l'hébergement en EE favorise le passage de l'ApN du sang vers le SNC dans des conditions pathologiques décrivant un nouveau mécanisme de défense endogène contre la neuroinflammation. Cependant, nos résultats montrent que l'ApN, bien qu'ayant des effets majeurs sur la microglie, n'est pas l'unique composante des effets antidépresseurs et anti-inflammatoires de l'EE. Si cette hypothèse souligne la pléiotropie de l'EE et la synergie des voies de signalisation impliquées dans ses effets bénéfiques, nos travaux révèlent les propriétés anti-inflammatoires et antidépressives de l'ApN au niveau du SNC. Ils identifient le système « adiponergique » et ses voies de signalisation dans le cerveau qui restent peu étudiées comme autant de cibles prometteuses dans le traitement de la dépression et d'autres maladies neuroinflammatoires.

ARTICLE 2

ARTICLE IN PRESS

Brain, Behavior, and Immunity xxx (2015) xxx-xxx



Contents lists available at ScienceDirect

Brain, Behavior, and Immunity



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

Enriched environment decreases microglia and brain macrophages inflammatory phenotypes through adiponectin-dependent mechanisms: Relevance to depressive-like behavior

Joëlle Chabry, Sarah Nicolas, Julie Cazareth, Emilie Murris, Alice Guyon, Nicolas Glaichenhaus, Catherine Heurteaux, Agnès Petit-Paitel*

^a Université de Nice Sophia Antipolis, 06103 Nice, France

^b Centre National de la Recherche Scientifique (CNRS), Institut de Pharmacologie Moléculaire et Cellulaire, UMR 7275, 06560 Valbonne, France

ARTICLE INFO

Article history: Received 29 April 2015 Received in revised form 16 July 2015 Accepted 16 July 2015 Available online xxxx

Keywords: Enriched environment Adiponectin Neuroinflammation Microglia Brain macrophages Cytokines Depression Antidepressant

ABSTRACT

Regulation of neuroinflammation by glial cells plays a major role in the pathophysiology of major depression. While astrocyte involvement has been well described, the role of microglia is still elusive. Recently, we have shown that Adiponectin (ApN) plays a crucial role in the anxiolytic/antidepressant neurogenesis-independent effects of enriched environment (EE) in mice; however its mechanisms of action within the brain remain unknown. Here, we show that in a murine model of depression induced by chronic corticosterone administration, the hippocampus and the hypothalamus display increased levels of inflammatory cytokines mRNA, which is reversed by EE housing. By combining flow cytometry, cell sorting and q-PCR, we show that microglia from depressive-like mice adopt a pro-inflammatory phenotype characterized by higher expression levels of IL-1 β , IL-6, TNF- α and I κ B- α mRNAs. EE housing blocks pro-inflammatory cytokine gene induction and promotes arginase 1 mRNA expression in brain-sorted microglia, indicating that EE favors an anti-inflammatory activation state. We show that microglia and brain-macrophages from corticosterone-treated mice adopt differential expression profiles for CCR2, MHC class II and IL-4reca surface markers depending on whether the mice are kept in standard environment or EE. Interestingly, the effects of EE were abolished when cells are isolated from ApN knock-out mouse brains. When injected intra-cerebroventricularly, ApN, whose level is specifically increased in cerebrospinal fluid of depressive mice raised in EE, rescues microglia phenotype, reduces pro-inflammatory cytokine production by microglia and blocks depressive-like behavior in corticosterone-treated mice. Our data suggest that EE-induced ApN increase within the brain regulates microglia and brain macrophages phenotype and activation state, thus reducing neuroinflammation and depressive-like behaviors in mice.

© 2015 Elsevier Inc. All rights reserved.

1. Introduction

Inflammation is an important factor in the initiation and development of depression (Maes, 1999; Dickens et al., 2003; Siegert

E-mail address: paitel@ipmc.cnrs.fr (A. Petit-Paitel).

http://dx.doi.org/10.1016/j.bbi.2015.07.018 0889-1591/© 2015 Elsevier Inc. All rights reserved. and Abernethy, 2005; Eisenberger et al., 2010; Pasco et al., 2010; Capuron and Miller, 2011). Patients with major depression often exhibit increased markers of innate immune system activation inflammation associated with elevated levels and of pro-inflammatory cytokines in the plasma and cerebrospinal fluid, mainly IL-1β, IL-6 and TNFa (Maes et al., 1997; Schiepers et al., 2005; Howren et al., 2009; Dowlati et al., 2010; Haapakoski et al., 2015). Inversely, both cytokines and lipopolysaccharide (LPS) can induce depressive-like behaviors in rodents after peripheral (Yirmiya, 1996; Swiergiel and Dunn, 2007; Goshen et al., 2008) and central administration (O'Connor et al., 2009; Kaster et al., 2012; Fu et al., 2010). In addition, many clinical investigations showed that antidepressant treatments have anti-inflammatory effects. Indeed, selective serotonin reuptake inhibitors (SSRIs) such

Please cite this article in press as: Chabry, J., et al. Enriched environment the environment adjustical and brain macrophages inflammatory phenotypes through adjustical environment the envit the environmen

Abbreviations: ApN, adiponectin; EE, enriched environment; SE, standard environment; LPS, lipopolysaccharide; CNS, central nervous system; CBA, cytometric bead array™; IL, interleukin; TLR4, toll like receptor-4; CCR2, C-C chemokine receptor type 2; CCL2, chemokine ligand 2; MHC class II, major histocompatibility complex class II; TNF, tumor necrosis factor; CSF, cerebrospinal fluid; HPA, hypot halamic-pituitary-adrenal; i.c.v., intracerebroventricular; FSC, forward scatter; SSC, side scatter; GCs, glucocorticoids; NF-κB, nuclear factor-kappa B; FST, forced swim test; TST, tail suspension test.

^{*} Corresponding author at: IPMC-CNRS, UMR 7275, 660 Route des Lucioles, 06560 Valbonne, France.

as fluoxetine, tricyclic anti-depressants such as imipramine or inhibitors of mono-amino-oxidase such as moclobemide all have anti-inflammatory properties by decreasing pro-inflammatory cytokine production and/or by increasing the anti-inflammatory IL-10 production (Swiergiel and Dunn, 2007; Goshen et al., 2008; O'Connor et al., 2009; Kaster et al., 2012). Further evidence of the close link between inflammation and depression comes from clinical observations showing that immunotherapy with the pro-inflammatory cytokines IL-2 and interferon- α increases the risk to develop major depression symptoms (Beishuizen and Thijs, 2003; Dantzer, 2004). Together, these observations provide evidence that prevention of chronic neuroinflammation could be a therapeutic target for depression.

Various studies have shown that enriched environment (EE) has beneficial effects in rodent models of neurological and psychiatric disorders including schizophrenia, depression and post-traumatic stress disorders (Takuma et al., 2011). For laboratory animal models, an enriched environment is "enriched" in relation to standard laboratory housing. "Enriched" animals are housed in larger cages and in larger groups with a variety of objects frequently changed (houses, toys, tunnels, hammocks, nesting materials...). In addition, animals are given the opportunity for voluntary physical activity on running wheels (van Praag et al., 2000; Nithianantharajah and Hannan, 2006). Very recently, we have shown that EE efficiently reverses anxiety/depressive-like state induced by long-term treatment of corticosterone. Moreover, we demonstrated that the adipokine Adiponectin (ApN) plays a crucial role in the neurogenesis-independent antidepressant effects of EE (Nicolas et al., 2015).

ApN is a circulating hormone released by adipocytes that circulates at high concentrations in the bloodstream as either full-length or a globular form that is generated by proteolytic cleavage of full-length ApN. ApN acts by binding to its receptors, AdipoR1 and AdipoR2, which are expressed in skeletal muscle, liver and in different areas of the central nervous system (CNS) such as cortex, the hippocampus, the hypothalamus, amygdala and vascular endothelial cells of the brain (Liu et al., 2012; Fry et al., 2006; Kubota et al., 2007: Psilopanagioti et al., 2009: Oi et al., 2004: Spranger et al., 2006; Zhang et al., 2011). Although 1000-fold less concentrated than in plasma, ApN has been shown to be present in the cerebrospinal fluid (CSF) of rodents (Nicolas et al., 2015; Liu et al., 2012; Qi et al., 2004; Yau et al., 2014) and humans (Neumeier et al., 2007; Ebinuma et al., 2007). In humans, the correlation between plasma levels of ApN and depression has not been formally demonstrated. Indeed, some reports indicate that ApN levels is higher in serum from subjects with major depression compared with healthy controls (Jow et al., 2006), while other researchers found lower (Cizza et al., 2010; Zeman et al., 2009) or unchanged levels (Kotani et al., 2012; Carvalho et al., 2014). In rodents, the results are more homogeneous. Indeed, Liu et al. have shown that levels of ApN in plasma are reduced in a mouse model of depression induced by chronic stress (Liu et al., 2012). In heterozygous ApN^{+/-} mice, reduced rate of ApN exacerbates depressive-like behaviors. Moreover, the neutralization of central effects of ApN by i.c.v. injection of antibodies causes depressive-like behaviors in rodents. Conversely, exogenous ApN i.c.v. injection produces antidepressant effects in normal or diabetic and obese mice (Liu et al., 2012). Interestingly, while plasma concentrations of ApN remained unchanged, CSF ApN levels are increased by physical activity and EE housing, leading to anxiolytic and antidepressant properties (Nicolas et al., 2015; Yau et al., 2014). Indeed, Yau et al. recently showed that the antidepressant effects of exercise would be dependent on ApN (Yau et al., 2014). In 2015, we conducted a study showing that some of the EE antidepressant effects were dependent on ApN (Nicolas et al., 2015). These results therefore identify ApN as an important player in the regulation of depressive-like behaviors in mice. However, little is known about the ApN-depending mechanisms implicated in mood control.

Several reports demonstrated anti-inflammatory properties of ApN in periphery (Lara-Castro et al., 2007; Ouchi and Walsh, 2007; Otero et al., 2006; Senolt et al., 2006). Circulating ApN levels were inversely correlated with systemic inflammatory markers, C-reactive protein and IL-6, as well as obesity, type 2 diabetes, and cardiovascular disease (Hotta et al., 2000; Otake et al., 2008). At least some anti-inflammatory properties of ApN could occur through its direct action on monocytes/macrophages. AdipoR1 and AdipoR2 are expressed in mouse and human peripheral monocytes, and in monocyte-derived macrophages (Yamauchi et al., 2003; Chinetti et al., 2004; Pang and Narendran, 2008; Weigert et al., 2008). In these cells, ApN has been shown to modulate the inflammatory activity and to inhibit their transformation into foam cells, a hallmark of atherosclerosis (Kotani et al., 2012; Carvalho et al., 2014; Lara-Castro et al., 2007; Ouchi and Walsh, 2007; Otero et al., 2006). Moreover, ApN induced the expression of the anti-inflammatory cytokine IL-10 in human monocytes and macrophages (Weigert et al., 2008; Wolf et al., 2004; Kumada et al., 2004), while it suppressed the LPS-stimulated release of IL-6 in porcine macrophages (Wulster-Radcliffe et al., 2004). Furthermore, monocytes from patients with type 1 or type 2 diabetes produced less IL-6, IL-8 and CCL2 in response to ApN treatment than those from healthy patients (Weigert et al., 2008; Abke et al., 2006).

Although it was considered homogeneous for many years, it is not known that the "macrophage" population of the CNS includes microglia and CNS-associated mononuclear phagocytes, among which neutrophils, CNS-resident perivascular and meningeal macrophages, choroid plexus macrophages and CNS-infiltrating monocyte-derived macrophages should be distinguished (Campanella et al., 2002; Zhou et al., 2009; Marques et al., 2008; Cazareth et al., 2014). In response to modifications in their environment, microglia and macrophages acquire diverse phenotypes (Franco and Fernandez-Suarez, 2015). "Primed" or "reactive" microglia exhibit increased levels of pro-inflammatory markers including CD80, CD86 (Downer et al., 2010), MHC class II (Frank et al., 2006; Godbout et al., 2005; Henry et al., 2009), and Toll-like receptors (TLRs) Hoogland et al., 2015, especially TLR4, which forms a functional complex with the CD14 surface protein (da Silva Correia et al., 2001). By contrast, IL-10 and IL-4 are two key cytokines promoting anti-inflammatory properties (Mantovani et al., 2004; Strle et al., 2001). Although the anti-inflammatory regulation of peripheral monocytes/ macrophages phenotype by ApN is well known, its effects on microglia and CNS-macrophages have not been examined yet.

The aim of this study is to examine how EE modulates the inflammatory status of brains from mice rendered depressive by a chronic corticosterone treatment, to analyze the activation state of microglia and CNS-associated phagocytes according to the depressive state and housing conditions and to explore the contribution of ApN in the regulation of neuroinflammation mediated by EE.

2. Materials and methods

2.1. Animals

Male wt or adiponectin knockout (ApN^{-/-}) mice with the same C57BL/6J genetic background were randomly assigned into different treatment groups and housed at 22 °C with a 12-h light–dark cycle (lights on at 07:00) with free access to drink and chow (A04, SAFE). All behavioral testing occurred during the light phase

Please cite this article in press as: Chabry, J., et al. Enriched environment de **tre**ases microglia and brain macrophages inflammatory phenotypes through adiponectin-dependent mechanisms: Relevance to depressive-like behavior. Brain Behav. Immun. (2015), http://dx.doi.org/10.1016/j.bbi.2015.07.018

and were conducted in compliance with the Institutional Animal Care and Use Committee of the University of Nice-Sophia Antipolis (permission number 010344.01 from the French "Ministère de l'Enseignement Supérieur et de la Recherche").

Four week-old male mice housed either in standard (SE) or enriched environment (EE) received corticosterone (35 mg/Ldissolved in tap water containing 4 g/L β -cyclodextrine) *ad libitum* for six consecutive weeks (David et al., 2009).

2.2. Isolation of immune cells from adult mouse brains

Mice were deeply anesthetized with a lethal injection of pentobarbital. Immune brain cells were isolated from whole-brain homogenates using a protocol adapted from Cardona et al. (Cardona et al., 2006). Mice were transcardially perfused with ice-cold PBS (pH 7.4, 1 mg/ml EDTA). Brains were collected and roughly homogenized in PBS, resuspended in PBS containing 3 mg/ml collagenase D (Roche Diagnostics) and incubated 30 min at 37 °C. After incubation, brain homogenates were filtered in 70 µm pore size cell strainers (BD Biosciences), centrifuged (10 min, 2000 rpm), washed and resuspended in 6 ml of 38% isotonic Percoll (GE Healthcare), before centrifugation (20 min, 2000 rpm, 4 °C). The surface ring containing myelin and debris was discarded. Pellets containing brain immune cells were collected, washed and labeled for subsequent cell sorting and/or flow cytometry analysis.

2.3. Brain immune cell staining, flow cytometry and cell sorting

Staining of brain immune cell surface antigens was performed as previously described (Cazareth et al., 2014). Briefly, Fc receptors were blocked with 2.4G2 antibody. Cells were incubated with appropriate combination of conjugated antibodies the CD11b-PercP-Cy5.5, CD45-APC-Cy7, Ly6C-PE-Cy7, Ly6G-pacific blue, CD3-FITC, CD8-APC, MHC class II-Alexa700, CD80-V450, CD14-APC. TLR4-Alexa488. CD124/IL-4Ra-Biotin and streptavidin-PE-Cy7 (BD Biosciences), CD4-Viogreen (Miltenyi Biotec), CCR2-PE (R&D systems) or isotype control antibodies for 30 min. Cells were washed and resuspended in PBS containing 0.5% BSA for analysis and cell sorting with FACS Aria III (BD Biosciences).

2.4. Ex vivo culture of microglia

Brain-sorted microglia were seeded at a density of 2×10^4 cells/well in 96-well tissue culture plates (Falcon) in Dulbecco's Modified Eagle's Medium (DMEM) culture media (Invitrogen) containing 10% FCS. Cells were cultured at 37 °C with 5% CO₂ and saturated humidity for 24 h with or without stimulation with 0.5 µg/ml LPS. Media were then collected and centrifuged at 1200 rpm for 10 min at 4 °C. The supernatants were used for Cytometric bead array (CBA) measurement of cytokines and chemokines with FACSarray (BD Biosciences).

2.5. RNA isolation and quantitative PCR

Total RNA from hippocampus, hypothalamus, or from brain-sorted immune cells were isolated using the Trizol[®] RNA extraction kit (Invitrogen) according to the manufacturer recommendations followed by a RQ1 DNAse (Promega) treatment. First-strand cDNAs were synthesized from 2 µg of total RNA with 200U of SuperScript III reverse transcriptase (SuperScriptIII, Invitrogen) in the appropriate buffer in the presence of 25 µg/ml random primers, 0.5 mM desoxyribonucleotide triphosphate mix, 5 mM dithiothreitol, 40U RNAsin (Promega). The reaction was incubated 5 min at 25 °C, then 50 min at 50 °C then inactivated 15 min at 70 °C. Quantitative PCR was performed using the SYBRgreen method (Roche) with the LightCycler 480 sequence detector system (Roche Diagnostics). β -actin and GAPDH were used as housekeeping genes for normalization. Primers were purchased from QIAGEN (QuantiTect primer assay, QIAGEN).

2.6. Cytokine measurement by CBA

Supernatants from *ex vivo* cultured cells were harvested and the concentration of secreted cytokines (TNF α , IL-1 β and IL-6) was detected using a cytometric bead array according to the manufacturer's instructions (BD Biosciences). For comparison, data were normalized relative to the cell number.

2.7. Measurement of ApN in CSF

Mice were anesthetized with an i.p. injection of sodium pentobarbital; then CSF $(2-5 \mu l)$ was obtained by cisternal puncture. ApN concentration was measured using the ALPCOTM immunoassay ELISA according to the manufacturer's protocol.

2.8. I.c.v. injections of ApN

Wt mice were anesthetized with a ketamine (100 mg/kg) and xylazine (10 mg/kg) mixture. The mouse was fixed thanks to ear bars on a stereotaxic apparatus (Kopf) on heating mat and the skull was exposed, then i.c.v. injections (0.3 μ g of ApN in 2 μ l of NaCl 0.9% or vehicle alone) were performed using a Hamilton micro-syringe (cerebral lateral ventricle coordinates: -0.22 mm posterior and 1 mm lateral to the bregma; depth 2.0 mm) at 0.2 μ l/min.

2.9. Tail suspension test (TST)

TST was conducted 24 h post i.c.v. injections. Briefly, individual mice were suspended upside down in the Bioseb apparatus about 30 cm above the floor by placing adhesive tape at approximately 1 cm from the tail tip. After a 10-s latency period, the duration of immobility of each mouse was automatically recorded for a 6-min session (Cryan et al., 2005). The TST avoids any possible bias induced by thermoregulation and motor coordination dysfunctions.

2.10. Forced swim test (FST)

One hour after the TST, mice were placed into glass buckets (20 cm diameter, 30 cm deep, filled with $22 \,^{\circ}C \pm 0.5 \,^{\circ}C$ water) and videotaped for the entire session. As described previously (Porsolt et al., 1977), only the last 4 min of the total 6 min were scored for immobility duration. A mouse was considered immobile when it remained floating in an upright position with only slight movements to keep its head above water. Preliminary experiments have shown that achieving successively TST and FST does not affect the scores of mice in the FST.

2.11. Statistical analysis

Statistical analysis was performed using the computing environment R. For q-PCR, CBA experiments, TST and FST, significant differences between two groups of data were determined using a Mann & Whitney test for non-parametric data. For FACS experiment analyses, we chose to use a non-parametric permutation statistical test to overcome the variability of absolute values obtained between the replicates (3 independent experiments with 3–4 brains in each group). Results are presented by a table representing median \pm SEM of all the data (n = 8-10 per group) and the p-value,

Please cite this article in press as: Chabry, J., et al. Enriched environment **reg** reases microglia and brain macrophages inflammatory phenotypes through adiponectin-dependent mechanisms: Relevance to depressive-like behavior. Brain Behav. Immun. (2015), http://dx.doi.org/10.1016/j.bbi.2015.07.018

as well as a box plot of one experiment among the 3 replicates, representative of the effect of the treatment.

3. Results

3.1. EE blocked chronic corticosterone-treatment pro-inflammatory cytokine mRNAs in mouse brain

Long-term corticosterone treatment induced a depressive-like phenotype in mice housed in standard environment (SE) but not in those housed in EE (Nicolas et al., 2015; David et al., 2009). After 6 weeks of treatment in different housing conditions, the expression of pro-inflammatory cytokine genes in the hippocampus and the hypothalamus of vehicle- and corticosterone-treated mice housed in SE or in EE was assayed by q-PCR (Fig. 1A). The hippocampus and the hypothalamus are two brain regions intimately linked to depression establishment (Eisch and Petrik, 2012; Kempermann and Kronenberg, 2003; Lupien et al., 2009; Drevets et al., 2008; MacQueen and Frodl, 2011).

Fig. 1 shows relative mRNA expression levels of the pro-inflammatory cytokines IL-1 β , IL-6 and TNF α in the hippocampus (Fig. 1B) and the hypothalamus (Fig. 1C). Corticosterone treatment significantly increased IL-6 and TNF α mRNA levels in both brain regions, although in various extents. IL-1 β mRNA levels were greatly increased in the hippocampus, but not in the hypothalamus. Interestingly, EE housing limited the corticosterone-induced increase of IL-6 and TNF α mRNA levels in the hippocampus, and the hypothalamus as well as IL-1 β mRNA levels in the hippocampus. These results suggested that EE housing exerted anti-inflammatory properties in two brain regions closely linked to depression establishment.

3.2. EE blocked the corticosterone-induced pro-inflammatory microglia activation state

As we previously described (Cazareth et al., 2014), microglia and other brain phagocytes can be identified by flow cytometry based on their CD11b and CD45 expression levels. Microglia express high levels of CD11b and low levels of CD45 $(CD11b^+/CD45^{low})$ while the heterogeneous population of CNS-associated phagocytes including brain macrophages express high levels of both CD11b and CD45 (CD11b⁺/CD45^{high}). In the front scatter (FSC) and side scatter (SSC) plots, dead cells, debris and cell doublets were excluded, and a live single cell population was selected and further analyzed (Fig. 2A). In this gate, three different immune cell populations were identified: CD11b⁺/CD45^{high} (CNS-associated phagocytes), CD11b⁺/CD45^{low} (microglia), and CD11b⁻/CD45^{high} cells. We selectively sorted microglia from vehicle SE-, corticosterone-treated SE- and corticosterone-treated EE-mouse brains and analyzed by q-PCR the expression of genes involved in the pro-inflammatory activation state (IL-1β, IL-6, TNF α) or characteristic of the anti-inflammatory phenotype (arginase 1). We also assessed the level of expression of $I\kappa B-\alpha$ mRNA. $I\kappa B\text{-}\alpha$ is an immediate-early gene that is induced in the brain by LPS (Quan et al., 1997), pro-inflammatory cytokines (Quan et al., 2000) and glucocorticoids (Quan et al., 2000; Scheinman et al., 1995). In SE-housing conditions, microglia sorted from brains of corticosterone-treated mice exhibited higher levels of the mRNAs of IL-1 β , IL-6, TNF α and I κ B- α and lower level of arginase 1 than those sorted from vehicle-treated mice brains, suggesting that chronic corticosterone administration led to a pro-inflammatory phenotype of microglia. Interestingly, microglia sorted from corticosterone-treated mice housed in EE have levels of IL-1β, IL-6, TNF α and I κ B- α mRNA that were not different from those from vehicle-SE mouse brains. Arginase 1 mRNA expression level

was similar to its basal level in the EE-housed corticosterone-treated group. Altogether, this suggests that EE housing efficiently blocked the pro-inflammatory activation of microglia induced by chronic corticosterone treatment.

3.3. *EE* housing modified the expression of activation markers on microglia and brain macrophages from corticosterone-treated mice

In order to study how EE modifies microglia and brain macrophages activity within the brain in a context of inflammation-linked depression state, we compared by flow cytometry the expression profiles of IL-4Ra, CCR2, MHC class II and TLR4/CD14 markers on the surface of microglia and brain macrophages from corticosterone-treated mouse brains housed either in SE or EE. Noteworthy, EE housing did not modify the relative percentages of the different CNS-immune brain cell populations (i.e. microglia, macrophages, neutrophils, lymphocytes) as compared to SE-housed mouse brains (Fig. 3A). Fig. 3B and C shows that EE housing significantly increased the percentages of microglia expressing IL-4Ra and CCR2 whereas it reduced the percentage of microglia expressing MHC class II and the TLR4/CD14 complex at their surface. We also looked at the mean fluorescence intensity (MFI) of the fluorochrome-coupled antibodies specific for CD80, CCR2 and IL-4R α on the surface of microglia EE housing did not modify any of these stainings (data not shown).

Same analyses were conducted on brain macrophages. The brain macrophages were identified as being SSC low on the FSC/SSC plot of the heteregeneous CNS-associated phagocyte population (Fig. 3D). Indeed, macrophages and neutrophils can clearly be distinguished according to their granularity (Fig. 3D). The exclusion of neutrophils in this cell population was also verified by the absence of Ly6G labeling (data not shown). EE housing significantly increased the percentages of macrophages expressing IL-4R α and CCR2, similarly to what was observed for microglia (Fig. 3E and F). However, EE housing increased the percentage of macrophages expressing the TLR4/CD14 complex and did not significantly modify the percentage of macrophages expressing MHC class II. Moreover, EE housing increased the MFI of the CCR2 labeling on macrophages, indicating an increase in the level of expression of this protein (data not shown).

3.4. EE-induced phenotypic modifications of microglia and CNSmacrophages are ApN-dependent

EE housing led to increased concentrations of the low and mid molecular weight forms of ApN in cerebrospinal fluid of corticosterone-treated mice (Fig. 4A and Nicolas et al., 2015). In order to study the putative implication of ApN in the EE-induced modifications of microglia and macrophage phenotypes, we analyzed immune brain cells from SE- and EE-housed (ApN^{-/-}) corticosterone-treated knock-out ApN mice. Interestingly, the changes induced by EE on microglia from wild-type mice were no longer observed on microglia from ApN^{-/-} mouse brains. Indeed, the percentages of microglia expressing IL-4Ra and CCR2 markers were not statistically different in EE-housed mouse brains as compared to SE-housed mouse brains (Fig. 4B and C). Higher percentages of microglia expressing the TLR4/CD14 complex and MHC class II were observed in brains from corticosterone-treated ApN^{-/-} mice housed in EE as compared to corticosterone-treated SE-housed ApN^{-/-} mice (Fig. 4B and C). This suggests that ApN deficiency led to a partial insensitivity of microglia toward the effects of EE and that corticosterone treatment had differential effects on microglia phenotype according to the presence or absence of ApN within the brain.

Same analyses were conducted on brain macrophages from SE- or EE-housed corticosterone-treated ApN $^{-/-}$ mice. Here again,

Please cite this article in press as: Chabry, J., et al. Enriched environment de meases microglia and brain macrophages inflammatory phenotypes through adiponectin-dependent mechanisms: Relevance to depressive-like behavior. Brain Behav. Immun. (2015), http://dx.doi.org/10.1016/j.bbi.2015.07.018



Fig. 1. EE blocks chronic corticosterone-induced pro-inflammatory cytokines mRNA profiles in mouse brain. (A) Schematic representation of the protocol and timeline. Adult (4 weeks-old) C57BL/6J male mice received vehicle (white bars) or corticosterone (black and gray bars) and were housed either in SE (white and black bars) or EE (gray bars) for 6 weeks. (B and C) Brains were dissected and pro-inflammatory genes IL-1 β , IL-6 and TNF α mRNA levels were determined by quantitative PCR from hippocampus (B) and hypothalamus (C). Bars represent the mean expression levels \pm s (where s = $\sqrt{(s1^2 + s2^2)}$, s1 = standard deviation of the Δ Ct of the gene of interest among replicates and s2 = standard deviation of the Ct of the housekeeping genes among replicates) expressed as fold change compared to vehicle SE-housed mouse brains. Mann & Whitney test for comparison between groups was performed on Δ Ct values, p < 0.025, $\frac{1}{2}p < 0.021$, $\frac{1}{2}p$

brain macrophage phenotype was differently modified by EE housing since neither the percentages of expression of IL-4R α and CCR2 (Fig. 4D and E) nor the level of expression of CCR2 protein (data not shown) was affected by EE. Percentages of brain macrophages expressing TLR4/CD14 complex and MHC class II in EE-housed corticosterone-treated ApN^{-/-} mouse brains were increased as compared to the SE-housed mouse brain macrophages (Fig. 4D and E), similarly to what was observed on microglia.

3.5. Intracerebroventricular injection of ApN induced antiinflammatory microglia and brain macrophages profiles and antidepressant-like effects on corticosterone-treated SE-housed mice

We next investigated whether the direct administration of exogenous ApN into the brain could mimic the phenotypic modifications of microglia and macrophages induced by EE. I.c.v. injection of recombinant globular ApN to corticosterone-treated wild-type mice housed in SE significantly increased the percentages of microglia and macrophages expressing IL-4R α and CCR2 (Fig. 5). However, ApN injection did not significantly change the MHC class II expression while it increased the level of microglia expressing the TLR4/CD14 complex (Fig. 5A and B). ApN injection decreased the percentage of macrophages expressing MHC class II while it increased those expressing TLR4/CD14 (Fig. 5C and D). ApN also increased CCR2 expression level on brains macrophages, as was observed in EE-housed mouse brains (data not shown).

To examine whether the phenotypic changes of microglia induced by ApN were truly representative of a change in cell activation state, we selectively sorted microglia from SE-housed corticosterone-treated mouse brains 24 h after i.c.v. injection of ApN. Results from q-PCR analyses on brain-sorted microglia showed that mRNA levels of the pro-inflammatory cytokines

Please cite this article in press as: Chabry, J., et al. Enriched environment **per**ceases microglia and brain macrophages inflammatory phenotypes through adiponectin-dependent mechanisms: Relevance to depressive-like behavior. Brain Behav. Immun. (2015), http://dx.doi.org/10.1016/j.bbi.2015.07.018

J. Chabry et al./Brain, Behavior, and Immunity xxx (2015) xxx-xxx



Fig. 2. EE blocks chronic corticosterone-induced pro-inflammatory cytokines mRNA profiles in microglia. (A) Representative bivariate dot plots of Percoll isolated brain cells illustrating gating strategy on CD11b⁺/CD45^{low} for microglia, CD11b⁺/CD45^{high} for CNS-associated phagocytes and CD11b⁻/CD45^{high} cells. (B) IL-1 β , IL- β , TNF α , IxB- α and arginase 1 mRNA levels were quantified by q-PCR from microglia sorted from brain cell suspensions of mice treated with vehicle (white bars) or corticosterone (black and gray bars) and housed either in SE (white and black bars) or EE (gray bars) for 6 weeks. Data represent the mean expression levels ± s expressed as fold change compared to vehicle SE-housed mouse microglia. Mann & Whitney for comparison between groups, p < 0.05, p < 0.025, p < 0.001 vs vehicle control; ns, non significant; n = 3-5 pools of 4 independent brains.

Please cite this article in press as: Chabry, J., et al. Enriched environment de cpgases microglia and brain macrophages inflammatory phenotypes through adiponectin-dependent mechanisms: Relevance to depressive-like behavior. Brain Behav. Immun. (2015), http://dx.doi.org/10.1016/j.bbi.2015.07.018

ARTICLE IN PRESS

J. Chabry et al./Brain, Behavior, and Immunity xxx (2015) xxx-xxx



Fig. 3. EE promotes anti-inflammatory marker expression on microglia and brain macrophages from corticosterone-treated mice. (A) Percentages of the microglia, brainassociated macrophages, lymphocytes and neutrophils were determined in the total live immune cell suspension or in the phagocyte population (for neutrophils) isolated from brains of corticosterone-treated mice housed either in SE or in EE. (B and E) Percentages of expression of IL-4R α , CCR2, MHC class II, TLR4/CD14 markers were determined by flow cytometry analysis in the populations of microglia (B) and brain macrophages (E) identified in brain cell suspensions from corticosterone-treated mice housed either in SE or in EE. Analyses were conducted on 3 independent experiments, each comprising 3–4 brains in both groups of mice. Results are expressed as the median values ± SEM of the percentages of microglia (B) and brain macrophages (E) expressing one marker. (D) Gating strategy for brain macrophages identification. Brain macrophages were identified among CNS-associated phagocytes as being SSC low and are clearly distinguished from neutrophils. (C and F) A representative experiment out of the 3 is represented for each marker as a box plot for microglia (C) and brain macrophages (F) of corticosterone-treated mice housed either in SE (white bars) or in EE (gray bars). Results are expressed as the median values ± SEM of the percentages of microglia and brain macrophages expressing one marker. *p* Values were calculated with a non parametric permutation test. "p < 0.001, ""p < 0.005 vs SE-housed mouse cells; ns, non significant; n = 3 experiments of 3–4 brains in each group.

Please cite this article in press as: Chabry, J., et al. Enriched environment <u>rep</u>creases microglia and brain macrophages inflammatory phenotypes through adiponectin-dependent mechanisms: Relevance to depressive-like behavior. Brain Behav. Immun. (2015), http://dx.doi.org/10.1016/j.bbi.2015.07.018





Fig. 4. ApN deficiency modifies the sensitivity of microglia and brain macrophages to EE. (A) Concentration of the mid and low forms of ApN in CSF of vehicle (white bars) and corticosterone-treated wild-type mice housed in SE (black bars) or EE (gray bars) for 6 weeks. Samples and assays were performed as indicated in the Section 2. N = 10-12 per group, ns, non significant; Mann & Whitney for comparison between groups, p < 0.05. (B and D) Percentages of expression of IL-4Ra, CCR2, MHC class II, TLR4/CD14 markers were determined by flow cytometry analysis in the populations of microglia (B) and brain macrophages (D) isolated from brains of corticosterone-treated ApN^{-/-} mice housed either in SE or in EE. Analyses were conducted on 3 independent experiments, each comprising 3 brains in both groups of microglia and brain macrophages expressing one marker (Fig. 3B and D, respectively). (C and E) A representative experiment out of the 3 is represented for each marker as a box plot for microglia (C) and brain macrophages (E) of corticosterone-treated ApN^{-/-} mice housed either in SE (white bars) or in EE (gray bars). Results are expressed as the median values ± SEM of the percentages of microglia (C) and brain macrophages (E) of corticosterone-treated ApN^{-/-} mice housed either in SE (white bars) or in EE (gray bars). Results are expressed as the median values ± SEM of the percentages of microglia and brain macrophages (E) of corticosterone-treated ApN^{-/-} mice housed either in SE (white bars) or in EE (gray bars). Results are expressed as the median values ± SEM of the percentages of microglia and brain macrophages of microglia and brain macrophages expressing one marker. *p* Values were calculated with a non parametric permutation test. p < 0.005 vs ApN^{-/-} SE-housed mouse cells; ns, non significant; n = 3 experiments of 3 brains in each group.

Please cite this article in press as: Chabry, J., et al. Enriched environment de cpgases microglia and brain macrophages inflammatory phenotypes through adiponectin-dependent mechanisms: Relevance to depressive-like behavior. Brain Behav. Immun. (2015), http://dx.doi.org/10.1016/j.bbi.2015.07.018

ARTICLE IN PRESS

J. Chabry et al./Brain, Behavior, and Immunity xxx (2015) xxx-xxx



Fig. 5. ApN intracerebroventricular injection mimics EE-induced phenotype changes of microglia and brain macrophage, promotes anti-inflammatory activation profile of microglia and exerts anti-depressant effects. Chronic corticosterone-treated wild-type mice received i.c.v. injection of NaCl 0.9% or ApN (0,3 µg, 2 µl). Brain were collected 24 h later as described in Section 2 and percentages of expression of IL-4Ra, CCR2, MHC class II, TLR4/CD14 markers were determined by flow cytometry analysis in the population of microglia (A) and brain macrophages (C) isolated from brains of saline- (white bars) or ApN- (gray bars) i.c.v. injected mouse brains. Analyses were conducted on 3 independent experiments, each comprising 3 to 4 brains in both groups of mice. Results are expressed as the median values ± SEM of the percentages of microglia and brain macrophages expressing one marker (Fig. 3A and C, respectively). (B and D) A representative experiment out of the 3 is represented for each marker as a box plot for microglia (B) and brain macrophages (D) of mouse brains injected i.c.v. with saline (white bars) or ApN (gray bars). Results are expressed as the median values ± SEM of the percentages of microglia and brain macrophages expressing one marker. p Values were calculated with a non parametric permutation test. *p < 0.05, **p < 0.01, ***p < 0.005 vs vehicle; ns, non significant; n = 3 experiments of 3-4 brains in each group. (E) IL-1β, IL-6, TNFα, IxB-α, arginase 1 and IL-10 mRNA levels were quantified by q-PCR from microglia sorted from brain cell suspensions of saline or ApN i.c.v. injected mice treated with corticosterone for 6 weeks. Data represent the mean expression levels of 2 independent experiments comprising a pool of 4 independent brains of each condition, expressed as fold change compared to saline injected brains. (F) 24 h after i.c.v. injections, brains were collected and microglia were sorted as described in Section 2, then pro-inflammatory cytokines IL-1β, IL-6 and TNFα proteins were quantified by CBA from saline (white bars) and ApN injected (gray bars) mouse brains. Bars represent the mean ± SEM. Mann & Whitney for comparison between groups, *** p < 0.005 vs saline control, n = 4. (G and H) Depression-like behavior was assessed by measuring the immobility time (in seconds) in the FST (G) and the TST (H) 24 h after i.c.v. injection of NaCl 0.9% or globular ApN (0.3 µg, 2 µl) in chronic corticosterone-treated wild-type mice housed in SE. Each dot represents an animal; Mann & Whitney for comparison between groups; ^{**}*p* < 0.01, ^{*}*p* < 0.05.

Please cite this article in press as: Chabry, J., et al. Enriched environment gegreases microglia and brain macrophages inflammatory phenotypes through adiponectin-dependent mechanisms: Relevance to depressive-like behavior. Brain Behav. Immun. (2015), http://dx.doi.org/10.1016/j.bbi.2015.07.018

IL-1 β , IL-6, TNF α and I κ B- α were greatly reduced after i.c.v. injection of ApN (Fig. 5E), similarly to what was observed on microglia sorted from EE-housed mouse brains. Interestingly, mRNAs of arginase 1 and the anti-inflammatory cytokine IL-10 were elevated in microglia from ApN-injected mouse brains (Fig. 5E). Using cytometric bead array, we also showed that this was paralleled by a great decrease in IL-1 β , IL-6 and TNF α secretion by brain-sorted, *ex vivo* cultured microglia (Fig. 5F).

We previously reported that $ApN^{-/-}$ mice displayed a more depressive phenotype than wild-type mice (Nicolas et al., 2015). They were insensitive to the neurogenesis-independent anti-depressant effects of EE housing and intravenous injection of ApN was able to rescue the EE beneficial effects (Nicolas et al., 2015). In order to check whether the anti-inflammatory actions of ApN on microglia and brain macrophages may coincide with its anti-depressant behavioral effects, we analyzed the depressive-like behavior of NaCl- and ApN-injected corticosterone-treated mice housed in SE, 24 h after i.c.v. injection. I.c.v. ApN injection significantly decreased immobility time in the FST (Fig. 5G) and the TST (Fig. 5H), two rodent behavioral tests classically used for evaluation of antidepressant drugs, antidepressant efficacy of new compounds and experimental conditions preventing depressive-like states (Fig. 5G and H).

4. Discussion

We recently reported that EE exerts anxiolytic and anti-depressant properties in the mouse model of depression induced by chronic exposure to corticosterone (Nicolas et al., 2015). In the present study, we provide a mechanistic explanation by showing that EE may exert its beneficial anti-depressant effects by limiting neuroinflammation. Indeed, we demonstrate that EE housing blocks the expression of pro-inflammatory genes induced by corticosterone chronic exposure. Moreover, we show that EE blocks the pro-inflammatory activation of microglia by inhibiting the pro-inflammatory genes and promoting the anti-inflammatory ones. These results are in agreement with a previous study performed in rats showing that EE housing can modulate glial phenotype within the hippocampus to limit the pro-inflammatory reactions (Williamson et al., 2012). Finally, we show that ApN could be the missing link between EE-induced neuroinflammation reduction and antidepressant properties.

Long-term exposure to exogenous corticosterone produces effects that mimic in rodents the behavior, the neurochemistry and the brain morphology associated to anxiety and depression (Nicolas et al., 2015; David et al., 2009; Ardayfio and Kim, 2006; Murray et al., 2008; Gourley et al., 2008). Indeed, besides their acute anti-inflammatory effects, glucocorticoids (GCs), when chronically administered, have pro-inflammatory properties (Kelly et al., 2012). GCs and chronic stress have been shown to promote neuroinflammation by modulating the phenotype of microglia and brain macrophages toward a pro-inflammatory activation profile (Nair and Bonneau, 2006; Espinosa-Oliva et al., 2011), as confirmed by our results. Various studies also demonstrated that GCs administration or chronic stress increases inflammation vulnerability of the brain by priming of microglial pro-inflammatory responses (Frank et al., 2010, 2011, 2012). Recent work by Frank et al. reported that chronic exposure of 10 days of corticosterone primes microglia to pro-inflammatory stimuli in rat brains (Frank et al., 2014).

Considering our previously published work and those presented in this article (Nicolas et al., 2015), we demonstrate that the anxiety/depression-like behavior elicited by a 6 weeks exposure to corticosterone is characterized by the increase of neuroinflammation in at least two brain regions closely linked to depression, i.e. the hippocampus and the hypothalamus. Interestingly, our results suggest that the hippocampus may be more susceptible to the pro-inflammatory actions of chronic corticosterone treatment than the hypothalamus. The hippocampus has two types of adrenal steroid receptors, MR (mineralocorticoid receptor) and GR (glucocorticoid receptor) which play important roles in the HPA axis regulation through their effect on GCs negative feedback (Feldman and Conforti, 1980). Here, we can speculate that chronic elevated GCs level would result in MR/GR impaired signaling leading to decreased hippocampal neurogenesis and increased neuroinflammation which in turn correlate with the induction of depressive symptoms (for review, see Anacker et al., 2011).

A clear distinction between functions and characteristics of microglia and brain macrophages is often lacking, but we recently reported that these two cell populations can be efficiently identified and studied by flow cytometry and selective cell sorting (Cazareth et al., 2014). In the present study, we show that depression-linked neuroinflammation is associated with the activation of microglia toward a pro-inflammatory profile, characterized by the upregulation of the pro-inflammatory and downregulation of the anti-inflammatory genes. Although we cannot rule out the possibility of the involvement of astrocytes in the neuroinflammation establishment after chronic exposure to GCs (Carter et al., 2012), pro-inflammatory activation profile of microglia may account for an important part of the neuroinflammation observed in corticosterone-treated mouse brains. Indeed, we show that ApN has potent anti-inflammatory properties on microglia, which happen to be sufficient to block the brain inflammation elicited by chronic corticosterone exposure. It is unlikely that the ApN-dependent anti-inflammatory effects of EE we highlighted also pass through the action of ApN on astrocytes. Indeed, a recent paper reports that ApN would rather be pro-inflammatory on astrocytes (Wan et al., 2014) and preliminary results we obtained in the laboratory indicate that ApN has little effect on astrocytic inflammatory state (unpublished observations)

Due to the small number of brain macrophages that can be recovered from a mouse brain, we were not able to conduct the g-PCR analyses of pro- and anti-inflammatory gene expression in these cells. However, to delve further in the characterization of microglia and brain macrophage regulation by EE, we performed detailed flow cytometry analyses of microglia and brain macrophages from brains of corticosterone-treated mice, housed either in SE or EE. Interestingly, it appears that microglia and brain macrophages display some similarities in response to EE housing. Indeed, percentages of both cell types expressing IL-4R α and CCR2 are increased in EE conditions. Percentages of microglia expressing MHC class II and TLR4/CD14 were decreased by EE housing, suggesting that overall EE blocks the pro-inflammatory activation of microglia induced by chronic corticosterone exposure. Contrary to this, the percentage of brain macrophages expressing the TLR4/CD14 complex was increased upon EE-housing. Up-regulation of TLR4/CD14 complex by microglia is known to induce TNFa production which in turn increases adhesion and recruitment of leukocytes in brain vessels (Zhou et al., 2006). Brain macrophages are located at blood-brain (perivascular), brain-cerebrospinal fluid (CSF) (meningeal), and CSF-blood (choroid plexus) interfaces, ideal locations for responsiveness to external stimuli (Schilling et al., 2009). Although very speculative, we can envision that up-regulation of the TLR4/CD14 complex by brain macrophages induced by EE may favor rolling and adhesion of leukocytes in brain micro-vessels allowing them to release various neuroprotective and anti-inflammatory factors to resolve inflamed CNS parenchyma (Schwartz and Baruch, 2014). This hypothesis is consistent with the fact that the action of the globular ApN on vascular endothelial cells would rather be pro-inflammatory and promote the expression of adhesion

Please cite this article in press as: Chabry, J., et al. Enriched environment decreases microglia and brain macrophages inflammatory phenotypes through adiponectin-dependent mechanisms: Relevance to depressive-like behavior. Brain Behav. Immun. (2015), http://dx.doi.org/10.1016/j.bbi.2015.07.018

molecules such as VCAM-1 (Tomizawa et al., 2009), which is necessary for leukocyte adhesion. Noteworthy, leukocyte infiltration into brain parenchyma is unlikely to have happened since we did not observe any difference in leukocyte proportion within the brains of mice housed either in SE or EE (Fig. 3A). Based on the chemoattractant properties of the CCR2/CCL2 signaling (Thompson et al., 2008; Mildner et al., 2009), CCR2 upregulation on both microglia and brain macrophages by EE may suggest that EE could make these cells more responsive and more mobile with respect to future eventual injuries.

We previously reported that the neurogenesis-independent anti-depressant effects of EE were mediated by the adipokine ApN (Nicolas et al., 2015). In corticosterone-treated mice, EE housing promotes the entry of low and mid molecular weight forms of ApN within the CSF. Although hypothalamic neuronal activity may be regulated by ApN (Nicolas et al., 2015; Hoyda et al., 2009: Thundvil et al., 2012: Guillod-Maximin et al., 2009). the modes of action of ApN in the brain remain largely unknown. We show here that ApN may exert its beneficial effects in the brain through its anti-inflammatory action on microglia and brain macrophages. Anti-inflammatory properties of ApN have already been established on blood monocytes and tissue macrophages (Zeman et al., 2009; Kotani et al., 2012; Carvalho et al., 2014; Lara-Castro et al., 2007; Ouchi and Walsh, 2007; Otero et al., 2006; Senolt et al., 2006; Hotta et al., 2000). We have collected a number of evidences that corroborate the hypothesis that ApN may also be anti-inflammatory for microglia and brain macrophages. First, ApN deficiency modifies the regulation of microglia and brain macrophage phenotypes by EE housing. Indeed, percentages of IL-4Ra and CCR2 expressing microglia and brain macrophages were unaffected by EE housing in corticosterone-treated ApN^{-/-} mouse brains. MHC class II and TLR4/CD14 complex expression regulation on microglia and brain macrophages appeared more complex and may be controlled by other factors elicited by EE. Secondly, i.c.v. injection of exogenous globular ApN to SE-housed corticosterone-treated mice has anti-inflammatory effects on microglia and brain macrophage profiles similar to that produced by EE housing. An exception is the percentage of microglia expressing the TLR4/CD14 complex which is increased by the injection of ApN while it is decreased by EE housing. EE is a complex set of motor, social, sensory and cognitive stimuli, whose effects within the brain can obviously not be limited to the only increase of ApN in CSF. Thus, it is likely that other molecules induced by EE may modulate microglia phenotype, explaining why ApN i.c.v. injection mimics most but not all aspects of microglia and brain macrophages phenotype regulation by EE. Third, our results show that ApN injection into the brain greatly reduces the level and expression of pro-inflammatory genes (II-1 β , IL-6, TNF α , $I\kappa B-\alpha$) and promotes the increase of anti-inflammatory mRNAs (Arg1, IL-10) in microglia sorted from corticosterone-treated mouse brains. Finally, i.c.v. injection of ApN results in reduction of the despair behavior measured in the FST and the TST behavioral tests, two tests commonly used to validate anti-depressant molecules. The decrease of immobility time observed in FST and TST was not due to an enhancement of locomotor activity because performances on rotarod (Brooks et al., 2012) were unchanged after i.c.v. injection of ApN (Liu et al., 2012).

According to our results, ApN has powerful anti-inflammatory properties in the brain; however in the periphery, its anti-inflammatory properties have been challenged in light of reports showing that ApN induces production of the pro-inflammatory mediator IL-6 and activation of NF- κ B in human synovial fibroblasts and adhesion molecule expression in endothe-lial cells (Hattori et al., 2006; Tomizawa et al., 2008). One plausible explanation for this discrepancy could be due to the existence of the various circulating forms of ApN. Although high molecular

weight multimers appear to be the most bioactive form in the periphery, only low molecular weight forms of ApN are present in CSF. Thus, the anti- or pro-inflammatory role of ApN may be dependent on the specific tissue or even type of cells it acts on and the presence or absence of a disease state.

5. Conclusions

Altogether, our results bring new insights in the understanding of EE and ApN beneficial effects on the brain. We propose the hypothesis that EE housing may favor the entry of ApN from the plasma to the CSF in inflammatory conditions so as to provide a defense mechanism against inflamed brain parenchyma by regulating microglia and brain macrophages activation profiles. In absence of ApN or in non-stimulating living conditions such as those mimicked by SE-housing for laboratory animals, this phenomenon would be prevented, thus perpetuating the pro-inflammatory activation of both microglia and brain macrophages, leading to depressive-like behavior establishment.

Finally, although speculative, development of selective adipoR agonists may represent a promising alternative therapeutic strategy to treat neuroinflammation in many brain diseases such as in the context of depressive disorders.

Acknowledgments

We are very grateful to Dr. Véronique Imbert for generously providing us oligonucleotides for I κ B- α mRNA analysis We also wish to thank Dr. Thomas Lorivel, Catherine Widmann and Dr. Caroline Vieuille (Anastats) for helpful discussions and advices on statistical analyses. Fundings were from the Centre National de la Recherche Scientifique and from Plan Cancer 2009–2013 AVIESAN.

References

- Abke, S. et al., 2006. Adiponectin-induced secretion of interleukin-6 (IL-6), monocyte chemotactic protein-1 (MCP-1, CCL2) and interleukin-8 (IL-8, CXCL8) is impaired in monocytes from patients with type I diabetes. Cardiovasc. Diabetol. 5, 17.
- Anacker, C., Zunszain, P.A., Carvalho, L.A., Pariante, C.M., 2011. The glucocorticoid receptor: pivot of depression and of antidepressant treatment? Psychoneuroendocrinology 36, 415–425.
- Ardayfio, P., Kim, K.S., 2006. Anxiogenic-like effect of chronic corticosterone in the light-dark emergence task in mice. Behav. Neurosci. 120, 249–256.
- Beishuizen, A., Thijs, L.G., 2003. Endotoxin and the hypothalamo-pituitary-adrenal (HPA) axis. J. Endotoxin Res. 9, 3–24.
- Brooks, S.P., Trueman, R.C., Dunnett, S.B., 2012. Assessment of motor coordination and balance in mice using the rotarod, elevated bridge, and footprint tests. Curr. Protoc. Mouse Biol. 2, 37–53.
- Campanella, M., Sciorati, C., Tarozzo, G., Beltramo, M., 2002. Flow cytometric analysis of inflammatory cells in ischemic rat brain. Stroke 33, 586–592.
- Capuron, L., Miller, A.H., 2011. Immune system to brain signaling: neuropsychopharmacological implications. Pharmacol. Ther. 130, 226–238.
- Cardona, A.E., Huang, D., Sasse, M.E., Ransohoff, R.M., 2006. Isolation of murine microglial cells for RNA analysis or flow cytometry. Nat. Protoc. 1, 1947–1951.
- Carter, B.S., Meng, F., Thompson, R.C., 2012. Glucocorticoid treatment of astrocytes results in temporally dynamic transcriptome regulation and astrocyte-enriched mRNA changes in vitro. Physiol. Genomics 44, 1188–1200.
- Carvalho, A.F. et al., 2014. Adipokines as emerging depression biomarkers: a systematic review and meta-analysis. J. Psychiatr. Res. 59, 28–37.
- Cazareth, J., Guyon, A., Heurteaux, C., Chabry, J., Petit-Paitel, A., 2014. Molecular and cellular neuroinflammatory status of mouse brain after systemic lipopolysaccharide challenge: importance of CCR2/CCL2 signaling. J. Neuroinflammation 11, 132.
- Chinetti, G., Zawadski, C., Fruchart, J.C., Staels, B., 2004. Expression of adiponectin receptors in human macrophages and regulation by agonists of the nuclear receptors PPARalpha, PPARgamma, and LXR. Biochem. Biophys. Res. Commun. 314, 151–158.
- Cizza, G. et al., 2010. Low 24-hour adiponectin and high nocturnal leptin concentrations in a case-control study of community-dwelling premenopausal women with major depressive disorder: the Premenopausal, Osteopenia/Osteoporosis, Women, Alendronate, Depression (POWER) study. J. Clin. Psychiatry 71, 1079–1087.

in th

11

Please cite this article in press as: Chabry, J., et al. Enriched environment **the** environment **the**

J. Chabry et al./Brain, Behavior, and Immunity xxx (2015) xxx-xxx

ARTICLE IN PRESS

- Cryan, J.F., Mombereau, C., Vassout, A., 2005. The tail suspension test as a model for assessing antidepressant activity: review of pharmacological and genetic studies in mice. Neurosci. Biobehav. Rev. 29, 571–625.
- da Silva Correia, J., Soldau, K., Christen, U., Tobias, P.S., Ulevitch, R.J., 2001. Lipopolysaccharide is in close proximity to each of the proteins in its membrane receptor complex transfer from CD14 to TLR4 and MD-2. J. Biol. Chem. 276, 21129–21135.
- Dantzer, R., 2004. Cytokine-induced sickness behaviour: a neuroimmune response to activation of innate immunity. Eur. J. Pharmacol. 500, 399–411.
- David, D.J. et al., 2009. Neurogenesis-dependent and -independent effects of fluoxetine in an animal model of anxiety/depression. Neuron 62, 479–493.
- Dickens, C., Jackson, J., Tomenson, B., Hay, E., Creed, F., 2003. Association of depression and rheumatoid arthritis. Psychosomatics 44, 209–215.
- Dowlati, Y. et al., 2010. A meta-analysis of cytokines in major depression. Biol. Psychiatry 67, 446–457.
- Downer, E.J. et al., 2010. A novel anti-inflammatory role of NCAM-derived mimetic peptide, FGL. Neurobiol. Aging 31, 118–128.
- Drevets, W.C., Price, J.L., Furey, M.L., 2008. Brain structural and functional abnormalities in mood disorders: implications for neurocircuitry models of depression. Brain Struct. Funct. 213, 93–118.
- Ebinuma, H. et al., 2007. Improved ELISA for selective measurement of adiponectin multimers and identification of adiponectin in human cerebrospinal fluid. Clin. Chem. 53, 1541–1544.
- Eisch, A.J., Petrik, D., 2012. Depression and hippocampal neurogenesis: a road to remission? Science 338, 72–75.
- Eisenberger, N.I. et al., 2010. Inflammation-induced anhedonia: endotoxin reduces ventral striatum responses to reward. Biol. Psychiatry 68, 748–754.
- Espinosa-Oliva, A.M. et al., 2011. Stress is critical for LPS-induced activation of microglia and damage in the rat hippocampus. Neurobiol. Aging 32, 85–102.
- Feldman, S., Conforti, N., 1980. Participation of the dorsal hippocampus in the glucocorticoid feedback effect on adrenocortical activity. Neuroendocrinology 30, 52–55.
- Franco, R., Fernandez-Suarez, D., 2015. Alternatively activated microglia and macrophages in the central nervous system. Prog. Neurobiol.
- Frank, M.G. et al., 2006. MRNA up-regulation of MHC II and pivotal proinflammatory genes in normal brain aging. Neurobiol. Aging 27, 717–722.
- Frank, M.G., Miguel, Z.D., Watkins, L.R., Maier, S.F., 2010. Prior exposure to glucocorticoids sensitizes the neuroinflammatory and peripheral inflammatory responses to *E. coli* lipopolysaccharide. Brain Behav. Immun. 24, 19–30.
- Frank, M.G., Watkins, L.R., Maier, S.F., 2011. Stress- and glucocorticoid-induced priming of neuroinflammatory responses: potential mechanisms of stressinduced vulnerability to drugs of abuse. Brain Behav. Immun. 25 (Suppl. 1), S21–28.
- Frank, M.G., Thompson, B.M., Watkins, L.R., Maier, S.F., 2012. Glucocorticoids mediate stress-induced priming of microglial pro-inflammatory responses. Brain Behav. Immun. 26, 337–345.
- Frank, M.G., Hershman, S.A., Weber, M.D., Watkins, L.R., Maier, S.F., 2014. Chronic exposure to exogenous glucocorticoids primes microglia to pro-inflammatory stimuli and induces NLRP3 mRNA in the hippocampus. Psychoneuroendocrinology 40, 191–200.
- Fry, M. et al., 2006. Area postrema neurons are modulated by the adipocyte hormone adiponectin. J. Neurosci. 26, 9695–9702.
- Fu, X. et al., 2010. Central administration of lipopolysaccharide induces depressivelike behavior in vivo and activates brain indoleamine 2,3 dioxygenase in murine organotypic hippocampal slice cultures. J. Neuroinflammation 7, 43.
- Godbout, J.P. et al., 2005. Exaggerated neuroinflammation and sickness behavior in aged mice following activation of the peripheral innate immune system. FASEB J. 19, 1329–1331.
- Gourley, S.L., Wu, F.J., Taylor, J.R., 2008. Corticosterone regulates pERK1/2 map kinase in a chronic depression model. Ann. NY Acad. Sci. 1148, 509–514.
- Guillod-Maximin, E. et al., 2009. Adiponectin receptors are expressed in hypothalamus and colocalized with proopiomelanocortin and neuropeptide Y in rodent arcuate neurons. J. Endocrinol. 200, 93–105.
- Haapakoski, R., Mathieu, J., Ebmeier, K.P., Alenius, H., Kivimaki, M., 2015. Cumulative meta-analysis of interleukins 6 and 1beta, tumour necrosis factor alpha and C-reactive protein in patients with major depressive disorder. Brain Behav. Immun.
- Hattori, Y., Hattori, S., Kasai, K., 2006. Globular adiponectin activates nuclear factorkappaB in vascular endothelial cells, which in turn induces expression of proinflammatory and adhesion molecule genes. Diabetes Care 29, 139–141.
- Henry, C.J., Huang, Y., Wynne, A.M., Godbout, J.P., 2009. Peripheral lipopolysaccharide (LPS) challenge promotes microglial hyperactivity in aged mice that is associated with exaggerated induction of both pro-inflammatory IL-1beta and anti-inflammatory IL-10 cytokines. Brain Behav. Immun. 23, 309– 317.
- Hoogland, I.C., Houbolt, C., van Westerloo, D.J., van Gool, W.A., van de Beek, D., 2015. Systemic inflammation and microglial activation: systematic review of animal experiments. J. Neuroinflammation 12, 114.
- Hotta, K. et al., 2000. Plasma concentrations of a novel, adipose-specific protein, adiponectin, in type 2 diabetic patients. Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol. 20, 1595–1599.

- Howren, M.B., Lamkin, D.M., Suls, J., 2009. Associations of depression with Creactive protein, IL-1, and IL-6: a meta-analysis. Psychosom. Med. 71, 171–186.
- Hoyda, T.D., Smith, P.M., Ferguson, A.V., 2009. Adiponectin acts in the nucleus of the solitary tract to decrease blood pressure by modulating the excitability of neuropeptide Y neurons. Brain Res. 1256, 76–84.
- Jow, G.M., Yang, T.T., Chen, C.L., 2006. Leptin and cholesterol levels are low in major depressive disorder, but high in schizophrenia. J. Affect. Disord. 90, 21–27.
- Kaster, M.P., Gadotti, V.M., Calixto, J.B., Santos, A.R., Rodrigues, A.L., 2012. Depressive-like behavior induced by tumor necrosis factor-alpha in mice. Neuropharmacology 62, 419–426.
- Kelly, K.A., Miller, D.B., Bowyer, J.F., O'Callaghan, J.P., 2012. Chronic exposure to corticosterone enhances the neuroinflammatory and neurotoxic responses to methamphetamine. J. Neurochem. 122, 995–1009.
- Kempermann, G., Kronenberg, G., 2003. Depressed new neurons-adult hippocampal neurogenesis and a cellular plasticity hypothesis of major depression. Biol. Psychiatry 54, 499–503.
- Kotani, K. et al., 2012. Adiponectin and smoking status: a systematic review. J. Atheroscler. Thromb. 19, 787–794.
- Kubota, N. et al., 2007. Adiponectin stimulates AMP-activated protein kinase in the hypothalamus and increases food intake. Cell Metab. 6, 55–68.
- Kumada, M. et al., 2004. Adiponectin specifically increased tissue inhibitor of metalloproteinase-1 through interleukin-10 expression in human macrophages. Circulation 109, 2046–2049.
- Lara-Castro, C., Fu, Y., Chung, B.H., Garvey, W.T., 2007. Adiponectin and the metabolic syndrome: mechanisms mediating risk for metabolic and cardiovascular disease. Curr. Opin. Lipidol. 18, 263–270.
- Liu, J. et al., 2012. Adiponectin is critical in determining susceptibility to depressive behaviors and has antidepressant-like activity. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 109, 12248–12253.
- Lupien, S.J., McEwen, B.S., Gunnar, M.R., Heim, C., 2009. Effects of stress throughout the lifespan on the brain, behaviour and cognition. Nat. Rev. Neurosci. 10, 434– 445.
- MacQueen, G., Frodl, T., 2011. The hippocampus in major depression: evidence for the convergence of the bench and bedside in psychiatric research? Mol. Psychiatry 16, 252–264.
- Maes, M., 1999. Major depression and activation of the inflammatory response system. Adv. Exp. Med. Biol. 461, 25–46.
- Maes, M. et al., 1997. Increased serum IL-6 and IL-1 receptor antagonist concentrations in major depression and treatment resistant depression. Cytokine 9, 853–858.
- Mantovani, A. et al., 2004. Infiltration of tumours by macrophages and dendritic cells: tumour-associated macrophages as a paradigm for polarized M2 mononuclear phagocytes. Novartis Found Symp. 256, 137–145, discussion 146–138, 259–169.
- Marques, C.P. et al., 2008. Prolonged microglial cell activation and lymphocyte infiltration following experimental herpes encephalitis. J. Immunol. 181, 6417– 6426.
- Mildner, A. et al., 2009. CCR2+Ly-6Chi monocytes are crucial for the effector phase of autoimmunity in the central nervous system. Brain 132, 2487–2500.
- Murray, F., Smith, D.W., Hutson, P.H., 2008. Chronic low dose corticosterone exposure decreased hippocampal cell proliferation, volume and induced anxiety and depression like behaviours in mice. Eur. J. Pharmacol. 583, 115– 127.
- Nair, A., Bonneau, R.H., 2006. Stress-induced elevation of glucocorticoids increases microglia proliferation through NMDA receptor activation. J. Neuroimmunol. 171, 72–85.
- Neumeier, M. et al., 2007. Detection of adiponectin in cerebrospinal fluid in humans. Am. J. Physiol. Endocrinol. Metab. 293, E965–969.
- Nicolas, S. et al., 2015. Neurogenesis-independent antidepressant-like effects of enriched environment is dependent on adiponectin. Psychoneuroendocrinology 57, 72–83.
- Nithianantharajah, J., Hannan, A.J., 2006. Enriched environments, experiencedependent plasticity and disorders of the nervous system. Nat. Rev. Neurosci. 7, 697–709.
- O'Connor, J.C. et al., 2009. Interferon-gamma and tumor necrosis factor-alpha mediate the upregulation of indoleamine 2,3-dioxygenase and the induction of depressive-like behavior in mice in response to bacillus Calmette-Guerin. J. Neurosci. 29, 4200–4209.
- Otake, H. et al., 2008. Relation between plasma adiponectin, high-sensitivity Creactive protein, and coronary plaque components in patients with acute coronary syndrome. Am. J. Cardiol. 101, 1–7.
- Otero, M. et al., 2006. Changes in plasma levels of fat-derived hormones adiponectin, leptin, resistin and visfatin in patients with rheumatoid arthritis. Ann. Rheum. Dis. 65, 1198–1201.
- Ouchi, N., Walsh, K., 2007. Adiponectin as an anti-inflammatory factor. Clin. Chim. Acta 380, 24–30.
- Pang, T.T., Narendran, P., 2008. The distribution of adiponectin receptors on human peripheral blood mononuclear cells. Ann. NY Acad. Sci. 1150, 143–145.
- Pasco, J.A. et al., 2010. Association of high-sensitivity C-reactive protein with de novo major depression. Br. J. Psychiatry 197, 372–377.
- Porsolt, R.D., Le Pichon, M., Jalfre, M., 1977. Depression: a new animal model sensitive to antidepressant treatments. Nature 266, 730–732.
- Psilopanagioti, A., Papadaki, H., Kranioti, E.F., Alexandrides, T.K., Varakis, J.N., 2009. Expression of adiponectin and adiponectin receptors in human pituitary gland and brain. Neuroendocrinology 89, 38–47.

Please cite this article in press as: Chabry, J., et al. Enriched environment deggases microglia and brain macrophages inflammatory phenotypes through adiponectin-dependent mechanisms: Relevance to depressive-like behavior. Brain Behav. Immun. (2015), http://dx.doi.org/10.1016/j.bbi.2015.07.018

ARTICLE IN PRESS

J. Chabry et al. / Brain, Behavior, and Immunity xxx (2015) xxx-xxx

- Qi, Y. et al., 2004. Adiponectin acts in the brain to decrease body weight. Nat. Med. 10, 524–529.
- Quan, N., Whiteside, M., Kim, L., Herkenham, M., 1997. Induction of inhibitory factor kappaBalpha mRNA in the central nervous system after peripheral lipopolysaccharide administration: an in situ hybridization histochemistry study in the rat. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 94, 10985–10990.
- Quan, N., He, L., Lai, W., Shen, T., Herkenham, M., 2000. Induction of IkappaBalpha mRNA expression in the brain by glucocorticoids: a negative feedback mechanism for immune-to-brain signaling. J. Neurosci. 20, 6473–6477.
- Scheinman, R.I., Cogswell, P.C., Lofquist, A.K., Baldwin Jr., A.S., 1995. Role of transcriptional activation of I kappa B alpha in mediation of immunosuppression by glucocorticoids. Science 270, 283–286.
- Schiepers, O.J., Wichers, M.C., Maes, M., 2005. Cytokines and major depression. Prog. Neuropsychopharmacol. Biol. Psychiatry 29, 201–217.
- Schilling, M., Strecker, J.K., Ringelstein, E.B., Kiefer, R., Schabitz, W.R., 2009. Turnover of meningeal and perivascular macrophages in the brain of MCP-1-, CCR-2or double knockout mice. Exp. Neurol. 219, 583–585.
- Schwartz, M., Baruch, K., 2014. The resolution of neuroinflammation in neurodegeneration: leukocyte recruitment via the choroid plexus. EMBO J. 33, 7–22.
- Senolt, L., Pavelka, K., Housa, D., Haluzik, M., 2006. Increased adiponectin is negatively linked to the local inflammatory process in patients with rheumatoid arthritis. Cytokine 35, 247–252.
- Siegert, R.J., Abernethy, D.A., 2005. Depression in multiple sclerosis: a review. J. Neurol. Neurosurg. Psychiatry 76, 469–475.
- Spranger, J. et al., 2006. Adiponectin does not cross the blood-brain barrier but modifies cytokine expression of brain endothelial cells. Diabetes 55, 141–147.
- Strle, K. et al., 2001. Interleukin-10 in the brain. Crit. Rev. Immunol. 21, 427–449. Swiergiel, A.H., Dunn, A.J., 2007. Effects of interleukin-1beta and lipopolysaccharide on behavior of mice in the elevated plus-maze and open field tests. Pharmacol. Biochem. Behav. 86, 651–659.
- Takuma, K., Ago, Y., Matsuda, T., 2011. Preventive effects of an enriched environment on rodent psychiatric disorder models. J. Pharmacol. Sci. 117, 71–76.
- Thompson, W.L., Karpus, W.J., Van Eldik, LJ., 2008. MCP-1-deficient mice show reduced neuroinflammatory responses and increased peripheral inflammatory responses to peripheral endotoxin insult. J. Neuroinflammation 5, 35.
- Thundyil, J., Pavlovski, D., Sobey, C.G., Arumugam, T.V., 2012. Adiponectin receptor signalling in the brain. Br. J. Pharmacol. 165, 313–327.
- Tomizawa, A., Hattori, Y., Kasai, K., Nakano, Y., 2008. Adiponectin induces NFkappaB activation that leads to suppression of cytokine-induced NF-kappaB

activation in vascular endothelial cells: globular adiponectin vs. high molecular weight adiponectin. Diab. Vasc. Dis. Res. 5, 123–127.

- Tomizawa, A., Hattori, Y., Kasai, K., 2009. Induction of gene expression in response to globular adiponectin in vascular endothelial cells. Life Sci. 85, 457–461.
- van Praag, H., Kempermann, G., Gage, F.H., 2000. Neural consequences of environmental enrichment. Nat. Rev. Neurosci. 1, 191–198.
- Wan, Z., Mah, D., Simtchouk, S., Klegeris, A., Little, J.P., 2014. Globular adiponectin induces a pro-inflammatory response in human astrocytic cells. Biochem. Biophys. Res. Commun. 446, 37–42.
- Weigert, J. et al., 2008. Reduced response to adiponectin and lower abundance of adiponectin receptor proteins in type 2 diabetic monocytes. FEBS Lett. 582, 1777–1782.
- Williamson, L.L., Chao, A., Bilbo, S.D., 2012. Environmental enrichment alters glial antigen expression and neuroimmune function in the adult rat hippocampus. Brain Behav. Immun. 26, 500–510.
- Wolf, A.M., Wolf, D., Rumpold, H., Enrich, B., Tilg, H., 2004. Adiponectin induces the anti-inflammatory cytokines IL-10 and IL-1RA in human leukocytes. Biochem. Biophys. Res. Commun. 323, 630–635.
- Wulster-Radcliffe, M.C., Ajuwon, K.M., Wang, J., Christian, J.A., Spurlock, M.E., 2004. Adiponectin differentially regulates cytokines in porcine macrophages. Biochem. Biophys. Res. Commun. 316, 924–929.
- Yamauchi, T. et al., 2003. Cloning of adiponectin receptors that mediate antidiabetic metabolic effects. Nature 423, 762–769.
- Yau, S.Y. et al., 2014. Physical exercise-induced hippocampal neurogenesis and antidepressant effects are mediated by the adipocyte hormone adiponectin. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 111, 15810–15815.
- Yirmiya, R., 1996. Endotoxin produces a depressive-like episode in rats. Brain Res. 711, 163–174.
- Zeman, M. et al., 2009. Leptin, adiponectin, leptin to adiponectin ratio and insulin resistance in depressive women. Neuro. Endocrinol. Lett. 30, 387–395.
- Zhang, D., Guo, M., Zhang, W., Lu, X.Y., 2011. Adiponectin stimulates proliferation of adult hippocampal neural stem/progenitor cells through activation of p38 mitogen-activated protein kinase (p38MAPK)/glycogen synthase kinase 3beta (GSK-3beta)/beta-catenin signaling cascade. J. Biol. Chem. 286, 44913–44920.
- Zhou, H., Lapointe, B.M., Clark, S.R., Zbytnuik, L., Kubes, P., 2006. A requirement for microglial TLR4 in leukocyte recruitment into brain in response to lipopolysaccharide. J. Immunol. 177, 8103–8110.
- Zhou, H., Andonegui, G., Wong, C.H., Kubes, P., 2009. Role of endothelial TLR4 for neutrophil recruitment into central nervous system microvessels in systemic inflammation. J. Immunol. 183, 5244–5250.



Figure 17 : Schéma illustrant les effets de l'environnement enrichi contre les comportements anxio-dépressifs induits par le stress.

La libération chronique dans le sang de corticostérone retrouvée chez les patients dépressifs, agit au niveau cérébral en promouvant une activation pro-inflammatoire de la microglie, favorisant ainsi l'établissement d'un état neuroinflammatoire et l'apparition de comportements anxio-dépressifs. A l'inverse, des conditions de vie favorables, telles que celles fournies par l'EE, permettent l'augmentation des taux d'adiponectine, adipokine produite par le tissu adipeux, qui dans le cerveau va promouvoir un phénotype anti-inflammatoire de la microglie et lutter contre la neuroinflammation et les comportements anxio-dépressifs.

ARTICLE 3 : GLOBULAR ADIPONECTIN LIMITS MICROGLIA PRO-INFLAMMATORY PHENOTYPE THROUGH AN ADIPOR1/NF-κB SIGNALING PATHWAY.

<u>Nicolas S</u>, Cazareth J, Zarif H, Guyon A, Heurteaux C, Chabry J, Petit-Paitel A. Front Cell Neurosci. 2017 Nov 14;11:352. doi : 10.3389/fncel.2017.00352. PMID : 29184485

CONTEXTE

Au niveau central, l'ApN est capable de réduire l'état inflammatoire et de favoriser le phénotype anti-inflammatoire de la microglie expliquant en partie ses effets antidépresseurs. Les récepteurs de l'ApN sont exprimés sur les cellules immunes circulantes. Sur ces cellules, l'ApNg inhibe NF-κB et induit une diminution de l'expression des cytokines pro-inflammatoires. Nous avons étudié s'il en était de même sur la microglie. Aussi, l'objectif de ce 3^{ème} article a été de caractériser la voie de signalisation, qui est activée par l'ApNg sur la microglie lors de la réponse inflammatoire.

RESULTATS

Dans un premier temps nous avons étudié si l'invalidation de ApN entrainait une différence de la réponse inflammatoire centrale. L'injection IP de LPS provoque une augmentation de l'expression des cytokines pro-inflammatoires (IL-1 β , IL-6 et TNF α) dans différentes régions du SNC (Hypothalamus, Hippocampe, Amygdale, CPF et LCS) des souris WT (*Figure 1 A, B*). Pour étudier l'importance de l'ApN dans la régulation de cette réponse inflammatoire, nous avons reproduit ces expériences sur des souris ApN^{-/-} (*Figure 1 A, B*). La réponse inflammatoire est exacerbée chez les souris ApN^{-/-}. Par des techniques de tri cellulaire nous avons montré que l'injection de LPS augmente le nombre de monocytes infiltrant dans le parenchyme cérébral des souris ApN^{-/-} en comparaison aux WT (*Figure 1 C, D*). Des études immunohistochimiques montrent une augmentation du marquage Iba1 dans le cerveau des souris ApN^{-/-} par rapport aux souris contrôles suggérant une hyperactivation de la microglie au niveau de l'hippocampe et de l'hypothalamus (*Figure 2 A, B*). Par ailleurs la microglie issue des souris ApN^{-/-} 24h après l'injection de LPS exprime et libère plus de cytokines pro-inflammatoires *ex vivo* que celles issues des WT (*Figure 2 C-E*). Par différents protocoles d'application de l'ApNg et sur différents modèles cellulaires (*in vivo, ex vivo et in vitro*) combinés à des techniques de qPCR ou de CBA, nous avons montré

que l'ApNg inhibe la réaction pro-inflammatoire mais ne promeut pas la réaction anti-inflammatoire des cellules microgliales (*Figure 3 et 4*). Pour identifier quel AdipoR était responsable de ces effets, nous avons étudié l'effet de l'ApNg sur des microglies issues de cerveaux de souris déficientes pour l'AdipoR2 traitées au LPS. L'ApNg conserve ses propriétés anti-inflammatoires sur la microglie issue des souris AdipoR2-KO (*Figure 7 A,B*). Cela suggère indirectement que l'AdipoR1 est responsable des effets anti-inflammatoires de l'ApNg. Pour étudier cette hypothèse, nous avons inhibé l'expression de l'AdipoR1 ou de l'AdipoR2 dans la lignée BV2 (cellules microgliales murine immortalisées) en utilisant des siRNA. Seule l'inhibition de l'expression de l'AdipoR1 supprime les effets anti-inflammatoires de l'ApNg vis-à-vis du LPS (*Figure 7 C-D*). Des expériences d'immunocytochimie et de western blot ont permis de mettre en avant que l'effet de l'ApNg passe par la levée de l'inhibition de l'AMPK par le LPS qui a activé la voie NF-κB et donc l'état pro-inflammatoire de la microglie (*Figure 8*).

CONCLUSION

Nous avons montré ici que l'ApNg est capable de limiter à la fois la libération par la microglie de cytokines pro-inflammatoires provoquée par une injection de LPS. De plus, nous avons identifié la voie de signalisation AdipoR1-AMPK-NF-κB comme étant la cible de l'ApNg lors de l'activation de la microgliale *in vitro*. Ces résultats confirment le potentiel anti-neuroinflammatoire de l'ApNg.

Ces travaux suggèrent que l'AdipoR1 est responsable au niveau du SNC des effets antiinflammatoires de l'ApNg. Ces résultats restent à confirmer *in vivo*. Nos travaux soulignent l'intérêt de cibler le système « adiponergique » dans la recherche de traitement contre les maladies du SNC ayant une composante neuroinflammatoire comme par exemple les maladies d'Alzheimer et de Parkinson, les AVC et la dépression.



<u>Figure 18 :</u> Représentation schématique des mécanismes d'action de l'adiponectine globulaire sur la microglie.

L'ApNg, en se liant à l'AdipoR1, stimule la phosphorylation de l'AMPK. Ceci empêche la dégradation de la kinase I κ -B et la translocation de la sous-unité p65 du NF- κ B dans le noyau. Ceci limite l'expression de cytokines proinflammatoires comme IL-1 β , IL-6 et TNF- α . L'ApN limite également l'expression de la « inducible Nitric Oxide Synthase » iNOS et la libération d'oxyde nitrique.

ARTICLE 3





Globular Adiponectin Limits Microglia Pro-Inflammatory Phenotype through an AdipoR1/NF-κB Signaling Pathway

Sarah Nicolas, Julie Cazareth, Hadi Zarif, Alice Guyon, Catherine Heurteaux, Joëlle Chabry and Agnès Petit-Paitel*

Centre Nationnal de la Recherche Scientifique, UMR7275 Institut de Pharmacologie Moléculaire et Cellulaire, Université Côte d'Azur, Valbonne, France

We recently reported that increased levels of Adiponectin (ApN) in the brain led to microglia phenotype and activation state regulation, thus reducing both global brain inflammation and depressive-like behaviors in mice. Apart from this, little is known on ApN molecular effects on microglia, although these cells are crucial in both physiological and pathological processes. Here we fill this gap by studying the effects and targets of ApN toward neuroinflammation. Our findings suggest that ApN deficiency in mice leads to a higher sensitivity of mice to neuroinflammation that is due to enhanced microglia responsiveness to a pro-inflammatory challenge. Moreover, we show that globular ApN (gApN) exerts direct *in vivo* anti-inflammatory actions on microglia by reducing IL-1β, IL-6, and TNFα synthesis. *In vitro*, gApN anti-inflammatory properties are confirmed in brain-sorted microglia, primary cultured and microglia cell line (BV2), but are not observed on astrocytes. Our results also show that gApN blocks LPS-induced nitrosative and oxidative stress in microglia. Finally, we demonstrate for the first time that these anti-inflammatory and anti-oxidant actions of gApN on microglia are mediated through an AdipoR1/NF- κ B signaling pathway.

OPEN ACCESS

Edited by:

Juan Andrés Orellana, Pontificia Universidad Católica de Chile, Chile

Reviewed by:

Andrew MacLean, Tulane University School of Medicine, United States Christiane Charriaut-Marlangue, Institut National de la Santé et de la Recherche Médicale, France

*Correspondence:

Agnès Petit-Paitel paitel@ipmc.cnrs.fr

Received: 07 September 2017 Accepted: 24 October 2017 Published: 14 November 2017

Citation:

Nicolas S, Cazareth J, Zarif H, Guyon A, Heurteaux C, Chabry J and Petit-Paitel A (2017) Globular Adiponectin Limits Microglia Pro-Inflammatory Phenotype through an AdipoR1/NF-kB Signaling Pathway. Front. Cell. Neurosci. 11:352. doi: 10.3389/fncel.2017.00352 Keywords: microglia, astrocytes, brain, neuroinflammation, adipokines, cytokines, nitrosative stress, oxidative stress

INTRODUCTION

Chronic neuroinflammation in the brain is a self-sustaining and long-lasting neuroinflammatory response characterized not only by a continuous activation of microglia, astrogliosis, and continuous release of inflammatory mediators, but also by increased oxidative and nitrosative stress (Block and Hong, 2005). This leads to blood-brain barrier (BBB) damage, resulting in infiltration of peripheral monocytes into the brain what maintains or even amplifies the inflammation (Rivest, 2009). Chronic neuroinflammation is most often harmful to neurons. Neurodegenerative diseases such as multiple sclerosis (MS), Alzheimer's disease (AD), Parkinson's disease (PD), and Huntington's disease (HD), but also psychiatric disorders, including major depressive disorders (MDD) are associated with chronic neuroinflammation (Dantzer et al., 2008; Frank-Cannon et al., 2009).

Chronic neuroinflammation may be the consequence of a chronic low-grade inflammation status in peripheral organs. Lifestyle factors, such as physical inactivity, smoking habits, obesity,

1 133 insulin resistance, non-healthy diets, and vitamin D deficiency may affect the immune system and lead to the establishment of inflammation. Conversely, favorable living conditions that provide a set of cognitive, social, sensory stimulations with physical exercise can help fighting against chronic inflammation. In periphery, a molecule known for its anti-inflammatory properties is Adiponectin (ApN). ApN is the most abundant adipokine (Arita et al., 1999; Matsuzawa, 2005), almost exclusively secreted by adipocytes (Scherer et al., 1995; Maeda et al., 1996). At the peripheral level, ApN is involved in many physiological processes, including the regulation of energy metabolism, vascular physiology, and inflammation (Kadowaki and Yamauchi, 2005). Its effects are considered to be antiatherogenic and anti-diabetogenic (Gil-Campos et al., 2004). The plasma ApN rates are inversely correlated with the amount of visceral adipose tissue (Weyer et al., 2001; Kern et al., 2003). Cardiometabolic diseases such as metabolic syndrome, atherosclerosis and type 2 diabetes are associated with a lowgrade chronic inflammatory condition, as well as low levels of circulating ApN (Hotta et al., 2000; Hoffstedt et al., 2004; Hara et al., 2006). The generally accepted hypothesis is that ApN would be an anti-inflammatory molecule whose low plasma levels would contribute to the establishment of a chronic inflammatory condition (Maeda et al., 2002; Xu et al., 2003).

In periphery, the main cellular targets of ApN are hepatocytes, cardiac myocytes, pancreatic beta cells, macrophages/monocytes, and podocytes. At the central level, there is much less data available. Although this has been subject to debate, it is now accepted that ApN crosses the BBB and reaches the brain parenchyma especially in the hypothalamus (Kubota et al., 2007; Guillod-Maximin et al., 2009; Nicolas et al., 2015) and hippocampus (Jeon et al., 2009; Yau et al., 2014) where it modifies the activation of neurons (Kubota et al., 2007; Zhang et al., 2011, 2016a,b; Liu et al., 2012; Yau et al., 2014; Nicolas et al., 2015), microglia (Chabry et al., 2015) and astrocytes (Wan et al., 2014).

ApN is a 30-kDa protein that forms multimeric complexes that combine via its collagen domain to create three main circulating isoforms: a trimer (low molecular weight LMW), a hexamer of medium molecular weight (MMW) and a larger multimeric high molecular weight (HMW) form (Pajvani and Scherer, 2003; Tsao et al., 2003). A proteolytic cleavage product of ApN, known as globular ApN (gApN), also circulates at very low levels in plasma (Fruebis et al., 2001; Waki et al., 2005). The functional role of each of these isoforms is not formally known, although the HMW ApN is considered as the main determinant of insulin sensitivity and the LMW ApN is the only form found in the cerebrospinal fluid (CSF) (Ebinuma et al., 2007; Kusminski et al., 2007; Chabry et al., 2015).

ApN exerts multiple physiological effects by binding to its receptors, AdipoR1, AdipoR2 (Yamauchi et al., 2003, 2007; Kadowaki and Yamauchi, 2005). AdipoR1 and AdipoR2 play important roles in the regulation of inflammation, glucose and lipid metabolism, and oxidative stress (Yamauchi et al., 2003, 2007, 2014; Chinetti et al., 2004; Yamaguchi et al., 2005). Both are present in peripheral monocytes/macrophages with high abundance of AdipoR1 (Chinetti et al., 2004; Yamaguchi et al., 2005; Hui et al., 2015), however their precise respective contribution to the anti-inflammatory action of ApN remains unclear. Indeed, AdipoR1 predominantly binds to gApN and mediates the suppression of Nuclear Factor-kB (NF-kB) activation and the subsequent reduction of expression of proinflammatory cytokines (Yamaguchi et al., 2005; Mandal et al., 2011) whereas AdipoR2 mediates the M2 anti-inflammatory phenotype of macrophages induced by ApN (Mandal et al., 2011).

Although less documented than its peripheral functions, ApN also has essential role in the CNS. Interestingly, we and others recently described ApN as being a major contributor to the antidepressant effects of enriched environment (EE), an experimental paradigm for laboratory animals that mimics stimulating and positive living conditions, characterized by social interactions, cognitive, sensory, and motor stimuli and voluntary exercise (Yau et al., 2014; Nicolas et al., 2015). We demonstrated that in the mouse brain, EE-mediated ApN level increase influenced microglial activation state to an anti-inflammatory phenotype, which significantly and concomitantly reduced the neuroinflammation and anxiety/depressive-like behaviors (Chabry et al., 2015).

Although anti-inflammatory effects of ApN on bloodmonocytes and macrophages are known, no information is available yet on the direct influence of ApN on microglial activation. To fill this gap, we conducted this study which demonstrates that gApN has powerful anti-inflammatory, antinitrosative and anti-oxidant properties on LPS-stimulated microglia through an AdipoR1-NF-κB signaling pathway.

MATERIALS AND METHODS

Animals

Six weeks-old male wt, adiponectin knock-out $(ApN^{-/-})$ or adiponectin-receptor 2 knock-out $(AdipoR2^{-/-})$ mice with the same C57BL/6J genetic background were housed at 22°C with a 12-h light-dark cycle (lights on at 07:00) with free access to drink and chow (A04, SAFE). All experiments were conducted in compliance with the Institutional Animal Care and Use Committee of the University of Nice-Sophia Antipolis (permission number 010344.01 from the French "Ministère de l'Enseignement Supérieur et de la Recherche").

LPS Administration

Lipopolysaccharide (LPS) from *Escherichia coli* 0111:B4 was purchased from Sigma-Aldrich and freshly dissolved in sterile saline prior to i.p. injection at a dose of 1 mg/kg.

Abbreviations: ApN, adiponectin; gApN, globular adiponectin; FL-ApN, Fulllength adiponectin; LPS, lipopolysaccharide; IL, interleukin; TNF, tumor necrosis factor; AdipoR1, adiponectin receptor 1; AdipoR2, adiponectin receptor 2; MDD, major depressive disorders; NF-κB, nuclear factor-kappa B; CNS, central nervous system; EE, enriched environment; CSF, cerebrospinal fluid; CBA, CYTOMETRIC BEAD ARRAYTM; MSD, Meso Scale Discovery; ip, intraperitoneal; i.c.v., intracerebroventricular; FSC, forward scatter; SSC, side scatter; ROS, reactive oxygen species; NO, nitric oxide; CD, cluster of differentiation; AMPK, AMP-activated protein kinase; MAPK, Mitogen-activated protein kinase; iNOS, inducible nitric oxide synthase; COX-2, cyclooxygenase-2.

I.c.v Injections of APN

Wt mice were anesthetized with a mixture of ketamine (100 mg/kg) and xylazine (10 mg/kg). The mouse was placed on a stereotaxic apparatus (Kopf) on heating mat and the skull was exposed. I.c.v injections (0.3 μ g of ApN in 2 μ l of NaCl 0.9% or vehicle alone) were performed using a Hamilton micro-syringe (cerebral lateral ventricle coordinates: -0.22 mm posterior and 1 mm lateral to the bregma; depth 2.0 mm) at 0.2 μ l/min.

CSF Sampling and Cytokine Measurement

Mice were an esthetized with an i.p. injection of sodium pentobarbital; then CSF $(2-5~\mu l)$ was obtained by cisternal puncture. Multiplex measurement of proinflam matory cytokines in mouse CSF was performed with the MSD 96-well multi-array mouse cytokine assay (Mesoscale). For comparison, data were normalized relative to the CSF volume.

Isolation of Immune Cells from Adult Mouse Brains

Mice were deeply anesthetized with a lethal injection of pentobarbital. Immune brain cells were isolated from wholebrain homogenates using a protocol adapted from Cardona et al. (2006), as previously described in Cazareth et al. (2014). Mice were transcardially perfused with ice-cold HBSS containing 1 mg/ml EDTA. Brains were collected and roughly homogenized in PBS, resuspended in PBS containing 3 mg/ml collagenase D (Roche Diagnostics) and incubated 20 min at 37°C. After incubation, brain homogenates were filtered on 70 µm pore size cell strainers (BD Biosciences), centrifuged (10 min, 2,000 rpm), washed and resuspended in 6 ml of 38% isotonic Percoll (GE Healthcare), before centrifugation (20 min, 2,000 rpm, 4°C). The surface ring containing myelin and debris was discarded. Cell pellets containing brain immune cells were collected, washed with PBS containing 0.5% BSA and 2.5 mM EDTA and labeled for subsequent cell sorting and/or flow cytometry analysis.

Brain Immune Cell Staining, Flow Cytometry, and Cell Sorting

Staining of brain immune cell surface antigens was performed as previously described (Cazareth et al., 2014). Briefly, Fc receptors were blocked with 2.4G2 antibody. Microglia was identified according to the labeling of CD11b-PercP-Cy5.5 and CD45-APC-Cy7 conjugated antibodies (BD Biosciences). Inflammatory monocytes were defined as CD11b⁺CD45^{hi}Ly-6G^{neg}Ly-6C^{hi} cells (Ly-6G and Ly-6C antibodies were purchased from BD Biosciences). Cells were washed and resuspended in PBS containing 0.5% BSA and 2.5 mM EDTA for analysis and cell sorting with FACS Aria III (BD Biosciences).

Ex Vivo Culture of Microglia

Brain-sorted microglia was seeded at a density of 2×10^4 cells/well in 96-well tissue culture plates (Falcon) in Dulbecco's Modified Eagle's Medium (DMEM) culture media (Gibco) containing 10% fetal bovine serum (FBS, Gibco). Cells were cultured at 37°C with 5% CO₂ and saturated humidity for 24 h. Fifteen minutes after cell plating, gApN (10µg/ml, Phoenix Pharmaceuticals) was added, 1 h prior stimulation with LPS

 $(0.5 \,\mu$ g/ml). LPS from *Escherichia coli* 0111:B4 was purchased from Sigma-Aldrich and freshly dissolved in sterile saline prior to cell treatment. Media were then collected and centrifuged at 1,200 rpm for 10 min at 4°C.

Tissue Collection and Immunohistochemistry

Mice were deeply anesthetized with pentobarbital and transcardially perfused with PBS and then 3.2% paraformaldehyde. Brains in 3.2% were postfixed paraformaldehyde for 48 h. Fixed brains were sectioned (40 µm) using a vibratome (Leica). Sections were blocked with 3% goat serum. Sections were washed and incubated with a rabbit anti-mouse ionized calcium binding adaptor molecule 1 (Iba-1) antibody (Wako Chemicals, USA), overnight at 4°C, followed by incubation with the appropriate fluorescent-conjugated secondary antibody (Invitrogen). Slices were then mounted on glass slices with Fluoroprep (Dako) containing 1 mg/ml Hoescht, a fluorescent specific DNA dye (Invitrogen). Each fluorochrome was independently captured with an FV10i scanning confocal microscope (Olympus, France). Quantification of Iba-1 staining was performed using ImageJ software (NIH). The software generated fluorescence intensity values by tracing the region-ofinterest (ROI). Arbitrary units were defined in terms of strength of fluorescent signal. The final intensity values were calculated by subtracting the area of the selected region multiplied by the background fluorescence from the fluorescence intensity of the region-of-interest (ROI): fluorescence intensity (arbitrary units) = fluorescence intensity of ROI – (area of selected region \times mean fluorescence of background).

Primary Astrocytes and Microglia Cell Cultures

Primary microglial cell cultures were prepared from the brains of newborn C56BL/6J mice (postnatal days 1-2; Marella and Chabry, 2004). The brains were removed and placed in DMEM, then the meninges and blood vessels were removed under a microscope. After mechanical dissociation, aliquots of the cell suspension were plated in a poly-D-lysine coated flask (Falcon). Cultures containing mainly astrocytes (90%) and microglial cells (10%) were maintained at 37°C in a humidified 5% CO2 atmosphere for 10 days, with the change of the medium every 3-4 days. The cultures were then shaken on an orbital shaker at 150 rpm for 60 min at 37°C. Floating cells in the supernatant were collected, centrifuged at 250 g for 5 min, and resuspended in the culture medium. This fraction contained the microglial cells (around 93% of purity). The adherent cell population (i.e., astrocytes) was grown in DMEM containing 10% FCS, split every week and used after two passages. Astrocytes cultures contained around 99% of GFAP+ positive cells.

Cell Culture

BV2 mouse microglia cells were grown and maintained in DMEM (4.5 g/l glucose, 4 mM L-glutamine, without sodium pyruvate from Gibco) supplemented with 10% fetal bovine serum (FBS, Gibco), 100 U/ml penicillin and 100 μ g/ml streptomycin (Gibco). Cells were grown in an atmosphere of 5% CO2 at a

temperature of 37° C. AdipoRon (2-(4-benzoylphenoxy)-N-[1-(phenylmethyl)-4 piperidinyl]acetamide) was purchased from Sigma-Aldrich and dissolved in 2.5% DMSO.

siRNA Cell Transfection

AdipoR1 or AdipoR2 interfering RNA (siRNA) or scrambled siRNA (Qiagen) were transfected into BV2 cells using RNAiMax Lipofectamine (Invitrogen) according to the manufacturer's recommendations. After various experimental tests, 48 h posttransfection time was selected as the optimal duration to allow maximal decrease of targeted protein expression. Therefore, in all experiments, cells were used 48 h after siRNA transfection.

Immunocytochemistry

BV2 cells were grown on poly-D-lysine-coated glass coverslips. After treatment, cells were fixed with 3.2% paraformaldehyde, then permeabilized in PBS pH 7.4, containing 0.3% Tween and 3% BSA. Cells were then incubated overnight with the appropriate primary antibody directed against CD11b (Abcam), iNOS (Merck Millipore), AdipoR1 or AdipoR2 (Sigma Aldrich) in the same buffer. At the end of the incubation time, cells were washed three times with PBS and incubated with either Alexa488conjugated or Alexa594-conjugated secondary antibodies (Invitrogen) and Hoechst fluorescent stain (Invitrogen) for 1h at room temperature. For NF-κB p65 subunit nuclear translocation study, cells were pre-treated with 10 µg/ml gApN or saline for 1 h before addition of $0.5 \,\mu$ g/ml LPS for 3 additional hours. Cells were then fixed and permeabilized as previously. Primary antibody against p65 was from Cell Signaling. Images were captured with an FV10i scanning confocal microscope (Olympus, France) and analyzed using Image J software ("National Institutes of Health" IMAGE J SoftwareTM).

RNA Isolation and Quantitative PCR

Total RNA from hippocampus, hypothalamus, amydgala, prefrontal cortex, microglia or astrocytes were isolated using the Trizol[®] RNA extraction kit (Invitrogen) according to the manufacturer recommendations followed by a RQ1 DNAse (Promega) treatment. First-strand cDNA were synthesized from 2 µg of total RNA with 200U of SuperScript III reverse transcriptase (SuperScriptIII, Invitrogen) in the appropriate buffer in the presence of 25 µg/ml random primers, 0.5 mM desoxyribonucleotide triphosphate mix, 5 mM dithiothreitol, 40U RNAsin (Promega). The reaction was incubated 5 min at 25°C, then 50 min at 50°C then inactivated 15 min at 70°C. Quantitative PCR was performed using the SYBRgreen method (Roche) with the LightCycler 480 sequence detector system (Roche Diagnostics). β-actin and GAPDH were used as reference genes for normalization. Primers were purchased from QIAGEN (QuantiTect primer assay, QIAGEN).

Ex Vivo Supernatants Collection and Cytokine Measurement by CBA or MSD

Supernatants from *ex vivo* microglia or BV2 cells were harvested and the concentration of secreted cytokines (TNF α , IL-1 β , and IL-6) was detected using a cytometric bead array according to the manufacturer's instructions (BD Biosciences) or with the MSD 96-well multi-array mouse cytokine assay (Mesoscale), as specified for each set of experiments. For comparison, data were normalized relative to the cell number.

Measurement of Intracellular ROS (Reactive Oxygen Species)

BV2 cells were seeded in 24-well plates as described above and then pre-treated with $10 \mu g/ml$ gApN for 1 h, then LPS $(0.5 \mu g/ml)$ was added. Fifteen hours later, 2.7-dichlorofluorescin diacetate (DCFH-DA) ($10 \mu M$; Sigma-Aldrich) was added and incubated at 37° C, 5% CO₂. DCFH-DA is a redox-sensitive dye which is readily taken up by the cells. Within the cell, esterases cleave the acetate groups on DCFH-DA, thus trapping the reduced form of the probe (DCFH), intracellularly. ROS in the cells oxidize DCFH, yielding the fluorescent product DCF. After 60 min, culture media were removed and kept at 4°C for subsequent NO production assay. Cells were rinsed with PBS and harvested in Trypsin/EDTA (Gibco). Cells were pelleted and resuspended in PBS containing 0.5% BSA and 2.5 mM EDTA for FACS analysis (Fortessa BD Biosciences).

Measurement of Nitric Oxide Production

 $\rm NO2^-$ was measured in BV2 culture supernatants to assess the NO production in microglial cells. Fifty microliters of the culture media were mixed with 50 μl of Griess' reagent for nitrite from Promega in a 96-well plate and incubated at 25°C for 10 min. The absorbance at 570 nm was measured by a microplate reader. Sodium nitrite (NaNO2) was used as the standard to calculate the NO2⁻ concentrations.

Cell Homogenates, Subcellular Fractionation, and Western Blotting

For total protein extraction, BV2 cells were rinsed with PBS and homogenized in lysis buffer (50 mM Tris-HCl, pH 7.5, 150 mM NaCl, 5 mM EDTA containing 0.5% Triton X-100 and 0.5% sodium deoxycholate). Equal amounts of total proteins (40 µg) determined by the Bradford method (BioRad) were separated onto 12% SDS-PAGE, then transferred on nitrocellulose membrane (Schleicher & Schuell, Dassel, Germany). Blots were incubated in PBS 0.1% Tween, 1% milk with antibodies directed against phospho-AMPKa (Thr172), total AMPK (Cell Signaling), iNOS/NOSII (Merck Millipore), or COX-2 (Chemicon), and then with the appropriate HRPsecondary antibody. Blots were developed using an enhanced chemoluminescence system (Immobilon, Merck Millipore) with a Fusion detector (Vilber). To correct for any loading artifact, same blots were re-probed with anti-actin antibody (Abcam). Densitometry analyses were performed with a "National Institutes of Health" IMAGE J SoftwareTM on the immunopositive bands. Results were expressed as a percentage of control load. For NF-KB translocation study, cells were pre-treated for 1 h with $10 \mu g/ml$ gApN or saline before addition of $0.5 \mu g/ml$ LPS for 3 additional hours. Cells were then rinsed with PBS and detached with trypsin/EDTA (Gibco). After centrifugation, cells were homogenized in lysis buffer [10 mM Hepes, pH 7.4, 10 mM KCl, 0.1 mM EDTA, 0.5% NP-40, 1 mM dithiothreitol (DTT), and protease inhibitor cocktail from Roche]. Cells were incubated 20 min on ice and then centrifuged for 10 min at 12,000 g. The supernatants contained cytosolic proteins. For nuclear protein extraction, nuclear pellets were homogenized in extraction buffer (20 mM Hepes pH 7.4, 400 mM NaCl, 1 mM EDTA, 1 mM DTT, and protease inhibitor cocktail). After 30 min on ice, samples were centrifuged 15 min at 12,000 g, 4°C. Supernatants contained nuclear extracts. Equal amounts of protein of nuclear extracts were loaded on 10% SDS-PAGE then transferred to nitrocellulose as previously described. Blots were probed with antibody against NF- κ B p65 subunit from Cell Signaling. Histone H3 immunoreactivity (Cell Signaling) was used as a nuclear loading control.

Statistical Analysis

Statistical analysis was performed using the XLSTAT software. Significant differences between two groups of data were determined using a Mann & Whitney test for non-parametric data. Alternatively, Kruskal–Wallis analysis followed by a Conover-Iman test for multiple comparisons with Bonferroni correction between two independent groups, or a two-way ANOVA was applied. Results from data analysis were expressed as mean \pm standard error of the mean (SEM). Statistical significance was set at **P* < 0.05 and ***P* < 0.01, ****P* < 0.001.

RESULTS

ApN-Deficient Mice Are More Sensitive to LPS-Induced Neuroinflammation than Wt Mice

In order to explore how ApN influences brain inflammation, we first evaluated the impact of ApN deficiency on mouse brain susceptibility to neuroinflammation. We analyzed the effect of a single LPS i.p. administration on pro-inflammatory cytokine mRNA expression in different brain regions of wild-type (Wt) and $ApN^{-/-}$ mice. Brain regions were selected according to their implication in emotional stress information (amydgala, hippocampus, prefrontal cortex) or integration (hypothalamus). While IL-6 mRNA levels were not modified 24 h after LPS treatment in Wt mice regardless the brain area, IL-1 β and TNF α mRNA levels were elevated in all the analyzed brain regions of Wt and $ApN^{-/-}$ mice, although to different extents depending on the area (Figure 1A). After the LPS challenge, IL-1β, IL-6, and TNFa mRNA levels were statistically higher in all brain regions from $ApN^{-/-}$ mice than in those from Wt mice, except from IL-6 mRNAs in prefrontal cortex (Figure 1A). We also investigated the levels of pro-inflammatory cytokines IL-1β, IL-6, and TNFα in the CSF of Wt and $ApN^{-/-}$ mice, 24 h after saline or LPS ip administration (Figure 1B). As expected, pro-inflammatory cytokines levels were extremely low in NaCl-injected Wt and ApN^{-/-} mouse CSF samples. LPS induced a strong increase of IL-1 β , IL-6, and TNF α levels in the CSF of Wt and ApN^{-/-} mice that was statistically higher in $\mathrm{ApN}^{-/-}$ mice as compared to Wt mice. Anti-inflammatory cytokine IL-10 was also detectable in the CSF of all mouse groups, but its levels were similarly increased after LPS challenge in Wt and $ApN^{-/-}$ CSF samples (data not shown).

Microglia is defined as being $CD11b^+/CD45^{low+}$ while the heterogeneous population of CNS-associated phagocytes is $CD11b^+/CD45^{high+}$. The gating strategy for their correct identification is presented in **Figure 1C**. Three different populations were identified in the brain immune cell suspensions: $CD11b^+/CD45^{high+}$ (CNS-associated phagocytes), $CD11b^+/CD45^{low+}$ (microglia), and $CD11b^-/CD45^{high+}$ cells (**Figure 1C**).

CNS infiltration of CD11b⁺CD45^{high+}Ly-6C^{hi} monocytes is a hallmark of CNS inflammation, including that caused by a peripheral injection of LPS. Flow cytometry analysis revealed that 24 h post LPS injection, the number of CD11b⁺CD45^{high+}Ly-6C^{hi} inflammatory monocytes was statistically higher in ApN^{-/-} mice as compared to Wt mice. The number of microglia collected from whole brains was similar in both mouse groups (**Figure 1D**).

Altogether, these results indicated that ApN deficiency triggers a stronger global neuroinflammatory response after a peripheral LPS challenge as compared to Wt mice, suggesting antiinflammatory properties of ApN within the CNS.

Microglia from ApN-Deficient Mice Is More Sensitive to LPS-Induced Inflammation than Microglia from Wt Mice

Microglia, the immune-like cells of the brain, plays an important role in inflammatory responses in the CNS. Previously, we have shown that EE mediates anti-inflammatory effects in the brain by targeting microglia activation profile in an ApNdependent manner (Chabry et al., 2015). Thus, we investigated whether the greater susceptibility of $ApN^{-/-}$ mice toward neuroinflammation may be due to a different responsiveness of microglia caused by ApN deficiency. To answer this question, we subjected Wt and ApN^{-/-} mice to a single LPS i.p. injection (1 mg/kg) and analyzed microglia reactivity by immunohistochemistry, protein analysis and gRT-PCR. Figure 2A shows Iba-1 labeling of microglia in hippocampus and hypothalamus of Wt and $ApN^{-/-}$ mouse brains, 24 h after LPS ip administration. Quantification of images shows that in both brain regions, Iba-1 fluorescence appeared more intense in $ApN^{-/-}$ challenged mice than in Wt mice (Figure 2B).

Microglia was sorted out of LPS-challenged brains from Wt and ApN^{-/-} mice (**Figure 2C**). Protein analysis of the secretion media of brain-sorted microglia revealed that LPS-stimulated microglia sorted from ApN^{-/-} mice produced statistically more IL-1 β , IL-6, and TNF- α pro-inflammatory cytokines than that from Wt mice (**Figure 2D**). Similarly, qRT-PCR analysis of pro-inflammatory cytokine mRNA expression in Wt and ApN^{-/-} microglia after an *in vivo* LPS challenge revealed higher levels of IL-1 β , IL-6, and TNF α mRNAs in ApN^{-/-} microglia as compared to Wt microglia (**Figure 2E**). Altogether, these results indicated that ApN deficiency leads to a greater sensitivity of microglia toward an inflammatory challenge triggered by LPS without significant microglia proliferation.



FIGURE 1 | Adiponectin deficiency exacerbates neuroinflammatory responses to LPS ip administration. (A) Twenty-four hours post saline or LPS ip administration, brains from Wt (white and gray bars, respectively) or ApN^{-/-} mice (black and dark gray bars, respectively) were dissected and pro-inflammatory genes IL-1 β , IL-6, and TNF α mRNA levels were determined by quantitative PCR from hypothalamus, hippocampus, amygdala, and prefrontal cortex. Bars represent the mean expression levels \pm s (where s = $\sqrt{(s1^2 + s2^2)}$, s1 = standard deviation of the Δ Ct of the gene of interest among replicates and s2 = standard deviation of the Ct of the housekeeping genes among replicates) expressed as fold change compared to saline injected Wt mouse brains. Kruskal–Wallis test followed by the Iman-Conover method for multiple comparison between groups was performed on Δ Ct values, $^p < 0.05$, $^{**p} < 0.01$, $^{***p} < 0.005$ vs. saline control; ns, non-significant, n = 4-5. (B) Concentrations of IL-1 β , IL-6, and TNF α cytokines in CSF of saline and LPS-treated Wt mice (white and black bars, respectively) or saline and LPS-treated ApN^{-/-} mice (light gray and dark gray bars, respectively) were measured as indicated in the Materials and Methods section. N = 4 per group, ns, non-significant; Mann & Whitney for comparison between groups, $^*p < 0.05$, $^{**p} < 0.005$. (C) Representative bivariate dot plots of Percoll isolated brain cells illustrating gating strategy on CD11b⁺/CD45^{high+} for MIS⁻associated phagocytes, and CD11b⁻/CD45^{high+}/Ly6G⁺/Ly6C⁺ med neutrophils and CD11b⁺/CD45^{high+}/Ly6G⁻/Ly6C⁺ inflammatory monocytes. (D) Immune brain cells were isolated and analyzed as described in the Materials and Methods section. Dot plots show the number of inflammatory monocytes (left panel) and microglia (right panel) in Wt and ApN^{-/-} mouse brains after LPS challenge. Bars represent mean \pm SEM, n = 4 per group.



using fluorescence intensity values to quantify Iba-1 levels. (C) Schematic representation of the protocol. 24 h after LPS ip injection, IL-1 β , IL-6, and TNF α proteins (D) or mRNAs (E) were quantified by CBA or qRT-PCR, respectively, from microglia sorted from brain cell suspensions of Wt (white bars) or ApN^{-/-} mice (black bars) cultured for 15 h. (D) Data represent the mean concentration \pm SEM, n = 4. (E) Data represent the mean expression levels \pm s expressed as fold change compared to LPS-treated Wt mouse microglia, n = 4. Mann & Whitney for comparison between groups, *p < 0.05, vs. control.

ApN Limits Pro-Inflammatory Phenotype of Brain Sorted Microglia

We next conducted a series of experiments aimed at evaluating the effects of ApN on microglia inflammatory profile. We

first examined the *in vivo* effects of ApN on microglia (**Figures 3A–C**). CBA measurement of cytokines in the secretion media of brain sorted microglia revealed that IL-1 β , IL-6, and TNF α levels were significantly lower in the secretion media

7 139 Nicolas et al.



FIGURE 3 Globular adiponectin limits LPS-induced pro-inflammatory activation of microglia. (A) Schematic representation of the protocol. Wt mice first received i.c.v injection of saline or gApN then LPS ip administration. Levels of IL-1 β , IL-6, and TNF α proteins (B) or mRNAs (C) were quantified by CBA or qRT-PCR, respectively, from microglia sorted out from brains of saline (white bars) or gApN (black bars) i.c.v injected mice. N = 3 per group; Mann & Whitney for comparison between groups, *p < 0.05. (D) Twenty-four hours after saline or LPS ip administration, microglia was sorted out from Wt mouse brains and cultured for additional 15 h in the presence of vehicle or gApN in their culture medium. Levels of IL-1 β , IL-6, and TNF α proteins were quantified by CBA from microglia sorted out from brains of saline (white bars) or LPS (black bars) treated Wt mice cultured in absence (white and black bars) or presence of 1 or 10 µg/ml gApN (gray bars). N = 3 per group; Kruskal–Wallis test followed by the Iman-Conover method for multiple comparison between groups was performed, *p < 0.05, *p < 0.01, ***p < 0.005; ns, non-significant. (E) Microglia was sorted out from Wt mouse brains and cultured for 1 h with saline or gApN as a pre-treatment before addition of LPS. Levels of IL-1 β , IL-6, and TNF α mRNAs were quantified by QRT-PCR, from microglia sorted out from brains of saline (white bars) or LPS (black bars) treated microglia cultured in absence (white and black bars) or presence of 10 µg/ml gApN (gray bars). N = 3 per group; Kruskal–Wallis test followed by the Iman-Conover method for multiple comparison between groups was performed, *p < 0.05, **p < 0.01, ***p < 0.005; ns, non-significant. (E) Microglia was sorted out from Wt mouse brains and cultured for 1 h with saline or gApN as a pre-treatment before addition of LPS. Levels of IL-1 β , IL-6, and TNF α mRNAs were quantified by qRT-PCR, from microglia sorted out from brains of saline (white bars) or LPS (black bars) treated microgli

from microglia sorted out from gApN injected mouse brains as compared to microglia from saline-injected mouse brains (**Figure 3B**). In agreement with this, qRT-PCR analysis showed that IL-1 β , IL-6, and TNF α mRNA levels were significantly lower in microglia sorted out from gApN injected mouse brains as compared to microglia from saline injected mouse brains (**Figure 3C**). These results suggested that i.c.v injection of gApN significantly, directly or indirectly, prevents the LPS-induced production of pro-inflammatory cytokines by microglia.

To deepen these results, we wondered if gApN could have direct anti-inflammatory effects on microglia. We first tested the ability of gApN to modulate the cytokine production by in vivo activated microglia (Figure 3D). Analysis of pro-inflammatory cytokines in the secretion media revealed that microglia sorted out from brains of LPS-treated mice released more IL-1β, IL-6, and TNF α than microglia from saline-treated mice (Figure 3D). In vitro treatment of microglia with 1 µg/ml gApN significantly reduced IL-1ß and TNFa production, but failed to change IL-6 production (Figure 3D). On the other hand, a higher dose of gApN (10 μ g/ml) promoted a greater inhibition of IL-1 β and TNFa and also significantly reduced IL-6 release by LPSactivated microglia (Figure 3D). Next, we tested the ability of gApN pre-treatment to block the cytokine production by microglia that has been activated in vitro by LPS (Figure 3E). As expected, in vitro LPS treatment promoted a strong increase of IL-1β, IL-6, and TNFα mRNAs in microglia that was almost totally abolished by gApN pre-treatment (Figure 3E). Together, these results indicated that gApN has direct anti-inflammatory actions on microglia. Moreover, gApN treatment nonetheless significantly reduced the production of pro-inflammatory cytokines by activated microglia but also efficiently prevented microglia activation when used prophylactically in pre-treatment experiments.

Globular ApN Limits Pro-Inflammatory Activation of Different Models of Microglia

Although, our results indicated that gApN exerted direct antiinflammatory actions on microglia, we wondered whether gApN could also affect cytokine production by astrocytes, as previously mentioned (Wan et al., 2014). To answer this question, we compared the effects of gApN treatment on primary cultures of microglia, astrocytes, or mixed glial cells obtained from postnatal mouse brains. Microglia or astrocytes were treated with gApN (10µg/ml) alone, LPS (0.5µg/ml) alone, or pretreated with gApN for 1h before addition of LPS for 15 additional hours (Figure 4). Cells were collected and proinflammatory cytokine mRNA levels were analyzed by qRT-PCR. GApN treatment significantly reduced basal levels of IL-1β and IL-6 by microglia but did not modify TNFa mRNA level of unchallenged microglia. Moreover, pre-treatment of microglia with gApN also significantly blocked the increase of IL-1β, IL-6 and TNFa mRNAs elicited by LPS treatment (Figure 4A). In contrast, gApN did not reduce the basal or LPS-induced levels of pro-inflammatory cytokine mRNAs by astrocytes (Figure 4B). Interestingly, gApN treatment on astrocytes rather produced pro-inflammatory effects, since it significantly increased LPS-induced production of IL-1ß and TNFα mRNAs (Figure 4B). We also assessed in both cell types the level of expression of IkB-a mRNA. IkB-a is an immediate-early gene induced by LPS challenge and involved in the NF-kB signaling pathway. Here, we confirmed that LPS increased the expression of I κ B- α mRNA in both microglia and astrocytes (Figures 4A,B). GApN by itself had no effect on basal expression level of IκB-α mRNA in microglia while it significantly increased it in astrocytes. When used as a pre-treatment, gApN significantly blocked LPS-induced IkB-a mRNA increase in microglia but failed to change it in astrocytes (Figures 4A,B). We also examined gApN effects on primary cultured mixed glial cells containing microglia and astrocytes. Our results showed that gApN (10 µg/ml) successfully limited IL-1β, IL-6, and TNFa mRNA production by mixed glial cells stimulated by LPS ($0.5 \mu g/ml$; Figure 4C), suggesting that microglia/astrocytes crosstalk may favor global anti-inflammatory response to gApN. Altogether, these results suggested that gApN exerts different or even opposite effects on microglia and astrocytes but that in a cellular environment containing both microglia and astrocytes (brain, see Figure 1A, or mixed glial cell cultures), gApN treatment elicits rather overall anti-inflammatory effects.

In order to characterize in more detail the anti-inflammatory properties of ApN on microglia, we chose to conduct the following experiments on a more convenient cell model, i.e., the BV2 cell line. Cells were pre-treated for 1h with saline or gApN (0.5, 2.5, or 10 µg/ml for qRT-PCR experiments, Figure 4D; 1, 10, and 50 µg/ml for CBA assays, Figure 4E) before subsequent LPS addition ($0.5 \,\mu$ g/ml), for 15 h. BV2 cells were then collected and cytokine mRNA levels and cytokine secretion were analyzed by qRT-PCR (Figure 4D) and CBA (Figure 4E), respectively. On this cell model, gApN alone had no effect on basal expression levels of any examined mRNA or secreted cytokine. However, we confirmed that a pre-treatment with 10 µg/ml of gApN significantly limited the LPS-induced increase of IL-1β, IL-6, TNFa mRNA expression and protein release (Figures 4D,E). GApN also limited the LPS-induced increase of I κ B- α mRNAs (Figure 4D). Our results indicated that gApN dose-dependently decreased the expression of pro-inflammatory markers characteristic of the M1 phenotype (IL-1 β , IL-6, TNF α , and $I\kappa B-\alpha$) of microglia. Therefore, we wondered if gApN could simultaneously promote the expression of anti-inflammatory markers characteristics of the M2 phenotype. We then analyzed Arginase 1 and IL-10 mRNA levels. Our results indicated that neither LPS nor gApN alone or in combination with LPS altered the expression of these markers in the BV2 cell line (Figure 4D). These findings suggested that gApN may block M1 phenotype of microglia rather than promote a M2 phenotype.

Globular ApN Limits Nitrosative and Oxidative Stress in BV2 Cells

When activated, microglia produces and releases not only inflammatory cytokines but also reactive oxygen species (ROS) and nitric oxide (NO). To assess whether ApN could regulate ROS and NO induction, BV2 cells were stimulated with LPS only or subsequently to a 1 h pre-treatment with gApN.




GApN by itself significantly inhibited the basal level of ROS production in BV2 cells and had no effect on NO basal release. As expected, LPS treatment induced great increases of both ROS and NO production. Both were significantly blocked by gApN pre-treatment (**Figures 5A,B**). In microglial cells, NO is synthesized from iNOS (Minghetti and Levi, 1998). We thus investigated by immunocytochemistry iNOS immunoreactivity in BV2 cells upon gApN treatment only, LPS only or gApN pre-treatment followed by LPS addition. CD11b labeling was also examined as a control of microglial activation. Images quantification indicated that gApN alone had no effect but reduced both LPS-induced intracellular iNOS and CD11b surface immunoreactivities (**Figures 5C,D**).

Globular ApN Activates Intracellular Signaling Pathways in BV2 Cells

Our next goal was to define downstream pathways that may explain ApN anti-inflammatory, anti-nitrosative, and antioxidative actions on microglia cells. In periphery, gApN was suggested to directly regulate glucose metabolism and insulin sensitivity through its action on AMPK (Berg et al., 2001; Tomas et al., 2002; Yamauchi et al., 2002). Moreover, it has been recognized that AMPK signal regulates the inflammatory responses induced by NF-KB (Salminen et al., 2011). However, nothing is known yet on ApN-mediated signaling pathways in microglia. To fill this gap, we analyzed by Westernblotting AMPKa phosphorylation on Thr172 in BV2 cells upon gApN treatment, with or without LPS challenge (Figure 6A). Phosphorylation of AMPKa was significantly enhanced by gApN in basal and LPS-stimulated conditions. In endothelial cells, HMW ApN has been shown to activate AMPK and eNOS, leading to NF-kB dependent signaling pathway regulation (Hattori et al., 2008). We thus analyzed NF-KB activation by studying the nuclear translocation of the p65 subunit in BV2 cells. As expected, nuclear p65 immunoreactivity was increased by LPS treatment. GApN pre-treatment before LPS administration partially blocked the nuclear translocation of p65 (Figure 6B). These results collectively suggest that gApN regulates inflammatory responses by modulating the activity of NF-κB via an AMPK signaling pathway.

Globular ApN Anti-Inflammatory Actions Depend on AdipoR1

The next step was to study which ApN receptor was responsible for the anti-inflammatory actions of ApN on microglia. Notably, we first noticed by qRT-PCR on microglia sorted out from Wt mouse brains that microglia expressed both AdipoR1 and AdipoR2 mRNAs, at equivalent levels (data not shown). We first subjected Wt, ApN^{-/-} and AdipoR2^{-/-} mice to a single i.p. injection of LPS (1 mg/kg). Twenty-four hours later, microglia was sorted out from mouse brains, plated and treated *in vitro* with saline or gApN (10 µg/ml), for 15 additional hours (**Figure 7A**). Cytokine level analysis of the secretion media revealed, as previously showed, that LPS-activated microglia from ApN^{-/-} mice produced more IL-1 β , IL-6, and TNF α cytokines than that from Wt mice, although differences were not statistically significant for TNF α (**Figure 7B**). Interestingly, it appeared that LPS-activated microglia from AdipoR2^{-/-} mice also produced significantly more pro-inflammatory cytokines IL-1 β and IL-6 than that from Wt mice, suggesting that AdipoR2 deficiency led to a higher susceptibility of microglia toward LPS challenge. However, our findings also revealed that *in vitro* gApN treatment efficiently inhibited IL-1 β , IL-6, and TNF α production by Wt, ApN^{-/-}, and AdipoR2^{-/-} microglia, showing that AdipoR2 deficiency did not affect gApN anti-inflammatory actions on microglia (**Figure 7B**).

In periphery, ApN effects have been shown to depend on the molecular structure of the adipokine (globular or fulllength) and the expression of the ApN receptor subtypes R1 and/or R2 in target cells (Yamauchi et al., 2002, 2003). However, nothing is known yet about microglial expression of ApN receptors. By qRT-PCR and immunocytochemistry analyzes, we studied AdipoR1 and AdipoR2 expression in BV2 cells. Our results showed that BV2 cells expressed both AdipoR1 and AdipoR2 mRNAs and comparable levels of corresponding proteins (Figure 7C, same results were obtained on brain sorted microglia, data not shown). To deepen AdipoR1 and AdipoR2 involvement in ApN actions on microglia, AdipoR1 or AdipoR2 expression was downregulated with specific siRNAs, cells were pre-treated with saline, 1 or 10 µg/ml of gApN and then treated with LPS (0.5 µg/ml). By qRT-PCR and immunocytochemistry, we showed that siRNA-mediated AdipoR1 or AdipoR2 downregulation led to a very efficient and specific reduction of AdipoR1 or AdipoR2 mRNA and protein expression with only minimal compensatory expression of the other receptor (Figure 7C).

qRT-PCR analyzes of pro-inflammatory cytokine mRNA expression showed that AdipoR1 downregulation blocked the inhibitory actions of gApN on LPS-induced IL-1 β , IL-6, and TNF α mRNA upregulation by microglia while AdipoR2 downregulation did not (**Figure 7D**). It is nonetheless noteworthy to remark that, in agreement with our previous results on microglia sorted out from AdipoR2^{-/-} mouse brains AdipoR2 downregulation in BV2 cells seemed to increase the microglial susceptibility toward LPS challenge, as it expressed more IL-1 β , IL-6, and TNF α mRNAs than that transfected with scrambled siRNAs (**Figure 7D**). Altogether, these findings suggested that AdipoR1 may mediate the anti-inflammatory properties of gApN on microglial sensitivity toward inflammatory challenges.

gApN Intracellular Signaling Cascade in Microglia Depends on AdipoR1 Expression

We next studied AdipoR1 and AdipoR2 involvements in gApN-dependent AMPK α phosphorylation and downstream intracellular molecular targets. By Western-blotting, we showed that AdipoR1 downregulation totally blocked the gApN-induced phosphorylation of AMPK α , while AdipoR2 downregulation did not change it (**Figure 8A**).

NF- κB signaling pathways are activated in response to extracellular stimuli, including LPS, leading to the induction



of various genes, including iNOS and COX-2, in microglia (Dang et al., 2014). Thus, we studied iNOS and COX2 immunoreactivities in BV2 cells transfected with scrambled, AdipoR1 or AdipoR2 siRNAs, and treated with LPS only or pre-treated with gApN (1 or 10µg/ml) before addition of LPS $(0.5 \mu g/ml)$ for 15 h. Results revealed that, as expected, LPS induced a great increase of both iNOS and COX2 expression in scrambled siRNA-transfected BV2 cells that was significantly reduced by the highest dose (10 µg/ml) of gApN (Figure 8B). GApN inhibitory effects were totally abolished in cells where AdipoR1 was downregulated whereas they remained significant in cells transfected with siRNA-targeted AdipoR2 (Figure 8B). In agreement with these results, LPSstimulated NO release was reduced by gApN in cells transfected with scrambled or AdipoR2-targeted siRNAs while it was not modified in cells transfected with AdipoR1-targeted siRNAs (Figure 8C).

We also investigated gApN effect on p65 NF- κ B nuclear translocation by immunocytochemistry in siRNA-transfected cells. As previously showed by Western-blotting of nuclear fractions (**Figure 6B**), analysis of immunocytochemistry images revealed that percentage of p65 positive nuclei was increased

by LPS treatment in scrambled-, AdipoR1 siRNA-, AdipoR2 siRNA- transfected cells. GApN pre-treatment before LPS administration partially blocked the percentage of p65 positive nuclei in scrambled- and AdipoR2 siRNA-transfected cells but not in AdipoR1 siRNA-transfected cells (**Figures 8D,E**). Globally, our findings indicated that gApN anti-inflammatory and anti-oxidant actions on microglia are mediated through an AdipoR1/AMPK/NF- κ B dependent signaling pathway (**Figure 9**).

AdipoRon Treatment Fails to Exert Anti-Inflammatory Effects on Mouse Brain and BV2 Cells

Next, we tested whether an AdipoR agonist, AdipoRon, could also exert anti-inflammatory effects on brain and microglia. Wt mice were chronically treated with vehicle or 1 mg/kg AdipoRon for 15 consecutive days and then administered with a single i.p. injection of saline or LPS (**Table 1**). As expected, LPS injection induced a significant increase in IL-1 β , IL-6, and TNF α protein levels in prefrontal cortex, hippocampus and hypothalamus but AdipoRon chronic pre-treatment failed to



prevent these pro-inflammatory effects (**Table 1**), although it crosses blood-brain barrier (unpublished observations).

We also examined whether AdipoRon could exert direct antiinflammatory actions on BV2 cells (**Figure 10**). AdipoRon pretreatment (10^{-6} M) did not statistically modify IL-1 β , IL-6, and TNF α mRNA expression levels in LPS-treated BV2 cells as compared to vehicle pre-treatment, whatever the incubation period considered (**Figure 10**). Dose-response experiments were also performed but none of the concentrations tested limited the LPS-induced pro-inflammatory cytokines mRNA levels increase (data not shown).

DISCUSSION

In the present study, we show that ApN deficiency results in higher susceptibility of the brain toward an inflammatory challenge elicited by LPS. This exacerbated sensitivity is due to microglia increased responsiveness. Also, we have identified the presence of both ApN receptors (AdipoR1 and AdipoR2) on microglia. On different *in vivo* and cultured models of microglia (brain-sorted *ex vivo* cultured microglia, primary cultured microglia, and BV2 cell line), we demonstrate that gApN has direct anti-inflammatory actions on microglia that limit LPS-induced IL-1 β , IL-6, and TNF α release. GApN properties are effective preventively, by blocking the activation of microglia by LPS, or *a posteriori*, by limiting the production of proinflammatory cytokines by LPS-activated microglia. According to our results, gApN would limit the M1 activation state of microglia without promoting the expression of M2 markers, such as Arginase 1 or IL-10. These effects on microglia differ from those describing that, in periphery, ApN promotes macrophage polarization toward an anti-inflammatory M2 phenotype both *in vivo* and in cultured macrophages (Ohashi et al., 2010; Mandal et al., 2011). However, it has been shown that the M2-promoting effects of ApN would be mediated in an AdipoR2-dependent manner (Mandal et al., 2011). Here, we show that the anti-inflammatory effects of gApN on microglia are mediated by AdipoR1, which could explain the difference.

Anti-inflammatory properties of gApN cannot be generalized to all brain cell types. Indeed, in a previous study, Wan et al. showed that gApN exerts rather pro-inflammatory effects on human astrocytic cells by inducing IL-6 and MCP-1 secretion and gene expression of IL-6, MCP-1, IL-1 β , and IL-8 (Wan et al., 2014). In agreement with this, our results show that gApN increases LPS-induced IL-1 β and TNF α gene expression by mouse astrocytes. Noteworthy, gApN still has overall antiinflammatory effects on mixed primary cultures of microglia and astrocytes, indicating that the anti-inflammatory actions



FIGURE 7 Globular adiponectin anti-inflammatory properties on microglia depend on AdipoR1 expression. (A) Schematic representation of the protocol. Wt, $ApN^{-/-}$ and $AdipoR2^{-/-}$ mice were ip administered with LPS and microglia was sorted out from mouse brains and cultured in absence or presence of gApN for 15 h as described in the Materials and Methods section. (B) Levels of IL-1 β , IL-6, and TNF α proteins released by *in vivo* LPS-activated and *in vitro* saline (white, black, and striped bars) or gApN-treated (dark gray, light gray, and double striped bars) microglia were quantified by MSD. N = 4-5 per group; Mann & Whitney for comparison between groups, *p < 0.05. (C) BV2 cells were transfected with scrambled (white bars), AdipoR1 (black bars), or AdipoR2 (gray bars) specific siRNAs as described in the Materials and Methods section. Forty-eight hours after transfection, AdipoR1 and AdipoR2 expression downregulation was verified by qRT-PCR (histograms) and immunocytochemistry (photographs). Photographs show representative images of BV2 cells transfected with scrambled (left panels), AdipoR1 (middle panels), or AdipoR2 (right panels) specific siRNAs labeled with AdipoR1 (green fluorescence, upper panels) or AdipoR2 antibodies (green fluorescence, lower panels). Nuclei are stained with Hoechst blue fluorescent dye. (D) BV2 cells were transfected with scrambled, AdipoR1 or AdipoR2 specific siRNAs, and then pre-treated with saline (black bars) or gApN (gray bars) for 1 h before addition of LPS. Levels of IL-1 β , IL-6, and TNF α mRNAs were quantified by qRT-PCR. N = 4 pergroup, ns, non-significant; Kruskal–Wallis test followed by the Iman-Conover method for multiple comparison between groups was performed, *p < 0.05; **p < 0.01.



FIGURE 8 | AMPK phosphorylation, anti-oxidative and anti-nitrosative properties of globular adiponectin on microglia depend on AdipoR1 expression. BV2 cells were transfected with scrambled, AdipoR1 or AdipoR2 specific siRNAs as described in the Materials and Methods section. Forty-eight hours after transfection, cells were pre-treated with saline or gApN 1 h before addition of LPS for 15 h. **(A,B)** Representative western-blot analysis of LPS, gApN, and gApN+LPS treatment on AMPK phosphorylation on Thr172 **(A)**, iNOS **(B**, upper panel) and COX-2 **(B**, lower panel) immunoreactivities in BV2 cells transfected with scrambled (left panels), AdipoR1 (middle panels), or AdipoR2 (right panels) specific siRNAs. Actin immunoreactivity is used as a loading control. **(B)** Histograms show western-blot quantification of iNOS (upper histograms) and COX-2 (lower histograms) immunoreactivity is used as a loading control. **(B)** Histograms show western-blot quantification of iNOS (upper histograms) and COX-2 (lower histograms) immunoreactivity is used as a loading control. **(B)** Histograms show western-blot quantification of iNOS (upper histograms) and COX-2 (lower histograms) immunoreactivities in siRNA transfected BV2 cells pre-treated with saline (white and black bars) or gApN (gray bars). **(C)** Nitric oxide (NO) release was quantified in medium of siRNA transfected BV2 cells pre-treated with saline (white and black bars) or gApN (gray bars) before addition of saline (white bars) or LPS (black and gray bars). **(C)** Nitric oxide (NO) release was quantified in medium of siRNA transfected BV2 cells pre-treated with saline conver method for multiple comparison between groups was performed, *p < 0.05, **p < 0.01, **p < 0.001, **p < 0.005, **(D)** Representative photomicrographs of p65 NF-kB subunit immunoreactivity (green fluorescence) in BV2 transfected with scanabled (upper panels), AdipoR1 (middle panels), or AdipoR2 (lower panels) siRNAs pre-treated with saline or gApN before addition of LPS. Nuclei are stained with Ho



of gApN on microglia are predominant compared to the pro-inflammatory ones on astrocytes. This is also true when examining the in vivo global effects of gApN on diverse brain regions such as hippocampus, hypothalamus or amygdala (Figure 1). The role of microglia and astrocyte crosstalk in neuroinflammation is poorly understood. However, we can speculate that when both are present and interact, microglia may be able to modulate astrocytic activation. This hypothesis is supported by a recent study showing that metal manganese induces an inflammatory phenotype in microglia that is essential for the subsequent activation of astrocytes (Kirkley et al., 2017). Moreover, these opposite effects of gApN on astrocytes and microglia comfort us to exclude the possibility that the antiinflammatory actions of gApN may result from its ability to bind LPS, as suggested previously (Peake et al., 2006). Indeed, Peake et al. demonstrated that both recombinant and native ApN directly bind LPS and may act as a scavenging anti-inflammatory agent (Peake et al., 2006). In such a case, anti-inflammatory effects of gApN treatment would be expected on both astrocytes and microglia.

AMPKα is a signaling kinase involved in a critical energy-sensing pathway with important functions in stimulating glucose uptake. Our present study demonstrates that AMPKα phosphorylation is down-regulated by LPS and up-regulated by gApN in BV2 microglia cells. It is known that pharmacological activation of AMPKα by 5-aminoimidazole-4-carboxamide- $1-\beta$ -d-ribofuranoside (AICAR) inhibits iNOS induction in macrophages and microglia exposed to LPS (Kuo et al., 2008). Gene-silencing experiments confirmed that AMPK-activating agents blunt iNOS-mediated NO production, at least in part, via activation of AMPKα (Pilon et al., 2004). Therefore, although we did not formally demonstrate it in this present study, we can hypothesize that gApN regulates iNOS expression and NO production through AMPKα activation in microglia.

Reactive oxygen species (ROS) are crucial regulators of microglial inflammatory function since they act as secondary messengers capable of modifying pro-inflammatory gene expression through effects on kinase cascades and activation

og/mg of protein		≟	-1β			-	-9			TN	Fα	
AdipoRon	1	+	I	+	I	+	I	+	I	+	I	+
PS	I	I	I	I	+	+	+	+	I	I	+	+
Prefrontal cortex	0.4 ± 0.04	0.4 ± 0.06	1.6 ± 0.2	2.1 ± 0.1	8.8 ± 2.1	8.1 ± 1.0	1.4 ± 0.2	1.55 ± 0.2	0.05 ± 0.01	0.07 ± 0.03	0.4 ± 0.05	0.5 ± 0.05
Hypothalamus	0.7 ± 0.2	0.7 ± 0.3	2.6 ± 0.7	2.9 ± 0.8	11.8 ± 2.2	14.3 土 3.5	1.5 ± 0.2	1.8 ± 0.5	0.16 ± 0.09	0.3 ± 0.1	0.47 ± 0.1	0.65 ± 0.08
Hippocampus	0.3 ± 0.03	0.3 ± 0.04	1.7 ± 0.3	2.4 ± 0.2	9.2 ± 1.5	9.9 ± 1.7	1.2 ± 0.1	1.9 ± 0.4	0.03 ± 0.01	0.03 ± 0.02	0.55 ± 0.08	0.6 ± 0.04
Nt mice (10 weeks of Twenty-four hours late	ld) were daily i.p. injec er, mice received a lasi	ted with vehicle (2 st injection of Adipo	2.5% DMSO solu oRon and were s	ution) or AdipoRo sacrificed. Brains	were dissected a	% DMSO solution nd pro-inflammato) during 15 cons pry cytokines we	ecutive days. On the measured by A	day 15, mice receive ASD in different brair	ed a single i.p. injec regions. Data repr	tion of saline or LF esent means ± ser	S (0.8mg/kg). m, n = 5 mice
ur LFS treated group vas significant in all c	onsidered brain region	14 11 = 0 101 LF3 -	ד אמוףטהטוו וופמו	rea group. A two	- ואמץ אואטעא גטוו.	המוווח ווום פוופרו ו	n III IINUNNINK II	וווופמופח מווח וופמ	ian rua ginnha sinn	wed ווט אטווווכמו וי וו	וופומכיוחו או ווופ יו וב	



of transcription factors, including MAPK and NF-kB (Torres and Forman, 2003; Pawate et al., 2004; Kim et al., 2008). One potential source of ROS production is NADPH oxidase in the plasma membrane and mitochondria (Collins et al., 2012). ROS generated from NADPH oxidase are involved in the signaling events leading to microglia activation (Cheret et al., 2008). Conversely, inhibition of NADPH oxidase prevents NF-kB-dependent iNOS expression and NO production in LPS-stimulated macrophages (Kim et al., 2009). Therefore, it is likely that neutralization of mitochondrial ROS can alleviate inflammation (Voloboueva et al., 2013). Here, we show that gApN limits LPS-induced ROS production and NF-KB p65 nuclear translocation. This would lead to a reduction of oxidative stress-related iNOS and COX-2 enzymes induction, thereby limiting NO and subsequent pro-inflammatory cytokine release production in BV2 cells. This is consistent with the previous observation made in vascular endothelial cells showing that HMW ApN activates AMPK and suppresses cytokine-induced NF-KB activation (Hattori et al., 2008). Interestingly, if the inhibitory actions of gApN on oxidative stress have already been described in different cell models such as human hepatic cells (Shrestha and Park, 2016) or macrophages (Kim et al., 2014), its effects on nitrosative stress are more controversial and seem to be highly dependent on the cell type. For example, gApN has been shown to induce NO production in vascular endothelial cells (Cheng et al., 2007; Dong et al., 2015). However, in advential fibroblasts, it reduces LPS-induced NO production by inhibiting AdipoR1/AMPK/iNOS pathway (Cai et al., 2010), which is a signaling pathway similar to the one we describe in the present manuscript. Indeed, our results show that the effects of gApN on microglia may be mediated by AdipoR1, since its anti-inflammatory and anti-nitrosative properties are abrogated by siRNA-targeted AdipoR1 downregulation in BV2 cells and that AdipoR2^{-/-} brain-sorted microglia are still sensitive to gApN anti-inflammatory effects. Nevertheless, we cannot formally exclude the involvement of AdipoR2 in the effects of ApN on microglia. First, our results suggest that siRNA-targeted AdipoR2 downregulation modifies microglia intrinsic characteristics. Indeed, it increases the LPS-induced production of pro-inflammatory cytokines IL-1β, IL-6, and TNFα and decreases LPS-induced iNOS expression. This indicates that AdipoR2 expression level somehow regulates microglia responsiveness toward an inflammatory challenge but does not mediate gApN effects on microglia. It is noteworthy that most of our experiments were conducted to study the effect of the globular form of ApN. GApN has been proposed to be generated from full-length by proteolytic cleavage by leukocyte elastase, secreted from activated monocytes and/or neutrophils (Waki et al., 2005). The AdipoRs display differential binding affinities for the various ApN multimers. While AdipoR1 binds to gApN with high affinity, AdipoR2 has an intermediate binding affinity for both gApN and full-length ApN (FL-ApN) (Yamauchi et al., 2003). The biological activities of FL-ApN and gApN do not necessarily overlap since it has been shown, for example, that gApN but not FL-ApN induces increased procoagulability in human endothelial cells (Bobbert et al., 2008). Although we did not perform all the experiments presented here with FL-ApN to compare its actions with those of gApN, we obtained results showing that FL-ApN also significantly prevented LPS-induced microglia activation when injected intracerebroventricularly (Figures S1A,B). In scrambled siRNA-transfected BV2 cells, FL-ApN also limited LPS-induced increases of IL-1β, IL-6, and TNFa mRNAs. Interestingly, this effect was still present in cells transfected with siRNA-targeted AdipoR2, whereas it was abolished in cells transfected with siRNA-targeted AdipoR1 (Figure S1C). This suggests that anti-inflammatory actions of ApN on microglia are not limited to its globular form and that FL-ApN effects on microglia are probably also dependent on AdipoR1 expression. Intriguingly, our results show that AdipoRon, an AdipoR agonist that binds to both AdipoR1 and AdipoR2 with comparable high affinities (Okada-Iwabu et al., 2013), neither prevents LPS-induced neuroinflammation when preventively chronically administered to mice nor blocks LPS-induced BV2 pro-inflammatory activation. One possible explanation might lie in the fact that in cells expressing comparable levels of both AdipoR1 and AdipoR2 (such as microglia and BV2 cells), agonist binding-induced intracellular signaling pathways may lead to opposite effects which mask the AdipoR1-dependent anti-inflammatory effects. Additional experiments would be necessary to address this question.

In previous studies we have shown that favorable living conditions such as those mimicked by EE could favor the passage of the LMW forms of ApN from the blood to the CSF where they influence microglia activation state thereby limiting neuroinflammation (Chabry et al., 2015). We have shown that ApN-mediated decrease in neuroinflammation efficiently limited anxio-depressive-like behavior in mice (Nicolas et al., 2015). It has been previously shown that ApN has beneficial effects on brain ischemic injury through an endothelial NO synthase-dependent mechanism. Indeed, ApN-KO mice have more serious damage than WT mice after ischemia-reperfusion as illustrated by enlarged brain infarction and increased neurological deficits. Conversely, administration of full-length ApN through adenovirus significantly reduced cerebral infarct size in WT and ApN-KO mice (Nishimura et al., 2008). More generally, anti-inflammatory actions of ApN in CNS could constitute a means of combating various mental disorders and brain diseases associated with deleterious chronic inflammation or exacerbated inflammatory response, such as depression, anxiety, schizophrenia, stroke, multiple sclerosis, Parkinson's disease, and Alzheimer's disease.

CONCLUSIONS

Together, our results provide the first direct evidence demonstrating that gApN acts against neuroinflammation by an AdipoR1-AMPK-NF- κ B pathway, as illustrated by the inhibition of LPS-mediated pro-inflammatory cytokine, NO and ROS production in microglia (**Figure 9**).

AVAILABILITY OF DATA AND MATERIALS

The datasets used and/or analyzed during the current study are available from the corresponding author on reasonable request.

REFERENCES

- Arita, Y., Kihara, S., Ouchi, N., Takahashi, M., Maeda, K., Miyagawa, J., et al. (1999). Paradoxical decrease of an adipose-specific protein, adiponectin, in obesity. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 257, 79–83. doi: 10.1006/bbrc.1999.0255
- Berg, A. H., Combs, T. P., Du, X., Brownlee, M., and Scherer, P. E. (2001). The adipocyte-secreted protein Acrp30 enhances hepatic insulin action. *Nat. Med.* 7, 947–953. doi: 10.1038/90992
- Block, M. L., and Hong, J. S. (2005). Microglia and inflammation-mediated neurodegeneration: multiple triggers with a common mechanism. *Prog. Neurobiol.* 76, 77–98. doi: 10.1016/j.pneurobio.2005.06.004
- Bobbert, P., Antoniak, S., Schultheiss, H. P., and Rauch, U. (2008). Globular adiponectin but not full-length adiponectin induces increased procoagulability in human endothelial cells. J. Mol. Cell. Cardiol. 44, 388–394. doi: 10.1016/j.yjmcc.2007.10.018
- Cai, X. J., Chen, L., Li, L., Feng, M., Li, X., Zhang, K., et al. (2010). Adiponectin inhibits lipopolysaccharide-induced adventitial fibroblast migration and transition to myofibroblasts via AdipoR1-AMPK-iNOS pathway. *Mol. Endocrinol.* 24, 218–228. doi: 10.1210/me.2009-0128

AUTHOR CONTRIBUTIONS

SN, HZ, and AP-P performed experiments. JCa carried out the flow cytometry, cell sorting, and cytometric bead array experiments. AP-P coordinated the study, analyzed the data, and drafted the manuscript with the assistance of JCh and AG. CH provided helpful advice and fruitful discussion. All authors have read and approved the final version of the manuscript.

FUNDING

Fundings were from the Centre National de la Recherche Scientifique and Fondation de l'Avenir.

ACKNOWLEDGMENTS

We wish to thank Lucien Relmy for animal care. We are very grateful to Dr. Véronique Imbert for generously providing us oligonucleotides for I κ -B α mRNA analysis. We also wish to thank Mélanie Guyot, Carine Gandin, and Catherine Widmann for technical assistance.

SUPPLEMENTARY MATERIAL

The Supplementary Material for this article can be found online at: https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fncel. 2017.00352/full#supplementary-material

Figure S1 | Full-length adiponectin limits LPS-induced pro-inflammatory activation of microglia. (A) Schematic representation of the protocol. Wt mice first received i.c.v injection of saline or FL-ApN then LPS ip administration. (B) Levels of IL-1 β , IL-6, and TNF α mRNAs were quantified qRT-PCR, from microglia sorted from brains of saline (white bars) or FL-ApN (black bars) i.c.v injected mice. N = 3 per group; Mann & Whitney for comparison between groups, *p < 0.05. (C) BV2 cells were transfected with scrambled, AdipoR1 or AdipoR2 specific siRNAs as described in the Materials and Methods section. Forty-eight hours after transfection, cells were pre-treated with saline or FL-ApN 1 h before addition of LPS for 15 additional hours. Levels of IL-1 β , IL-6, and TNF α mRNAs were quantified by qRT-PCR. N = 3 per group, s, Mann & Whitney for comparison between groups, *p < 0.05.

- Cardona, A. E., Huang, D., Sasse, M. E., and Ransohoff, R. M. (2006). Isolation of murine microglial cells for RNA analysis or flow cytometry. *Nat. Protoc.* 1, 1947–1951. doi: 10.1038/nprot.2006.327
- Cazareth, J., Guyon, A., Heurteaux, C., Chabry, J., and Petit-Paitel, A. (2014). Molecular and cellular neuroinflammatory status of mouse brain after systemic lipopolysaccharide challenge: importance of CCR2/CCL2 signaling. *J. Neuroinflammation* 11:132. doi: 10.1186/1742-2094-11-132
- Chabry, J., Nicolas, S., Cazareth, J., Murris, E., Guyon, A., Glaichenhaus, N., et al. (2015). Enriched environment decreases microglia and brain macrophages inflammatory phenotypes through adiponectin-dependent mechanisms: relevance to depressive-like behavior. *Brain Behav. Immun.* 50, 275–287. doi: 10.1016/j.bbi.2015.07.018
- Cheng, K. K., Lam, K. S., Wang, Y., Huang, Y., Carling, D., Wu, D., et al. (2007). Adiponectin-induced endothelial nitric oxide synthase activation and nitric oxide production are mediated by APPL1 in endothelial cells. *Diabetes* 56, 1387–1394. doi: 10.2337/db06-1580
- Cheret, C., Gervais, A., Lelli, A., Colin, C., Amar, L., Ravassard, P., et al. (2008). Neurotoxic activation of microglia is promoted by a nox1-dependent NADPH oxidase. *J. Neurosci.* 28, 12039–12051. doi: 10.1523/JNEUROSCI.3568-08.2008

- Chinetti, G., Zawadski, C., Fruchart, J. C., and Staels, B. (2004). Expression of adiponectin receptors in human macrophages and regulation by agonists of the nuclear receptors PPARalpha, PPARgamma, and LXR. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 314, 151–158. doi: 10.1016/j.bbrc.2003.12.058
- Collins, Y., Chouchani, E. T., James, A. M., Menger, K. E., Cocheme, H. M., and Murphy, M. P. (2012). Mitochondrial redox signalling at a glance. J. Cell Sci. 125, 801–806. doi: 10.1242/jcs.098475
- Dang, Y., Xu, Y., Wu, W., Li, W., Sun, Y., Yang, J., et al. (2014). Tetrandrine suppresses lipopolysaccharide-induced microglial activation by inhibiting NFkappaB and ERK signaling pathways in BV2 cells. *PLoS ONE* 9:e102522. doi: 10.1371/journal.pone.0102522
- Dantzer, R., O'Connor, J. C., Freund, G. G., Johnson, R. W., and Kelley, K. W. (2008). From inflammation to sickness and depression: when the immune system subjugates the brain. *Nat. Rev. Neurosci.* 9, 46–56. doi: 10.1038/nrn2297
- Dong, Z., Su, L., Esmaili, S., Iseli, T. J., Ramezani-Moghadam, M., Hu, L., et al. (2015). Adiponectin attenuates liver fibrosis by inducing nitric oxide production of hepatic stellate cells. *J. Mol. Med.* 93, 1327–1339. doi: 10.1007/s00109-015-1313-z
- Ebinuma, H., Miida, T., Yamauchi, T., Hada, Y., Hara, K., Kubota, N., et al. (2007). Improved ELISA for selective measurement of adiponectin multimers and identification of adiponectin in human cerebrospinal fluid. *Clin. Chem.* 53, 1541–1544. doi: 10.1373/clinchem.2007.085654
- Frank-Cannon, T. C., Alto, L. T., McAlpine, F. E., and Tansey, M. G. (2009). Does neuroinflammation fan the flame in neurodegenerative diseases? *Mol. Neurodegener.* 4:47. doi: 10.1186/1750-1326-4-47
- Fruebis, J., Tsao, T. S., Javorschi, S., Ebbets-Reed, D., Erickson, M. R., Yen, F. T., et al. (2001). Proteolytic cleavage product of 30-kDa adipocyte complementrelated protein increases fatty acid oxidation in muscle and causes weight loss in mice. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 98, 2005–2010. doi: 10.1073/pnas.98.4.2005
- Gil-Campos, M., Canete, R. R., and Gil, A. (2004). Adiponectin, the missing link in insulin resistance and obesity. *Clin. Nutr.* 23, 963–974. doi: 10.1016/j.clnu.2004.04.010
- Guillod-Maximin, E., Roy, A. F., Vacher, C. M., Aubourg, A., Bailleux, V., Lorsignol, A., et al. (2009). Adiponectin receptors are expressed in hypothalamus and colocalized with proopiomelanocortin and neuropeptide Y in rodent arcuate neurons. *J. Endocrinol.* 200, 93–105. doi: 10.1677/JOE-08-0348
- Hara, K., Horikoshi, M., Yamauchi, T., Yago, H., Miyazaki, O., Ebinuma, H., et al. (2006). Measurement of the high-molecular weight form of adiponectin in plasma is useful for the prediction of insulin resistance and metabolic syndrome. *Diabetes Care* 29, 1357–1362. doi: 10.2337/dc05-1801
- Hattori, Y., Nakano, Y., Hattori, S., Tomizawa, A., Inukai, K., and Kasai, K. (2008). High molecular weight adiponectin activates AMPK and suppresses cytokineinduced NF-kappaB activation in vascular endothelial cells. *FEBS Lett.* 582, 1719–1724. doi: 10.1016/j.febslet.2008.04.037
- Hoffstedt, J., Arvidsson, E., Sjolin, E., Wahlen, K., and Arner, P. (2004). Adipose tissue adiponectin production and adiponectin serum concentration in human obesity and insulin resistance. J. Clin. Endocrinol. Metab. 89, 1391–1396. doi: 10.1210/jc.2003-031458
- Hotta, K., Funahashi, T., Arita, Y., Takahashi, M., Matsuda, M., Okamoto, Y., et al. (2000). Plasma concentrations of a novel, adipose-specific protein, adiponectin, in type 2 diabetic patients. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* 20, 1595–1599. doi: 10.1161/01.ATV.20.6.1595
- Hui, X., Gu, P., Zhang, J., Nie, T., Pan, Y., Wu, D., et al. (2015). Adiponectin enhances cold-induced browning of subcutaneous adipose tissue via promoting M2 macrophage proliferation. *Cell Metab.* 22, 279–290. doi: 10.1016/j.cmet.2015.06.004
- Jeon, B. T., Shin, H. J., Kim, J. B., Kim, Y. K., Lee, D. H., Kim, K. H., et al. (2009). Adiponectin protects hippocampal neurons against kainic acid-induced excitotoxicity. *Brain Res. Rev.* 61, 81–88. doi: 10.1016/j.brainresrev.2009.05.002
- Kadowaki, T., and Yamauchi, T. (2005). Adiponectin and adiponectin receptors. Endocr. Rev. 26, 439–451. doi: 10.1210/er.2005-0005
- Kern, P. A., Di Gregorio, G. B., Lu, T., Rassouli, N., and Ranganathan, G. (2003). Adiponectin expression from human adipose tissue: relation to obesity, insulin resistance, and tumor necrosis factor-alpha expression. *Diabetes* 52, 1779–1785. doi: 10.2337/diabetes.52.7.1779
- Kim, J. H., Lee, G., Cho, Y. L., Kim, C. K., Han, S., Lee, H., et al. (2009). Desmethylanhydroicaritin inhibits NF-kappaB-regulated inflammatory gene

expression by modulating the redox-sensitive PI3K/PTEN/Akt pathway. *Eur. J. Pharmacol.* 602, 422–431. doi: 10.1016/j.ejphar.2008.10.062

- Kim, J. H., Na, H. J., Kim, C. K., Kim, J. Y., Ha, K. S., Lee, H., et al. (2008). The non-provitamin A carotenoid, lutein, inhibits NF-kappaB-dependent gene expression through redox-based regulation of the phosphatidylinositol 3-kinase/PTEN/Akt and NF-kappaB-inducing kinase pathways: role of H(2)O(2) in NF-kappaB activation. *Free Radic. Biol. Med.* 45, 885–896. doi: 10.1016/j.freeradbiomed.2008.06.019
- Kim, M. J., Nagy, L. E., and Park, P. H. (2014). Globular adiponectin inhibits ethanol-induced reactive oxygen species production through modulation of NADPH oxidase in macrophages: involvement of liver kinase B1/AMP-activated protein kinase pathway. *Mol. Pharmacol.* 86, 284–296. doi: 10.1124/mol.114.093039
- Kirkley, K. S., Popichak, K. A., Afzali, M. F., Legare, M. E., and Tjalkens, R. B. (2017). Microglia amplify inflammatory activation of astrocytes in manganese neurotoxicity. J. Neuroinflammation 14:99. doi: 10.1186/s12974-017-0871-0
- Kubota, N., Yano, W., Kubota, T., Yamauchi, T., Itoh, S., Kumagai, H., et al. (2007). Adiponectin stimulates AMP-activated protein kinase in the hypothalamus and increases food intake. *Cell Metab.* 6, 55–68. doi: 10.1016/j.cmet.2007.06.003
- Kuo, C. L., Ho, F. M., Chang, M. Y., Prakash, E., and Lin, W. W. (2008). Inhibition of lipopolysaccharide-induced inducible nitric oxide synthase and cyclooxygenase-2 gene expression by 5-aminoimidazole-4-carboxamide riboside is independent of AMP-activated protein kinase. J. Cell. Biochem. 103, 931–940. doi: 10.1002/jcb.21466
- Kusminski, C. M., McTernan, P. G., Schraw, T., Kos, K., O'Hare, J. P., Ahima, R., et al. (2007). Adiponectin complexes in human cerebrospinal fluid: distinct complex distribution from serum. *Diabetologia* 50, 634–642. doi: 10.1007/s00125-006-0577-9
- Liu, J., Guo, M., Zhang, D., Cheng, S. Y., Liu, M., Ding, J., et al. (2012). Adiponectin is critical in determining susceptibility to depressive behaviors and has antidepressant-like activity. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 109, 12248–12253. doi: 10.1073/pnas.1202835109
- Maeda, K., Okubo, K., Shimomura, I., Funahashi, T., Matsuzawa, Y., and Matsubara, K. (1996). cDNA cloning and expression of a novel adipose specific collagen-like factor, apM1 (AdiPose Most abundant Gene transcript 1). *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 221, 286–289. doi: 10.1006/bbrc.1996.0587
- Maeda, N., Shimomura, I., Kishida, K., Nishizawa, H., Matsuda, M., Nagaretani, H., et al. (2002). Diet-induced insulin resistance in mice lacking adiponectin/ACRP30. *Nat. Med.* 8, 731–737. doi: 10.1038/nm724
- Mandal, P., Pratt, B. T., Barnes, M., McMullen, M. R., and Nagy, L. E. (2011). Molecular mechanism for adiponectin-dependent M2 macrophage polarization: link between the metabolic and innate immune activity of full-length adiponectin. *J. Biol. Chem.* 286, 13460–13469. doi: 10.1074/jbc.M110.204644
- Marella, M., and Chabry, J. (2004). Neurons and astrocytes respond to prion infection by inducing microglia recruitment. J. Neurosci. 24, 620–627. doi: 10.1523/JNEUROSCI.4303-03.2004
- Matsuzawa, Y. (2005). Adiponectin: identification, physiology and clinical relevance in metabolic and vascular disease. *Atheroscler. Suppl.* 6, 7–14. doi: 10.1016/j.atherosclerosissup.2005.02.003
- Minghetti, L., and Levi, G. (1998). Microglia as effector cells in brain damage and repair: focus on prostanoids and nitric oxide. *Prog. Neurobiol.* 54, 99–125. doi: 10.1016/S0301-0082(97)00052-X
- Nicolas, S., Veyssiere, J., Gandin, C., Zsurger, N., Pietri, M., Heurteaux, C., et al. (2015). Neurogenesis-independent antidepressant-like effects of enriched environment is dependent on adiponectin. *Psychoneuroendocrinology* 57, 72–83. doi: 10.1016/j.psyneuen.2015.03.017
- Nishimura, M., Izumiya, Y., Higuchi, A., Shibata, R., Qiu, J., Kudo, C., et al. (2008). Adiponectin prevents cerebral ischemic injury through endothelial nitric oxide synthase dependent mechanisms. *Circulation* 117, 216–223. doi: 10.1161/CIRCULATIONAHA.107.725044
- Ohashi, K., Parker, J. L., Ouchi, N., Higuchi, A., Vita, J. A., Gokce, N., et al. (2010). Adiponectin promotes macrophage polarization toward an antiinflammatory phenotype. *J. Biol. Chem.* 285, 6153–6160. doi: 10.1074/jbc.M109. 088708
- Okada-Iwabu, M., Yamauchi, T., Iwabu, M., Honma, T., Hamagami, K., Matsuda, K., et al. (2013). A small-molecule AdipoR agonist for type 2 diabetes and short life in obesity. *Nature* 503, 493–499. doi: 10.1038/nature12656

- Pajvani, U. B., and Scherer, P. E. (2003). Adiponectin: systemic contributor to insulin sensitivity. *Curr. Diab. Rep.* 3, 207–213. doi: 10.1007/s11892-003-0065-2
- Pawate, S., Shen, Q., Fan, F., and Bhat, N. R. (2004). Redox regulation of glial inflammatory response to lipopolysaccharide and interferongamma. J. Neurosci. Res. 77, 540–551. doi: 10.1002/jnr.20180
- Peake, P. W., Shen, Y., Campbell, L. V., and Charlesworth, J. A. (2006). Human adiponectin binds to bacterial lipopolysaccharide. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 341, 108–115. doi: 10.1016/j.bbrc.2005.12.162
- Pilon, G., Dallaire, P., and Marette, A. (2004). Inhibition of inducible nitric-oxide synthase by activators of AMP-activated protein kinase: a new mechanism of action of insulin-sensitizing drugs. *J. Biol. Chem.* 279, 20767–20774. doi: 10.1074/jbc.M401390200
- Rivest, S. (2009). Regulation of innate immune responses in the brain. *Nat. Rev. Immunol.* 9, 429–439. doi: 10.1038/nri2565
- Salminen, A., Hyttinen, J. M., and Kaarniranta, K. (2011). AMP-activated protein kinase inhibits NF-kappaB signaling and inflammation: impact on healthspan and lifespan. J. Mol. Med. 89, 667–676. doi: 10.1007/s00109-011-0748-0
- Scherer, P. E., Williams, S., Fogliano, M., Baldini, G., and Lodish, H. F. (1995). A novel serum protein similar to C1q, produced exclusively in adipocytes. J. Biol. Chem. 270, 26746–26749. doi: 10.1074/jbc.270.45.26746
- Shrestha, A., and Park, P. H. (2016). Globular adiponectin attenuates LPS-induced reactive oxygen species production in HepG2 cells via FoxO3A and HO-1 signaling. *Life Sci.* 148, 71–79. doi: 10.1016/j.lfs.2016.02.001
- Tomas, E., Tsao, T. S., Saha, A. K., Murrey, H. E., Zhang Cc, C., Itani, S. I., et al. (2002). Enhanced muscle fat oxidation and glucose transport by ACRP30 globular domain: acetyl-CoA carboxylase inhibition and AMP-activated protein kinase activation. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 99, 16309–16313. doi: 10.1073/pnas.222657499
- Torres, M., and Forman, H. J. (2003). Redox signaling and the MAP kinase pathways. *Biofactors* 17, 287–296. doi: 10.1002/biof.5520170128
- Tsao, T. S., Tomas, E., Murrey, H. E., Hug, C., Lee, D. H., Ruderman, N. B., et al. (2003). Role of disulfide bonds in Acrp30/adiponectin structure and signaling specificity. Different oligomers activate different signal transduction pathways. *J. Biol. Chem.* 278, 50810–50817. doi: 10.1074/jbc.M309469200
- Voloboueva, L. A., Emery, J. F., Sun, X., and Giffard, R. G. (2013). Inflammatory response of microglial BV-2 cells includes a glycolytic shift and is modulated by mitochondrial glucose-regulated protein 75/mortalin. *FEBS Lett.* 587, 756–762. doi: 10.1016/j.febslet.2013.01.067
- Waki, H., Yamauchi, T., Kamon, J., Kita, S., Ito, Y., Hada, Y., et al. (2005). Generation of globular fragment of adiponectin by leukocyte elastase secreted by monocytic cell line THP-1. *Endocrinology* 146, 790–796. doi: 10.1210/en.2004-1096
- Wan, Z., Mah, D., Simtchouk, S., Klegeris, A., and Little, J. P. (2014). Globular adiponectin induces a pro-inflammatory response in human astrocytic cells. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 446, 37–42. doi: 10.1016/j.bbrc.2014.02.077
- Weyer, C., Funahashi, T., Tanaka, S., Hotta, K., Matsuzawa, Y., Pratley, R. E., et al. (2001). Hypoadiponectinemia in obesity and type 2 diabetes: close association with insulin resistance and hyperinsulinemia. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 86, 1930–1935. doi: 10.1210/jcem.86.5.7463

- Xu, A., Wang, Y., Keshaw, H., Xu, L. Y., Lam, K. S., and Cooper, G. J. (2003). The fat-derived hormone adiponectin alleviates alcoholic and nonalcoholic fatty liver diseases in mice. J. Clin. Invest. 112, 91–100. doi: 10.1172/JCI200317797
- Yamaguchi, N., Argueta, J. G., Masuhiro, Y., Kagishita, M., Nonaka, K., Saito, T., et al. (2005). Adiponectin inhibits Toll-like receptor family-induced signaling. *FEBS Lett.* 579, 6821–6826. doi: 10.1016/j.febslet.2005.11.019
- Yamauchi, T., Iwabu, M., Okada-Iwabu, M., and Kadowaki, T. (2014). Adiponectin receptors: a review of their structure, function and how they work. *Best Pract. Res. Clin. Endocrinol. Metab.* 28, 15–23. doi: 10.1016/j.beem.2013.09.003
- Yamauchi, T., Kamon, J., Ito, Y., Tsuchida, A., Yokomizo, T., Kita, S., et al. (2003). Cloning of adiponectin receptors that mediate antidiabetic metabolic effects. *Nature* 423, 762–769. doi: 10.1038/nature01705
- Yamauchi, T., Kamon, J., Minokoshi, Y., Ito, Y., Waki, H., Uchida, S., et al. (2002). Adiponectin stimulates glucose utilization and fatty-acid oxidation by activating AMP-activated protein kinase. *Nat. Med.* 8, 1288–1295. doi: 10.1038/nm788
- Yamauchi, T., Nio, Y., Maki, T., Kobayashi, M., Takazawa, T., Iwabu, M., et al. (2007). Targeted disruption of AdipoR1 and AdipoR2 causes abrogation of adiponectin binding and metabolic actions. *Nat. Med.* 13, 332–339. doi: 10.1038/nm1557
- Yau, S. Y., Li, A., Hoo, R. L., Ching, Y. P., Christie, B. R., Lee, T. M., et al. (2014). Physical exercise-induced hippocampal neurogenesis and antidepressant effects are mediated by the adipocyte hormone adiponectin. *Proc. Natl. Acad. Sci.* U.S.A. 111, 15810–15815. doi: 10.1073/pnas.1415219111
- Zhang, D., Guo, M., Zhang, W., and Lu, X. Y. (2011). Adiponectin stimulates proliferation of adult hippocampal neural stem/progenitor cells through activation of p38 mitogen-activated protein kinase (p38MAPK)/glycogen synthase kinase 3beta (GSK-3beta)/beta-catenin signaling cascade. J. Biol. Chem. 286, 44913–44920. doi: 10.1074/jbc.M111.310052
- Zhang, D., Wang, X., and Lu, X. Y. (2016a). Adiponectin exerts neurotrophic effects on dendritic arborization, spinogenesis, and neurogenesis of the dentate gyrus of male mice. *Endocrinology* 157, 2853–2869. doi: 10.1210/en. 2015-2078
- Zhang, D., Wang, X., Wang, B., Garza, J. C., Fang, X., Wang, J., et al. (2016b). Adiponectin regulates contextual fear extinction and intrinsic excitability of dentate gyrus granule neurons through AdipoR2 receptors. *Mol. Psychiatry* 22, 1044–1055. doi: 10.1038/mp.2016.58

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

Copyright © 2017 Nicolas, Cazareth, Zarif, Guyon, Heurteaux, Chabry and Petit-Paitel. 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.

ARTICLE 4 - ADIPORON, AN ADIPONECTIN RECEPTOR AGONIST ACTS AS AN ANTIDEPRESSANT AND METABOLIC REGULATOR IN A MOUSE MODEL OF DEPRESSION

<u>Nicolas S</u>, Debayle D, Bechade C, Maroteaux L, Gay AS, Bayer P, Heurteaux C, Guyon A, Chabry J. Soumis à Translational Psychiatry

CONTEXTE

En utilisant une approche d'invalidation génique, nos travaux ont confirmé l'importance de l'ApN dans la résistance à la dépression et l'inflammation et par conséquences l'intérêt de cibler le système adiponergique dans le traitement des pathologies ayant une composante neuroinflammatoire et en particulier la dépression. Dans ce contexte, nous avons étudié le potentiel d'une stimulation pharmacologique de ce système avec un agoniste des récepteurs à l'ApN (AdipoRs), AdipoRon. L'AdipoRon est décrit pour avoir des effets similaires à l'ApN dans des modèles murins de pathologies du métabolisme comme le diabète et l'obésité. Ces pathologies étant associées au syndrome métabolique qui est également lié à la dépression, l'objectif de ce 4^{ème} article était d'étudier les effets de l'AdipoRon sur différentes caractéristiques de la dépression dont le comportement et les dérégulations biologiques observées aussi bien au niveau du SNC qu'en périphérie.

RESULTATS

L'administration chronique de corticostérone induit un phénotype dépressif mais également une prise de poids anormale chez les souris WT. Un traitement par l'AdipoRon en IP inhibe les effets de la CORT sur la prise de poids, la masse du tissu adipeux blanc épididymale et le volume des adipocytes (*Figure 1 A-E*). Les taux circulants de cholestérol et de triglycérides, qui sont augmentés par la CORT sont rétablis par le traitement à l'adipoRon contrairement aux taux d'ApN et de leptine circulantes qui restent augmentés par la CORT (*Figure 1 G, H*). Nous avons ensuite dosé par HPLC couplée à la spectrométrie de masse différentes molécules de la voie des kynurénines (5-HT, TRP, KYN et KYNA) dans le plasma. Nos résultats montrent que la CORT augmente la KYN au dépend du TRP et donc de la 5-HT et que l'AdipoRon est capable de rétablir l'équilibre entre ces métabolites (*Figure 1 J-K*).

En parallèle, nous avons montré l'intérêt d'un traitement chronique par l'AdipoRon contre la dépression induite dans le modèle CORT. L'adipoRon réverse de façon totale ou partielle les effets de la CORT (Figure 2). Cet effet antidépresseur de l'AdipoRon est associé à un effet antiinflammatoire que nous avons caractérisé par un dosage multiplex des quantités de cytokines au niveau de l'hippocampe, l'hypothalamus et du CPF. Dans ces 3 zones l'AdipoRon restaure les niveaux physiologiques des cytokines pro-inflammatoires qui sont surexprimées en réponse au traitement par la CORT (Figure 3, A). La voie des kynurénines étant activée par l'inflammation nous avons regardé l'expression des ARNm des enzymes IDO et KAT et de leurs différentes isoformes. L'augmentation de l'expression de certaines de ces isoformes par la CORT est inhibée par l'AdipoRon (Figure 3, B). Par ailleurs, en dosant la 5-HT et son métabolite le 5-HIAA au niveau du noyau raphé dorsal, nous avons montré que le taux de 5-HT n'est pas modifié mais qu'il y a une augmentation de son métabolite dans la condition CORT+AdipoRon. L'ensemble de ces résultats mettent en évidence le potentiel anti-neuroinflammatoire de l'AdipoRon et également sa capacité à augmenter le turnover de la 5-HT (*Figure 3, C*). Enfin, par des techniques d'immunohistochimie et de qPCR nous avons montré que l'AdipoRon améliore la neurogenèse et l'expression de facteurs trophiques inhibés par la CORT. L'AdipoRon rétablit le nombre de neurones néoformés (Figure 5, A-D). De plus, l'expression du BDNF, VEGF α , IGF1 et NGF, diminuée par la CORT est rétablie en partie par l'AdipoRon (*Figure 5, E*).

CONCLUSION

Pour conclure, ces résultats mettent en avant le potentiel antidépresseur d'un agoniste des AdipoRs, l'AdipoRon. De plus, nos travaux montrent qu'un traitement chronique par la corticostérone induit une obésité viscérale avec des troubles métaboliques en plus d'un comportement « dépressif ».

L'adipoRon semble cibler plusieurs systèmes simultanément puisqu'il limite la neuroinflammation, les troubles métaboliques et le métabolisme du TRP et de la KYN et favorise la neurogenèse. Ainsi, l'adipoRon apparaît comme étant une molécule aux effets pléiotropiques prometteuse dans le traitement de la dépression.

ARTICLE 4

Title

Adiporon, an adiponectin receptor agonist acts as an antidepressant and metabolic regulator in a mouse model of depression

Authors

Sarah Nicolas¹, Delphine Debayle², Catherine Béchade³, Luc Maroteaux³, Anne-Sophie Gay², Pascale Bayer⁴, Catherine Heurteaux¹, Alice Guyon¹ and Joëlle Chabry¹*

ABSTRACT

Major depression is a psychiatric disorder with complex etiology. About 30% of depressive patients are resistant to antidepressants that are currently available, likely because they only target the monoaminergic systems. Thus, identification of novel antidepressants with a larger action spectrum is urgently required.

Epidemiological data indicate high comorbidity between metabolic and psychiatric disorders, particularly obesity and depression. We used a well-characterized anxiety/depressive-like mouse model consisting of continuous input of corticosterone for seven consecutive weeks. A panel of reliable behavioral tests were conducted to assessing numerous facets of the depression-like state, including anxiety, resignation, reduced motivation, loss of pleasure and social withdrawal. Furthermore, metabolic features including weight, adiposity and plasma biological parameters (lipids, adipokines, and cytokines) were investigated in corticosterone-treated mice. Our data show that chronic administration of corticosterone induced the parallel onset of metabolic and behavioral dysfunctions in mice. AdipoRon, a potent adiponectin receptor agonist, prevented the corticosteroneinduced early onset of moderate obesity and metabolic syndromes. Moreover, in all the behavioral tests, daily treatment with AdipoRon successfully reversed the corticosterone-induced depression-like state in mice. AdipoRon exerted its pleiotropic actions on various systems including hippocampal neurogenesis, serotonergic neurotransmission, neuroinflammation and the tryptophan metabolic pathway, which can explain its antidepressant properties. Our study highlights the pivotal role of the adiponergic system in the development of both metabolic and psychiatric disorders. AdipoRon may constitute a promising novel antidepressant.

- 1 -

INTRODUCTION

Major depression is a mood disorder with multifactorial origins, which affects about 350 million people worldwide. The symptomology is complex and characterized by sadness, low self-esteem, social withdrawal, loss of interest and pleasure, despair for several consecutive weeks, amongst other symptoms. Major depression can occur as a transient and isolated episode or in a chronic fashion. Current treatments are mainly based on monoaminergic system regulation such as selective serotonin reuptake inhibitors (SSRIs), and are readily available and efficient. However, about 30% of patients with depressive disorders are partially or completely resistant to treatments. Thus, there is an urgent need for novel therapeutic targets for the treatment of depression.

Beside monoaminergic system disturbances, depression has been linked to dysfunctions of other neuroendocrine and/or physiological functions, including the hypothalamo-pituitary-adrenal (HPA) axis. People with Cushing's disease present a concomitant elevation in circulating cortisol and mood symptoms, suggesting that sustained elevation of cortisolemia is involved in the etiology of depression. The occurrence of depression increases after chronic corticosteroid therapy, and an elevated level of circulating cortisol has been observed in roughly half of people with major depression (5). When corticosterone is administered over a long-term period to laboratory rodents, it causes several anxio-depressive symptoms including resignation, anhedonia and reduced social interactions (3, 6). Unregulated, elevated cortisol levels are linked with metabolic illnesses including obesity. In depressive patients, higher cortisolemia was found to correlate strictly with an increase in the abdominal fat mass (7, 8). Furthermore, epidemiological data indicate high comorbidity between metabolic and psychiatric disorders, particularly obesity and depressive symptomology is closely linked to adipose-related metabolic signals including levels of glucocorticoid, adipokines and cytokines, among others.

Interestingly, levels of the most abundant adipokine, adiponectin (ApN), have recently been associated with both depression and obesity and thus may represent a potential target against these disorders (12). ApN was primarily involved in glucose and lipid metabolism (13, 14), and plasma ApN was found to negatively correlate with obesity and abdominal fat in humans (15, 16) and rodents (17, 18). Recent studies showed that ApN has a more widespread influence and functionality in the brain than previously thought (19). Indeed, ApN regulates thermogenesis (20), food intake (21) and fear memory extinction (22) through the activation of its membrane receptors AdipoR1 and AdipoR2, which are expressed throughout the brain. Patients with major depression displayed lower ApN plasma levels compared to controls (23, 24). Given that ApN knockout mice are more susceptible to anxio-depressive symptoms than wild-type (wt) mice, antidepressant-like properties have been ascribed to ApN (6, 25, 26). Together, these data allow us to envisage the modulation of the adiponergic system

- 2 -

as a possible therapy against depression related to metabolic dysfunction. Here, we show that AdipoRon, a non-peptidic agonist of ApN receptors (27), rescues depression associated with moderate obesity and abdominal adiposity in an anxiety/depression-like mouse model induced by continuous input of glucocorticoids. Like classic antidepressants, AdipoRon promotes adult hippocampal neurogenesis, serotonin turnover and serotonergic neurotransmission. Additionally, AdipoRon alleviates low-grade peripheral and central inflammation and regulates the Trp/L-Kyn pathway. Through its pleiotropic actions on multiple systems that are affected during depression, AdipoRon could constitute a powerful and promising antidepressant drug.

METHODS and MATERIALS

Mice- Male C57BL/6J mice wild type (wt) or transgenic ApN knock-out mice (ApN^{-/-}) were obtained from Janvier (France) and the Jackson Laboratory, respectively. Mice were housed at 22°C ±1 on a 12-hour light/dark cycle (lights on/off at 7am/7pm) and allowed free access to drink and chow (A04 Safe, 2900 kcal/kg).

Chronic treatment of AdipoRon in a mouse model of depression-like behaviors- In the present study, the well-established mouse model of depression-like behavior based on the long-term corticosterone (cortico) treatment has been used (3). Five-week-old wt male mice (five/cage) received cortico (35 mg/L dissolved in tap water containing 4 g/L β CD) or vehicle alone *ad libitum* for 7 consecutive weeks (3). Cortico and vehicle solutions were changed every 3 days to prevent possible degradation. Additionally, during the last three weeks of the treatment, mice were intraperitoneally (*ip*) injected daily with AdipoRon (1 mg/kg in 2.5% DMSO) or vehicle alone (Fig. 1A, 2A and SI-MM1).

Behavioral testing- All behavioral tests were conducted during the light phase (from 09:00 to 13:00) in compliance with the Institutional Animal Care and Use Committee of the University of Nice-Sophia Antipolis (permission number 010344.01 from the French "Ministère de l'Enseignement Supérieur et de la Recherche"). All data were obtained in blind-coded experiments, in which the investigators who obtained the data were unaware of the specific genotypes and treatments of mice (SI-MM2).

Hippocampal neurogenesis and neuronal survival- To assay newborn hippocampal neuron survival and maturation, mice were *ip* injected with BrdU (50 mg/kg of body weight) once a day for five consecutive days, one week prior to the start of the chronic treatment with AdipoRon. For neurogenesis experiments, mice were *ip* injected with BrdU (50 mg/kg of body weight) three times, 3 hours apart one day before the end of AdipoRon treatment. Either one day or twenty-one days after

the last BrdU injections, mice were euthanized and transcardially perfused with cold PBS then fixed with 3.2% PFA. Brain sections were prepared for immunohistochemistry (IHC) as detailed in SI-MM3.

Kinetic studies of Adiporon effects- Twelve-week-old male C57BL/6J mice were *ip* injected with AdipoRon (1 mg/kg) or vehicle alone (2.5% DMSO). At different time points after injection (0, 30 min, 1 h, 3 h, 6 h), mice were anesthetized by *ip* injection of sodium pentobarbital; blood samples were collected then perfusions were performed by intra-cardiac puncture of 30 ml of cold saline solution following by dissection of various brain regions. Samples were stored at -80°C until use.

Brain tissue collection- Mice were deeply anesthetized with pentobarbital, and then perfused by intracardiac puncture of cold saline solution. Brains were collected and immediately cut into 1 mm thick slices with an ice-cold brain slicer matrix. Brain regions of interest were punched out, weighed, and stored at -80°C.

Cytokine measurements- Hypothalamus, hippocampus, prefrontal cortex and epididymal white adipose tissue (WAT) samples were homogenized in lysis buffer (10 mM Tris-HCl, pH 7.5, 150 mM NaCl, 5 mM EDTA containing 10% glycerol and 1% NP-40 with protease inhibitor). MCP1, IFN- γ , IL-1 β , IL-6 and TNF α levels were measured using an electrochemoluminescence (ECL)-based assay (U-plex, MesoScale Discovery, Rockville, MD, USA) following manufacturer instructions. Results were standardized according to the protein concentration of each sample as determined by the Bradford method.

Triglyceride and cholesterol measurements- Plasma concentrations of cholesterol and triglycerides (TG) were assessed with an enzymatic colorimetric method (Kits from Roche diagnostic, respectively TRIGL and CHOL2) and on a "Roche Cobas c701" chemistry system.

Statistical analysis- Statistical analyses were performed using GraphPad Prism 4.0 software. The Shapiro-Wilk test was systematically used to check for the normal distribution of the data. When the sample size was small ($n\leq12$) and/or in case of non-normal distribution, differences between more than two groups were assessed by the nonparametric Kruskal-Wallis test followed by a *post hoc* Dunn's for multiple comparisons. Differences between two conditions were assessed by the nonparametric Friedman test was used when comparing groups of mice with repeated measurements (e.g. Fig.1B and Fig.2G). Data are presented as means ± standard error of the mean (sem); statistical significance was set at **P*<0.05 and ***P*<0.01, ****P*<0.001.

RESULTS

Chronic AdipoRon treatment ameliorates corticosterone–induced excess weight and dyslipidemia

We investigated the metabolic changes that occurred in cortico-induced depressive-like mice and the involvement of ApN pathway activation as assessed by chronic administration of the ApN agonist AdipoRon (Fig.1A). Long-term treatment with cortico resulted in a significant weight gain in mice from the sixth week (Fig.1B). The epididymal white adipose tissue mass (Fig.1C) and the adipocyte surface area (Fig.1D, E) were significantly increased in cortico-treated mice compared to controls. Interestingly, daily administration of AdipoRon during the last three weeks of the cortico treatment prevented both weight gain, and the increase of epididymal mass and adipocyte surface area, while vehicle-treated mice did not exhibit any significant changes (Fig.1B, C, D, E). The inflammation state of epididymal fat tissue was further investigated by measuring the in situ production of proinflammatory cytokines. Compared to the control group, WAT from the cortico-treated mice produced significantly less TNF α and more MCP1, independently of the AdipoRon treatment (Fig. 1F). None of the treatments significantly altered IL1 β production in WAT (Fig. 1F). Long-term corticotreatment resulted in elevated plasma levels of both cholesterol and TG compared to that of control mice, while AdipoRon prevented the cortico-induced increase of plasma lipids (Fig. 1G). The plasma concentrations of ApN and leptin were increased in cortico-treated mice compared to that of control group, but chronic administration of AdipoRon did not counteract this cortico-induced effect (Fig. 1H). The leptin/ApN ratio is considered to be a reliable indicator of metabolism dysfunctions and was increased in cortico-treated mice, independently of the AdipoRon treatment (Fig. 1H). Plasma concentrations of proinflammatory cytokines IL1 β and TNF α were significantly reduced in the presence of cortico treatment, while AdipoRon restored physiological levels (Fig. 11). No significant variation in plasma concentrations of the chemokine MCP1 was observed, regardless of the treatment (Fig. 11). The plasma and WAT concentrations of IL6 were virtually undetectable in all groups of mice (data not shown).

The Trp/L-Kyn pathway is markedly altered in overweight/obese patients and in rodent models of metabolic syndrome. Plasma levels of 5-HT, Trp, L-Kyn and KynA were assayed by chromatography coupled to tandem mass spectrometry, allowing for the assessment of indoleamine 2,3-dioxygenase (IDO) and kynurenine aminotransferase (KAT) activities by means of the Trp/L-Kyn and KynA/L-Kyn ratios, respectively (Fig. 1J). Long-term administration of cortico triggered an increase in the plasma concentration of L-Kyn, resulting in a KynA/L-Kyn ratio decrease and a concomitant increase in L-Kyn/Trp (Fig. 1K). Chronic AdipoRon treatment significantly counteracted this effect, restoring the physiological IDO and KAT index. The 5-HT concentration was found to be decreased in plasma

- 5 -

samples from cortico-treated mice compared to control mice. This parameter was also normalized by the chronic administration of AdipoRon (Fig. 1K). Note that in control mice, AdipoRon alone (i.e. without cortico treatment) did not alter the Trp/L-Kyn pathway, the plasma levels of lipids, adipokines, and cytokines, or the WAT features (Fig. 1C-K).

Antidepressant effects of AdipoRon on a depression-like mouse model

The potential anxiolytic and antidepressant properties of Adiporon were investigated using long-term cortico treatment in a mouse model (Fig. 2A). Cortico-treated mice presented exacerbated anxiety compared to control mice as demonstrated by a reduction in time spent in the aversive light chamber of the light-dark paradigm (Fig. 2B). Chronic administration of AdipoRon reversed the anxiety phenotype in the cortico-treated group, without significant effect on vehicle-treated mice (Fig. 2B). Long-term cortico treatment promoted depression-like behavior in mice, as shown by behavioral tests for anhedonia (sucrose preference test), resignation (FST), learned helplessness (LH), anxiodepressive-like behavior (NSF), and social interactions. Briefly, long-term exposure to cortico reduced the sucrose preference (Fig. 2C), increased the duration of immobility in the FST (Fig. 2D), the latency to eat in the NSF (Fig. 2E), and lowered social interactions (Fig.2F). Interestingly, chronic administration of AdipoRon reversed the depressive-like behavior induced by long-term administration of cortico in all these paradigms, whereas no significant effect was observed in the control group. In the LH paradigm, the latency to escape remained unchanged while the number of failures to escape the aversive area was increased in cortico-treated mice compared to controls, suggesting that longterm cortico treatment favored the resignation-like behavior (Fig.2G, H, I). Chronic administration of AdipoRon prevented the resignation-like behavior in both healthy and depressive-like mice (Fig.2G, H, I).

Chronic treatments with cortico and/or AdipoRon did not significantly modify locomotion and exploration activities assessed by the total traveled distance and mean speed in the OF (Fig. S1A, B, respectively), nor they did significantly affect motor coordination as assessed using the rotarod (Fig. S1C). In conclusion, using a set of behavioral tests, we showed that AdipoRon, counteracted depressive-like behaviors in a well-established mouse model of depression. Thus, AdipoRon presented antidepressant-like potential.

Together, our data suggest that chronic administration of cortico induced metabolic and behavioral dysfunctions in parallel, and these dysfunctions were at least partially counteracted by AdipoRon.

Effect of acute administration of AdipoRon on various depression-like mouse models

The FST is the gold standard rodent behavioral test for rapid and high-throughput screening of new antidepressant drugs. Timing the immobility time in the FST after an acute administration of AdipoRon

- 6 -

162

allowed us to assess the kinetics of action, the dose-response effect and the route of administration (Fig. S2, SI-R1). A single *ip* or *per* os administration of AdipoRon produced a transient and dosedependent reduction of the resignation-like behavior on the FST on different mouse models of depression. Furthermore, we showed that AdipoRon can cross the BBB and directly target the brain by activating intracellular signaling pathways (Fig. S3, SI-R2).

Chronic AdipoRon treatment prevents neuroinflammation, restores the normal kynurenine pathway and increases serotonin turnover in the brain

Neuroinflammation plays a crucial role in the pathogenesis of depression. To investigate whether AdipoRon displayed similar anti-inflammatory properties to ApN, the concentration of proinflammatory cytokines (IL1 β , IL6, TNF α , IFN γ) in various brain regions involved in depression (i.e. hypothalamus, hippocampus and prefrontal cortex) was measured using a multiplex assay (Fig. 3A). IL1 β and TNF α concentrations were elevated in hypothalamus from cortico-treated mice compared to control, while in the hippocampus; only IFN γ was increased by cortico-treatment (Fig. 3A). The prefrontal cortex of cortico-treated mice showed increased levels of IL1 β , IL6 and TNF α , but not IFN γ (Fig. 3A). In all brain regions, AdipoRon restored physiological concentrations of cytokines and thus abolished the cortico-induced neuroinflammation (Fig. 3A).

The expression levels of IDO and KAT mRNA were assessed by quantitative PCR in brain areas of interest (Fig. 3B). Chronic cortico treatment significantly increased the level of expression of IDO1 and KAT3 in the hypothalamus, IDO1, KAT2 and KAT3 in the hippocampus, but only that of KAT2 in the prefrontal cortex (Fig. 3B). AdipoRon treatment restored the physiological levels of expression for both IDO and KAT in each brain region that was investigated in depressive-like mice (Fig. 3B).

The "serotonin hypothesis" postulates that diminished activity of the serotonin pathway plays a causal role in the pathophysiology of depression. Both AdipoR1 and AdipoR2 were expressed in the dorsal raphe, the largest serotonergic nucleus (Fig. S4). It was therefore of interest to determine if AdipoRon altered the levels of serotonin (5-HT) and its metabolite 5-hydroxyindoleacetic acid (5-HIAA) in the dorsal raphe from control and depressive-like mice. However, in dorsal raphe from depressive-like mice, AdipoRon increased the level of 5-HIAA without impacting that of 5-HT, resulting in a three-fold increase in the 5-HIAA/5-HT ratio (Fig.3C). Chronic administration of AdipoRon increased the release and turnover of serotonin in the raphe nucleus from depressive-like mice (Fig.3C).

A direct action of AdipoRon on serotonergic neurons of the dorsal raphe cannot be ruled out. To explore this hypothesis, patch-clamp experiments were conducted on brain slices in the whole-cell mode. In serotonergic neurons of the dorso-median raphe, AdipoRon led to an increase in action potential discharge frequency that was accompanied by a small depolarization (Fig. S4).

- 7 -

Chronic AdipoRon treatment reverses the deleterious effect of long-term cortico-treatment on hippocampal neurogenesis

To further investigate the potential cellular mechanisms underlying the benefits of AdipoRon on depression-like behavior, we evaluated changes in adult hippocampal neurogenesis and neuronal survival (Fig. 4 A,B). Neither cortico nor AdipoRon treatment modified the proliferation of neuronal precursors (i.e. assessed one-day post BrdU injection, Fig. 4C). However, long-term cortico administration significantly decreased the rate of survival of newborn hippocampal neurons, while AdipoRon reversed this deleterious effect (Fig. 4D). AdipoRon counteracted the adverse effects of cortico on the survival of hippocampal neurons without having any effects in control conditions (Fig. 4C, D). The expression of the genes encoding neurotrophic factors (namely BDNF, VEGF α , IGF1 and NGF) was down-regulated in the dentate gyrus of cortico-treated mice, AdipoRon restored physiological levels of expression of genes encoding these neurotrophic factors (Fig. 4E).

DISCUSSION

HPA axis dysfunction and sustained elevation of plasma glucocorticoids are involved in many of the physiological changes associated with metabolic syndrome and depression. Here we demonstrate that AdipoRon, a potent agonist of adiponectin receptors, efficiently reverses cortico-induced early onset of moderate obesity, metabolic syndrome and depression-like behaviors in mice. Together, our study highlights the pivotal role of the adiponergic system in the development of these diseases and provides a novel and promising pharmacotherapeutic approach.

Previous studies have shown that mice deficient in ApN exhibit increased susceptibility to stressinduced depressive behaviors (6, 25). Intracerebral administration of exogenous ApN produces antidepressant-like effects in mice (25) suggesting that ApN receptor agonists could exert similar effects. In agreement with this assumption, we demonstrate that AdipoRon exhibits antidepressant-like properties. AdipoRon is of particular interest because it was initially selected based on its ability to bind both adipoR1 and adipoR2 with similar affinities, thus globally activating the ApN-related intracellular pathways (27). Furthermore, AdipoRon prevents obesity-related disorders in db/db mice (27). As reliable readout, we performed a panel of behavioral tests aiming to assess a numerous aspects of the depression-like state, including anxiety (L&D), resignation (FST, LH), lower motivation (NSF), loss of pleasure (sucrose preference test) and social withdrawal (1-4). In all of these paradigms, daily treatment with AdipoRon for 3-weeks successfully reversed the cortico-induced depression-like state in mice.

Childhood and adolescence are critical periods of development. During this period, hormonal and neuroendocrine disruptors are likely to have important implications for physiological and Nicolas, S, et al.

neurobehavioral functions in adulthood. During these phases, the HPA axis is maturing, as are tissues that respond to glucocorticoids, including adipose tissue and brain. It is likely that the continuous intake of glucocorticoids from the youngest age may lead to adulthood metabolic syndrome. Metabolic syndrome is defined as a cluster of disorders, including abdominal obesity, insulin resistance, and dyslipidemia. In this work, mice were chronically exposed to cortico from 5-weeks of age, for seven consecutive weeks. Cortico-treated mice exhibited variations in metabolic outcomes (body weight, and abdominal fat) compared to controls, suggesting the onset of metabolic syndrome. Interestingly, AdipoRon thwarts the cortico-induced effects, and prevents the increase of adiposity and body weight in this model. It should be noted that, some but not all of the indicators of metabolic syndrome were established at the adulthood. Indeed, while increase of body weight, abdominal fat, adipocyte size, hyperlipidemia and hyperleptinemia was observed in cortico-treated mice, no systemic inflammation was observed. Yet, a chronic low-grade inflammatory state with production of proinflammatory cytokines such as IL1 β , IL6, TNF α is the hallmark of metabolic disorders (12). Conversely, in the experimental protocol described above, anti-inflammatory properties of cortico were still effective, as shown by decreased concentrations of TNF α and IL1 β in plasma and WAT. The chemokine MCP1 controls the recruitment of monocytes from the blood stream across the vascular endothelium for routine immunological surveillance of tissues, and in response to inflammation and tissue injury (30). The increased MCP1 production in WAT of cortico-treated mice could reflect the onset of WAT dysfunctions and thus portend future infiltration of macrophages and inflammation. Interestingly, AdipoRon limits MCP1 production, thus is likely to prevent or delay impairment of WAT function.

Adipokinemia is closely linked to waist circumference and abdominal adipose tissue distribution (31). The leptin/ApN ratio is now considered to be an indicator of metabolic syndrome. It is more reliable than independent plasma adipokine concentrations and correlates positively with all metabolic symptom criteria (32-35). In the present study, an elevated plasma leptin/ApN ratio was found in cortico-treated mice, compared to controls, suggesting the onset of obesity and metabolic syndrome.

To our knowledge, this is the first report showing the concomitant occurrence of moderate visceral obesity, metabolic syndrome and anxio-depressive-like behaviors following cortico treatment. Our data suggest that dysfunction of the HPA axis early in life triggers parallel neurobehavioral and metabolic disorders, as opposed to a model in which one disorder (i.e. depression) is the consequence of the other (i.e. metabolic syndrome). To explore the mechanisms underlying the antidepressant actions of AdipoRon, we investigated the possible effects of AdipoRon on some depression-related neurochemical dysfunctions *i.e.* neurogenesis, serotonergic neurotransmission, neuroinflammation and the Trp/L-Kyn metabolic pathway. Although current depression research largely focuses on "the neurogenic hypothesis", both neurogenesis-dependent and -independent pathways are likely to be involved in antidepressant-related actions (3). In agreement with previous reports, we found that

- 9 -

chronic cortico treatment altered neuronal cell differentiation in adult hippocampus (3, 6, 38). As demonstrated with other antidepressants, including fluoxetine (3, 29), AdipoRon efficiently counteracts the deleterious effect of long-term cortico treatment on neurogenesis. However, a major difference between existing antidepressants and AdipoRon was revealed. Whereas chronic SSRI treatment, including fluoxetine, stimulates all stages of the neurogenesis process i.e. proliferation, differentiation and survival of neuronal cells in healthy control mice (3), the effects of AdipoRon were exclusively observed in depressive-like mice. This suggests a significant difference in the SSRI and Adiporon mechanisms of action on adult neurogenesis. One can assume that AdipoRon acts by counteracting the deleterious cortico-induced pathways, rather than by directly stimulating neuronal survival and/or differentiation pathways. In agreement with this assumption, chronic cortico-treatment has been shown to potentiate the behavioral and neuroplastic effects of fluoxetine in C57BL/6 mice (39).

Changes in the serotonin system elicited by chronic stress and/or the depression-like state might explain the effects that AdipoRon produced exclusively in depressive-like mice, but not in naive mice. The serotonergic neurotransmission strongly depends on the negative feedback function ascribed to 5-HT1A autoreceptors in the somatodendritic neuron of the dorsal raphe. Clinical studies have clearly established a crucial role of 5-HT1A autoreceptors in mood disorders and antidepressant treatments (40). Long-term administration of cortico results in the desensitization of 5-HT1A autoreceptors and an antidepressant response (39, 41). Our data show an elevation of the 5-HIAA/5-HT ratio in the dorsal raphe of cortico-treated mice in response to AdipoRon is in favor of a greater enhancement of brain serotonergic neurotransmission and turnover. Finally, the direct effects of AdipoRon on 5-HT neurons should not be neglected, since acute application of AdipoRon on dorsal raphe slices increases serotonergic neuron firing.

The Trp/Kyn pathway is at the interface between inflammation and the serotonergic system, and has thus received increased attention in the pathophysiology of depression over the last decade (42-44). Thus we investigated cortico-induced changes to the profiles of both proinflammatory cytokines and the expression of genes that encode Trp/L-Kyn pathway-related enzymes, namely KAT and IDO, in the brain regions involved in depression. Neuroinflammation manifested mainly in the prefrontal cortex and the hypothalamus of anxiodepressive-like mice. Increased levels of gene expression for enzymes involved in Trp catabolism were found in the prefrontal cortex, hippocampus and hypothalamus of anxio-depressive-like mice. These results suggest that cortico exposure leads to a reduction of essential amino acid availability (Trp and 5-HT) and/or an increase in neurotoxic metabolites as has previously been proposed (42). Together, a long-lasting neuroinflammation profile and an alteration to the Trp/L-Kyn pathway could contribute to the emergence of anxio-depressive-like behaviors (45). Interestingly, AdipoRon treatment reverses both phenotypes in cortico-treated mice without having a significant effect on control mice. Low-grade peripheral inflammation and the Trp/L-Kyn metabolic

pathway are potential pathophysiological links between metabolic syndrome and depression (46). In mice, plasma KynA/L-Kyn and L-Kyn/Trp ratios appear to be reliable indicators of cortico-induced behavioral and metabolic alterations as well as AdipoRon-induced recovery. Further epidemiologic studies are required to demonstrate the reliability and relevance of these ratios as predictive biomarkers for obesity-linked depression in humans.

The present study clearly demonstrates the antidepressant-like properties of AdipoRon in mice, likely through actions on multiple targets that are altered during mood disorders. AdipoRon fulfills the prerequisites for a medication, namely no or minor side effects, achievable doses *in vivo*, and a pharmacokinetic profile suitable for *in vivo* assessment. Although the use of AdipoRon as an antidepressant in humans will require further clinical investigations, AdipoRon appears to constitute a promising novel antidepressant.

ACKNOWLEDGMENTS

This work was supported by grants from *Fondation de l'Avenir* (#AP-rm-16-011-Chabry), the *Agence Nationale de la Recherche* (ANR-13-SAMA-0002), and by funds from the *Centre National de la Recherche Scientifique* and the *Institut National de la Santé et de la Recherche Médicale*. SN was the recipient of a fellowship from the "*Ministère de la Recherche et de l'Enseignement Supérieur*". LM and CB were supported by funds from the *Université Pierre et Marie Curie*, and by grants from the *Fondation pour la Recherche sur le Cerveau* and the *Fondation pour la Recherche Médicale*.

We thank Dr. Mélanie Guyot and all the staff of the Biochemistry Laboratory of the "*Centre Hospitalier Universitaire*" (Nice) for technical assistance, Alain Barbot and Lucien Relmy for animal care and Franck Aguila for graphic art. We are very grateful to Drs. Laetitia Davidovic, Jacques Barik and Abby Cuttriss (Office of International Scientific Visibility, Université Côte d'Azur) for critical review of the manuscript.

FINANCIAL DISCLOSURES

SN, AG and JC are co-inventors of a patent entitled "Use of adiponectin receptor agonists in treating depression, anxiety and neuroinflammation" (registration ref # 17 305953.6). The other co-authors of the present manuscript declare no conflict of interest.

- 11 -

REFERENCES

1. Santarelli L, Saxe M, Gross C, Surget A, Battaglia F, Dulawa S, et al. Requirement of hippocampal neurogenesis for the behavioral effects of antidepressants. *Science* 2003; 301:805-809.

2. Revest JM, Dupret D, Koehl M, Funk-Reiter C, Grosjean N, Piazza PV, et al. Adult hippocampal neurogenesis is involved in anxiety-related behaviors. *Mol Psychiatry* 2009; 14:959-967.

3. David DJ, Samuels BA, Rainer Q, Wang JW, Marsteller D, Mendez I, et al. Neurogenesisdependent and -independent effects of fluoxetine in an animal model of anxiety/depression. *Neuron* 2009; 62:479-493.

4. Malberg JE, Duman RS. Cell proliferation in adult hippocampus is decreased by inescapable stress: reversal by fluoxetine treatment. *Neuropsychopharmacology* 2003; 28:1562-1571.

5. Varghese FP, Brown ES The Hypothalamic-Pituitary-Adrenal Axis in Major Depressive Disorder: A Brief Primer for Primary Care Physicians. *Prim Care Companion 2001; J Clin Psychiatry*. 3:151-155.

6. Nicolas S, Veyssiere J, Gandin C, Zsurger N, Pietri M, Heurteaux C, et al. Neurogenesisindependent antidepressant-like effects of enriched environment is dependent on adiponectin. *Psychoneuroendocrinology* 2015; 57:72-83.

7. Thakore JH, Richards PJ, Reznek RH, Martin A, Dinan TG. Increased intra-abdominal fat deposition in patients with major depressive illness as measured by computed tomography. *Biol Psychiatry* 1997; 41:1140-1142.

8. Roberts RE, Deleger S, Strawbridge WJ, Kaplan GA. Prospective association between obesity and depression: evidence from the Alameda County Study. *Int J Obes Relat Metab Disord* 2003; 27:514-521.

9. Mansur RB, Brietzke E, McIntyre RS. Is there a "metabolic-mood syndrome"? A review of the relationship between obesity and mood disorders. *Neurosci Biobehav Rev* 2015; 52:89-104.

10. McElroy SL, Kotwal R, Malhotra S, Nelson EB, Keck PE, Nemeroff CB. Are mood disorders and obesity related? A review for the mental health professional. *J Clin Psychiatry* 2004; 65:634-651.

11. Luppino FS, de Wit LM, Bouvy PF, Stijnen T, Cuijpers P, Penninx BW, et al. Overweight, obesity, and depression: a systematic review and meta-analysis of longitudinal studies. *Arch Gen Psychiatry* 2010; 67:220-229.

12. Hryhorczuk C, Sharma S, Fulton SE. Metabolic disturbances connecting obesity and depression. *Front Neurosci* 2013; 7:177.

13. Berg AH, Combs TP, Scherer PE. ACRP30/adiponectin: an adipokine regulating glucose and lipid metabolism. *Trends Endocrinol Metab* 2002; 13:84-89.

14. Turer AT, Scherer PE. Adiponectin: mechanistic insights and clinical implications. *Diabetologia* 2012; 55:2319-2326.

15. Arita Y, Kihara S, Ouchi N, Takahashi M, Maeda K, Miyagawa J, et al. Paradoxical decrease of an adipose-specific protein, adiponectin, in obesity. *Biochem Biophys Res Commun* 1999; 257:79-83.

16. Ryo M, Nakamura T, Kihara S, Kumada M, Shibazaki S, Takahashi M, et al. Adiponectin as a biomarker of the metabolic syndrome. *Circ J* 2004; 68:975-981.

17. Maeda N, Takahashi M, Funahashi T, Kihara S, Nishizawa H, Kishida K, et al. PPAR γ ligands increase expression and plasma concentrations of adiponectin, an adipose-derived protein. *Diabetes* 2001; 50:2094-2099.

18. Ye J, Gao Z, Yin J, He Q. Hypoxia is a potential risk factor for chronic inflammation and adiponectin reduction in adipose tissue of ob/ob and dietary obese mice. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 2007; 293:E1118-1128.

19. Arnoldussen IA, Kiliaan AJ, Gustafson DR. Obesity and dementia: Adipokines interact with the brain. *Eur Neuropsychopharmacol* 2014;, 24(12):1982-99.

20. Qi Y, Takahashi N, Hileman SM, Patel HR, Berg AH, Pajvani UB, et al. Adiponectin acts in the brain to decrease body weight. *Nat Med* 2004; 10:524-529.

21. Kubota N, Yano W, Kubota T, Yamauchi T, Itoh S, Kumagai H, et al. Adiponectin stimulates AMP-activated protein kinase in the hypothalamus and increases food intake. *Cell Metab* 2007; 6:55-68.

22. Zhang D, Wang X, Wang B, Garza JC, Fang X, Wang J, et al. Adiponectin regulates contextual fear extinction and intrinsic excitability of dentate gyrus granule neurons through AdipoR2 receptors. *Mol Psychiatry* 2016; 22(7):1044-1055.

23. Leo R, Di Lorenzo G, Tesauro M, Cola C, Fortuna E, Zanasi M, et al. Decreased plasma adiponectin concentration in major depression. *Neurosci Lett* 2006; 407:211-213.

24. Hu Y, Dong X, Chen J. Adiponectin and depression: A meta-analysis. *Biomed Rep* 2015; 3:38-42.

25. Liu J, Guo M, Zhang D, Cheng SY, Liu M, Ding J, et al. Adiponectin is critical in determining susceptibility to depressive behaviors and has antidepressant-like activity. *Proc Natl Acad Sci USA* 2012; 109:12248-12253.

26. Yau SY, Li A, Hoo RL, Ching YP, Christie BR, Lee TM, et al. Physical exercise-induced hippocampal neurogenesis and antidepressant effects are mediated by the adipocyte hormone adiponectin. *Proc Natl Acad Sci USA* 2014; 111:15810-15815.

27. Okada-Iwabu M, Yamauchi T, Iwabu M, Honma T, Hamagami K, Matsuda K, et al. A small-molecule AdipoR agonist for type 2 diabetes and short life in obesity. *Nature* 2013; 503:493-499.

28. Chabry J, Nicolas S, Cazareth J, Murris E, Guyon A, Glaichenhaus N, et al. Enriched environment decreases microglia and brain macrophages inflammatory phenotypes through adiponectin-dependent mechanisms: Relevance to depressive-like behavior. *Brain Behav Immun* 2015; 50:275-287.

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

30. Deshmane SL, Kremlev S, Amini S, Sawaya BE. Monocyte chemoattractant protein-1 (MCP-1): an overview. *J Interferon Cytokine Res* 2009; 29:313-326.

31. Satoh N, Naruse M, Usui T, Tagami T, Suganami T, Yamada K, et al. Leptin-to-adiponectin ratio as a potential atherogenic index in obese type 2 diabetic patients. *Diabetes Care* 2004; 27:2488-2490.

32. Zhuo Q, Wang Z, Fu P, Piao J, Tian Y, Xu J, et al. Comparison of adiponectin, leptin and leptin to adiponectin ratio as diagnostic marker for metabolic syndrome in older adults of Chinese major cities. *Diabetes Res Clin Pract* 2009; 84:27-33.

33. Mojiminiyi OA, Abdella NA, Al Arouj M, Ben Nakhi A. Adiponectin, insulin resistance and clinical expression of the metabolic syndrome in patients with Type 2 diabetes. *Int J Obes 2007;* 31:213-220.

34. Gauthier A, Dubois S, Bertrais S, Gallois Y, Aube C, Gagnadoux F, et al. The Leptin to Adiponectin Ratio is a Marker of the Number of Metabolic Syndrome Criteria in French Adults. *J Metabolic Synd* 2012; 1:101.

35. Lopez-Jaramillo P, Gomez-Arbelaez D, Lopez-Lopez J, Lopez-Lopez C, Martinez-Ortega J, Gomez-Rodriguez A, et al. The role of leptin/adiponectin ratio in metabolic syndrome and diabetes. *Horm Mol Biol Clin Investig* 2014; 18:37-45.

36. Eisch AJ, Petrik D. Depression and hippocampal neurogenesis: a road to remission? *Science* 2012; 338:72-75.

37. Hanson ND, Owens MJ, Nemeroff CB. Depression, antidepressants, and neurogenesis: a critical reappraisal. *Neuropsychopharmacology* 2011; 36:2589-2602.

38. Murray F, Smith DW, Hutson PH. Chronic low dose corticosterone exposure decreased hippocampal cell proliferation, volume and induced anxiety and depression like behaviours in mice. *Eur J Pharmacol* 2008; 583:115-127.

39. Robinson SA, Brookshire BR, Lucki I. Corticosterone exposure augments sensitivity to the behavioral and neuroplastic effects of fluoxetine in C57BL/6 mice. *Neurobiol Stress* 2016; 3:34-42.

40. Albert PR, Le Francois B, Millar AM. Transcriptional dysregulation of 5-HT1A autoreceptors in mental illness. *Mol Brain* 2011; 4:21.

41. Rainer Q, Nguyen HT, Quesseveur G, Gardier AM, David DJ, Guiard BP. Functional status of somatodendritic serotonin 1A autoreceptor after long-term treatment with fluoxetine in a mouse model of anxiety/depression based on repeated corticosterone administration. *Mol Pharmacol* 2012; 81:106-112.

42. Dantzer R, O'Connor JC, Lawson MA, Kelley KW. Inflammation-associated depression: from serotonin to kynurenine. *Psychoneuroendocrinology*. 2011; 36:426-436.

43. Reus GZ, Jansen K, Titus S, Carvalho AF, Gabbay V, Quevedo J. Kynurenine pathway dysfunction in the pathophysiology and treatment of depression: Evidences from animal and human studies. *J Psychiatr Res* 2015; 68:316-328.

44. Dantzer R. Role of the Kynurenine Metabolism Pathway in Inflammation-Induced Depression: Preclinical Approaches. *Curr Top Behav Neurosci* 2017; 31:117-138.

45. O'Connor JC, Lawson MA, Andre C, Moreau M, Lestage J, Castanon N, et al. Lipopolysaccharide-induced depressive-like behavior is mediated by indoleamine 2,3-dioxygenase activation in mice. *Mol Psychiatry* 2009; 14:511-522.

46. Chaves Filho AJM, Lima CNC, Vasconcelos SMM, de Lucena DF, Maes M, Macedo D. IDO chronic immune activation and tryptophan metabolic pathway: A potential pathophysiological link between depression and obesity. *Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry* 2017; 80:234-249.

47. Lestage J, Verrier D, Palin K, Dantzer R. The enzyme indoleamine 2,3-dioxygenase is induced in the mouse brain in response to peripheral administration of lipopolysaccharide and superantigen. *Brain Behav Immun* 2002; 16:596-601.

48. Porsolt RD, Le Pichon M, Jalfre M. Depression: a new animal model sensitive to antidepressant treatments. *Nature* 1977; 266:730-732.

49. Moy SS, Nadler JJ, Perez A, Barbaro RP, Johns JM, Magnuson TR, et al. Sociability and preference for social novelty in five inbred strains: an approach to assess autistic-like behavior in mice. *Genes Brain Behav* 2004; 3:287-302.

50. Aghajanian GK, Vandermaelen CP. Intracellular identification of central noradrenergic and serotonergic neurons by a new double labeling procedure. *J Neurosci* 1982; 2:1786-1792.

FIGURES AND LEGENDS

Figure 1: AdipoRon prevents excess weight gain, adiposity and dyslipidemia in long-term corticosterone-treated mice. A. Schematic representation of the experimental protocol. B. Weights from the four groups of mice: vehicle (light gray symbols), corticosterone (cortico, dark gray symbols), cortico with AdipoRon (1 mg/kg, squares) or cortico without AdipoRon (vehicle, circles). Values plotted are mean \pm sem. A Friedman statistical analysis was followed by a Dunn's post-hoc test; *P < 0.05 (N=10-12 per group). C. Weights of epididymal adipose tissue from control (light gray) and corticotreated (dark gray) mice chronically treated with vehicle (-) or 1 mg/kg of AdipoRon (+). D. Representative images of eosin-hematoxylin-stained epididymal adipose tissue from control (water) and cortico-treated (cortico) mice with or without AdipoRon administration for 3 consecutive weeks. Scale bar, 50 µm. E. Quantification of the surface area of adipocytes expressed in mm², cells from 5 random fields containing about 100 cells/field were counted from four slices per mouse per group. Values plotted are mean ± sem; each symbol represents the mean of one mouse F. Concentrations of proinflammatory cytokines IL1 β , TNF α and chemokine MCP1 in epididymal fat tissue (expressed in pg/mg of total proteins) from control and cortico-treated mice ± AdipoRon administration. G, H, I. Histograms showing the plasma concentrations of lipids (G; cholesterol, *left*; TG, *right* expressed in mM), adipokines (H; ApN, *left*, expressed in µg/ml; leptin, *center*, expressed in ng/ml; ratio leptin/ApN, *right*), and cytokines (I; IL1 β , TNF α and chemokine MCP1, expressed in pg/ml) from long-term corticotreated mice ± AdipoRon administration. J. Schematic representation of the Trp/Kyn pathway. K. Histograms representing the relative plasma content of 5-HT, Trp, L-Lyn, KynA and the ratio KynA/L-Kyn and L-Kyn/Trp from control and cortico-treated mice ± AdipoRon administration. Experiments were conducted as described in SI-MM6. Means of data from vehicle-treated control mice were taken as 1. Values plotted are expressed as mean ± sem; N=8-10 per group; Kruskal-Wallis statistical analysis was followed by a Dunn's statistical test for comparison with the vehicle control group. ns. non-significant: **P* < 0.05. ***P* < 0.001. ****P*<0.001.

- 15 -



Nicolas, S. et al.

- 16 -

Figure 2: Antidepressant-like effects of AdipoRon assessed through behavioral tests on corticosterone-induced depressive-like mice. A. Schematic representation of the experimental protocol (SI-MM1). Five-week-old male mice were randomly distributed to the following groups for a 7-week period i.e. vehicle (*light gray symbols*), cortico (*dark gray symbols*), cortico + AdipoRon (1 mg/kg, *squares*) or cortico – AdipoRon (vehicle alone, *circles*). As described in the SI-MM1 and SI-MM2, during the seventh week of treatment, mice were submitted to behavioral testing: the light and dark test (**B**), the sucrose preference test (**C**), the FST (**D**), the NSF test (**E**), the social interaction test (**F**) and the learned helplessness test from which latency data were extracted (**G**, **H**) and the number of failures to escape the aversive box (**I**). Values plotted were mean ± sem; each symbol represents a mouse (N=10-12 *per* group); Kruskal-Wallis statistical analysis was followed by a Dunn's statistical test for comparison between groups. ns, non-significant; **P* < 0.05; ***P* < 0.01; ****P* < 0.001.



Figure 3- AdipoRon alleviates depression-related neuroinflammation and the Trp/L-Kyn pathway. A. Proinflammatory cytokines IL1 β , IL6, TNF α and INF γ were measured from the hypothalamus, the hippocampus and the prefrontal cortex using a multiarray assay from control (*light gray*) and cortico-treated mice (*dark gray*) chronically treated by vehicle (-) or 1 mg/kg AdipoRon (+). B. The expression of genes that encode enzymes involved in the Trp/L-Kyn pathway i.e. IDO1, IDO2, KAT1, KAT2, and KAT3 was assessed by quantitative PCR in the hypothalamus, the hippocampus and the prefrontal cortex from control and cortico-treated mice ± AdipoRon administration. Data are expressed as relative amount (means data from control vehicle-treated mice taken as 1) are expressed as mean ± sem. C. Concentration of 5-HT and its metabolite 5-HIAA assessed using HPLC analysis from the dorsal raphe of control (*light*) and cortico-treated mice (*dark*) ± 1 mg/kg of AdipoRon as described in SI-MM7. Histograms are means ± sem of 5-HT (*left*) and 5-HIAA (*center*) concentrations expressed in pmol/mg of total protein and the ratio 5-HIAA/5-HT (*right*). N=8 *per* group; Kruskal-Wallis statistical analysis was followed by a Dunn's statistical test for comparison with the vehicle control group. ns, non-significant; **P*<0.05; ***P*<0.01; ****P*<0.001.



Figure 4- AdipoRon rescues neurogenesis in the dentate gyrus of the hippocampus of depressive-like mice. A.

Representative immunohistochemical images depicting co-staining BrdU-labeled nuclei (green) and DCX- (left, red) or NeuN-positive neurons (right, red). Upper panel: X10 magnification bar, 100 µm; Lower panel: X60 magnification bar, 10 µm. B. Representative immunohistochemical images depicting BrdU-labeled nuclei (black, insert) of dentate gyrus slices from brains of vehicle-treated (upper) or chronically cortico-treated (lower) mice treated with AdipoRon (right) or vehicle (left). C. BrdU (50 mg/kg of body weight) was injected three times, 3-hours apart one day before sacrifice to examine the effects on neuronal proliferation after 7 weeks of cortico treatment ± AdipoRon (1 mg/kg/day). **D.** BrdU was administered daily during the cortico treatment for 5 consecutive days prior the initiation of a 3-week period of treatment ± AdipoRon to assess for neuronal survival. Experiments were conducted as described in SI-MM3. Data represent the number of BrdUpositive nuclei counted in the dentate gyrus from the four groups of mice. Values plotted are mean ± sem; each symbol represents a mouse. E. Dentate gyri were micro-dissected from hippocampus from long-term corticotreated mice ± AdipoRon administration. The level of expression for genes involved in synaptic maturation i.e. BDNF, VEGFa, IGF1 and NGF was determined by quantitative Histograms are means PCR. ± sem expressed as fold-change compared to vehicle control group. N=8/group; Kruskal-Wallis followed by a Dunn's post-hoc test for comparison with the vehicle control group; ns, non-significant, *P < 0.05, **P < 0.01.



SUPPLEMENTARY INFORMATION

METHODS AND MATERIALS

SI-Materials- AdipoRon, dimethylsulfoxyde (DMSO), lipopolysaccharide (LPS, from Escherichia Coli 0111:B4), bromodesoxyuridine (BrdU), paraformaldehyde (PFA), corticosterone (cortico), β -cyclodextrine (β -CD), Bradford reagent, EDTA, sodium deoxycholate, NP-40, tween 20, triton X100, protease cocktail, phosphatase inhibitors, bovine serum albumin (BSA) were purchased from Sigma-Aldrich (Saint-Quentin Fallavier, France).

SI-MM1- *Acute treatment of AdipoRon in mouse models of acute sickness and depression-like behaviors.* Three well-established mouse models of depression-like behavior have been used in the present study namely, **a-** long-term corticosterone (cortico) treatment in the drinking water of wt mice (3), **b-** ApN^{-/-} mice (25), and **c-** the systemic injection of LPS (45) as an acute sickness behavior model. For the acute sickness model, eight-week-old male mice were *ip* injected daily with AdipoRon or vehicle for twenty consecutive days. One day prior to behavioral testing, mice were *ip* injected with LPS (0.83 mg/kg in saline solution) or vehicle alone; the LPS dose was selected on the basis of its ability to induce the full spectrum of the acute sickness and depressive-like behaviors (47).

SI-MM2- *Behavioral testing.* Independent groups of control and cortico-treated mice were submitted to behavioral testing, or used for sample collection and immunohistochemistry (IHC) experiments as follows: groups #1 and #2 - IHC on brain sections from 1-day (#1) and 21-days post-BrdU injections (#2), group #3 - successively analyzed one day apart (OF, rotarod, L&D, FST), group #4 - successively analyzed two-days apart (sucrose preference, social interactions, NSF), group #5 - LH, and group #6 - IHC and biological analysis on dissected brain region (WAT and plasma). Before each trial, the L&D, OF, rotarod, social interaction and LH devices were thoroughly cleaned with 70% ethanol and dried.

Open-field test (OF)- Locomotor activity was determined using an open-field (OF) arena. Mice were placed in the corner of the test apparatus (40Lx40Wx25H cm Plexiglas box) that was weakly illuminated (30 lux) for a 10 min session of free moving, and each entire session was videotaped. The automated analysis was performed using the ANY-maze software (ANY-maze[©] version 4.6, Stoelting Co., USA) and resulted in a track record of the mouse movements in the arena, which allowed for evaluation of locomotor activity i.e. total distance traveled and mean speed.

Rotarod- Mice were placed on a rotating rod for a 5 min habituation period (10 rpm/min). The next day, the latency to fall, an index of the motor coordination, was recorded on an accelerating rod (from 10 to 40 rpm/min in 3.7 rpm/min increments).

Light & Dark test (L&D)- The L&D place preference test was used to assess anxiety-like behavior. The test apparatus (40Lx30Wx25H cm) was divided into equal zones (i.e., light or dark zones) with a doorway connecting the two sides. The light zone was very bright (600 lux) while the dark zone was protected from light by an opaque lid. To initiate testing, mice were placed into the light side and activity was recorded for 5 min. The level of anxiety is inversely correlated to the time spent in the light zone.

Forced Swimming test (FST)- Mice were placed an inescapable water-filled $(23^{\circ}C \pm 0.5)$ transparent tank (20 cm diameter, 40 cm deep) for 6 min, as previously described by Porsolt *et al.* (48). The immobility duration, was timed during the last four minutes of the test, as an indicator of resignation. A mouse was considered immobile when it remained floating with only slight movements to keep its head out of the water.

Sucrose preference- The sucrose preference test is based on the rodent interest in sweet solutions and used as an indicator of anhedonia. Mouse was placed in an individual cage and habituated to two water bottles for 24-hours. For the test, taking place during the 12 h dark session, the mouse had the choice to drink a 2% sucrose solution or tap water only. Sucrose preference was calculated as a percentage of the volume of sucrose intake over the total volume of fluid intake.

Novelty Suppressed Feeding (NSF)- NSF is a conflict test that elicits competing motivations: the drive to eat and the fear of venturing into the center of the brightly lit arena. The testing apparatus consisted of a plastic box, the floor of which was covered with approximately 2 cm of wooden bedding. Twenty hours prior to behavioral testing, all food was removed from the home cage. At the time of testing, a single pellet of food was placed on a piece of plastic at the center of the box, and the entire session was videotaped (i.e. 10 min period). The mouse was placed in a corner of the box and the latency to eat (defined as the mouse sitting on its haunches and biting the pellet) was timed. Immediately after the test, food consumption was measured for 30-min as a control for potential feeding differences.

Social interaction test- The social testing apparatus was a rectangular, three-chambered box with clear Plexiglas walls, and small circular openings (3.5 cm in diameter) that allowed for access to each chamber (25Lx15Wx20H cm). Three interconnected chambers were separated by manually-operated sliding doors. The test mouse was first placed in the middle chamber and allowed to explore the entire apparatus for a 5 min habituation period. At the end of the session, the test mouse was confined to the central chamber for 1 min by closure of the doorways between the two side chambers. A wire cup-like container was placed in the corner of each chamber; one was empty (*right chamber*), while the second (*left chamber*) contained an unfamiliar mouse with same genotype, sex and age range. Both doors to the side chambers were then unblocked and the test mouse was allowed to freely explore the entire test box for a 5 min period. The time spent in the right (*empty*) and left (*stranger mouse*) chamber was timed allowing for assessment of the interaction with an inanimate object *versus* sociability (49).

Learned Helplessness (LH)- The tested mouse was placed into a shock chamber and exposed to inescapable shocks comprised of 360 scrambled footshocks (intensity: 0.3 mA) with a 2 sec duration and an interval-episode of 10 sec, amounting to total session duration of 60 min. The shock procedure was repeated for four consecutive days. On the fifth day, learned helplessness was assessed by testing shuttle box performance. Each trial started with a 0.3 mA footshock with a maximum duration of 24 sec. The inter-trial interval was 60 sec. The following behavioral reactions were defined: "escape" as shuttling to the other compartment in reaction to the electric shock, and "failure" when no attempt to escape was made. Furthermore, the "escape latency" parameter was defined and recorded as the time needed to shuttle into the other compartment after onset of footshocks. The mice that failed to escape were excluded from the escape latency measurement. Total time of testing for helplessness lasted about 20-24 min, the exact time period depended on the animal's ability to learn the paradigm and to respond. Control animals underwent the same handling and contextual procedures without receiving the footshocks.

SI-MM3- *Hippocampal neurogenesis and neuronal survival.* Serial coronal sections of the brains were cut (40 µm) throughout the hippocampus (from bregma -1.34 to -3.52) on a vibratome (Leica). Every fifth section (eight in total) from throughout the hippocampus was processed for BrdU immunohistochemistry as follows. Free-floating sections were first incubated for 1 hour at room temperature in PBS containing 2.5% horse serum then overnight at 4°C with a mouse anti-BrdU antibody (1/7500; BD Pharmingen #555627) and finally for 2 hours in biotin-conjugated species-specific secondary antibodies (1:400; Vector Laboratories, CliniSciences, Nanterre, France) followed by a peroxidase-avidin complex solution according to the manufacturer's protocol. The peroxidase activity of immune complexes was visualized with DAB staining using the VectaStain ABC kit (Vector Laboratories). BrdU-labeled cells in the subgranular and granule cell layers were counted in each section at 40x magnification under a light microscope (Olympus). The number of BrdU⁺ cells *per* eight slices along the rostro-caudal axis was multiplied by five to obtain the total number of cells within the entire dentate gyrus.

Alternatively, free-floating sections mouse were incubated with mAb anti-BrDu (1/7500) combined with rabbit pAb anti-NeuN (1/1000, Abcam #Ab177487) or anti-doublecortin (DCX; 1/500 Santa Cruz Biotechnology #SC8066); secondary donkey anti-mouse or anti-rabbit mAb coupled to AlexaFluor 488 (Invitrogen) were used for double immunofluorescence staining.

SI-MM4- Quantitative reverse transcription (RT)-PCR- Total RNA was isolated from frozen brain tissues with Trizol (Merck, France) according to the manufacturer instructions. 2 μ g of total RNA was reverse transcribed using the Superscript III synthesis kit (Invitrogen, ThermoFisher, Courtaboeuf, France) then treated with RNase-free DNase (Invitrogen) for 30 min at 37°C. Diluted reactions were analyzed with SYBR green PCR reagents and a sequence detector (Rotor-gene 6000, Corbett Research, Qiagen). mRNA levels of mouse genes of interest were normalized to actin. The quality of the PCR was confirmed by control reactions without RT, slope of standard curves and dissociation curves of products. The primers used to evaluate the level of expression of various mouse genes were purchased from Qiagen (Valencia, CA, USA) and Eurogentec (Angers, France).

The following primers were purchased from Qiagen (Valencia, CA, USA): ApN (QT01048047), BDNF (QT01545348), VEGFα **Q**T00160769), IGF1 (QT00154469), NGF (QT00093464), TDO2 (QT00150409), CRF (QT00293489), GR (QT00160349), actin (QT01136772). The following primers were from Eurogentec (Angers, France): AdipoR1 forward 5'-CTTCTACTGCTCCCACAGC-3' and reverse 5'-GACAAAGCCCTCAGCGATAG-3'; AdipoR2 forward 5'-AGCCTATCTGCCCTATGGTG-3' and reverse 5'-CTGTGTGCTGGGCATTGCAG-3'; IDO1 forward 5'-CAAAGCAATCCCCACTGTATCC-5'-ACAAAGTCACGCATCCTCTTAAA-3'; 3' and reverse IDO2 forward 5'-CCTCATCCCTCCTTCCTTTC-3' and reverse 5'-GGAGCAATTGCCTGGTATGT-3' ; TDO1 forward 5'-AACATGCTCAAGGTGATAGCTC-3' and reverse 5'-GAACCGAGAACTGCTGTACCA-3'; KAT1 forward 5'-CGAAGGCTGGAAGGGATCG-3' and reverse 5'-GCGGTGAGAAGTCAGGGAA-3'; KAT2 forward 5'-ATGAATTACTCACGGTTCCTCAC-3' and reverse 5'-AACATGCTCGGGTTTGGAGAT-3'; KAT3 forward 5'-TTCAAAAACGCCAAACGAATCG-3' and reverse 5'-GATGACCAAAGCCTCTTGTGT-3'.

SI-MM5- Acute brain slices and whole-cell patch-clamp recordings. Mice were deeply anesthetized with halothane, decapitated and the brains were immediately placed into ice-cold gassed medium (95% $O_2/5\%$ CO₂) containing (in mM): 125 NaCl, 2.5 KCl, 1 MgCl₂, 0.4 CaCl₂, 1.25 NaH₂PO₄, 26 NaHCO₃ and 25 glucose. Coronal slices at the level of the fourth ventricle (350µM thick) were cut with an HM650V vibratome (Microm, Walldorf, Germany) and placed in a holding chamber at 34°C for 1 h. Slices were
then transferred at room temperature in Phosphate Bicarbonate Buffer Saline (PBBS) composed of (in mM): 125 NaCl, 2.5 KCl, 1 MgCl₂, 2 CaCl₂, 1.25 NaH₂P0₄, 26 NaHC0₃ and 25 glucose, pH 7.4 when bubbled with 95% $O_2/5\%$ CO₂.

Brain slices containing the raphe nucleus were placed under a Nomarski microscope (Zeiss, France) equipped with an infrared video camera (Axiocam, Zeiss, France) in a recording chamber superfused at a flow rate of 1 ml/min with oxygenated PBBS (2 mM CaCl₂). Recordings from median and dorsal raphe nucleus neurons were made at room temperature (25 ± 2°C) using an Axopatch 200B (Axon Instruments, USA). Patch clamp pipettes made from borosilicate glass capillary (Hilgenberg, Germany) had a resistance of 3-8 M Ω when filled with the internal solution containing (mM): 130 K gluconate, 1 MgCl₂, 0.3 CaCl₂, 1 EGTA, 4 Mg₂ATP, 0.4 Na₃GTP, 10 Hepes, pH 7.3. Neurons were first patch-clamped in the cell-attached mode to record spontaneous action potential firing and then in the whole-cell configuration in current clamp. Values of access resistance ranged from 12 to 20 M Ω and were not compensated. Measurements were made 2-3 min after obtaining the whole-cell to ensure dialysis. Cell capacitance and resistance were measured by voltage clamp using the pClamp Clampex software by applying 5 mV voltage steps. Solutions were applied in the bath. Current-clamp recordings were made in the IClamp mode of the Axopatch 200B. 5-HT neurons from dorsal raphe were identified using the following criteria: a slow (0.5–2.5 Hz) and regular firing rate, a long-duration action potential (50) and a large hyperpolarization of membrane potential in response to the application of 5-HT at the end of the recording (presence of 5HT1a auto-receptors).

Voltage-clamp experiments were performed with a KCl solution of the following composition (mM): 390 KCl, 5 MgCl₂, 1 CaCl₂, 10 Hepes, 10 EGTA, 4 Na₂ATP, 0.4 Na₃GTP (pH 7.3, 300 mOsm). Data were digitized at 5-10 kHz using a Digidata interface coupled to a microcomputer running pClamp 9 (Axon Instruments, USA) and digitally filtered at 1-3 kHz. Average data were expressed as mean \pm sem, n = number of neurons, N = number of mice.

SI-MM6- Plasma determination of AdipoRon and tryptophan metabolites. Plasma levels of AdipoRon, serotonin (5-HT), L-kynurenin (L-Kyn), tryptophan (Trp), kynurenin acid (KynA) were determined as follows: 25 µl of plasma was deproteinated with 150 µl of cold methanol, incubated on ice for 20 min then centrifuged at 10,000 x g for 10 min at 4°C; supernatants were dried under speed vacuum centrifuge then resuspended in 50 µl of a 90% water, 10% acetonitrile, 0.1% formic acid mixture. Determination of AdipoRon and metabolite amounts were performed in triplicate (5 µl of sample) and determined by liquid chromatography (HPLC, using a Dionex U3000 RSCL Instrument) coupled to an MS-MS equipped with an ESI source. The separation for Adiporon was performed using a Nucleodur C18 gravity-SB column (150 mm x2 mm i.d. x 1.8 µm) from Macherey-Nagel operated at a 350µl/min flow rate. The following elution program based on water (solvent A) and acetonitrile (solvent B), both containing 0.1% formic acid (v/v): 0 min 2%B, 15 min 34%B, 20 min 95%B. The separation conditions for 5-HT, L-Kyn, KynA and Trp were performed using an Accucore PFP colum n(150 mm x 2.1 mm i.d. x 2.6 µm) from Thermo Scientific operated at a 400µl/min flow rate. The following elution program based on water (solvent A) and acetonitrile (solvent B) both containing 0.1% formic acid (v/v): 0 min 0%B, 2 min 0%B, 8 min 6%B and 13 min 40%B. The Q-exactive plus spectrometer was completely controlled by the XCalibur software and operated in electrospray positive mode. Typical ESI conditions were as follows: electrospray voltage 3.5 kV; capillary temperature 320°C, probe temperature 350°C, sheath gas flow 40 U and auxiliary gas 12 U. It was operated in PRM (Parallel Reaction Monitoring) mode. The quadrupole was set to transmit the protonated molecular ions at m/z 429.21 for AdipoRon, m/z 209,09 for L-Kyn, m/z 205.09 for Trp, m/z 190.05 for KynA and m/z177.10 for 5-HT. The protonated molecular ions were fragmented by HCD (High Collision Dissociation) as shown in the table 1. Data acquisition and processing were carried out using XCalibur Quan-Browser software version 3.0.

Compound Name	Collision Energy	Fragment m/z
m/z value	(V)	value
AdipoRon	27	322.143
429.2172		174.127
L-Kyn	15	174.054
209.0921		146.059
Trp	35	188.0705
205.0971		146.0600
KynA	15	162 054
190.0498		102.004
5-HT	10	160.0757
177.1021		132.0809

Transitions from parallel reaction monitoring analysis

SI-MM7- 5-HT and 5-HIAA quantification in brain regions. The concentrations of serotonin (5-HT) and its metabolite 5-hydroxy-indol-acetic acid (5-HIAA) were quantified by HPLC. Dorsal raphe were homogenized by sonication in 0.1 N HCl and then centrifuged at 3 000 rpm for 10 min at 4°C. The supernatant was then filtered by centrifugation through a Nanosep 3K device (Pall Co Sigma) at 15 000 rpm for 30 min at 4°C, and then stored at -80 °C. Diluted samples (10 μ l, 1:20 in 0.1 N HCl) were injected into a reverse-phase HPLC column (Thermo HR-80 RP-18 column; 80 x 4.6 mm; 3 μ m). The mobile phase for the 5-HT/5-HIAA analysis was: 0.1 M NaH₂PO4, 0.1 mM EDTA, 2.75 mM octane sulfonic acid, 0.25 mM triethylamine, 15% methanol, 5% acetonitrile, pH 2.9 delivered at 0.7 ml/min by an ESA-580 pump. An ESA coulometric detector (ESA Coulochem III connected to a graphite-electrodes analytical cell, ESA 5014B) was used for electrochemical detection. The conditioning electrode was set at -0.175 mV and the detecting electrode was set at + 0.175 mV.

SI-MM8- *Immunoblotting.* Total proteins were extracted from mouse hypothalamus samples by homogenization in lysis buffer (50 mM Tris-HCl, pH 7.5, 150 mM NaCl, 5 mM EDTA containing 0.5% Triton X-100 and 0.5% sodium deoxycholate with a cocktail of protease and phosphatase inhibitors). Equal amounts of total proteins (50 μ g), as determined by the Bradford method (BioRad), were separated by 12% SDS-PAGE, then transferred to a nitrocellulose membrane (Schleicher & Schuell, Dassel, Germany). Blots were incubated in PBS 0.1% Tween 20, 2% BSA with mAb directed against phospho-AMPK α (Thr172; 1/1000; Cell Signaling #2535) or total AMPK (1/1000; Cell Signaling #2532), then with the appropriate HRP-coupled secondary mAb. Blots were developed using an enhanced chemoluminescence system (Immobilon, Merck Millipore) with a Fusion detector (Vilber). To correct for

any loading artifact, blots were re-probed with anti-actin pAb (Abcam #Ab8227). Densitometry analyses were performed with the "National Institutes of Health" Image software[™] on the immuno-positive bands.

RESULTS

SI-R1- Mice were *ip* injected with AdipoRon (1 mg/kg) or vehicle alone, then submitted to the FST 1 h or 3 h later. Compared to the vehicle, AdipoRon decreased the immobility time of wt mice when measured 1 h post-injection, whereas no significant effect was observed 3 h post-injection (Fig. S2A). Dose-response experiments were conducted on wt (Fig. S1B) and depression-like mouse models, namely cortico-treated (Fig. S2C), ApN^{-/-} (Fig. S2D) and LPS-treated mice (Fig. S2D). One hour post-injection, 0.5 mg/kg of AdipoRon significantly reduced the immobility time of wt and cortico-treated mice (Fig. S2B, C). Doses of 5 mg/kg and 1 mg/kg of AdipoRon were required to produce an effect in ApN^{-/-} (Fig. S2D) and LPS-treated mice (Fig. S2E). An alternative route of administration, i.e. *per os*, was then investigated. AdipoRon administered *per os* significantly reduced the immobility duration in the FST of both ApN^{-/-} and wt mice.

SI-R2- The possibility that AdipoRon could cross the blood-brain barrier and trigger activation of intracellular signaling pathways was investigated as follows. Plasma samples and brain regions of interest (hypothalamus, and hippocampus) were collected from mice at different time points after *ip* injection of 1 mg/kg AdipoRon. The kinetics of BBB crossing and the recovery rate of AdipoRon in plasma and brain samples were determined by HPLC coupled to MS/MS analysis. The highest amount of AdipoRon was measured 30 min post *ip* injection in plasma (Fig. S3A), the hypothalamus (Fig. S3B) and the hippocampus (1.41 nmol/g \pm 0.32) and then it decreased until it was barely detectable 3 hours post injection.

AdipoRon binds to ApN receptors activating various intracellular pathways, including AMPK phosphorylation (27). Immunoblot experiments were performed at different time points post *ip* injection of AdipoRon to determine the rate of AMPK phosphorylation within the hypothalamus. Interestingly, AdipoRon increased the level of phospho-AMPK 30 min and 1 hour post *ip* injection. These effects were no longer observable 3 hours post injection (Fig. 3D,E). We showed that AdipoRon can cross the BBB and directly target the brain by activating intracellular signaling pathways.

Figure S1- Absence of AdipoRon effects on locomotor and motor coordination.

Locomotor and exploratory activities (**A**, **B**) and motor coordination (**C**) of wt mice chronically treated with cortico (*dark gray*) or vehicle (*light gray*) with (+) and without (-) AdipoRon administration (*ip*, 1 mg/kg) were recorded in the open-field (OF) for 10 minutes (i.e. total distance (**A**) and mean speed (**B**) and in the rotarod (**C**) respectively, as described in the SI-MM2.





Figure S2: Α. Assessment of the antidepressant-like effect of an acute injection of AdipoRon using the FST. A. Ten-week-old male wt mice were ip injected with Adiporon (1 mg/kg, dark gray) or vehicle alone (light gray) one and three hours prior to the FST, which was performed as described in the SI-MM2. Untreated male wt mice (B), longterm treated mice with cortico in the drinking water (C) and ApN^{-/-} male mice were *ip* injected with the indicated concentration of AdipoRon (0.5 and 5 mg/kg) or vehicle alone (0) one hour prior the FST. E. Wt male mice were ip injected with LPS (0.83 mg/kg). 16 hours later, mice were ip injected with AdipoRon (1 mg/kg) or vehicle alone prior to the FST. F, G. AdipoRon (1 mg/kg) or vehicle alone was administered per os to wt (F) and ApN^{-/-} mice (G) one-hour prior the FST. The immobility time (in sec) was measured during the last four minutes of the six-minute test. Data are plotted as mean ± sem; each symbol represents a mouse; Kruskal-Wallis was followed by a Dunn's multiple comparison test (A, B, C, D). The Mann-Whitney statistical analysis was performed for comparison between two groups (**E**, **F**, **G**). ns, non-significant ; **P* < 0.05, ***P* < 0.01 ; ****P* < 0.001.



Figure S3- AdipoRon crosses the BBB and targets the brain.

The concentrations of AdipoRon were measured in plasma (**A**), and hypothalamus (**B**) by HPLC-coupled to MS-MS analysis as described in SI-MM6 at different time points post *ip* injection of 1 mg/kg AdipoRon. Data are mean \pm sem, area expressed in nM for the plasma and in nmol/mg of total protein for each region of the brain; N = 6 mice *per* group. **C**. Representative western blot showing the phosphorylation kinetics of AMPK in the hypothalamus from vehicle- (0) or AdipoRon-treated mice 30 min (0.5), 1 h, 3 h or 6 h post *ip* injection as assessed by western blotting (SI-MM8). **D**. Histogram showing the quantification of pAMPK levels expressed as fold-change compared to the vehicle-injected group. Data are expressed as mean \pm sem of the four independent experiments, N=2 *per* time point *per* experiment. Kruskal-Wallis was followed by a Dunn's post-hoc test for comparison with the vehicle control group; ns, non-significant; ***P* < 0.01.



Figure S4: Adiporon modulates serotonergic neuron activity and 5-HT turnover in dorsal raphe. **A.** Relative level of expression of ApN and ApN receptors in dorsal raphe from wt mice assessed by quantitative PCR (expressed in means Ct ± sem; N=4). **B.** Acute exposure of AdipoRon on dorsal raphe slices increased the frequency of discharge in action potentials and depolarized a presumed serotonergic neuron, which was characterized by its low frequency, regular pattern of discharge, and its hyperpolarizing response to an application of 5-HT at the end of the recording. Experiments were conducted as described in SI-MM5. **C.** The action potential frequency was measured for each recording using the clampfit threshold search method at one min intervals before and during application of AdipoRon (10 μ M). Data are expressed as mean ± sem; each symbol represents a neuron; Mann-Whitney statistical analysis was performed; **P* < 0.05. **D.** AdipoRon had no effect on the action potential discharge in a presumed serotonergic neuron. **E.** AdipoRon hyperpolarized a presumed non-5-HT neuron, which was characterized by its lack of response to a 5-HT application at the end of the recording.



A Relative level of gene expression in mouse dorsal raphe assessed by quantitative PCR (expressed in Ct mean ± sem)

DISCUSSION ET PERSPECTIVES

L'augmentation de l'incidence de la **dépression** dans le monde et les préjudices socioéconomiques dont elle est responsable motive la nécessité de trouver des traitements efficaces contre cette maladie. Les limites des traitements pharmacologiques ont encouragé le développement de thérapies non-pharmacologiques visant à augmenter les activités physiques, sociales et cognitives. Comprendre les mécanismes biologiques impliqués dans leurs effets bénéfiques pourrait conduire à l'identification de nouvelles cibles thérapeutiques. C'est dans ce contexte que le modèle murin d'environnement enrichi (EE) qui résume en quelque sorte ces thérapies « intégratives » a émergé. L'objectif global de l'utilisation du modèle d'EE par mon équipe était d'identifier de nouvelles molécules endogènes aux propriétés antidépressives.

Ainsi, le premier axe de mes travaux de thèse était centré sur la mise en place du modèle d'EE et l'évaluation de ces effets sur un modèle murin de dépression induite. Mon travail de thèse a permis d'apporter des précisions sur la validité et l'intérêt du modèle d'administration chronique de corticostérone (CORT) pour reproduire/induire pharmacologiquement un état dépressif (David et al., 2009; Gourley et al., 2008). Nous avons notamment montré que les souris traitées chroniquement par la CORT administrée dans l'eau de boisson présentaient un phénotype « anxiodépressif » dans les tests du Light&Dark, du LH et des interactions sociales. Nous avons montré pour la première fois que les souris dans ce modèle présentaient une augmentation de la neuroinflammation et un métabolisme du tryptophane altéré, au niveau central et périphérique. De plus, nous avons constaté une augmentation modérée du tissu adipeux blanc viscéral en l'absence d'une augmentation de la prise alimentaire. Nos résultats font écho à une autre publication montrant que l'administration de dexamethasone, un GC synthétique, induit une augmentation de l'adiposité viscérale et une augmentation de la lipogenèse (Vienberg and Bjornholm, 2014). Pour autant, il est envisageable que la durée de notre protocole (6 semaines) ne soit pas suffisamment longue pour que le traitement à la CORT induise tous les traits du syndrome métabolique. Cette hypothèse est appuyée par le fait que l'inflammation du tissu adipeux n'est pas avérée mais que l'expression de la chimiokine MCP-1 est augmentée dans la condition CORT par rapport aux souris contrôles. L'augmentation de MCP-1 qui est décrite pour orchestrer l'infiltration monocytaire (Kanda et al., 2006) pourrait indiquer le début d'une inflammation du tissu adipeux. De plus, le modèle CORT est basé sur l'augmentation des GCs observée chez les patients souffrant de dépression liée à un stress chronique et il est connu qu'un stress chronique diminue l'expression de PPARy dans le tissu adipeux ce qui favorise l'inflammation et l'intolérance au glucose (Pereira et al., 2016).

Il serait donc intéressant de voir les effets à plus long terme d'un tel traitement aux GCs. Ceci nous permettra de définir si le modèle CORT permet également de reproduire les dérégulations métaboliques souvent observées de façon concomitante avec la dépression. Si c'est la 1ère fois qu'une augmentation du tissu adipeux blanc est observée dans ce modèle d'administration chronique de CORT, l'opposé a aussi été décrit une fois. Une publication décrit en effet qu'un traitement chronique par la CORT diminue le poids des animaux et le poids du tissu adipeux blanc alors qu'il augmenterait en parallèle la taille des adipocytes (Yu et al., 2014). Cette différence de résultats pourrait s'expliquer par une différence dans la dose de CORT utilisée. La dose utilisée par Yu et collaborateurs est presque 3 fois supérieure à celle que nous avons utilisée dans mes travaux de thèse. En résumé, nos travaux ajoutés à ceux déjà publiés montrent la puissance du modèle CORT dans l'étude la dépression liée à un stress chronique. En effet, ce modèle reproduit au niveau central les différents stigmates « attendus » caractéristiques de la dépression et au niveau périphérique reproduit des problèmes métaboliques parfois retrouvés chez les patients dépressifs. De plus, ce modèle est sensible aux antidépresseurs et à l'EE ce qui fait de lui un atout dans la recherche d'approches antidépressives combinées résultant du dialogue entre la périphérie et le cerveau.

Nous avons montré que l'environnement enrichi a des effets antidépresseurs dans notre modèle de dépression induite pharmacologiquement et également dans un modèle génétique présentant un phénotype dépressif : les souris ApN^{-/-}. Nos travaux sont en adéquation avec de nombreuses publications montrant l'effet de l'EE dans d'autres modèles de dépression. Par exemple, sur un modèle de rat ayant subi un stress post-natal, 4 semaines d'hébergement en EE permettent d'inhiber les comportements de type dépressif (FST) et les troubles cognitifs associés à ce modèle (Cui et al., 2006). Après le protocole de stress, trois semaines d'EE permettent d'améliorer l'état « dépressif » d'un modèle de rats d'UCMS (McQuaid et al., 2013a; Veena et al., 2009; Zhang et al., 2011). Comme les effets de l'EE sont retrouvés dans plusieurs modèles, cela confirme leur consistance et polyvalence. Cependant, le modèle de l'enrichissement de l'environnement des souris de laboratoire est basé sur une comparaison différentielle des effets d'un enrichissement vis-à-vis des effets d'un environnement « appauvri » représenté par les conditions « standard » d'hébergement des animaleries. Il faut toutefois noter que les nouvelles règles éthiques imposent désormais un minimum d'enrichissement dans chaque cage. En effet, il y a eu une évolution des normes classiques d'hébergement dans les laboratoires avec la directive 2010/63/UE.

Un autre élément est à prendre en considération : nos travaux ont été réalisés sur la souche C57BL/6 qui a déjà tendance à développer des réactions comportementales anxio-dépressives en hébergement standard en comparaison à d'autres différentes souches de souris (Fureix et al., 2016). Comme chez l'Homme, il existe chez la souris une hétérogénéité face à la sensibilité à la dépression. Il en est de même pour la capacité de résilience, c'est à dire la capacité à faire face à des évènements plus ou moins traumatisants qui est très variable d'un individu à l'autre. Si cette variabilité est due à de nombreux facteurs environnementaux, certains mécanismes impliqués dans la capacité de résilience commun à l'homme et la souris (Heshmati et al., 2018). Cela renforce l'hypothèse que l'étude de l'EE pourrait permettre d'identifier de nouvelles cibles thérapeutiques.

Cependant, ces différentes données nous amènent à nous poser la question suivante :

Les effets bénéfiques de l'EE sur la dépression sont-ils transposables à l'Homme ? En effet, il est rare, pour l'homme de vivre dans un environnement « appauvri » ressemblant à l'environnement standard des souris de laboratoire et nous tendons pour la majorité vers une vie type « EE ». Cependant, par la nature même de la pathologie, la dépression va conduire l'individu déprimé à appauvrir son environnement (isolation sociale, manque de motivation donc, sédentarité qui augmente et activité cérébrale qui diminue). Ainsi le replacer dans des conditions de vie « stimulantes » pourrait déjà avoir des bénéfices. Il y a d'ailleurs une évolution dans ce sens des mentalités dans la prise en charge thérapeutique de la dépression qui a longtemps été réduite à la combinaison médicament/psychothérapie. L'EE souligne l'importance d'adopter une vision plus intégrative dans la prise en charge des patients dépressifs où se combineraient approche médicamenteuse, séances de psychothérapie et prise en charge physique.

Pourquoi ne pas se contenter d'accentuer cet « enrichissement de l'environnement » en cas de dépression pour en ressentir les bénéfices ? Tout d'abord, il n'existe pas de consensus sur la mise en place d'un « EE » chez l'Humain. Vu le nombre de stimulations existantes, il sera compliqué d'établir un cahier des charges « universel » pour bâtir un protocole clinique. Le développement d'une thérapie basée sur l'EE ne trouvera sa place que parallèlement à celui de la médecine personnalisée qui consiste à adapter les traitements en fonction des caractéristiques des patients. Si une prise en charge personnalisée où seraient regroupés des patients présentant des besoins similaires en termes de stimulations pourrait être mise en place, il faudra tenir compte de la complexité de la psychologie humaine : nous ne sommes pas tous égaux, et les stimulations environnementales n'auront pas le même effet sur tous.

Par exemple, il existe une diversité dans la réponse physiologique entre les femmes et les hommes. Parmi ces différences on retrouve la réponse cérébrale vis à vis d'un stimuli visuel (Rupp and Wallen, 2008) ou encore lors de la réponse à un événement stressant (Helbig and Backhaus, 2017). Ces différences dans la réponse physiologique qui existent entre les genres sont retrouvées chez la souris. Il existe des inégalités dans les effets bénéfiques de l'EE entre les mâles et les femelles sur la mémoire spatiale (Chamizo et al., 2016) et dans la réponse au stress (Tzeng et al., 2016). De plus, les différences peuvent être induites par la qualité de l'enrichissement où une même souche de souris peut avoir une réponse comportementale différente selon l'enrichissement qui lui est proposé (Tucci et al., 2006). Tout en gardant en mémoire l'existence de ces variabilités, l'étude de l'EE permettra d'approfondir l'étude de la dépression et probablement d'identifier de nouvelles cibles thérapeutiques.

Nos résultats montrent que l'EE inhibe l'apparition d'un état de type anxio-dépressif induit par un traitement chronique par la CORT. A la recherche de similitudes avec les traitements antidépresseurs et par rapport à l'étendue des données bibliographiques concernant les effets de l'EE ou de l'exercice physique sur la neurogenèse, nous avons regardé l'impact de l'EE sur la neurogenèse dans le modèle CORT. Nos résultats montrent que 6 semaines d'hébergement en EE augmentent la neurogenèse hippocampique et que l'EE s'oppose aux effets néfastes de la CORT sur la neurogenèse. Alors que la diminution de la neurogenèse n'induit pas forcément un état dépressif, sa stimulation par les traitements fait partie des caractéristiques souvent associées à l'obtention d'effets antidépresseurs (Eliwa et al., 2017). L'EE rétablit la neurogenèse en partie en augmentant l'expression des facteurs neurotrophiques. Par exemple, une étude réalisée au laboratoire a montré dans des conditions basales que l'EE augmentait l'expression de facteurs neurotrophiques (BDNF, IGF) (Zarif et al., 2017) mais également la densité synaptique (Hosseiny et al., 2015) qui peut être altérée dans la dépression. D'autres travaux réalisés sur un modèle type UCMS indiquent que l'EE augmente la neurogenèse via l'augmentation de l'expression de BDNF et VEGF (Shilpa et al., 2017), et de TrkB (Seong et al., 2018). De plus, nous avons montré que l'hébergement en EE diminue la concentration de CORT dans les fèces des animaux traités par la CORT en comparaison à ceux hébergés en ES. Cela signifie que l'EE est capable de s'opposer à l'augmentation en périphérie de la CORT normalement attendue en cas d'apport continu par l'eau de boisson de CORT. L'EE contribue donc à limiter l'hyperactivation de l'axe HPA associée à cette augmentation de CORT circulante. Cette diminution des taux de corticostérone par l'EE a été retrouvée dans différents modèles de dépression (Branchi et al., 2013; McQuaid et al., 2013a; Vega-Rivera et al., 2016).

Récemment il a été démontré que l'EE diminuait la translocation du GR vers le noyau dans des conditions de stress traduisant une diminution de son activation (Novaes et al., 2017). D'autres travaux ont montré qu'en conditions de stress l'expression du MR et le ratio MR/GR sont diminués au niveau de l'hippocampe et l'EE rétablit les niveaux d'expression du MR au dépend du GR. Le GR étant responsable des réponses associées au stress, le rétablissement de l'équilibre MR/GR permet de limiter l'hyperactivation de l'axe HPA (Zhang et al., 2011).

La suite de mon travail de thèse a permis d'identifier l'ApN comme étant une nouvelle voie thérapeutique possible dans le traitement de la dépression. Différentes publications associent de faibles taux d'adiponectine à l'état dépressif et nous avons montré que l'absence d'ApN supprime une partie des effets bénéfiques de l'EE, attribuant à l'ApN des effets antidépresseurs. Ces résultats confirment l'intérêt d'étudier l'ApN et ses différentes voies de signalisation dans le traitement de la dépression. Par exemple, activer les AdipoRs avec des agonistes (AdipoRon ou l'Osmotine (Narasimhan et al., 2005)) ou cibler les dérivés des différentes voies de signalisation de l'ApN pourrait avoir un potentiel thérapeutique. Il serait également intéressant d'augmenter directement la transcription/traduction de l'ApN. Par exemple, il a récemment été montré que l'Exendine-4 augmente la sécrétion d'ApN par les adipocytes (Wang et al., 2017a), et que celle-ci aurait des propriétés « antidépressives » sur les symptômes de type dépressif liés à une infection au LPS (Ventorp et al., 2017). Une autre approche pourrait cibler le promoteur du gène de l'adiponectine qui contient des éléments de réponse pour PPARγ (Liu and Liu, 2009), un régulateur clef du métabolisme lipidique et glucidique. L'utilisation d'agonistes de PPAR γ (de la famille des thiazolidinedione) améliore la sensibilité à l'insuline chez la souris et également les taux plasmatiques d'ApN (Pajvani et al., 2004). De plus, un agoniste de PPAR_Y (pioglitazone) de la même famille a des effets antidépresseurs sur le modèle d'UCMS (Kurhe and Mahesh, 2016). Ainsi, agir sur d'autres facteurs permettant l'augmentation de la sécrétion d'ApN pourrait être une autre façon d'améliorer l'état dépressif.

Nos résultats révèlent qu'un des intérêts thérapeutiques de l'ApN serait que ses effets antidépresseurs sont indépendants de la neurogenèse. Ces résultats pourraient être perçus comme en contradiction avec un article publié dans le journal PNAS par un groupe de recherche chinois (Yau et al., 2014) qui décrit que l'absence d'ApN supprime les effets neurogéniques de l'EE. La différence majeure avec notre étude est que l'étude de Yau et collaborateurs ne porte que sur les effets de l'exercice seul qui ne peut être assimilable à la complexité des stimulations apportées par l'EE.

L'EE qui a des effets pléiotropiques stimule plus de systèmes physiologiques/biologiques que l'exercice physique seul. Par exemple, les effets de l'EE et de l'exercice seul sur l'angiogenèse dans le SNC ont été comparés chez des rats. Alors que l'EE augmente l'angiogenèse dans l'hippocampe et le cortex préfrontal, l'exercice physique n'a d'effet qu'au niveau de l'hippocampe (Ekstrand et al., 2008). Une autre étude montre que les effets de l'EE sur la neurogenèse implique une augmentation de la survie des nouveaux neurones alors que les effets de l'exercice physique semblent être associés à une augmentation de la prolifération (Olson et al., 2006). D'une part, cela confirme que les effets bénéfiques de l'EE ne sont pas uniquement dus à l'exercice physique. D'autre part, cela n'exclut pas que si l'ApN est importante dans les effets pro-neurogenèse induits par l'exercice, son absence serait compensée en EE par d'autres mécanismes moléculaires liés aux stimulations sociales et cognitives. D'ailleurs, d'autres travaux ont décrit que la neurogenèse n'était pas essentielle à la mise en place de certains effets antidépresseurs de l'EE. L'inhibition de la prolifération cellulaire par irradiation aux rayons X au niveau de l'hippocampe n'empêche pas l'EE de conserver ces effets antidépresseurs (dans le NSF et la Piscine de Morris) (Meshi et al., 2006). Enfin, la fluoxetine exerce ses effets antidépresseurs via 2 voies distinctes, dépendante et indépendante de la neurogenèse (David et al., 2009). Cet aspect dépendance/indépendance de la neurogenèse apporte une plus-value à l'ApN. En effet, puisqu'elle semble avoir des effets antidépresseurs indépendants de la neurogenèse, l'ApN pourrait être utilisée en complément de traitements dépendants de la neurogenèse. D'ailleurs le long délai d'apparition des effets antidépresseurs des traitements classiques est en partie expliqué par le temps nécessaire à la création de nouveaux neurones matures au cours de la neurogenèse. Les effets antidépresseurs de l'ApN indépendants de la neurogenèse devraient être plus précoces et pourraient apporter des bénéfices plus rapides aux patients.

Cette rapidité d'action est une des caractéristiques de l'AdipoRon. Nous avons montré qu'il était capable de franchir la BHE car il est retrouvé, 30 min après son injection périphérique, dans l'hypothalamus et dans l'hippocampe. De plus, 45 min après son injection, l'adipoRon diminue le temps d'immobilité dans le FST. Deux semaines de traitement chronique par l'AdipoRon suffisent à s'opposer aux différents troubles induits par la CORT. Ces résultats renforcent l'intérêt d'étudier les agonistes des AdipoRs comme l'AdipoRon. Par exemple, l'osmotine n'a jamais été étudiée dans un contexte de dépression car elle ne pourrait franchir la BHE que dans certaines conditions expérimentales extrêmement strictes (Amin et al., 2017). Cependant il existe d'autres agonistes de l'ApN dont les effets ont majoritairement été étudiés sur le métabolisme ou le cancer (Sun et al., 2013).

Par exemple l'ADP355, capable de limiter la prolifération cellulaire dans le cancer du sein (Otvos et al., 2011) réduit la fibrose observée dans le foie de souris traitées par du carbone tétrachlorure. D'ailleurs, les effets de l'ADP355 sur ce modèle sont associés à une augmentation de la phosphorylation de l'AMPK dans le foie (Kumar et al., 2014). Ce même agoniste est capable de limiter les troubles métaboliques (dyslipidémie et résistance à l'insuline) induits par des inhibiteurs de protéases qui sont utilisés lors de thérapies contre l'HIV (Pepping et al., 2014). Le GTDF, un autre agoniste, est capable de s'opposer aux effets de la dexamethasone sur l'atrophie musculaire de façon similaire à l'ApNg (Singh et al., 2017). L'efficacité de ces agonistes à reproduire les effets de l'ApN encourage l'étude de leur capacité à atteindre le SNC et de leurs effets antiinflammatoires ou antidépresseurs.

Le passage de la BHE par les candidats médicaments est souvent perçu comme un prérequis à leur intérêt thérapeutique dans le cadre des maladies cérébrales. Si cette caractéristique semble indiscutable pour l'AdipoRon, le passage de l'ApN semble tributaire des conditions expérimentales/pathologiques. Nous avons montré que les niveaux d'ApN étaient inchangés en périphérie mais qu'ils étaient augmentés dans le LCS uniquement dans la condition EE+CORT. Ces résultats suggèrent que dans des conditions pathologiques (ici induites par la CORT), l'EE favoriserait le passage de l'ApN (et probablement d'autres molécules) pour lutter contre la pathologie ou que l'ApN serait produite dans ces conditions au niveau local. L'action de l'EE sur la BHE relèverai donc de la mise en place d'un mécanisme de protection endogène. Cependant, si l'ApN a été dosée dans le LCS chez l'Homme et la souris, son origine dans le SNC a été longtemps débattue (Neumeier et al., 2007) et le mécanisme par lequel l'ApN traverse la BHE est encore inconnu. Il est possible que l'ApN atteigne le parenchyme au travers des OCVs ou d'un système de transport au niveau de la BHE. La découverte d'un réseau de vaisseaux lymphatiques dans le cerveau (Louveau et al., 2015) amène l'hypothèse que l'ApN pourrait être transportée dans le SNC via ce système puisque ses différentes formes ont déjà été retrouvées dans la lymphe (Miller et al., 2011). Dans l'absence de données concernant le mécanisme par lequel l'ApN atteint le cerveau, nos travaux suggèrent que l'une des « portes d'entrée » pourrait être l'éminence médiane de l'hypothalamus. En effet, nous avons observé une activation neuronale au niveau de l'hypothalamus après l'injection d'ApN. Cependant, seulement 5% des molécules transportées de la périphérie vers le cerveau passent par les OCVs, les 95% restants sont dépendants de la BHE (Plotkin SR, 1996). Les cellules responsables du passage de molécules entre le sang et le SNC sont les tanycytes. Il a récemment été démontré que le passage de la leptine dans le SNC est dépendant de ce type cellulaire (Balland et al., 2014).

Aucune donnée n'a été publiée à ce jour concernant l'ApN. Il serait intéressant à l'avenir d'étudier l'interaction entre l'ApN et les cellules impliquées dans le contrôle du passage de molécules à travers la barrière sang/LCS comme les tanycytes ou les cellules épithéliales des plexus choroïdes. Ceci pourrait se faire par des études in vitro, notamment sur la lignée ECPC4, une lignée murine immortalisée de cellules de plexus choroïdes issues de souris. Il serait alors possible de vérifier l'expression des AdipoRs sur ces cellules et si l'application d'ApN induit la production de 2nd messagers propres aux voies de signalisation de l'ApN. Ces expériences permettraient de statuer sur la possibilité que le marquage c-fos retrouvé dans l'hypothalamus soit une conséquence indirecte de la fixation de l'ApN sur les plexus choroïdes. Elles permettraient également de savoir si l'activation de c-fos observée pourrait être liée aux effets directs de l'ApN sur les neurones. Ensuite, nous pourrions caractériser la réponse de ces cellules en présence de CORT ou de LPS pour caractériser les modifications biologiques associées à des conditions « pathologiques ». En effet, l'expression de certains marqueurs d'adhésion (VCAM, ICAM) reflète l'intégrité et indirectement la perméabilité la BHE. Ce modèle in vitro pourrait aussi nous permettre d'étudier le transport de l'ApN au travers de l'épithélium formé par les ECPC4. Enfin, si les résultats s'avéraient concluants, l'étude in vivo des modifications induites par l'EE sur les plexus choroïdes, en conditions physiologiques ou pathologiques pourrait être réalisée.

Ainsi, les effets antidépresseurs de l'ApN observés 3h après injection i.v. combinés à l'activation des neurones, uniquement dans la condition EE+CORT, suggèrent que les neurones de l'hypothalamus sont la 1ère cible au niveau central de l'ApN, que ce soit par une activation directe ou indirecte. La modulation des circuits hypothalamiques par l'ApN pourrait être responsable de ces effets antidépresseurs « rapides » car les niveaux d'APN modulent le potentiel de membrane – la polarisation- des neurones du PVN (Hoyda and Ferguson, 2010). Une autre cible de l'ApN serait périphérique puisque l'ApNg inhibe la sécrétion de corticostérone sur une lignée de cellules murines surrénaliennes (Li et al., 2009). Sur le long terme, l'ApN pourrait diminuer l'hyperactivation de l'axe HPA observée dans la dépression ce qui participerait aux effets antidépresseurs de l'EE. Cette diminution pourrait être traduite par une diminution au niveau central de l'expression de CRH ou d'ACTH, ou bien de l'expression ou de la translocation nucléaire du GR. Ces hypothèses sont encore à tester. De plus, les effets de l'ApN au niveau du SNC dans des zones impliquées dans la dépression comme le cortex préfrontal, le noyau du raphé dorsal ou encore l'amygdale restent peu explorés. Il existe quelques travaux concernant l'hippocampe où l'ApN a un effet neuroprotecteur dans des conditions d'excitotoxicité induite soit par application de kaïnate (Qiu et al., 2011) soit par application de glutamate (Yue et al., 2016).

Dans ces modèles de toxicité glutamatergique, l'ApN protège les neurones en inhibant la production de ROS et en activant la voie de l'AMPK. Ces résultats font écho à ceux obtenus lors de ma thèse dans un autre type cellulaire, la microglie, où nous avons démontré que l'ApN inhibait la production de ROS et activait la voie de l'AMPK lors d'une réponse inflammatoire. Cependant, il semblerait l'activation de l'AMPK ne soit pas le seul mécanisme associé à des effets bénéfiques puisqu'une publication de 2017 sur l'AdipoRon montre que ses effets bénéfiques, dans un modèle d'ischémie cardiaque en condition de diabète, sont à la fois dépendants et indépendants de la voie de l'AMPK (Wang et al., 2017b).

Les nombreux effets de l'AdipoRon (Chapitre 3 II.B), de l'EE (Chapitre 2 I.B) sur le système vasculaire ouvrent la possibilité que leurs effets bénéfiques sur la dépression et plus globalement sur le SNC passent par une amélioration du réseau vasculaire. Par exemple, l'EE augmente la vascularisation cérébrale dans un modèle de souris diabétiques (Beauquis et al., 2010) et diminue la mort neuronale et les symptômes cognitifs dans un modèle de « démence vasculaire » (Jin et al., 2017). Concernant l'ApN, certaines publications mettent également en avant son rôle dans la mise en place et le maintien du réseau et de la fonction vasculaire. Par exemple, une publication récente a mis en évidence une corrélation entre des faibles taux circulants d'ApN et le retard de la vascularisation de la rétine chez des enfants prématurés (Fu et al., 2018). Les auteurs ont reproduit ces conditions pathologiques chez la souris et ont montré que l'injection d'ApN ou d'AdipoRon pouvait rétablir la vascularisation et ainsi empêcher les dommages associés comme la cécité. De plus, l'ApN contrecarre les effets de l'accumulation d'acides gras libres sur la fonction endothéliale (Wang et al., 2012) et favorise la vasodilatation (Hattori et al., 2003). Enfin, l'ApN inhibe l'apoptose des cellules endothéliales se trouvant au niveau des artères (Kobayashi et al., 2004) et des cardiomyocytes (Shibata et al., 2005). Kobayashi et coll. mettent en avant que les propriétés protectrices de l'ApN ne sont dues qu'à sa forme de haut poids moléculaire, suggérant une différence d'effet selon la conformation de l'ApN. De plus, l'ApNg, comme l'ApN-FL (full-Length), induit la phosphorylation de l'AMPK dans le muscle squelettique alors que dans le foie seule l'ApN-FL a cet effet (Yamauchi et al., 2002). Ces données nous rappellent que les différentes formes de l'ApN n'ont pas la même affinité pour les 2 AdipoRs (Chapitre 3 I.B) attribuant ainsi certaines des propriétés de l'ApN soit aux formes de haut poids moléculaire plutôt qu'à celles de faible poids moléculaire, et vice-versa. Ainsi, il est possible que les agonistes synthétiques de l'ApN, ou l'ApNg exogène ne reproduisent pas à l'identique les effets de l'ApN endogène (et de ses différentes formes).

De plus, l'ApNg n'a été dosée que dans le plasma (Fruebis et al., 2001) mais pas -encore- dans le SNC. C'est pourquoi afin de caractériser au mieux les effets de l'ApN sur la microglie, nous avons utilisé les formes globulaires et « full-length ».

Nos résultats concernant l'EE, l'ApN et l'adipoRon suggèrent que la réduction de l'état dépressif est associée à une réduction de la neuroinflammation. Cependant, nos travaux ne nous permettent pas de savoir si la réduction de la neuroinflammation induit une diminution des symptômes dépressifs ou bien si c'est la diminution de l'état dépressif qui réduit la neuroinflammation. Chez les rats, l'administration de célécoxib, un anti-inflammatoire nonstéroïdien (AINS), sur une durée de 14 à 21 jours a des effets bénéfiques sur l'état dépressif des modèles : UCMS (Guo et al., 2009) et la bulbectomie (Myint et al., 2007). Chez la souris, les AINS ont un effet antidépresseur dans un modèle d'obésité (Kurhe et al., 2014), dans un modèle d'hépatite auto-immune (EM et al., 2016) et la combinaison d'AINS et de Bupropion - un antidépresseur utilisé aussi dans l'aide au sevrage tabagique - a un effet antidépresseur dans un modèle d'inflammation chronique induite par l'adjuvant de Freund (Maciel et al., 2013). Chez l'Homme, l'analyse des essais cliniques est plus complexe car il existe une variabilité entre les cohortes (âge, sexe, atteint d'une maladie inflammatoire ou pas...) et les critères d'évaluation de l'état dépressif varient selon les études. Cependant, de nombreux travaux montrent que les AINS (Aspirine, Célécoxib ou ibuprofène) induisent une amélioration de l'état dépressif uniquement lorsque les patients présentent au départ une inflammation périphérique (Almeida et al., 2012; Pasco et al., 2010) (Iyengar et al., 2013). Lorsque le patient souffre « uniquement » de dépression, l'association d'un ISRS avec du Célécoxib améliore significativement l'état dépressif (Abbasi et al., 2012; Akhondzadeh et al., 2009; Majd et al., 2015). Il est donc tentant de penser qu'il existe un sous-type de dépression à composante inflammatoire où les patients ne répondant pas aux antidépresseurs classiques auraient besoin d'un traitement anti-inflammatoire additionnel. Donner aux personnes résistantes aux traitements antidépresseurs des antiinflammatoires semble une piste intéressante mais les AINS sont associés à de nombreux effets secondaires lorsqu'ils sont pris sur le long terme (augmentation des risques de thrombose, d'hypertension et d'athérosclérose) (Kopschina Feltes et al., 2017). De plus, la combinaison ISRS + AINS a été souvent associée à une augmentation des saignements, y compris au niveau cérébral (Shin et al., 2015; Varney et al., 2017). Enfin, certaines publications suggèrent des effets antagonistes de l'utilisation d'AINS qui en complément d'ISRS pourraient diminuer leurs effets antidépresseurs chez la souris et chez l'Homme (pour revue (Warner-Schmidt et al., 2011)).

Le caractère récent de la théorie de la neuroinflammation et le manque d'analyses cliniques basées sur des critères identiques peuvent expliquer les différences de résultats obtenus selon les publications. D'ailleurs une étude clinique parue en 2000 (Lanquillon et al., 2000) montre que les patients répondant positivement à un traitement par un antidépresseur tricyclique avaient au départ moins d'IL-6 circulante que ceux ne répondant pas. Alors que les taux de TNF α étaient élevés au départ dans les 2 groupes, seul le groupe répondant au traitement présentait une diminution des taux plasmatiques de TNF α à la fin de l'étude. Ces travaux suggèrent que si la réponse aux traitements pourrait être « anticipée » en fonction de la quantité plasmatique d'IL-6 initiale, la concentration de TNF α serait en corrélation avec la réponse clinique. Cependant la méta-analyse de (Strawbridge et al., 2015) montre que le TNF α serait le marqueur de la dépression résistante aux traitements pharmacologiques plutôt que l'IL-6. La conclusion la plus simple serait que devant l'absence de documents rapportant une corrélation avérée et fiable entre les marqueurs inflammatoires périphériques et centraux, leur utilisation comme marqueur de diagnostique ou prédictif de l'évolution de la dépression n'est pas encore d'actualité, même si le concept est extrêmement intéressant.

Cela nous rappelle que les cytokines inflammatoires sont fortement affectées par des facteurs environnementaux (âge, genre, obésité, activité physique, cigarette...) et que l'hétérogénéité de la dépression induit une variabilité interindividuelle. D'ailleurs, dans le modèle CORT utilisé pendant ma thèse, il n'y a pas d'inflammation périphérique (dosage des cytokines dans le plasma) alors qu'il y a une neuroinflammation. Comme proposé par (Carvalho et al., 2014), il serait plus judicieux de caractériser l'état inflammatoire des monocytes (ou de la microglie) pour détecter la neuroinflammation et déterminer l'éventuelle réponse aux antidépresseurs, plutôt que de doser directement les taux plasmatiques de cytokines. Lors de ma thèse, nous avons montré que l'EE comme l'ApN diminuait l'état pro-inflammatoire induit par la CORT de la microglie et des macrophages du cerveau. Cette caractérisation sera réalisée prochainement sur le modèle CORT avec l'adipoRon. En accord avec d'autres travaux, l'ApN ne semble pas avoir d'effet antiinflammatoire mais plus des effets pro-inflammatoires sur les astrocytes (Wan et al., 2014). Cependant, nous avons montré par des expériences de co-culture des 2 types cellulaires que les effets anti-inflammatoires de l'ApN sur la microglie sont suffisants pour limiter l'état proinflammatoire des astrocytes, suggérant l'existence d'un dialogue entre les deux types cellulaires. Depuis le début de ma thèse, la technique permettant de récupérer différentes populations cellulaires du cerveau utilisée au laboratoire a évolué, permettant ainsi d'isoler d'un cerveau de

souris un nombre suffisant de microglies et d'astrocytes pour faire des analyses ou des expériences *ex-vivo*. Ceci réduit le nombre d'animaux utilisés et permet d'avoir un rendement reproductible entre les expériences. Il serait intéressant d'étudier les effets de l'EE, de l'ApN et de l'AdipoRon sur d'autres populations de cellules retrouvées dans le cerveau comme les astrocytes, les oligodendrocytes, les lymphocytes T et B, ou encore les mastocytes (Korin et al., 2017). Les effets anti-inflammatoires pourront être en plus étudiés précisément dans des régions du cerveau associées à la dépression comme l'hippocampe, l'hypothalamus ou le cortex préfrontal. Cette analyse plus complète permettra éventuellement d'identifier d'autres acteurs des effets de l'EE.

Parmi les adipokines sécrétées par le tissu adipeux blanc, la leptine est également associée à des pathologies inflammatoires. Cependant, à l'inverse de l'ApN, la leptine aurait un rôle proinflammatoire plutôt qu'anti-inflammatoire. En effet, son expression est en corrélation avec une augmentation de l'état inflammatoire dans des pathologies comme l'obésité, le diabète de type 2, le psoriasis, et aussi dans des troubles cognitifs (pour revue (Paz-Filho et al., 2012). À la différence de l'ApN, la leptine se trouve augmentée chez les patients obèses (Stachowicz et al., 2013). De plus, certains travaux ont associé des hauts taux plasmatiques de leptine avec un état d'anxiété/dépression retrouvé chez les patients souffrant d'anorexie mentale (Misra and Klibanski, 2014). Une augmentation plasmatique de la leptine a été observée chez des hommes souffrant de dépression (Esel et al., 2005) et chez des femmes souffrant de dépression post-partum (Yildiz et al., 2017). A l'inverse, chez des personnes bipolaires traversant une phase dépressive, les taux de leptine sont diminués (Cordas et al., 2015). La différence entre ces travaux est certainement associée aux différents « types » de dépression, cependant ces 3 études montrent qu'un traitement antidépresseur, qu'il soit efficace ou non, n'a pas d'impact sur les taux plasmatiques de leptine. Les résultats obtenus chez la souris sont plus homogènes. Les troubles dépressifs observés dans un modèle d'obésité (HFD) ont été associés à une diminution de la leptine dans l'hippocampe. De plus, l'injection sous-cutanée ou ICV de leptine a des effets antidépresseurs sur ce modèle (Yamada et al., 2011). Une diminution de l'expression de la leptine et de son récepteur a été constatée au niveau de l'hypothalamus dans le modèle d'UCMS (Ge et al., 2013). Enfin, des souris KO pour le récepteur de la leptine présentent un comportement dépressif qui n'est pas réversé par l'exercice physique (Liu et al., 2017). Les études sur le rongeur suggèrent que des faibles taux de leptine sont associés à la dépression comme l'ApN, or les effets de la leptine sur la microglie sont à l'opposé de l'ApN. En effet, la leptine active l'état pro-inflammatoire de la microglie en activant la voie NF-κB et la libération d'IL-6 (Tang et al., 2007). Ainsi, il est possible que les effets de la leptine dans la dépression

soient indépendants de ses effets sur l'inflammation. Il serait donc intéressant de caractériser l'importance de la leptine dans les effets bénéfiques de l'EE.

L'inflammation observée chez les personnes dépressives est souvent associée à une augmentation du métabolisme de la kynurénine. Nos travaux montrent notamment que l'AdipoRon est capable de s'opposer aux effets de l'inflammation sur la voie des kynurénines et de limiter la transformation du tryptophane en kynurénine. Le tryptophane étant à l'origine à la fois de la 5-HT et de la kynurénine, cibler et limiter sa transformation en kynurénine permettrait de privilégier la formation de 5-HT ce qui pourrait être une voie alternative contre la dépression.

Comme la neuroinflammation, le microbiote intestinal contrôle le métabolisme du tryptophane et pourrait ainsi avoir un impact sur notre santé mentale. Cette hypothèse est appuyée par des travaux réalisés chez le rongeur montrant que la déplétion du microbiote intestinal induit des comportements de type anxio-dépressifs (Desbonnet et al., 2015; Hoban et al., 2016). Le microbiote participe au développement et à la régulation du système immunitaire (Round and Mazmanian, 2009) qui régule le métabolisme de la kynurénine. L'absence de microbiote (chez les souris « Germ-Free ») empêche la maturation complète du système immunitaire (Hooper et al., 2012) et ces souris ont une diminution du ratio KYN/TRP qui peut être normalisé par l'introduction d'une flore microbienne à l'adolescence (Clarke et al., 2013). La balance entre l'utilisation du tryptophane par les bactéries, sa synthèse, la production de 5-HT ou de kynurénine semble jouer un rôle important dans la disponibilité du tryptophane circulant pour l'organisme. Enfin, le microbiote intestinal a le potentiel de contrôler la distribution du tryptophane et de la kynurénine et donc leur destin dans le SNC. Par exemple, alors que la KYN et le TRP peuvent atteindre le cerveau via des transporteurs d'acides aminés, le KYNA et QUIN ne peuvent traverser la BHE. Or, le microbiote intestinal peut moduler l'intégrité de la BHE et modifier sa perméabilité (Braniste et al., 2014). Il existe ainsi différents liens entre le microbiote-intestinal, les différents métabolites du tryptophane et la neuroinflammation.

Récemment, il a été montré un lien entre le microbiote intestinal et la sécrétion d'ApN par le tissu adipeux (Taira et al., 2015). Le microbiote contrôle l'expression de facteurs de transcription, dont PGC1 α qui lui régule la transcription de l'ApN. Cette succession d'évènements est dépendante de plusieurs facteurs, à commencer par la proportion de certaines souches bactériennes. De plus, la composition du microbiote est dépendante de facteurs environnementaux comme le stress, le tabac, l'alcool, la sédentarité ou des régimes alimentaires déséquilibrés.

Par exemple, chez le rat, des régimes trop gras ou trop sucrés entraînent un déséquilibre du microbiote conduisant à des troubles cognitifs (Noble et al., 2017a; Noble et al., 2017b). De plus, il a été décrit qu'une administration chronique de dexamethasone altère la composition du microbiote intestinal (Wu et al., 2018), ainsi il est possible que dans nos conditions expérimentales, le traitement chronique par la CORT ait également un effet sur la composition du microbiote. De façon intéressante, l'exercice physique permet de limiter les effets néfastes d'un régime trop gras sur le microbiote (Molteni R, 2004) et dans des conditions physiologiques, l'exercice physique permet d'augmenter la diversité bactérienne et le développement de bactéries commensales ayant des effets bénéfiques pour la santé (Monda et al., 2017). Cependant, le caractère récent de cette thématique de recherche fait qu'il n'existe pas d'étude clinique réalisée chez l'Homme.

Ainsi, les conditions de vie saines et stimulantes mentalement et physiquement, comme celles apportées par l'EE chez la souris, pourraient moduler positivement le microbiote intestinal. A ce jour, il n'existe aucune publication caractérisant le microbiote intestinal dans nos conditions expérimentales. Il serait donc intéressant d'identifier une signature microbienne correspondant à l'EE et de regarder les possibles variations induites par la CORT ou par l'absence de l'expression d'ApN. Ces travaux permettraient d'aller plus loin dans la caractérisation des effets bénéfiques de l'EE mais surtout dans l'identification de nouveaux acteurs cellulaires et moléculaires des effets antidépresseurs et anti-inflammatoires de l'EE.

CONCLUSION

Les travaux de recherche contribuant à l'avancée des connaissances scientifiques ont de tout temps eu des répercussions considérables dans le domaine de la santé. Ma vision de la recherche s'intégrant dans cette démarche, l'objectif de mon travail de thèse a consisté à développer des méthodes et des concepts pouvant un jour, je l'espère, conduire à la mise au point de nouveaux traitements contre la dépression.

Atteindre cet objectif implique à la fois de trouver des cibles pharmacologiques nouvelles et de les reproduire dans des modèles expérimentaux de complexité croissante allant de modèles cellulaires à l'animal entier. L'accumulation de connaissance encourage aussi à développer une notion plus large de la thérapeutique qui ne se limiterait plus à des substances synthétiques, voire naturelles, n'ayant qu'une cible unique, mais à des approches plus intégrées. En effet, la considération du mode de vie du patient (*alimentaire, activités physiques et sociales, stimulation cognitive*), et les différentes façons d'intervenir sur ce mode de vie (*suivi diététique, séances de kinésithérapie et de psychologie, groupe d'entraide contre les conduites addictives ou l'isolement social*) pourraient alors être utilisées dans un but thérapeutique. Notre travail sur le modèle de l'EE va dans ce sens puisque ce modèle permet la stimulation simultanée des grands systèmes physiologiques *via* ses différentes composantes qui pourraient avoir un effet thérapeutique. Ainsi, en utilisant ce modèle, nous avons dû aborder des disciplines scientifiques et des champs thématiques variés, suggérant que l'étude de la dépression, comme d'un grand nombre de pathologies du SNC, dépasse les frontières des neurosciences.

Pendant mon travail de thèse, j'ai été confrontée à différents champs disciplinaires qui sont les neurosciences, le métabolisme et l'immunologie. L'interdépendance de ces grandes fonctions physiologiques renforce la nécessité d'aborder les problèmes de santé, même mentale, de manière intégrative : notre cerveau n'est pas « indépendant » du reste du corps. Sa santé est influencée par celle du corps, et vice-versa. Par exemple, nous nous sommes intéressés à certaines caractéristiques du syndrome métabolique qui peuvent être corrélées à un certain nombre de pathologies comme l'obésité, le diabète ou l'hyperlipidémie. Nous avons fait appel à l'immunologie, qui semble être à part, et qui pourtant est fortement impliquée à tous les niveaux de par l'existence d'un dialogue entre les cellules immunitaires (de la périphérie ou du SNC) et les différents organes/tissus de notre organisme. De ce fait, l'avenir de la recherche de futures thérapies contre la dépression nécessitera

une approche pluridisciplinaire et transversale de ces différents champs de recherche. Les concepts abordés par mon travail de thèse s'intègrent dans cette démarche de compréhension des liens complexes entre ces thématiques autrefois vues comme indépendantes.

Ainsi notre projet a abordé la recherche sous trois aspects. Tout d'abord, il nous a permis d'approfondir les connaissances dites fondamentales sur les fondements de phénomènes physiologiques impliquant les cellules immunes de notre SNC. Deuxièmement, nos travaux s'intègrent dans le développement de stratégies thérapeutiques innovantes, en particulier dans le traitement contre la dépression. Et enfin, il considère les interactions gènes-environnement pour mieux appréhender les modifications physiopathologiques observées dans les maladies multifactorielles.

Au-delà des résultats scientifiques, mon travail de thèse conduit à une réflexion plus générale. En effet, alors que les différentes aptitudes que nous avons acquises au cours de l'évolution de notre espèce ont conduit à l'Homme moderne, l'évolution de nos avancées techniques pourrait se retourner contre nous. L'augmentation de la sédentarité, la surconsommation de « malbouffe », et l'excès de l'utilisation des nouvelles technologies sont associés à l'apparition de nombreuses pathologies. A l'inverse, les preuves scientifiques concernant les bénéfices, aussi bien au niveau périphérique qu'au niveau central, d'un mode de vie sain (*exercice physique, vie sociale réelle, activités cognitives et régime alimentaire équilibré*) s'accumulent. Bien qu'intuitivement évident, ce concept repose désormais sur de solides preuves scientifiques.

Pendant de nombreuses années, l'étude des différents aspects de nos modes de vie a été faite de manière trop restrictive. Il a longtemps été considéré, à tort, qu'un seul facteur pouvait être responsable d'effets bénéfiques ou à l'inverse négatifs sur notre physiologie. Depuis, les concepts de transversalité et pluridisciplinarité ont vu le jour dans la recherche. Ceci doit faire évoluer les mentalités, et surtout donner de la crédibilité aux nombreux travaux prenant simultanément en considération **toutes** les variables de nos modes de vie, que ce soit dans la prévention, ou l'aide à la rémission d'un grand nombre de pathologies.

ANNEXE

L'ADIPONECTINE : UN ANTIDEPRESSEUR ENDOGENE ?

Nicolas S, Chabry J, Guyon A, Zarif H, Heurteaux C et Petit-Paitel A.

Revue acceptée pour publication le 23/02/2018 dans le journal Médecine/sciences

(n°msc170224-R1).

L'adiponectine : un antidépresseur endogène ?

Sarah Nicolas, Joëlle Chabry, Alice Guyon, Hadi Zarif, Catherine Heurteaux et Agnès Petit-Paitel

Résumé et mots clés en français :

L'adiponectine (ApN) est une hormone produite par le tissu adipeux dont le taux plasmatique est diminué chez les personnes en surpoids ou obèses ainsi que chez les personnes diabétiques. En périphérie, cette baisse du taux circulant d'ApN induit l'établissement d'un état inflammatoire chronique à bas bruit, le développement d'une résistance à l'insuline et des plaques d'athérome. Inversement, des conditions de vie « favorables », la perte de poids et la pratique régulière d'exercice physique permettent d'augmenter la concentration sanguine d'ApN. Certaines formes d'ApN peuvent passer dans le cerveau par le biais du liquide cérébrospinal. Dans le cerveau, l'augmentation de l'ApN exerce de puissants effets antidépresseurs et anxiolytiques, notamment en diminuant la neuroinflammation.

Mots clés : adiponectine, cerveau, microglie, inflammation, dépression, environnement enrichi

Adiponectin : an endogenous antidepressant?

Summary and key words in english:

Adiponectin (ApN) is a hormone produced by adipose tissue, yet the plasma level of ApN is decreased in overweight and obese people, as well as in people with diabetes. In the periphery, this decrease in circulating levels of ApN induces the establishment of a chronic low-grade inflammatory state and is involved in the development of insulin resistance and atheromas. Conversely, "favorable" living conditions, weight loss and regular physical exercise increase ApN blood concentration. Some forms of ApN can reach the brain parenchyma through the cerebrospinal fluid. In the brain, the increase in ApN exerts powerful antidepressant and anxiolytic effects, in particular by fighting against neuroinflammation.

Key words: adiponectin, brain, microglia, inflammation, depression, enriched environment

L'adiponectine : une hormone du tissu adipeux présente dans le cerveau.

Dans les années 90, l'ApN a été identifiée presque simultanément par 4 groupes de recherche indépendants, ce qui a conduit cette protéine à être « baptisée » de différentes façons. Ses premiers noms ont été : Acrp30 (*Adipocyte complement-related protein of 30 kDa*) {Scherer, 1995 #411}, apM1 (*AdiPose Most abudant gene transcript 1*) {Maeda, 1996 #412}, AdipoQ {Hu, 1996 #413} et GBP28 (*Gelatin-binding Protein of 28 kDa*) {Nakano, 1996 #414}, mais c'est désormais le terme d'adiponectine qui est le plus utilisé.

L'ApN, une hormone sécrétée essentiellement par les adipocytes, est une protéine très abondante dans le plasma (5-30µg/ml). Il s'agit d'une adipokine, c'est-àdire une cytokine (hormone jouant un rôle dans le système immunitaire) produite par le tissu adipeux. Contrairement à la leptine, une autre adipokine libérée par les adipocytes lorsqu'ils sont gonflés de gras et qui joue le rôle d'une hormone de satiété, l'ApN est libérée par les adipocytes lorsque les stocks de gras des adipocytes sont utilisés. Du point de vue structural, l'ApN est une protéine de 30kDa comprenant un domaine globulaire côté C-terminal et un domaine de type collagène. Le domaine globulaire possède la même séquence en acides aminés que le facteur du complément C1q et présente de fortes similitudes avec les domaines globulaires d'autres protéines telles que le collagène VIII et X et le TNF-a (Tumor Necrosis *Factor* α), entre autres [1]. Le domaine collagène permet la formation de trimères, d'hexamères et d'autres formes multimériques sécrétées d'ApN. La forme monomérique n'est pas présente dans la circulation et n'est détectée que dans les adipocytes. La forme globulaire circulante, appelée gApN, est produite par clivage protéolytique de la forme entière monomérique par l'élastase leucocytaire [2]. Les formes trimériques et hexamériques sont considérées comme étant respectivement les formes de faible et moyen poids moléculaire, alors que les gros complexes (18 unités et plus) sont de haut poids moléculaire. Dans la circulation, les formes hexamériques et de hauts poids moléculaire sont majoritaires (Figure 1).

La présence d'ApN dans le cerveau a longtemps été controversée. Toutefois, il est désormais admis que certaines formes d'ApN sont capables de franchir la barrière hémato-encéphalique (BHE). Une étude a notamment montré qu'une injection intraveineuse ou intracérébroventriculaire (i.c.v) d'ApN agit au niveau central

msc170224-R1

et réduit la glycémie, la lipidémie et le poids corporel des souris [3]. En 2007, Kubota et al. ont confirmé l'action de l'ApN dans le cerveau en montrant que l'injection périphérique d'ApN augmentait la prise alimentaire et diminuait les dépenses énergétiques des souris [4]. Depuis, plusieurs études ont détecté l'ApN dans le liquide cérébrospinal (LCS) murin et humain, à des taux 100 fois plus faibles que les taux plasmatiques [5-7]. Dans le cerveau, contrairement à la circulation, les formes actives seraient les formes de faible poids moléculaire, et plus particulièrement les formes trimériques qui seraient les seules à pouvoir franchir la BHE. Enfin, la présence d'ARN messagers (ARNm) de l'ApN a été détectée dans des extraits de cerveau de souris et de poulets, suggérant qu'il pourrait exister une production locale d'ApN [8, 9]. Chez l'Homme, les ARNm de l'ApN ont été détectés uniquement dans l'hypophyse [10, 11].

L'ApN agit par l'intermédiaire de ses deux principaux récepteurs : l'AdipoR1 et l'AdipoR2, qui possèdent 67% d'homologie [12]. Ces récepteurs contiennent 7 domaines transmembranaires, comme les récepteurs couplés aux protéines G, avec une topologie membranaire inversée, avec l'extrémité N-terminale intracellulaire et l'extrémité C-terminale extracellulaire [12]. Les récepteurs AdipoR1 et R2 ont des expressions tissulaires distinctes ainsi que des affinités de liaison différentes pour les formes globulaire et entière de l'ApN. Les deux récepteurs sont exprimés dans le cerveau, en particulier dans l'hypothalamus et le gyrus denté de l'hippocampe [4, 5] [13]. Leur expression a été rapportée au niveau neuronal [4, 5], astrocytaire [14] et microglial [15].

Obésité, troubles psychiques et adiponectine.

De nombreux arguments ont permis d'établir un lien entre les maladies métaboliques possédant une composante inflammatoire (comme le surpoids et l'obésité) et la dépression. L'obésité et la dépression sont deux pathologies distinctes du point de vue étio-pathologique mais leurs prévalences croissent parallèlement dans le monde. Des relations bidirectionnelles existent entre ces deux maladies : la dépression augmente le risque de prise de poids et d'obésité et inversement. Par exemple, l'incidence de la dépression chez les individus obèses est proche de 30%, ce qui est significativement plus élevé que dans la population générale (où elle se situe autour de 7,5%). Ces observations suggèrent l'existence de mécanismes

physiopathologiques communs parmi lesquels l'inflammation tient une position centrale [16]. Notons que les symptômes dépressifs que développent les personnes obèses présentent souvent des caractéristiques atypiques (augmentation de l'appétit, prise de poids, hypersomnie, fatigue...) [17], suggérant qu'il existerait un sous-type particulier de dépression lié à l'état métabolique et inflammatoire.

Quels sont les liens avec l'ApN ? Chez l'Homme, la corrélation entre les taux plasmatiques d'ApN et la dépression est controversée, probablement à cause de l'existence de différents sous-types de dépression. En effet, certains rapports indiquent que les taux sériques d'ApN sont plus élevés chez les sujets souffrant de dépression majeure par rapport à des témoins sains [18], tandis que d'autres chercheurs ont trouvé des niveaux inférieurs [19] ou inchangés [20]. Récemment, il a été démontré que des faibles taux d'ApN sont associés à une évolution défavorable de la maladie en cas de troubles bipolaires [21].

Chez les rongeurs, les résultats sont plus unanimes. En 2012, Liu et al. ont montré que les niveaux d'ApN dans le plasma sont réduits dans un modèle murin de dépression induit par un stress chronique (modèle de stress social). Chez les souris hétérozygotes ApN^{+/-}, la réduction des taux d'ApN exacerbe les comportements dépressifs qui se manifestent par une augmentation de l'aversion sociale, de l'anhédonie et de la résignation. De plus, la neutralisation des effets centraux de l'ApN par injection i.c.v d'anticorps spécifiques provoque un comportement dépressif chez les animaux. Inversement, l'injection i.c.v d'ApN exogène produit des effets antidépresseurs chez les souris saines ou diabétiques et obèses. Ces résultats suggèrent un rôle important de l'ApN dans la régulation des comportements dépressifs chez la souris [5].

Récemment, la même équipe a démontré l'implication de l'ApN, via ses récepteurs AdipoR2, dans les phénomènes d'extinction de la mémoire de peur associée à un contexte. Ces résultats suggèrent que l'ApN pourrait réguler les phénomènes impliqués dans le stress post-traumatique [22]. Une étude récente confirme d'ailleurs qu'une baisse des taux circulants d'ApN est associée à la dépression liée au stress post-traumatique [23].

En 2014, une autre étude a démontré l'implication de l'ApN dans la dépression. Yau et coll. ont en effet montré que les effets antidépresseurs de l'exercice physique

étaient dépendants de l'ApN [6]. En 2015, notre équipe a démontré que les effets antidépresseurs de l'environnement enrichi (EE) (modèle expérimental qui stimule les activités sociales, motrices, sensitives et cognitives des souris) étaient en partie dépendants de l'ApN [24]. En effet, les souris déficientes en ApN sont plus sensibles aux effets dépresseurs d'un traitement chronique à la corticostérone que des souris sauvages et sont partiellement insensibles aux effets antidépresseurs de l'EE. Chez les souris sauvages, l'EE induit une augmentation sélective de la concentration des formes de bas et faible poids moléculaire d'ApN dans le LCS des souris rendues « dépressives ». De plus, l'injection intraveineuse de gApN exogène exerce des effets antidépresseurs rapides et efficaces sur les souris, et l'un de ses mécanismes d'action possible serait une activation des neurones hypothalamiques [24].

L'inflammation comme lien entre ApN et dépression

ApN et inflammation périphérique

En périphérie, un faible taux circulant d'ApN est associé à différentes maladies inflammatoires chroniques telles que l'obésité, le diabète de type 2 et la résistance à l'insuline, ainsi que l'athérosclérose, l'hypertension et les maladies coronariennes [25] [26]. En revanche, un niveau d'ApN sérique élevé a été trouvé dans d'autres maladies inflammatoires telles que le lupus érythémateux systémique [27], la mucoviscidose [28], les maladies inflammatoires de l'intestin [29] et la polyarthrite rhumatoïde [30]. Une hypothèse possible permettant de réconcilier ces résultats est que l'augmentation de l'ApN puisse être dans certains cas une réaction de l'organisme visant à contrebalancer l'inflammation chronique caractéristique de ces maladies.

Chez l'Homme possédant les taux les plus élevés d'ApN, le risque d'infarctus du myocarde est diminué d'un facteur deux et le risque de calcification des artères coronaires d'un facteur sept par rapport à des sujets aux taux moyens [31].

Plusieurs mécanismes ont été suggérés pour expliquer l'implication de l'ApN dans les processus inflammatoires, y compris des actions directes sur les cellules médiatrices de l'inflammation, l'activation de la voie NF- κ B et l'interaction avec le TNF- α .

Les cellules mononucléées du sang (monocytes, lymphocytes T, B et Natural Killer) expriment à leur surface les récepteurs AdipoR1 et R2 [32]. Dans un contexte d'athérosclérose, caractérisée par une inflammation chronique, l'ApN inhibe la croissance des progéniteurs myélomonocytaires et le fonctionnement des macrophages matures [33], inhibe la transformation des macrophages en cellules spumeuses (essentielles dans l'athérosclérose) [34] et stimule la production par les macrophages de la cytokine anti-inflammatoire IL-10 [35]. En réduisant l'expression de molécules d'adhésion telles que VCAM-1 (*Vascular Cell Adhesion Molecule-1*), ICAM-1 (*InterCellular Adhesion Molecule-1*), l'E-sélectine et l'IL-8 dans les cellules endothéliales aortiques humaines, l'ApN empêcherait l'adhésion des monocytes à l'endothélium [36]. Enfin, l'ApN inhibe l'activation du facteur NF- κ B dépendante des TLRs (*Toll Like Receptors*) dans les macrophages [37] et réduit la production des ROS (*Reactive Oxygen Species*) dans les neutrophiles humains [38].

Le facteur nucléaire NF-kB est un acteur clé dans la réponse inflammatoire. L'action de l'ApN sur la voie de signalisation du NF-kB est complexe, car elle peut être à la fois activatrice et inhibitrice sur les cellules périphériques. Sur les macrophages, l'ApN inhibe la voie du NF- κ B induite par le TNF- α [39]. Globalement, l'ApN jouerait un rôle anti-inflammatoire vis-à-vis des réponses cellulaires impliquant le TNF- α . La relation ApN/TNF- α serait bi-directionnelle. En effet, le TNF- α supprime l'expression et la sécrétion de l'ApN dans des cultures cellulaires d'adipocytes humains et murins [40]. Inversement, les taux élevés d'ARNm du TNF- α sont retrouvés dans le tissu adipeux et le plasma des souris déficientes en ApN. L'expression virale de l'ApN chez ces souris rétablit des niveaux physiologiques de TNF- α [26]. En outre, dans les macrophages, l'ApN inhibe fortement l'expression des ARNm du TNF- α induite par le lipopolysaccharide (LPS), un composant des parois bactériennes à gram négatif couramment utilisé pour provoquer une réponse inflammatoire [33]. Chez l'Homme, une étude a montré que les taux plasmatiques de TNFa et d'ApN chez des patients dépressifs en rémission avant reçu un traitement antidépresseur étaient respectivement plus faibles et plus élevés que chez les patients contrôles [41]. Anderson et al. ont exploré la relation entre une inflammation aiguë et le taux d'adipokines au sein d'une cohorte humaine de 20 patients en bonne santé. L'endotoxémie a été associée à une augmentation du TNF- α et de l'IL-6 dans l'ensemble des leucocytes du sang et monocytes du sang ainsi que dans le tissu

msc170224-R1

gras mais sans changement significatif des taux plasmatiques d'ApN. En revanche, une baisse de l'expression des récepteurs AdipoR1 et R2 a été observée, suggérant que les fonctions de sensibilisation à l'insuline et de régulation de l'inflammation par l'ApN étaient altérées [42]. Dans des modèles animaux de choc septique, la déficience en ApN est associée à une augmentation marquée du statut inflammatoire et à une exacerbation des lésions hépatiques [43]. Dans une étude menée en 2010 portant sur 33 patients atteints de sepsis sévère ou de choc septique, une corrélation inverse similaire a été démontrée [44]. Ceci suggère que la modulation de l'ApN dans le sepsis pourrait être une cible thérapeutique potentielle pour atténuer la réponse inflammatoire périphérique.

Neuroinflammation, dépression et adiponectine

L'hypothèse de l'implication de la neuroinflammation dans la dépression a été évoquée il y a une dizaine d'années. Cette théorie est basée sur une étude démontrant que l'administration de cytokines proinflammatoires à des volontaires sains provoque des symptômes de type dépressif [45]. Selon cette théorie, la production excessive de médiateurs de l'inflammation par les macrophages jouerait un rôle essentiel dans la pathogenèse de la dépression. Par la suite, ceci a été confirmé par d'autres travaux montrant une activation du système immunitaire inné chez certains patients dépressifs [46].

Malgré une littérature abondante liant ApN et inflammation périphérique, peu d'études se sont intéressées aux effets de l'ApN sur la neuroinflammation. En 2013, une étude de Piccio et al. a montré que les souris déficientes en ApN étaient plus sensibles à l'induction d'une sclérose en plaque par injection d'antigènes de la myéline, et que cela s'accompagnait d'une réponse inflammatoire accrue dans la moelle épinière [47]. A l'inverse, un traitement d'une semaine par injections intrapéritonéales quotidiennes de gApN ralentit la progression de la maladie et réduit les niveaux de cytokines pro-inflammatoires dans la moelle épinière.

Dans le SNC, la réponse inflammatoire est caractérisée par la présence de cellules microgliales activées et d'astrocytes réactifs dans le parenchyme du cerveau, mais aussi par la participation directe du système immunitaire adaptatif, une

production accrue de cytokines, de chimiokines et de prostaglandines, la cascade des protéines du complément et la production d'espèces réactives de l'oxygène et de l'azote (ROS/RNS), qui, dans certains cas, peuvent conduire à la rupture de la BHE.

Au niveau central, l'ApN exercerait de puissants effets anti-inflammatoires en modulant le phénotype de la microglie. La microglie maintient l'homéostasie et effectue la surveillance immunitaire en examinant en permanence l'environnement cérébral en étendant des prolongements cellulaires. Du fait de l'expression de nombreux canaux ioniques, de cytokines, de Toll-like receptors (TLRs, récepteurs jouant un rôle majeur dans l'immunité innée car ils reconnaissent des motifs moléculaires présents chez de nombreux pathogènes) et de récepteurs aux chimiokines, la microglie réagit rapidement en réponse à des altérations subtiles dans son microenvironnement telles que des changements dans l'homéostasie ionique et des dommages cérébraux de différentes natures, tels que des agrégats protéigues ou des agents pathogènes. La microglie peut schématiquement adopter deux types de phénotypes. M1 et M2. Le phénotype M1 de la microglie est lié à l'induction de la réponse inflammatoire, alors que le phénotype M2 est associé à des rôles neuroprotecteurs. La polarisation de la microglie est importante dans l'homéostasie du SNC, car elle est impliquée dans les processus d'apprentissage et de mémoire [48].

L'absence d'ApN exacerbe globalement les réponses neuroinflammatoires. En effet, les souris déficientes en ApN sont plus sensibles à la neuroinflammation induite par une injection périphérique de LPS. Cela se traduit par une augmentation des niveaux des cytokines proinflammatoires plus importante dans différentes zones du cerveau et dans le LCS de ces souris par rapport à des souris contrôles. De plus, l'absence d'ApN engendre une plus forte infiltration monocytaire chez les souris traitées au LPS. Cette réponse exacerbée des souris déficientes en ApN à un stimulus proinflammatoire est due à une réactivité accrue de la microglie qui présente un phénotype différent de celle des souris contrôles, après traitement au LPS. De plus, la microglie issue de cerveaux des souris ApN KO exprime plus d'ARNm et de protéines proinflammatoires après traitement au LPS que celle issue de cerveaux de souris contrôles [15].

Si on ne peut pas exclure des effets *in vivo* combinés sur différentes populations cellulaires et/ou des effets indirects, notre équipe a montré que l'ApN, sous ses formes globulaire et entière, exerce des effets anti-inflammatoires directs, préventifs et curatifs sur la microglie. Le traitement par la gApN permet de réduire la sécrétion de cytokines pro-inflammatoires par la microglie préalablement activée *in vivo*. La gApN limite également la sécrétion des cytokines proinflammatoires par la microglie traitée *ex vivo* par du LPS [15].

De manière intéressante, les effets anti-inflammatoires de l'ApN sont spécifiques de la microglie. En effet, la gApN n'a pas d'effets anti-inflammatoires après stimulation par du LPS sur des astrocytes murins en culture primaire [15].

Sur la lignée de microglie murine BV2, la gApN réduit de manière dosedépendante l'expression des ARNm et des protéines pro-inflammatoires, réduit le stress oxydatif (ROS) et le stress nitrosatif (oxide nitrique, NO) engendrés par un traitement au LPS. L'ApN agit sur la microglie *via* son récepteur AdipoR1 et induit une voie de signalisation impliquant l'AMPK. Enfin, l'ApN empêche également la translocation de la sous-unité p65 du NF-κB induite par le LPS, ce qui expliquerait ses effets anti-inflammatoires globaux (Figure 2) [15].

L'adiponectine, un médiateur des effets anti-dépresseurs de l'environnement enrichi

Tous les individus ne sont pas égaux vis-à-vis de leur susceptibilité à développer des troubles psychiatriques. Il est connu par exemple que des abus et violences pendant l'enfance ou des conditions de vie socio-économiquement difficiles favorisent l'apparition de désordres mentaux à l'âge adulte [49]. De même, il existe des susceptibilités génétiques prédisposant aux épisodes dépressifs, comme des polymorphismes dans les gènes codant pour les récepteurs de la sérotonine [50] ou du BDNF [51]. Si personne ne peut changer son passé ni modifier son patrimoine génétique, on peut toutefois, dans une certaine mesure, agir sur son style de vie à l'âge adulte et adopter des conditions de vie saines et stimulantes.

Chez la souris, des conditions de vie favorables telles que celles procurées par l'EE promeuvent l'augmentation dans le LCS des taux des formes de bas poids moléculaires de l'ApN, suggérant que son passage serait facilité par un mécanisme encore inconnu. Dans un modèle de souris rendues dépressives, l'EE permet de

9

msc170224-R1

lutter contre l'augmentation des taux d'ARNm des cytokines pro-inflammatoires IL-1β, IL-6 et TNF-α au niveau de l'hypothalamus et de l'hippocampe, deux zones du cerveau étroitement liées à la dépression. L'EE promeut également un profil d'activation anti-inflammatoire de type M2 de la microglie par rapport à des souris hébergées en conditions standards d'hébergement, qui présente un phénotype M1. Les effets anti-inflammatoires sur la microglie ainsi que les effets comportementaux antidépresseurs de l'EE sont dépendants de l'ApN. L'injection i.c.v de gApN mime les effets anti-inflammatoires de l'EE sur le profil d'activation de la microglie, baisse l'expression et la production des cytokines pro-inflammatoires tout en augmentant les niveaux des ARNm des marqueurs anti-inflammatoires Arg1 et IL-10 et améliore les comportements anxio-dépressifs des souris [7].

En conclusion, l'ApN est une adipokine produite par le tissu gras, aux propriétés antidépressives, dont l'action dans le cerveau serait favorisée par des conditions de vie positives et stimulantes combinant activités physiques, cognitives et sociales. Les propriétés antidépressives de l'ApN sont attribuables notamment à ses effets anti-inflammatoires directs sur la microglie et donc à sa capacité à limiter la neuroinflammation. Ainsi, le développement d'agonistes sélectifs des récepteurs de l'ApN pourrait représenter une stratégie thérapeutique alternative prometteuse pour réduire la neuroinflammation dans de nombreuses maladies cérébrales telles que les maladies neurodégénératives et les troubles dépressifs (Figure 3).

Bibliographie

- 1. Berg AH, Combs TP, Scherer PE. ACRP30/adiponectin: an adipokine regulating glucose and lipid metabolism. *Trends Endocrinol Metab* 2002,**13**:84-89.
- 2. Waki H, Yamauchi T, Kamon J, Kita S, Ito Y, Hada Y, *et al.* Generation of globular fragment of adiponectin by leukocyte elastase secreted by monocytic cell line THP-1. *Endocrinology* 2005,**146**:790-796.
- 3. Qi Y, Takahashi N, Hileman SM, Patel HR, Berg AH, Pajvani UB, *et al.* Adiponectin acts in the brain to decrease body weight. *Nat Med* 2004,**10**:524-529.
- 4. Kubota N, Yano W, Kubota T, Yamauchi T, Itoh S, Kumagai H, *et al.* Adiponectin stimulates AMP-activated protein kinase in the hypothalamus and increases food intake. *Cell Metab* 2007,**6**:55-68.
- 5. Liu J, Guo M, Zhang D, Cheng SY, Liu M, Ding J, *et al.* Adiponectin is critical in determining susceptibility to depressive behaviors and has antidepressant-like activity. *Proc Natl Acad Sci* U S A 2012,**109**:12248-12253.
- 6. Yau SY, Li A, Hoo RL, Ching YP, Christie BR, Lee TM, *et al.* Physical exercise-induced hippocampal neurogenesis and antidepressant effects are mediated by the adipocyte hormone adiponectin. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2014,**111**:15810-15815.
- 7. Chabry J, Nicolas S, Cazareth J, Murris E, Guyon A, Glaichenhaus N, *et al.* Enriched environment decreases microglia and brain macrophages inflammatory phenotypes through adiponectin-dependent mechanisms: Relevance to depressive-like behavior. *Brain Behav Immun* 2015, **50**:275-287.
- 8. Maddineni S, Metzger S, Ocon O, Hendricks G, 3rd, Ramachandran R. Adiponectin gene is expressed in multiple tissues in the chicken: food deprivation influences adiponectin messenger ribonucleic acid expression. *Endocrinology* 2005,**146**:4250-4256.
- 9. Hoyda TD, Fry M, Ahima RS, Ferguson AV. Adiponectin selectively inhibits oxytocin neurons of the paraventricular nucleus of the hypothalamus. *J Physiol* 2007,**585**:805-816.
- 10. Rodriguez-Pacheco F, Martinez-Fuentes AJ, Tovar S, Pinilla L, Tena-Sempere M, Dieguez C, *et al.* Regulation of pituitary cell function by adiponectin. *Endocrinology* 2007,**148**:401-410.
- 11. Wilkinson M, Brown R, Imran SA, Ur E. Adipokine gene expression in brain and pituitary gland. *Neuroendocrinology* 2007,**86**:191-209.
- 12. Yamauchi T, Kamon J, Ito Y, Tsuchida A, Yokomizo T, Kita S, *et al.* Cloning of adiponectin receptors that mediate antidiabetic metabolic effects. *Nature* 2003,**423**:762-769.
- 13. Suyama S, Lei W, Kubota N, Kadowaki T, Yada T. Adiponectin at physiological level glucoseindependently enhances inhibitory postsynaptic current onto NPY neurons in the hypothalamic arcuate nucleus. *Neuropeptides* 2017.
- 14. Wan Z, Mah D, Simtchouk S, Klegeris A, Little JP. Globular adiponectin induces a proinflammatory response in human astrocytic cells. *Biochem Biophys Res Commun* 2014,**446**:37-42.
- 15. Nicolas S, Cazareth J, Zarif H, Guyon A, Heurteaux C, Chabry J, *et al.* Globular Adiponectin Limits Microglia Pro-Inflammatory Phenotype through an AdipoR1/NF-kappaB Signaling Pathway. *Front Cell Neurosci* 2017,**11**:352.
- 16. Capuron L, Lasselin J, Castanon N. Role of Adiposity-Driven Inflammation in Depressive Morbidity. *Neuropsychopharmacology* 2017,**42**:115-128.
- 17. Lojko D, Buzuk G, Owecki M, Ruchala M, Rybakowski JK. Atypical features in depression: Association with obesity and bipolar disorder. *J Affect Disord* 2015,**185**:76-80.
- 18. Jow GM, Yang TT, Chen CL. Leptin and cholesterol levels are low in major depressive disorder, but high in schizophrenia. *J Affect Disord* 2006,**90**:21-27.
- 19. Cizza G, Nguyen VT, Eskandari F, Duan Z, Wright EC, Reynolds JC, *et al.* Low 24-hour adiponectin and high nocturnal leptin concentrations in a case-control study of community-dwelling premenopausal women with major depressive disorder: the Premenopausal,
Osteopenia/Osteoporosis, Women, Alendronate, Depression (POWER) study. *J Clin Psychiatry* 2010,**71**:1079-1087.

- 20. Carvalho AF, Rocha DQ, McIntyre RS, Mesquita LM, Kohler CA, Hyphantis TN, *et al.* Adipokines as emerging depression biomarkers: a systematic review and meta-analysis. *J Psychiatr Res* 2014,**59**:28-37.
- 21. Mansur RB, Rizzo LB, Santos CM, Asevedo E, Cunha GR, Noto MN, *et al.* Adipokines, metabolic dysfunction and illness course in bipolar disorder. *J Psychiatr Res* 2016,**74**:63-69.
- 22. Zhang D, Wang X, Wang B, Garza JC, Fang X, Wang J, *et al.* Adiponectin regulates contextual fear extinction and intrinsic excitability of dentate gyrus granule neurons through AdipoR2 receptors. *Mol Psychiatry* 2017,**22**:1044-1055.
- 23. Na KS, Kim EK, Park JT. Decreased plasma adiponectin among male firefighters with symptoms of post-traumatic stress disorder. *J Affect Disord* 2017,**221**:254-258.
- 24. Nicolas S, Veyssiere J, Gandin C, Zsurger N, Pietri M, Heurteaux C, et al. Neurogenesisindependent antidepressant-like effects of enriched environment is dependent on adiponectin. *Psychoneuroendocrinology* 2015,**57**:72-83.
- 25. Hu E, Liang P, Spiegelman BM. AdipoQ is a novel adipose-specific gene dysregulated in obesity. *J Biol Chem* 1996,**271**:10697-10703.
- 26. Maeda N, Shimomura I, Kishida K, Nishizawa H, Matsuda M, Nagaretani H, *et al.* Diet-induced insulin resistance in mice lacking adiponectin/ACRP30. *Nat Med* 2002,**8**:731-737.
- 27. Rovin BH, Song H, Hebert LA, Nadasdy T, Nadasdy G, Birmingham DJ, *et al.* Plasma, urine, and renal expression of adiponectin in human systemic lupus erythematosus. *Kidney Int* 2005, **68**:1825-1833.
- 28. Moriconi N, Kraenzlin M, Muller B, Keller U, Nusbaumer CP, Stohr S, *et al.* Body composition and adiponectin serum concentrations in adult patients with cystic fibrosis. *J Clin Endocrinol Metab* 2006,**91**:1586-1590.
- 29. Karmiris K, Koutroubakis IE, Xidakis C, Polychronaki M, Voudouri T, Kouroumalis EA. Circulating levels of leptin, adiponectin, resistin, and ghrelin in inflammatory bowel disease. *Inflamm Bowel Dis* 2006,**12**:100-105.
- 30. Otero M, Lago R, Gomez R, Lago F, Dieguez C, Gomez-Reino JJ, *et al.* Changes in plasma levels of fat-derived hormones adiponectin, leptin, resistin and visfatin in patients with rheumatoid arthritis. *Ann Rheum Dis* 2006,**65**:1198-1201.
- 31. Pischon T, Girman CJ, Hotamisligil GS, Rifai N, Hu FB, Rimm EB. Plasma adiponectin levels and risk of myocardial infarction in men. *JAMA* 2004,**291**:1730-1737.
- 32. Pang TT, Narendran P. The distribution of adiponectin receptors on human peripheral blood mononuclear cells. *Ann N Y Acad Sci* 2008,**1150**:143-145.
- 33. Yokota T, Oritani K, Takahashi I, Ishikawa J, Matsuyama A, Ouchi N, *et al.* Adiponectin, a new member of the family of soluble defense collagens, negatively regulates the growth of myelomonocytic progenitors and the functions of macrophages. *Blood* 2000,**96**:1723-1732.
- 34. Ouchi N, Kihara S, Arita Y, Nishida M, Matsuyama A, Okamoto Y, *et al.* Adipocyte-derived plasma protein, adiponectin, suppresses lipid accumulation and class A scavenger receptor expression in human monocyte-derived macrophages. *Circulation* 2001,**103**:1057-1063.
- 35. Kumada M, Kihara S, Ouchi N, Kobayashi H, Okamoto Y, Ohashi K, *et al.* Adiponectin specifically increased tissue inhibitor of metalloproteinase-1 through interleukin-10 expression in human macrophages. *Circulation* 2004,**109**:2046-2049.
- 36. Ouedraogo R, Wu X, Xu SQ, Fuchsel L, Motoshima H, Mahadev K, *et al.* Adiponectin suppression of high-glucose-induced reactive oxygen species in vascular endothelial cells: evidence for involvement of a cAMP signaling pathway. *Diabetes* 2006,**55**:1840-1846.
- 37. Yamaguchi N, Argueta JG, Masuhiro Y, Kagishita M, Nonaka K, Saito T, *et al.* Adiponectin inhibits Toll-like receptor family-induced signaling. *FEBS Lett* 2005, **579**:6821-6826.
- 38. Magalang UJ, Rajappan R, Hunter MG, Kutala VK, Kuppusamy P, Wewers MD, *et al.* Adiponectin inhibits superoxide generation by human neutrophils. *Antioxid Redox Signal* 2006,**8**:2179-2186.

- 39. Wulster-Radcliffe MC, Ajuwon KM, Wang J, Christian JA, Spurlock ME. Adiponectin differentially regulates cytokines in porcine macrophages. *Biochem Biophys Res Commun* 2004,**316**:924-929.
- 40. Kappes A, Loffler G. Influences of ionomycin, dibutyryl-cycloAMP and tumour necrosis factoralpha on intracellular amount and secretion of apM1 in differentiating primary human preadipocytes. *Horm Metab Res* 2000,**32**:548-554.
- 41. Narita K, Murata T, Takahashi T, Kosaka H, Omata N, Wada Y. Plasma levels of adiponectin and tumor necrosis factor-alpha in patients with remitted major depression receiving long-term maintenance antidepressant therapy. *Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry* 2006,**30**:1159-1162.
- 42. Anderson PD, Mehta NN, Wolfe ML, Hinkle CC, Pruscino L, Comiskey LL, *et al.* Innate immunity modulates adipokines in humans. *J Clin Endocrinol Metab* 2007,**92**:2272-2279.
- 43. Uji Y, Yamamoto H, Maeda K, Tsuchihashi H, Akabori H, Shimizu T, *et al.* Adiponectin deficiency promotes the production of inflammatory mediators while severely exacerbating hepatic injury in mice with polymicrobial sepsis. *J Surg Res* 2010,**161**:301-311.
- 44. Hillenbrand A, Knippschild U, Weiss M, Schrezenmeier H, Henne-Bruns D, Huber-Lang M, *et al.* Sepsis induced changes of adipokines and cytokines septic patients compared to morbidly obese patients. *BMC Surg* 2010,**10**:26.
- 45. Smith RS. The macrophage theory of depression. *Med Hypotheses* 1991,**35**:298-306.
- 46. Maes M. Major depression and activation of the inflammatory response system. *Adv Exp Med Biol* 1999,**461**:25-46.
- 47. Piccio L, Cantoni C, Henderson JG, Hawiger D, Ramsbottom M, Mikesell R, *et al.* Lack of adiponectin leads to increased lymphocyte activation and increased disease severity in a mouse model of multiple sclerosis. *Eur J Immunol* 2013,**43**:2089-2100.
- 48. Parkhurst CN, Yang G, Ninan I, Savas JN, Yates JR, 3rd, Lafaille JJ, *et al.* Microglia promote learning-dependent synapse formation through brain-derived neurotrophic factor. *Cell* 2013,**155**:1596-1609.
- 49. Daches S, Kovacs M, George CJ, Yaroslavsky I, Kiss E, Vetro A, *et al.* Childhood adversity predicts reduced physiological flexibility during the processing of negative affect among adolescents with major depression histories. *Int J Psychophysiol* 2017,**121**:22-28.
- 50. Lebe M, Hasenbring MI, Schmieder K, Jetschke K, Harders A, Epplen JT, *et al.* Association of serotonin-1A and -2A receptor promoter polymorphisms with depressive symptoms, functional recovery, and pain in patients 6 months after lumbar disc surgery. *Pain* 2013,**154**:377-384.
- 51. Kishi T, Yoshimura R, Ikuta T, Iwata N. Brain-Derived Neurotrophic Factor and Major Depressive Disorder: Evidence from Meta-Analyses. *Front Psychiatry* 2017,**8**:308.



Figure 1 : Les différentes formes d'adiponectine



Figure 2 : Mécanismes d'action de l'ApN globulaire sur la microglie

Légendes des Figures

Figure 1 - *Représentation schématique de la structure de l'adiponectine et de ses oligomères.* La forme entière de l'adiponectine comprend 244 acides aminés, un domaine de type collagène vers l'extrémité N-terminale et un domaine globulaire de type C1q à sont extrémité C-terminale. Dans le plasma, les monomères d'adiponectine se combinent par leur domaine globulaire pour former des complexes multimériques tels que des trimères, des hexamères ou des gros multimères de haut poids moléculaires. Il existe également une forme globulaire circulante de l'adiponectine.

Figure 2 – Représentation schématique des mécanismes d'action de l'adiponectine globulaire sur la microglie. L'adiponectine globulaire, en se liant à son récepteur AdipoR1 présent à la surface des cellules microgliales, stimule l'activation de l'AMPK α en favorisant la phosphorylation du résidu thréonine en position 172. Ceci empêche la dégradation de la kinase I κ -B et la translocation de la sous-unité p65 du NF- κ B dans le noyau, où elle se lie sur l'ADN à des séquences consensus présentes dans les promoteurs de nombreux gènes codant pour des protéines pro-inflammatoires comme les cytokines IL-1 β , IL-6 et TNF- α . L'adiponectine limite également l'expression de la « inducible Nitric Oxide Synthase » iNOS et la libération d'oxyde nitrique.

Figure 3 – Schéma illustrant comment l'environnement enrichi pourrait lutter contre les comportements anxio-dépressifs induits par le stress. La libération chronique dans le sang de corticostérone, hormone de stress produite par les glandes surrénales, agit au niveau cérébral en promouvant une activation pro-inflammatoire de la microglie, induisant ainsi l'établissement d'un état neuroinflammatoire et l'apparition de comportements anxiodépressifs. A l'inverse, des conditions de vie favorables où se mêlent activités physiques, sociales et cognitives, telles que celles fournies par l'environnement enrichi, permettent l'augmentation des taux d'adiponectine, adipokine produite par le tissu adipeux, qui va promouvoir dans le cerveau un phénotype microglial anti-inflammatoire et ainsi lutter contre la neuroinflammation et les comportements anxio-dépressifs.

CD8+ T CELLS ARE ESSENTIAL FOR THE EFFECTS OF ENRICHED ENVIRONMENT ON HIPPOCAMPO-DEPENDENT BEHAVIOR, HIPPOCAMPAL NEUROGENESIS AND SYNAPTIC PLASTICITY

Zarif H, <u>Nicolas S</u>, Guyot M, Hosseiny S, Lazzari A, Canali M, Cazareth J, Brau F, Golzné F, Dourneau E, Maillaut M, Luci C, Paquet A, Lebrigand K, Arguel MJ, Daoudlarian D, Heurteaux C, Glaichenhaus N, Chabry J Guyon A, Petit-Paitel A.

Brain Behav Immun. 2017 Nov 22. pii: S0889-1591(17)30517-2. doi: 10.1016/j.bbi.2017.11.016

RESUME

Dans ce travail, nous avons étudié le rôle des Lymphocytes T-CD8+ (LT-CD8) dans la mise en place des effets bénéfiques de l'EE sur la plasticité cérébrale. Les LT-CD8 ont été éliminés *via* l'utilisation d'anticorps déplétants dirigés contre le CD8 avant 4 semaines d'hébergement en EE. A la fin de ce protocole expérimental nous avons réalisé une batterie de tests comportementaux, d'analyses biochimiques, cellulaires et moléculaires afin de caractériser au mieux la fonction des LT-CD8 dans les effets de l'EE. Ainsi, ce travail a pu mettre en avant que les LT-CD8 jouent un rôle important dans la plasticité cérébrale induite par l'EE. Ce rôle a été évalué dans des tests comportementaux, des études immunohistochimiques (neurogenèse et spinogenèse), et de l'électrophysiologie. Ensuite, cette étude montre que les LT-CD8 de la périphérie n'ont pas les mêmes propriétés que ceux issus de souris élevées en SE. En effet, leurs différences se retrouvent à plusieurs niveaux : tout d'abord dans leur capacité d'expression de cytokines après une stimulation *in vitro* ; ensuite dans leurs propriétés de prolifération, leur répartition (périphérie/SNC) et enfin leur signature transcriptomique. Ce travail met en avant l'importance du dialogue entre la périphérie *-en particulier les cellules immunes-* et le cerveau, dans les effets bénéfiques de l'EE.

Brain, Behavior, and Immunity xxx (2017) xxx-xxx



Contents lists available at ScienceDirect

Brain, Behavior, and Immunity



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

Full-length Article

CD8⁺ T cells are essential for the effects of enriched environment on hippocampus-dependent behavior, hippocampal neurogenesis and synaptic plasticity

Hadi Zarif^a, Sarah Nicolas^a, Mélanie Guyot^b, Salma Hosseiny^a, Anne Lazzari^b, María Magdalena Canali^b, Julie Cazareth^a, Frédéric Brau^a, Valentine Golzné^a, Elisa Dourneau^a, Maud Maillaut^a, Carmelo Luci^c, Agnès Paquet^a, Kevin Lebrigand^a, Marie-Jeanne Arguel^a, Douglas Daoudlarian^b, Catherine Heurteaux^a, Nicolas Glaichenhaus^b, Joëlle Chabry^{b,*}, Alice Guyon^{a,*,1}, Agnès Petit-Paitel^{a,1}

^a Université Côte d'Azur, CNRS, IPMC, France ^b Université Côte d'Azur, INSERM, CNRS, IPMC, France ^c Université Côte d'Azur, C3M, INSERM U 1065, France

ARTICLE INFO

Article history: Received 18 July 2017 Received in revised form 13 November 2017 Accepted 20 November 2017 Available online xxxx

Keywords: Enriched environment CD8⁺ T cells Hippocampus Brain plasticity Behavior Neurogenesis Synaptogenesis Long term potentiation Choroid plexus Mice

ABSTRACT

Enriched environment (EE) induces plasticity changes in the brain. Recently, $CD4^+$ T cells have been shown to be involved in brain plasticity processes. Here, we show that $CD8^+$ T cells are required for EE-induced brain plasticity in mice, as revealed by measurements of hippocampal volume, neurogenesis in the DG of the hippocampus, spinogenesis and glutamatergic synaptic function in the CA of the hippocampus. As a consequence, EE-induced behavioral benefits depend, at least in part, on CD8⁺ T cells. In addition, we show that spleen CD8⁺ T cells from mice housed in standard environment (SE) and EE have different properties in terms of 1) TNF α release after *in vitro* CD3/CD28 or PMA/Iono stimulation 2) *in vitro* proliferation properties 3) CD8⁺ CD44⁺ CD62L^{low} and CD62L^{hi} T cells repartition 4) transcriptomic signature as revealed by RNA sequencing. CD8⁺ T cells purified from the choroid plexus of SE and EE mice also exhibit different transcriptomic profiles as highlighted by single-cell mRNA sequencing. We show that CD8⁺ T cells are essential mediators of beneficial EE effects on brain plasticity and cognition. Additionally, we propose that EE differentially primes CD8⁺ T cells leading to behavioral improvement.

© 2017 Elsevier Inc. All rights reserved.

1. Introduction

Environmental enrichment (EE) refers to housing conditions, such as home cages or exploratory chambers that facilitate enhanced sensory, cognitive and motor stimulation. EE housing induces structural changes in the brain, i.e. plasticity, and more specifically in the hippocampus which is primarily involved in spatial learning, memory and mood regulation. We have previously shown that housing mice in EE for 4 weeks increased neurogenesis in the dentate gyrus (DG) of the hippocampus, induced changes in neuronal morphology, and modified synaptic plasticity (Hosseiny

¹ Co-direction of the work.

https://doi.org/10.1016/j.bbi.2017.11.016 0889-1591/© 2017 Elsevier Inc. All rights reserved. et al., 2015). Compared to mice housed in a standard environment (SE), EE mice exhibited an increased number of functional synapses as demonstrated by measuring spontaneous and miniature excitatory post synaptic currents (EPSCs) recorded on CA1 neurons, larger field excitatory postsynaptic potential (fEPSPs) and decreased long term potentiation (LTP).

The immune system is primarily involved in protection from infectious agents. However, studies performed over the past 30 years have demonstrated that it is also involved in neurobehavioral processes. For example, cytokines produced by immune cells in infected individuals induce sickness behavior and impaired neurobehavioral plasticity. Furthermore, because both glia and neurons express cytokines and their receptors in the absence of infection, it was suggested that cytokines could act as neuromodulators to regulate brain function in non-pathological conditions (Donzis and Tronson, 2014; Vitkovic et al., 2000; Yirmiya and Goshen, 2011). Indeed, cytokines were shown to have a critical role

Please cite this article in press as: Zarif, H., et al. CD8⁺ T cells are essentia<u>d</u> for the effects of enriched environment on hippocampus-dependent behavior, hippocampal neurogenesis and synaptic plasticity. Brain Behav. Immun. (2017), https://doi.org/10.1016/j.bbi.2017.11.016

^{*} Corresponding authors at: IPMC CNRS UMR 7275, 660 route des Lucioles, 06560 Valbonne, France.

E-mail addresses: joelle.chabry@ipmc.cnrs.fr (J. Chabry), alice.guyon@ipmc.cnrs. fr (A. Guyon).

in sleep (Krueger et al., 2001; Opp, 2005; Wolf et al., 2003). Furthermore, studies using lymphocyte-deficient Severe Combined Immune Deficiency (SCID) mice and T cell-deficient nude mice have demonstrated the critical role of T cells in brain function. SCID mice display dramatic impairments in hippocampal-dependent spatial learning and memory assessed in spatial tasks such as the Morris water maze paradigm (Kipnis et al., 2004a; Kipnis et al., 2004b; Ron-Harel et al., 2008), the radial arm water maze (Brynskikh et al., 2008) and tests designed to assess recognition of the novel spatial arrangement of familiar objects (Ron-Harel et al., 2008). Likewise, CD4⁺ T cell depletion results in impaired memory and learning, as well as decreased LTP and neurogenesis (Kipnis et al. 2004b). More recently, Schwartz, Kipnis and their colleagues have shown that auto-reactive CD4⁺ T cells that recognized brain antigens could be neuroprotective (Kipnis et al., 2008; Schwartz and Kipnis, 2011: Schwartz and Shechter, 2011). While these latter studies clearly demonstrated a role of CD4⁺ T cells in brain function, almost nothing is known about the role of CD8⁺ T cells, and this despite the fact that CD8⁺ T cells are in equal proportions or even outnumber CD4⁺ T cells in both the human and the mouse brain (Bradl et al., 2005; Ritzel et al., 2016; Smolders et al., 2013; Song et al., 2016).

Here, we have investigated the role of CD8⁺ T cells in EE-induced brain plasticity. We found that CD8⁺ T cell depletion abolished EEinduced behavioral changes, hippocampal plasticity, neurogenesis in DG, spinogenesis in CA and functional synaptic plasticity in CA1. We further demonstrated that CD8⁺ T cells in SE and EE mice were functionally different in both the spleen and the brain.

2. Materials and methods

2.1. Mouse strains and housing

C57BL6/J female mice (Janvier Labs, France) were exposed to EE starting 4 weeks after birth (i.e. at weaning) for a 1, 2, 3 or 4 week period (Suppl Fig. 1 A and B). A total number of 388 C57BL6/J mice were used for this study. 12–15 age-matched mice were housed in large-sized cages (9120 cm²; $L \times l \times h$: $120 \times 76 \times 21$ cm) with nesting material, houses, running wheels, hammocks, scales, plastic toys and tunnels (Suppl Fig. 1C). Objects were changed twice a week. Mice in standard conditions (SE) were housed in medium sized cages (666 cm²; $L \times l \times h$: $36 \times 18.5 \times 14$ cm) with 5–6 mice/cage without objects. All mice had access to tap water and standard lab chow (diet SAFE A04, 2900 kcal/kg) *ad libitum* and were housed in a 12 h light/12 h dark cycle at 22–23 °C with 40–60% humidity. The animals analyzed in each experiment were randomized either in SE or EE.

20 OT-I female mice (Charles River, France) of the same age, raised in the same conditions, were also used for a set of experiments. These homozygous mice have a transgenic MHC class I-restricted alpha beta T cell receptor designed to recognize ovalbumin (OVA) residues 257–264, an antigen that is absent in the mouse.

All animal studies were carried out in accordance with French standard ethical guidelines for laboratory animals (Agreement N° 75–178, 05/16/2000) and the European Communities Council Directive of 24 Nov 1986 (86/609/EEC). Formal approval to conduct the experiments described has been obtained from the animal subjects review board of our institution and can be provided upon request. All efforts were made to minimize the number of animals used and their suffering.

2.2. T cell depletion

For T cell depletion, 3-week old C57BL6/J female mice were injected *ip* with 0.5 mg of anti-CD8 α (clone 53–6.72, BioXCell or

from hybridoma culture supernatants ATCC[®] No. TIB-105[™]), or isotype control (clone 2A3, BioXCell) mAb. We found that the anti-CD8 "depleting" antibody was in fact a neutralizing antibody and thus we had to use these antibodies together with mouse antirat secondary antibodies (IgG2b, clone RG9/6.13 HLK from hybridomas culture supernatant ATCC[®] No. TIB-167[™]) in order to obtain complete depletion 3 days post-injection as previously described (Goldschmidt et al., 1988) (Suppl Fig. 2). 3 days after the first injection, mice were placed in either SE or EE. Mice received the second and third injections (0.3 mg), 10 days apart each, with the control groups receiving the control antibody at the same time. The mice were subsequently sacrificed, spleens were harvested and immune cells prepared to control for the absence of CD8⁺ T cells by using flow cytometry with anti-CD3, anti-CD8 and anti-CD4 antibodies (BD Biosciences). No depletion was observed in control mice, while around 98% depletion was observed with the anti-CD8 antibody (Suppl Fig. 2A). In order to confirm that the depleting antibodies were efficient in the brain, we measured the presence of T cells in the whole brain by FACS (LSRII Fortessa, BD Biosciences, Rungis) (Suppl Fig. 2B).

2.3. Behavioral studies

Before each trial, all devices were thoroughly cleaned with 70% ethanol and dried. All behavioral tests were performed once on the same cohort of mice (N = 9 per group), in order rotarod, L&D, OF, social interactions, NSF and FST one day apart. The behavioral tests were performed in this order owing to the increasing of stressfulness (Suppl Fig. 1B). An independent cohort of mice N = 10–14 per group was submitted to the Barnes maze experiment.

2.3.1. Rotarod

For assessing motor coordination, mice were placed on a rotating wheel for two 5 min- habituation phases on fixed rod (10 rpm/ min) 4 h apart. Twenty-four hours later, the latency to fall was recorded on accelerating rod (from 10 to 40 rpm/min). The retention duration on the rod was an index of motor coordination.

2.3.2. Open-field (OF) activity and light/dark (L&D) preference tests

Anxiety-like behavior was assessed using the OF and L&D preference tests as previously described (Bailey et al., 2009; Kinsey et al., 2007; Wohleb et al., 2011). For the OF test, mice were placed in the corner of the test apparatus ($40L \times 40 W \times 25H$ cm Plexiglas box, center area $20L \times 20$ W) and activity was recorded for 5 min. Initially, 9 mice per group were tested, however some recording of the OF test were damaged and data were lost, explaining why the number of mice per groups was 6-9 (Fig. 1B). Mice with anxiety-like behavior entered the center less often, delayed the first entry and spent less time in the center of the arena. For light/dark preference (L&D), the test apparatus ($40L \times 30 W \times 25H cm$) was divided into two equal zones with a doorway connecting the two sides. The light zone was very bright (500-600 lux) while the dark zone was protected from light by an opaque lid. To initiate testing, mice were placed into the light side and activity was recorded for 5 min.

2.3.3. Novelty suppressed feeding (NSF)

NSF is a conflict test that elicits competing motivation: the drive to eat and the fear of venturing into the center of the brightly lit arena. The testing apparatus consisted of a plastic box $(45L \times 45$ $W \times 25H$ cm) with 2 cm of wooden bedding on the floor and a single pellet of food in the center. Mice were fasting for 20 h prior testing. At the time of testing, an animal was placed in a corner of the box, and the entire session was videotaped (i.e. 10 min period). The latency to eat (defined as the mouse sitting on its haunches and biting the pellet) was timed. Immediately after the

Please cite this article in press as: Zarif, H., et al. CD8⁺ T cells are essential for the effects of enriched environment on hippocampus-dependent behavior, hippocampal neurogenesis and synaptic plasticity. Brain Behav. Immun. (2017), https://doi.org/10.1016/j.bbi.2017.11.016

H. Zarif et al./Brain, Behavior, and Immunity xxx (2017) xxx-xxx



Ε

G



Control







anic CD8 AD control AD -8-SE EE -150 Latency to find the target (sec) 100 50 0 ò 2 4 6 Trial #

anti-CD8

8

Time spent in target area



Please cite this article in press as: Zarif, H., et al. CD8⁺ T cells are essentia 20 r the effects of enriched environment on hippocampus-dependent behavior, hippocampal neurogenesis and synaptic plasticity. Brain Behav. Immun. (2017), https://doi.org/10.1016/j.bbi.2017.11.016

4

test, food consumption was measured for 5 min as control for potential feeding differences.

2.3.4. Forced swimming test (FST)

Mice were placed in a glass bucket (20 cm diameter, 30 cm deep, filled with water 23 °C \pm 0.5 °C). As described previously by (Porsolt et al., 1977), only the last 4 min were scored for immobility duration. A mouse was considered immobile when it remained floating in an upright position with only slight movements to keep its head above water (Pechnick et al., 2004).

2.3.5. Social interaction test

The social testing apparatus was a rectangular, threechambered box with clear Plexiglas walls, having small circular openings (3.5 cm in diameter) allowing access into each chamber $(25L \times 15W \times 20H \text{ cm})$. Three interconnected chambers were separated by manually operated sliding doors. The test mouse was first placed in the middle chamber and allowed to explore the entire apparatus for five minutes under dim light (25 lux). During the habituation period, the chambers were empty. At the end of the session, the test mouse was confined into the center chamber for two minutes by obstruction of the doorways between the two side chambers. An unfamiliar C57BL/6J female in same age range, that had no prior contact with the subject mice, was enclosed in a perforated box of one of the side chambers while another empty perforated box was placed in the opposite chamber. Both doors to the side chambers were then unblocked and the test mouse was allowed to explore the entire social test box for a 5-min session. The test was videotaped and the time spent in each chamber of the apparatus during the two 5-min sessions was measured (Moy et al., 2004). The first session controlled for the place preference. No significant difference between groups was observed during this period; the second session allowed the assessment of the sociability.

2.3.6. Barnes maze

This model is based on aversion to open and lighted spaces, which motivates the rodent to seek shelter and assesses the spatial learning capability of rodent. The Barnes maze consisted of a circular surface (90 cm diameter, 206 cm²) raised 80 cm from the floor with 20 circular holes around its circumference. The table surface was brightly lit by overhead lighting. Visual cues (colored shapes) were placed around the table in plain sight of the animal. A black Plexiglas box was placed underneath one of the holes as an escape chamber (Suppl Fig. 3A). Two 5-min sessions of training were

performed per day for 4 consecutive days and videotaped. The mouse was placed on the middle of the device and the latency for entering the escape box (or at least two paws in the box for >2 s) was scored to establish a learning curve during 4 consecutive days. On days 5 and 9, probe trials were conducted without the escape box; time spent in each quadrant, a virtual space around each hole (8.2 cm²) was recorded over 90 s. Neither the distance traveled nor the mean speed was significantly different between SE and EE-housed mice.

2.3.7. Statistical analysis

Comparisons between two conditions were made using the nonparametric Kruskal and Wallis test followed by the Dunn's post hoc test except for paired data (i.e. Fig. 1G, Barnes maze), which was analyzed using the Friedmann test. Data are presented as me ans \pm SEM. Statistical significance was set at *p < .05 and **p < .01, ***p < .001.

2.4. Hippocampal neurogenesis

We measured hippocampal neurogenesis in EE and control SE mice using intra-peritoneal (ip.) injections of bromodeoxyuridine (BrdU) (50 mg/kg, once a day for 5 consecutive days) followed by immunohistochemistry quantification of BrdU-stained cells in the hippocampus, according to (Heurteaux et al., 2006). Briefly, mice were euthanized with pentobarbital 24 h or 21 days after the last injection, perfused with ice-cold HBSS (pH 7.4, 1 mg/mL EDTA) and fixed by 3.2% paraformaldehyde (PFA) through intra-cardiac perfusion. The brain was rapidly removed and fixed in 3.2% PFA for 48 h. 40 µm thick serial sections of PFA-fixed brains were cut through the hippocampus on a vibratome (Microm). One slice out of every six was collected for a total number between eight and twelve sections to proceed to immunohistochemistry staining using a monoclonal mouse anti-BrdU (1:7000; BD Biosciences). For BrdU chromogenic immunodetection, sections were incubated for 1 h in biotin-conjugated species-specific secondary antibodies (1:400, Vector Laboratories), followed by a peroxidase-avidin complex solution according to the manufacturer's protocol. The peroxidase activity of immune complexes was visualized with 3,3'diaminobenzidine (DAB) staining using VectaStain ABC kit (Vector Laboratories). BrdU-labeled cells of granular and subgranular layers were counted in each section under a light microscope. The total number of BrdU⁺ cells counted per eight slices was multiplied by 6 to obtain the total number of BrdU⁺ cells per DG.

Fig. 1. CD8⁺ T cell depletion affects EE-induced changes in hippocampal-dependent behavior. **A–E**: Each dot represents an animal; values are means ± SEM. **A**: CD8⁺ T cell depleted mice housed for 4 weeks either in SE (white) or EE (grey) were tested for motor coordination, and assessed by the time of retention on the rotarod. **B**: Mice were assessed in the open-field test (OF). Time spent in the aversive center of the arena (left) was compared to the number of entries in the center (right). **C**: Anxiety behavior was assessed in the light/dark paradigm (L&D) by recording the number of attempts to go to light (left), the first entry in black (center) and the time spent in the lighted aversive area (right). **D**,**E**: Anxiety and depressive-like phenotypes of CD8⁺ T cells-depleted mice housed either in SE or EE were assessed by the latency to feed in the NSF (**D**) and the time of immobility in the FST (**E**). The NSF test was stopped after a 10 min period. **F**: Social skills were evaluated by the social interaction test: the % of time spent in the compartment previously associated with the presence of the mouse was measured as indicated. Means ± SEM, N = 9 for each group. **G**: Spatial learning curve was established by trainings in the Barnes maze for four consecutive days (two trainings a day). Groups were compared using the Friedman rank test for repeated measures with level of QP (D9), *t*-test was performed on means. *: p < .05. **G** and **H**: means ± SEM, N = 10, 10, 10 and 14 for SE control, EE control, SE + anti CD8 Ab and EE + anti-CD8 Ab, respectively.

Dunn's multiple comparison	Difference in Rank Sum	p value	Significant
SE Ctrl vs EE Ctrl	13.00	<i>p</i> < .05	*
SE CD8 vs SE ctrl	9.00	<i>p</i> > .05	ns
SE CD8 vs EE CD8	13	<i>p</i> < .05	*
EE CD8 vs EE ctrl	9.00	<i>p</i> > .05	ns

Please cite this article in press as: Zarif, H., et al. CD8⁺ T cells are essential for the effects of enriched environment on hippocampus-dependent behavior, hippocampal neurogenesis and synaptic plasticity. Brain Behav. Immun. (2017), https://doi.org/10.1016/j.bbi.2017.11.016

We also performed a double labeling experiment with both the monoclonal mouse anti-BrdU (1:500; BD Biosciences) and a secondary donkey anti-mouse Alexafluor 488 (Invitrogen), and thepolyclonal rabbit anti-NeuN (1:1000, Abcam Ab177487) antibody coupled to a secondary donkey anti-rabbit Alexafluor 594 antibodies (Invitrogen) to investigate which of the new cells were differentiated into neurons, following the protocol (Wojtowicz and Kee, 2006).

2.5. Spinogenesis

Mice were deeply anesthetized with pentobarbital and perfused with 3.2% paraformaldehyde (PFA). A single brain serial section (200 μ m) was cut at the level of the hippocampus on a vibratome (Microm) from the same mice as those used for the neurogenesis experiments approximately between bregma 2.30 and 2.50 mm. The slices were then stored in 0.1% (wt/vol) NaN₃ in PBS at 4 °C until microinjections of the fluorescent dye Alexa Fluor 568 (ThermoFisher Scientific) by iontophoresis coupled with pressure ejection using micropipettes with high tip resistance (15–20 M\Omega). The slices were then mounted using a Vecta-Shield mounting medium and imaged within a few days.

Stacks of images from segments of 45 µm long dendrites were obtained through a 63X/1.4 NA objective on an LSM780 laserscanning confocal microscope (Carl Zeiss, Le Pecq, France). A detailed morphometric analysis of the spines was first performed using an in-house macro-program from ImageJ software (Rasband, W.S., ImageJ, US National Institutes of Health, Bethesda, Maryland, USA, http://imagej.nih.gov/ij/, 1997–2012). Briefly, after a maximal projection of the images of each stack and segmentation to produce a binary image (Suppl Fig. 5), the skeleton of the dendritic tree was analyzed and its length measured. The number of intersections and spines were determined and after binary thinning the length of the principal axis was measured. These images were subsequently analyzed with NeuronStudio software and spines were classified into "thin", "mushroom" and "stubby" according to (Peters and Kaiserman-Abramof, 1970) using the following parameters: the maximum and minimum spine heights were set at 3.5 and 0.5 μ m, respectively. Minimum stubby spine was set at 22 voxels. In each group, we used 1874-2856 segments of dendrites from 82 to 106 neurons from 4 to 6 mice.

2.6. Electrophysiology

2.6.1. Acute brain slices

Mice were deeply anesthetized with halothane, then decapitated and brains were immediately placed in ice-cold gassed medium (95% O2/5% CO2) containing (in mM): 125 NaCl, 2.5 KCl, 1 MgCl₂, 0.4 CaCl₂, 1.25 NaH₂PO₄, 26 NaHCO₃ and 25 glucose. Coronal slices of hippocampus (350 μ M thick) were cut with an HM650V vibratome (Microm, Walldorf, Germany) and placed in a holding chamber at 34 °C for 1 h. Slices were then transferred into a phosphate bicarbonate buffered saline (PBBS) composed of (in mM): 125 NaCl, 2.5 KCl, 1 MgCl₂, 2 CaCl₂, 1.25 NaH₂PO₄, 26 NaHCO₃ and 25 glucose, pH 7.4 when bubbled with 95% O₂ and 5% CO₂.

The same mice were used both for patch-clamp and LTP experiments using two different electrophysiology setups simultaneously.

2.6.2. Patch clamp

CA1 pyramidal neurons were patch-clamped in the whole-cell configuration. This technique allows for the recording of currents from the whole surface of a single neuron in the living slice while it is still connected with the rest of the neuronal network. Using pipettes $(2-8 \text{ M}\Omega)$ filled with a cesium chloride (CsCl) solution supplemented with N-(2,6-dimethylphenylcarbamoylmethyl)trie

thylammonium bromide (QX314, a sodium channel blocker to block action potentials) we recorded the glutamatergic excitatory post-synaptic currents (EPSCs) which were pharmacologically isolated using the GABA_A receptor antagonist bicuculline (10 μ M) in the bath solution. We recorded both spontaneous (without the sodium channel inhibitor tetrodotoxin, TTX) and miniature (in the presence of 2 μ M TTX) EPSCs. Three minute recordings were used to determine the properties of the spontaneous events. 3– 16 neurons were recorded in 2–5 mice for each group.

2.6.3. Long-term potentiation (LTP)

Hippocampal slices were placed under a Nomarski microscope (Zeiss, Germany) equipped with an infrared video camera (Axiocam, Zeiss) in a recording chamber superfused at a flow rate of 1 mL.min⁻¹ with oxygenated PBBS. Pictures were taken using a digital camera (Axiocam, Zeiss) connected to image-acquisition software (Axiovision, Zeiss). Recordings were made at room temperature (20-25 °C) using an Axopatch 200B (Axon Instruments, Foster City, CA, USA) connected via an interface (Digidata 3200) to a computer running pClamp (Axon Instruments). At the beginning of each recording, a tungsten bipolar stimulating electrode was positioned at the stratum radiatum for stimulation of the Schaffer collateral projections to CA1, using a stimulator (STG4002 Multichannel systems) connected to the computer. Field potentials in the dendritic tree of CA1 neurons were recorded with pipettes (made from borosilicate glass capillary (Hilgenberg, Masfeld, Germany) with resistance of 3–6 M Ω when filled with extracellular solution). The intensity of stimulation was adjusted in each experiment to evoke about 50% of the maximal field potential amplitude without appreciable population spike contamination. Low-frequency stimulation (0.1 Hz) was applied to the Schaffer collaterals to establish a stable baseline (for 20-30 min) of the excitatory post synaptic potential (EPSP) slope, after which LTP was induced by high-frequency stimulation (HFS; 100 Hz/1 s), followed by the initial low frequency stimulation. To analyze the time course of the EPSP slope, the recorded fEPSP data were routinely averaged over $1 \min (n = 6)$. Successful induction of LTP was obtained when the post-HFS EPSP exceeded that seen before HFS and was maintained for at least 40-60 min. 5-6 mice were used per group.

2.6.4. Drugs and reagents

APV ((2R)-amino-5-phosphonovaleric acid, a N-methyl-Daspartate (NMDA) receptor antagonist) and 6-cyano-7-nitroqui noxaline-2,3-dione (CNQX), α -amino-3-hydroxy-5-methyl-4-isoxa zolepropionic acid receptor (AMPA)/Kainate receptor antagonist, QX314, TTX and bicuculline were from Sigma Aldrich, France.

2.6.5. Data analysis

Voltage clamp data were digitized at 0.5 kHz using a Digidata interface coupled to a microcomputer running p-Clamp 9 (Axon Instruments). Currents were digitally filtered at 1–3 kHz. Average data were expressed as mean ± SEM, n = number of neurons that were recorded. Statistical significance between groups was calculated using the Student *t*-test, the ANOVA followed by the Fisher test, or the Kruskal-Wallis followed by the Dunn's test and were considered significant at *p < .05, **p < .01 and ***p < .001 using a statistical software package (SigmaStat 2.03, Jandel Sci and Graph Prism software). Cumulative histograms were compared by Kolmogorov-Smirnov analysis using Clampfit (Axon Instruments), with an equal number of events for each group. Significant differences between two groups of data were determined using a Mann-Whitney test for non-parametric data.

Please cite this article in press as: Zarif, H., et al. CD8⁺ T cells are essentiad **f** ar the effects of enriched environment on hippocampus-dependent behavior, hippocampal neurogenesis and synaptic plasticity. Brain Behav. Immun. (2017), https://doi.org/10.1016/j.bbi.2017.11.016

6

2.7. RNA isolation and quantitative polymerase chain reaction (qPCR)

Total RNA from hippocampus tissue (entire, or dissections from DG and CA from the same mice) were isolated using the Trizol[®] RNA extraction kit (Invitrogen) according to the manufacturer's recommendations, followed by a RQ1 DNAse (Promega) treatment. First-strand cDNAs were synthesized from 2 µg of total RNA with 200 U of SuperScript III reverse transcriptase (SuperScriptIII, Invitrogen) in the appropriate buffer in the presence of 25 μ g/mL random primers, 0.5 mM desoxyribonucleotide triphosphate mix, 5 mM dithiothreitol, 40 U RNAsin (Promega). The reaction was incubated for 5 min at 25 °C, 50 min at 50 °C, then inactivated 15 min at 70 °C. Quantitative PCR was performed using the SYBRgreen method (Roche) with the LightCycler 480 sequence detector system (Roche Diagnostics). β-Actin and GAPDH were used as housekeeping genes for normalization. Primers were purchased from QIAGEN (QuantiTect primer assay, QIAGEN). The following primers were used

Gene	Cat. No.	Gene	Cat. No.
β-actin	QT01136772	Slc17a7	QT00148841
Bdnf	QT00097118	Syn1	QT00171206
Cntf	QT00303478	Syn2	QT00152698
Cx3cr1	QT00259126	Syp	QT01042314
Dlg4	QT00121695	Syt1	QT00167300
Homer1	QT00129983	DG and CA	genes
Icam1	QT00155078	Dsp	QT00321496
Igf1	QT00121695	Tdo2	QT00150409
Ntf3	QT02524942	Tyro3	QT00197659
Ntf5	QT00254058	Meis1	QT00172557

To confirm that the dissected tissue is DG we measured specific gene expression (Dsp, Tdo2 and Ammon's horn enriched genes, Tyro3, Meis1) using quantitative Polymerase Chain Reaction (qPCR) according to (Hagihara et al., 2009). Gene expression was analyzed following the $\Delta\Delta$ Ct method.

Statistical analysis: for each gene, we first performed a nonparametric Kruskal-Wallis test on Δ Ct values followed by exact two-sample Fisher-Pitman permutation tests comparing SE to EE at 3 W and 4 W, and in each group (SE or EE) comparing 3 W to 1 W and 4 W to 1 W (or 3 W to 2 W and 4 W to 2 W for Abinjected mice). The obtained *p* values were corrected using the FDR method of Benjamini-Hochberg for a total of 8 comparisons per gene.

2.8. T cell immunostaining in choroid plexus

Mice were deeply anesthetized with pentobarbital and transcardially perfused with ice-cold HBSS. Choroid plexus from individual mice were collected rapidly in cold PBS and fixed on slide in a 2.5% PFA solution. For this experiment, we used the same mice as the ones used for hippocampus qPCRs. Choroid plexus cells were stained with monoclonal mouse anti-actin (1:300, Abcam Ab8227) and a secondary goat anti-mouse Alexafluor 488 (1:1000, Invitrogen) and the polyclonal hamster anti-CD3 (1:200, Abcam Ab5690) antibody coupled to a secondary goat anti-hamster Alexa fluor 594 antibodies (1:1000, Invitrogen) to localize T cells in the choroid plexus.

2.9. Immune cell staining, flow cytometry and cell sorting

Staining of brain immune cell surface antigens was performed as previously described (Cazareth et al., 2014). Briefly, Fc receptors were blocked with a purified rat anti-mouse CD16/CD32 (2.4G2, Fc block) antibody (BD Biosciences). Cells were incubated with the appropriate combination of conjugated antibodies: anti-CD11b-PerCP-Cy5.5, anti-CD45-APC-Cy7, anti-CD3-FITC, anti-CD8-PE-Cy7 or anti-CD8-PE, anti-CD4-BV510 or anti-CD4-PB, anti-CD44-PE and anti-CD62L-A700 (BD Biosciences) antibody for 30 min. Phenotype analysis cells were performed in a flow cytometer (LSR II Fortessa, BD). Immune cells were sorted on a Becton-Dickinson FACS Aria III.

2.10. CD8⁺ T cell enrichment from splenocytes

A single cell suspension from spleen was obtained by mashing the organs through nylon sieves in RPMI 1640 (Gibco, Life Technologies). Erythrocytes were eliminated by treatment with ammonium chloride potassium (ACK). Splenic CD8⁺ T cells were enriched to a purity of >96% by negative selection with the EasyStep mouse CD8⁺ T cells enrichment kit (StemCell Technologies).

2.11. Immune cells isolation from adult brain

Mice were deeply anesthetized with a lethal injection of pentobarbital. Immune brain cells were isolated from whole-brain homogenates using a protocol adapted from Cardona et al. (Cardona et al., 2006) as previously described in (Cazareth et al., 2014). Mice were transcardially perfused with ice-cold HBSS containing 1 mg/ml EDTA. Brains were collected and homogenized in PBS, resuspended in PBS containing 3 mg/ml collagenase D (Roche Diagnostics) and incubated 20 min at 37 °C. After incubation, brain homogenates were filtered on 70 µm pore size cell strainers (BD Biosciences), centrifuged (10 min, 2000 rpm), washed and resuspended in 6 ml of 38% isotonic Percoll (GE Healthcare), before centrifugation (20 min, 2000 rpm, 4 °C). The surface ring containing myelin and debris was discarded. Cell pellets containing brain immune cells were collected washed with PBS containing 0.5% BSA and 2.5 mM EDTA and labeled for subsequent cell sorting and/or flow cytometry analysis.

2.12. 12-RNA sequencing

2.12.1. Cell sorting

Mice were deeply anesthetized with a lethal injection of pentobarbital and transcardially perfused with ice-cold HBSS containing 1 mg/mL EDTA. Choroid plexus and spleen were collected in two independent series of experiments. Splenocytes were suspended by mechanic dissociation and immune cells were prepared after ACK treatment to remove red blood cells. Choroid plexus were homogenized in PBS containing 3 mg/mL collagenase D (Roche Diagnostics) and incubated for 20 min at 37 °C. Cell pellets containing choroid plexus immune cells were collected, washed with PBS containing 0.5% BSA and 2.5 mM EDTA and labeled. Staining of immune cell surface antigens from choroid plexus and spleen was performed as previously described (Cazareth et al., 2014). Immune cells were identified according to the labeling of anti-CD45, anti-CD11b, anti-CD3, anti-CD4 and anti-CD8 conjugated antibodies (BD Biosciences). CD45⁺ CD11b⁻ CD3⁺ CD4⁺ and CD45⁺ CD11b⁻ CD3⁺ CD8⁺ cells were sorted by the FACSAria cell sorter (BD Biosciences).

2.12.2. cDNA preparation

Cells were directly collected into 0.2 mL tube stripes in a lysis reaction with a final volume of 13.5 μ l according to Arguel et al., all incubations steps occurred in a Veriti thermal cycler (Applied Biosystem). Reverse transcription (RT) mix was added during incubation at 10 °C immediately following lysis, tubes were vortexed and centrifuged briefly and put back in thermocycler for RT incubations steps. Template switching oligonucleotide (TSO) was

Please cite this article in press as: Zarif, H., et al. CD8⁺ T cells are essential for the effects of enriched environment on hippocampus-dependent behavior, hippocampal neurogenesis and synaptic plasticity. Brain Behav. Immun. (2017), https://doi.org/10.1016/j.bbi.2017.11.016

designed as per Picelli et al. (Picelli et al., 2014), with a LNA on 3 prime extremity 5'-GCA ATG AAG TCG CAG GGT TGN NNN HHH HrGrG lnG-3'.

For CD8⁺ T cells from the choroid plexus, the number of cells varied from 2 to 20 cells per sample, thus the entire RT volume was added to the PCR amplification reaction, leading to 31.5 μ l of RT in a final volume of 83 μ l, 60 μ M barcode primer, 0.6 μ M biotinylated PCR primer. For spleen, 1000 cells per sample were used, and after RT, 1/10 of cDNA was used for sequencing.

2.12.3. Library preparation

All 48 barcoded cDNAs were pooled and 20 nanograms was used as template for Ion Proton sequencer tagmentation protocol as described previously (Arguel et al., 2017).

2.12.4. Sequencing

Libraries were sequenced on a Proton Ion PI[™] Chip V3 (Thermo). generating 38 M reads for the choroid plexus and 170 M for the spleen experiment. Single end reads were then processed with a custom analysis pipeline. The first step was to remove the 3p adaptor "CTGTCTCTTATACACATCT" and the sequenced front adaptor: "AAGTCGCAGGGTTG" using Cutadapt (v1.2.1). Immediately after the front adaptor we stipulated an 8 base pattern requirement in accordance with the design UMI N4H4 (N = ATCG, H = ATC only) followed by a stretch of GGG. Reads without those specifications were discarded from further analysis to avoid artefactual molecules that were produced by the creation of new UMI sequences related to sequencing errors, especially indels that are frequent in Ion Torrent reads. Reads with a template sequence length of under 50 bases were discarded. This filtration process removed 32% and 34% of the total number of reads for the plexus and the spleen experiment respectively. Mapping of the identified cDNAs was conducted with the STAR_2.4.0a versus mm10 mouse genome build using RNAseq Encode recommendations. For molecule counting based on UMI counts, we used the Dropseq Core Computational Protocol version 1.0.1 (dropseq.jar) from McCarrol (Macosko et al., 2015) using the GTF gene model from Ensembl release GRCm38.83. Digital Expression function of dropseq.jar was called with default parameters (edit distance = 1) to produce a matrix of molecule counts which was used in subsequent statistical analysis.

2.12.5. Statistical analysis and biological theme analysis

Choroid plexus and spleen samples were analyzed separately. Quality control of RNAseq data was performed with in-house R scripts. The purity of biological samples was verified by inspection of Cd4, Cd8a and Cd8b1 expression levels. CD4 (CD8 respectively) samples with non-zero expression levels for Cd8a or Cd8b1 (Cd4 respectively) were considered of poor quality and excluded. Low abundance genes were filtered out, then sequencing depth normalization and differential expression analysis was carried out using the Bioconductor package DESeq2 (Love et al., 2014). P-values were adjusted for multiple testing using the Benjamini-Hochberg procedure, which controls the false discovery rate. No gene reached statistical significance at the 0.05 level after adjustment. For choroid plexus samples, mild differential expression was observed between the enriched and standard environment and candidate differentially expressed genes were selected based on a nominal p < .05. For spleen samples, differentially expressed candidate genes were selected based on a combination of nominal p < .05, absolute log2 fold-change > 1 and an average log2 expression level >2. Heatmaps were generated using the R package pheatmap (Pretty Heatmaps V 1.0.8, https://CRAN.R-project.org/package = pheatmap).

Canonical pathways and molecular function analyses were carried out using Ingenuity Pathway Analysis (IPA, Qiagen Bioinformatics). Gene Set Enrichment Analysis was performed using GSEA, by comparing the modifications observed in EE vs SE to modifications observed in the same subcellular population in the immune set of data (C7) or a larger ser of data (C2). Pathways with a normalized p < .05 were considered to be enriched.

2.13. T cell proliferation and cytokine production

For T cell stimulation, 96-well microplates were coated with 10 μ g/mL of anti-CD3 mAb in sterile PBS and incubated overnight at 4 °C. One day later, wells were washed three times with sterile PBS to remove non-bound soluble antibody. 3.10⁵ enriched CD8⁺ T cells from spleen and 2 μ g/mL of soluble CD28 antibody was added in a classic culture medium and incubated 72 h at 37 °C, 5% CO₂. Two independent experiments were performed (one for sorting, and the other for negative selection). A third independent sorting experiment was performed where CD8⁺ T cells were submitted to 4 h of stimulation with phorbol myristate acetate (PMA, 20 ng/ml)/ionomycin (1 μ g/ml) in a classic culture medium (PMA/Iono). IFN γ and TNF α levels were measured by MSD (Meso Scale Discovery) following the manufacturer's recommendations.

For assessing T cell proliferation, 1×10^6 CD8⁺ T cells were cultured with 5 μ M CFSE in 48 wheels plate with different concentrations (6, 13 and 25 μ g/mL) of anti-CD3 and 2 μ g/mL of soluble anti-CD28. After 72 h, cells were stained and acquired by cytometry (Fotessa, BD). We used CFSE labeling of CD8⁺ T cells to measure proliferation. The dye is long lasting and well-retained within labeled cells.

2.14. Astrocytes and microglia isolation from adult brain

Mice were euthanized with pentobarbital, perfused with icecold HBSS (pH 7.4, 1 mg/mL EDTA) through intra-cardiac perfusion. Hippocampi were dissected and astrocytes and microglia were sorted out using sequential labeling with anti-ACSA2 and anti-CD11b magnetic microbeads, respectively. Briefly, single-cell suspensions from hippocampi were obtained after use of Adult Brain Dissociation Kit (Miltenyi Biotec) in combination with the gentle-MACS Dissociator (Miltenyi Biotec). Fc receptors were blocked with FcR Blocking Reagent (Miltenyi Biotec). Then, the ACSA-2⁺ cells were magnetically labeled with anti-ACSA-2 microbeads (Miltenyi Biotec). The cell suspension was loaded onto MACS® Column (Miltenyi Biotec), which was placed in the magnetic field of MACS Separator (Miltenyi Biotec). The magnetically labeled ACSA-2⁺ cells were retained within the column. The unlabeled cells running through this cell fraction was used to label and sort CD11b⁺ cells by using the same protocol as ACSA-2⁺ cells isolation.

3. Results

3.1. EE-induced behavior changes are dependent on CD8⁺ T cells

We first confirmed that CD8⁺ T cell depletion did not impact the animal weight (Suppl Fig. 1 D) or locomotion as assessed in the Rotarod test (Fig. 1A).

CD8⁺ T cell depletion abolished the effects of EE on anxiety, as measured by multiple behavior tests including the open-field test (Fig. 1B), the light/dark test (Fig. 1C), and the novelty suppressed feeding test (Fig. 1D). In contrast, CD8⁺ T cell depletion did not alter the beneficial effects of EE in the forced swimming test (Fig. 1E) and the social interaction test (Fig. 1F).

In a second set of experiments, the Barnes maze test was performed to assess the role of CD8⁺ T cells in spatial learning (Suppl Fig. 3). Although EE mice found the hole faster than SE mice on the first day of training, the performances of all groups of mice were similar at the end of the training period (Fig. 1G) and on the first

Please cite this article in press as: Zarif, H., et al. CD8⁺ T cells are essentiad **fo**r the effects of enriched environment on hippocampus-dependent behavior, hippocampal neurogenesis and synaptic plasticity. Brain Behav. Immun. (2017), https://doi.org/10.1016/j.bbi.2017.11.016

test day (day 5, Fig. 1H left and Suppl Fig. 3B), suggesting that neither the EE nor the CD8⁺ T cell depletion was involved in shortterm memory. On day 9 (Fig. 1H, right and Suppl Fig. 3C), EE mice injected with the control antibody spent significantly more time in the vicinity of the target hole compared to control SE mice whereas CD8⁺ T cell depletion abolished the EE-induced increase in time spent around the target hole.

In conclusion, of the tests we carried out, the behavioral tests of anxiety and spatial learning involving hippocampus function, such as the Barnes maze, were affected by CD8⁺ T cell depletion.

3.2. EE-induced hippocampal plasticity is dependent on CD8⁺ T cells

3.2.1. EE-induced neurogenesis is CD8⁺ T cell dependent

EE increases hippocampal thickness, dendritic arborization and cell number (Kempermann et al., 1997). We first investigated whether CD8⁺ T cell depletion affected EE-induced changes in the number of cells, dendrites, or spines. In mice injected with a control antibody, EE housing increased neurogenesis as illustrated by the increase in BrdU⁺ cells in DG (Fig. 2A). This effect was observed by counting the number of BrdU⁺ cells 24 h (Fig. 2Aa) and 21 days after BrdU injection (Fig. 2Ab) further demonstrating that EE promoted both cellular proliferation and survival, respectively. Depletion of CD8⁺ T cells partially abolished the EE-induced increase in the number of BrdU⁺ cells (Fig. 2A, 2B). Therefore, the EE-induced increase in DG cell proliferation and survival is at least partially CD8⁺ T cell dependent.

Because BrdU could be incorporated into both neuronal and glial cells, BrdU/NeuN co-staining was performed to assess the specific BrdU incorporation into neurons (Fig.2B). Regardless of the housing conditions or Ab treatments, no significant difference was observed between the number of double (BrdU/NeuN) and single (BrdU) positive cells, indicating that in our conditions, the BrdU incorporation occurred almost exclusively in neuronal populations.

We subsequently investigated whether the effect of CD8⁺ T cells was antigen-dependent. We used OT-I mice in which all T cells react to an ovalbumin (OVA)-derived peptide bound to H2-K^b MHC class I molecules. Neurogenesis in the DG hippocampus was increased in OT-I mice housed in EE compared to those housed in SE (Fig. 2Ac). This suggests that the impact of CD8⁺ T cells on EEinduced neurogenesis was antigen-independent.

Because neurogenesis is regulated by neurotrophic factors, the expression level of several neurotrophic factors was measured in DG using qPCR over the time of housing in SE and EE. In mice raised in SE, the expression of neurotrophic factor genes was relatively stable over time from 1 week housing for Igf1 and Ntf3, reaching significance only at 4 weeks for Ntf5 and Cntf, and at 3 weeks for Bdnf with a twofold increase only. By contrast, in EE mice, the expression of Bdnf, Cntf, Igf1, Ntf3 and Ntf5 progressively increased, reaching statistical significance after 3 weeks for Bdnf, Igf1, Ntf5 and Cntf and increasing significantly more than in SE mice for Bdnf and Igf1 at 3 W (Fig. 3A). In order to evaluate the effect of CD8⁺ T cell depletion, the expression of neurotrophic factor genes was assessed over the time between 2 and 4 weeks of EE housing. For mice treated with control Ab, EE induced a significant increase of the expression of Bdnf and Ntf3 that was abolished by CD8⁺ T cell depletion. This suggests that CD8⁺ T cells played a critical role in neurogenesis process (Fig. 3B).

3.2.2. EE-induced synaptogenesis in CA1 is dependent on CD8⁺ T cells

We next investigated the role of CD8⁺ T cell depletion on the number and type of basilar dendrite spines in pyramidal CA1 neurons using a previously described method (Suppl. Fig. 4 A, B). Spine density (Fig. 4A), head diameter (Fig. 4B) and length (Fig. 4D) were increased in EE mice compared to SE mice. The ratio between the number of thin and stubby spines was also different between SE

and EE mice (Suppl Fig. 4C and D). These differences were partially abolished by CD8⁺ T cell depletion, although head diameter (Fig. 4B) and spine length (Fig. 4D) attenuation was mainly due to an increase following CD8⁺ T cell depletion in SE. Altogether, these results demonstrate that EE-induced spinogenesis in pyramidal CA1 neurons of the hippocampus was dependent on CD8⁺ T cells, although CD8⁺ T cell depletion also affected spine shape in SE conditions.

EE-induced changes in spine morphology were expected to be associated with altered expression of genes encoding synaptic proteins such as the neurotrophic factor Bdnf, presynaptic proteins (synapsin 1, synapsin 2, synaptophysin and synaptotagmin) and proteins expressed at the glutamatergic synapse (Dlg4, homer1, Slc17a7). To investigate this further, gene expression was measured by RT-qPCR from CA of SE and EE mice as a function of housing time (Fig. 5A). The level of several mRNAs increased over time in EE mice, reaching statistical significance at 3 weeks for Bdnf, Syt1, Syn1, Syn2, Syp, Homer1 and Slc17a7. By contrast, in SE, only Bdnf and Syn2 mRNAs levels increased at a housing time of 4 W, suggesting that EE promoted the expression of these genes involved in synaptogenesis over time. These differences were abolished upon depletion of CD8⁺ T cells (Fig. 5B) therefore demonstrating a critical role for these cells in this phenomenon.

3.2.3. Effects of CD8⁺ T cell depletion on glutamatergic transmission at the CA1 synapses

We then sought to further characterize the effects of CD8⁺ T cell depletion on spontaneous glutamatergic activity in SE and EE mice (Fig. 6). Thus, we used a patch-clamp technique to record both spontaneous EPSCs (sEPSCs, in the presence of 10 µM bicuculline to block GABA_A IPSCs) and miniature EPSCs (mEPSCs, in the presence of bicuculline + 2 µM TTX to block the action potentials) on CA1 pyramidal neurons. In control conditions, EE mice exhibited a 1.5-2-fold increased frequency of both sEPSCs and mEPSCs compared to SE mice, suggesting an increased number of synaptic release sites (Fig. 6 and Suppl. Fig. 5), which correlated with an increase in the number of spines counted in brain slices at the level of the basal secondary dendrites of CA1 neurons, as previously shown (Hosseiny et al., 2015). The amplitude and the time constant of decay of the events were unaffected in mice injected with control antibodies. The EE-induced increase in sEPSC frequency was no longer observed in CD8⁺ T cell depleted mice, but CD8⁺ T cell depletion caused a significant increase in sEPSC frequency in SE (Fig. 6A), whereas no effect on amplitude or time constant of decay was observed between these groups. When considering the mEPSCs, however, no proper effect of CD8⁺ T cell depletion was observed on their frequencies in SE mice whereas the EEinduced increase in mEPSC frequency was abolished.

3.2.4. Effect of CD8⁺ T cell depletion on LTP

LTP was reduced in EE mice as compared to SE mice injected with control antibodies (Fig. 6B and C). This effect was abolished by CD8⁺ T cell depletion (Fig. 6C).

Overall our results demonstrated that EE-induced neurogenesis and increased synaptic activity were dependent on CD8⁺ T cells.

3.3. CD8⁺ T cells are phenotypically different in SE and EE mice

3.3.1. CD8⁺ T cell number and function

SE and EE mice exhibited a similar number of CD8⁺ T cells in spleen tissue, as well as similar CD8/CD4 ratios in spleen (Suppl Fig. 10A). We investigated whether CD8⁺ T cells from SE and EE mice differed in their ability to secrete cytokines or proliferate in response to *in vitro* stimulations with an anti-CD3/CD28 Ab or with the TCR independent PMA/Iono stimulation. CD8⁺ T cells from EE mice secreted increased levels of TNF α but similar levels of IFN γ ,

Please cite this article in press as: Zarif, H., et al. CD8⁺ T cells are essential for the effects of enriched environment on hippocampus-dependent behavior, hippocampal neurogenesis and synaptic plasticity. Brain Behav. Immun. (2017), https://doi.org/10.1016/j.bbi.2017.11.016

H. Zarif et al./Brain, Behavior, and Immunity xxx (2017) xxx-xxx



Fig. 2. $CD8^+$ T cell depletion affects neurogenesis in DG of the hippocampus from SE and EE mice. **A:** Chromogenic immunedetection of new BrdU⁺ cells measured in the DG 24 h (**a**) or 21 days after the first BrdU injection (**b,c**) in mice raised in SE (white) or EE (grey). WT mice were treated either with the depleting anti-CD8 antibodies mixture (see methods) or the control antibody mixture (**a, b**). **c:** Effect of 4 weeks in EE housing on the number of BrdU⁺ cells in OT-I mice. Each dot represents a mouse. Bars: means ± SEM. a,b: N = 6 per group. c: SE, N = 7 and EE, N = 13. **B:** Confocal micrographs of the DG from control (left) or CD8 T cells-depleted (right) mice housed in SE (white) or EE (grey) showing the labeling of BrdU⁺ (green) and NeuN⁺ (red) cells (**a**). Histograms show the mean number of BrdU⁺ cells and BrdU⁺ neuN⁺ cells labeled in the DG (**b**). Each dot represents a mouse. Bars: means ± SEM. N= 4 per group. (For interpretation of the references to colour in this figure legend, the reader is referred to the web version of this article.)

Two-way ANOVA	p interaction (treatment vs housing)	p treatment (Control vs Anti-CD8 Ab)	p housing (SE vs EE)
BrdU 24h	.20	.09	.0146
BrdU 21j	.0052	.4002	.0006

Please cite this article in press as: Zarif, H., et al. CD8⁺ T cells are essentiad **fg** the effects of enriched environment on hippocampus-dependent behavior, hippocampal neurogenesis and synaptic plasticity. Brain Behav. Immun. (2017), https://doi.org/10.1016/j.bbi.2017.11.016

H. Zarif et al./Brain, Behavior, and Immunity xxx (2017) xxx-xxx



Fig. 3. CD8⁺ T cell depletion blocks EE-induced neurotrophic factor gene expression increase in the DG of the hippocampus. DG were micro-dissected from hippocampus and transcript abundance of neurotrophic genes was determined by RT-qPCR after different housing duration (2W, 3 W and 4 W) in SE or EE conditions. Bars represent the mean expression levels ± SEM of the $2^{-\Delta\Delta Ct}$. For each gene, we first performed a Kruskal-Wallis test on the Δ Ct values followed by an exact two-sample Fisher-Pitman permutation test comparing SE to EE at 3 W and 4 W, and comparing in each group (SE or EE) 3 W to 1 W and 4 W to 1 W in Fig. 3A (or 3 W to 2 W and 4 W to 2 W for Ab-injected mice in Fig. 3 B). The obtained p values were corrected using the FDR method of Benjamini-Hochberg for a total of 8 comparisons per gene. *: p < .05 and **: p < .01, N = 6 for each group.

as compared to cells from SE mouse spleen (Fig. 7A, B, C). Compared to those from SE mice, CD8⁺ T cells from EE mice demonstrated increased proliferation as assessed by CFSE dilution and flow cytometry (Fig. 7D, E). In contrast, CD4⁺ T cells from SE and EE mice did not differ in their ability to secrete TNF α or IFN γ after stimulation, or to proliferate (Suppl Fig. 6A, B).

3.3.2. Splenic CD8⁺ T cells from SE and EE mice exhibit different transcriptomic profiles

Transcriptomic profiles were compared between CD8⁺ T cells of SE or EE mice. To this end, we purified CD8⁺ T cells from the spleen of SE and EE mice by flow cytometry (1000 cells/mouse, n = 6/group) and analyzed these cells by RNA sequencing transcriptomic analysis. As expected, Cd8a and Cd8b1, but not Cd4 mRNAs were detected in all samples (Suppl Fig. 7A). Among 4856 transcripts, 208 and 225 mRNAs were differentially expressed in SE and EE mice $(Log_2 FC > 0.5 \text{ or } < 0.5, p < .05)$ (Fig. 8). Ingenuity Pathway Analysis (IPA) with the following parameters: p < .05, Log_2 FC 0.5 and intensity 10, revealed that differentially expressed genes that were enriched in several signaling pathways, including the estrogen receptor, glucocorticoid signaling and TNF-R1 and TNF-R-2 signaling pathways (Suppl Fig. 8). We also used a Gen Set Enrichment Analysis (GSEA, Broad Institute) to assess the overall differences between EE and SE conditions in CD8⁺ T cells from spleen compared to an immunology data set that was previously published by others (named C7). We selected the pathways that corresponded to the variations observed in EE vs SE with a p < .05 and ordered them according to the normalized enrichment score and

considered only those experiments that concerned CD8⁺ T cells (Suppl Fig. 9). Variations in expression between the sets of genes obtained from SE to EE were similar to variations in expression observed in naïve vs. memory or in effector vs. naive CD8⁺ T cells. Compared to a more general set of GSEA data (named C2) and focusing on the reactome pathways closest to the set of genes that differed between EE and SE, we also found similarities with the TGF- β receptor signaling reactome.

As a conclusion, splenic CD8⁺ T cells of mice raised in EE vs. SE differ in the expression of a set of genes, in agreement with differences in previously described cell profiles.

3.3.3. CD8+ T cells from the whole brain

3.3.3.1. $CD8^+$ T cells are present in the whole brain (i.e. including blood vessels, meninges, CSF, and the choroid plexus). As previously published, a small number of $CD3^+$ T cells were detected in the whole brain (445.9 ± 79.7, n = 11). Of note, $CD8^+$ T cells accounted for 30% and 50% of $CD3^+$ T cells in spleen and whole brain respectively (Suppl Fig. 10A). Among $CD8^+$ T cells detected in the whole brain, about 50% (216.8 ± 30.7, n = 11) were present in the choroid plexus. Immunostaining showed that they were close to epithelial cells (Suppl Fig. 10B).

3.3.3.2. Choroid plexus $CD8^+$ T cells transcriptomic signature is different in SE and EE. RNAseq experiments were performed on isolated $CD8^+$ and $CD4^+$ T cells from the choroid plexus of SE and EE mice (10 cells/mice, 12 mice/group) and the transcriptomic profiles were analyzed by single cell RNAseq methods. As expected, Cd8a

Please cite this article in press as: Zarif, H., et al. CD8⁺ T cells are essential for the effects of enriched environment on hippocampus-dependent behavior, hippocampal neurogenesis and synaptic plasticity. Brain Behav. Immun. (2017), https://doi.org/10.1016/j.bbi.2017.11.016

10

H. Zarif et al./Brain, Behavior, and Immunity xxx (2017) xxx-xxx



Fig. 4. $CD8^*$ T cell depletion modifies EE-induced spinogenesis and dendritic spine morphology in CA1 neurons. Spine characteristics were determined using NeuronStudio on segments of 45–50 µm dendrites at the second basilar dendrites of CA1 neurons labeled with Alexa Fluor 568. **A**- Number of spines/µm, **B**- Mean spine head diameter, **C**- Mean spine neck diameter, **D**- Mean spine length. Bars are means ± SEM. SE is in white and EE is in grey. Statistical analysis was performed using two-way analysis of variance (ANOVA), followed by post hoc *t*-test for comparison between groups for paired data. *: p < .05 and ***: p < .001.

	SE Control	EE control	SE CD8 ⁺	EE CD8 ⁺
Number of mice	4	4	6	6
Number of dendrites	83	82	105	106
Number of spines	1874	2841	2384	2856
Two-way ANOVA	p interaction (treatment vs housing)	p treatment (cont	rol vs anti-CD8 Ab)	p housing (SE vs EE)
Spine density	.0645	.0008		<.0001
Spine head	<.0001	<.0001		.0061
Spine neck	.0319	<.0001		.6335
Spine length	<.0001	<.0001		<.0001

and Cd8b1, but not Cd4 mRNAs were found in CD8⁺ T cells. In contrast, Cd4 but neither Cd8a nor Cd8b1 mRNAs were found in CD4⁺ T cells (Suppl Fig. 7B). In CD8⁺ T cells, among 2851 transcripts, 20 genes were upregulated and 20 genes were downregulated between SE and EE mice (p value < .05; log2FC > 0.5 or <-0.5). Among them, Lat and Lck (pathway activated by the TCR) and Il17r decreased in EE. Several genes whose expression varied in EE vs. SE in CD8⁺ T cells from choroid plexus such as Lat, Lck and Tagln2 were characteristic of lymphocytes (Fig. 9).

To determine the pathways that were involved in the differences between whole brain $CD8^+$ T cells from EE and SE mice, we performed an IPA with the following parameters: p < .05, Log_2 FC 0.5 and intensity 10 (Suppl Fig. 8). This analysis revealed that

Please cite this article in press as: Zarif, H., et al. CD8⁺ T cells are essentiat **fo** the effects of enriched environment on hippocampus-dependent behavior, hippocampal neurogenesis and synaptic plasticity. Brain Behav. Immun. (2017), https://doi.org/10.1016/j.bbi.2017.11.016

H. Zarif et al./Brain, Behavior, and Immunity xxx (2017) xxx-xxx



Fig. 5. CD8⁺ T cell depletion blocks EE-induced expression increases for synaptic factor genes in the CA of the hippocampus. CA were micro-dissected from hippocampi and expression levels of genes involved in synapse activity and maturation was determined by RT-qPCR after different housing durations (1W, 2 W, 3 W and 4 W) in SE or EE conditions. Bars represent the mean expression levels \pm SEM of the $2^{-\Delta\Delta Ct}$. For each gene, we first performed a Kruskal-Wallis test on the Δ Ct values followed by an exact two-sample Fisher-Pitman permutation test comparing SE to EE at 3 W and 4 W, and comparing in each group (SE or EE) 3 W to 1 W and 4 W to 1 W in Fig. 5A (or 3 W to 2 W and 4 W to 2 W for Ab-injected mice in Fig. 5 B). The obtained p values were corrected using the FDR method of Benjamini-Hochberg for a total of 8 comparisons per gene. *: p < .05, N = 6 for each group.

Please cite this article in press as: Zarif, H., et al. CD8⁺ T cells are essential for the effects of enriched environment on hippocampus-dependent behavior, hippocampal neurogenesis and synaptic plasticity. Brain Behav. Immun. (2017), https://doi.org/10.1016/j.bbi.2017.11.016

12

H. Zarif et al./Brain, Behavior, and Immunity xxx (2017) xxx-xxx



Fig. 6. $CD8^* T$ cell depletion modifies EE effects on spontaneous and miniature EPSPs and LTP at the CA3-CA1 synapse. **A**: Histograms representing event frequency, event amplitude and the time constant of decay of spontaneous (left) and miniature (right) EPSCs recorded in pyramidal CA1 neurons by patch clamp in whole cell configuration. SE is in white, and EE is in grey. Number of slices and mice used are indicated on the top. *: p < .05, **: p < .01. **B**: Field excitatory postsynaptic potentials (fEPSPs) recorded in the CA1 region of the hippocampus in response to a stimulation of Schaffer collaterals every 30 s. Stimulating intensity was chosen to trigger a fEPSP of 50% of the maximum response. After a stable baseline of 20 min, the high-frequency stimulation (HFS) protocol was applied (100 Hz during 1 s). Then, the 30 s stimulation with the same intensity restarted and a potentiation of the response to the stimulation was observed as expected, to 125-300% of the initial response. Curves show the time course of the slope amplitude of the EPSPs for an average of representative slices of each group of mice, a group raised for 8 weeks in SE, and a group raised for 4 weeks in EE since 4 weeks of age. LTP was established in both groups after the HFS, but its magnitude was less pronounced in the group of mice raised for 4 weeks in EE. C: Histograms showing the mean percentage of LTP (measured on the sEPSC slope) ± SEM obtained 40 min after HFS according to the different conditions. SE is in white and EE is in grey. Number of slices and mice used are indicated on the top. *: p < .05.

differentially-expressed genes were enriched in several signaling pathways including T-cell receptor and IL17-A signaling pathways.

As for splenic CD8⁺ T cells, we used GSEA to analyze the overall changes between EE and SE conditions in CD8⁺ T cells from choroid plexus compared to data previously published by others in the immunology set (C7). We selected the pathways that corresponded to the variations observed in EE vs SE with a p < .05 and ordered them according to the normalized enrichment score. We selected only the experiments which were conducted using the same cellular type (i.e. CD8⁺ T cell; Suppl Fig. 9). Variations in the expression of the gene sets obtained from SE to EE were closer to variations in

expression observed in naïve vs. memory or in effector vs. naive $\mbox{CD8}^{+}\mbox{T}$ cells.

In conclusion, the housing conditions induced changes in the expression profile of $CD8^+$ T cells in both the periphery and at the choroid plexus. The relative differences between EE and SE expression sets could indicate a favored "memory" profile of $CD8^+$ T cells in EE.

3.3.3.3. Brain repartition of SE and EE CD8+ memory T cells compared to the spleen. CD44 is an indicative marker for memory T cells, expressed at the membrane of $CD8^+$ T cells. We decided to

13

Please cite this article in press as: Zarif, H., et al. CD8⁺ T cells are essentiad for the effects of enriched environment on hippocampus-dependent behavior, hippocampal neurogenesis and synaptic plasticity. Brain Behav. Immun. (2017), https://doi.org/10.1016/j.bbi.2017.11.016

H. Zarif et al./Brain, Behavior, and Immunity xxx (2017) xxx-xxx



Fig. 7. CD8⁺ T cells from mice raised in SE or EE present different phenotypic characteristics. **A,B**: EE enhances TNF α but not IFN γ secretion (measured by MSD) of CD8⁺ T cells from spleen, either sorted (**A**) or enriched by negative selection (**B**) after a 72 h period of *in vitro* stimulation with CD3/CD28. Mean ± SEM, N = 6 in each group. **C**: EE enhances TNF α but not IFN γ secretion (measured by MSD) of sorted CD8⁺ T cells from spleen, after a 4 h period of *in vitro* stimulation with PMA/iono. Mean ± SEM, N = 8 in each group. **D,E**: Representative FACS profiles of splenic CFSE-labeled CD8⁺ T cells from SE (white) and EE (grey) mice (**D**) and percentage of proliferating CD8⁺ T cells after a 72 h period of stimulation with CD28 and different concentrations of CD3 (**E**). Mean ± SEM, N = 3 in each group.

compare, both in the whole brain and the spleen, the repartition among CD8⁺ CD44⁺ T cells between cells expressing a high and a low level of CD62L (respectively referred to as "central memory T cells" and "effector memory T cells" (Tough, 2003); Fig. 10A, B).

The percentage of CD62L^{low} and CD62L^{hi} among the CD8⁺ CD44⁺ T cell population differed in the whole brain between in EE and SE: the percentage of CD62L^{low} cells significantly increased (Fig. 10C) while the percentage of CD62L^{hi} cells significantly decreased (Fig. 10D). Conversely, the percentage of CD62L^{hi} and CD62L^{low} cells in spleen showed no significant modifications in SE and EE (Fig. 10C, D). In contrast, no variation among CD4⁺ T cells populations from whole brain and spleen was observed (Suppl. Fig. 6 C).

In conclusion, CD8⁺ T cells from EE mice are different compared to SE mice, both in the periphery and the choroid plexus. Furthermore, profiles of peripheral CD8⁺ T cells and whole brain CD8⁺ T cells located at the choroid plexus also differed.

3.4. In mice raised in EE, hippocampal astrocytic growth factor gene expression is dependent on $CD8^+$ T cells

To determine whether glial cells (astrocytes or microglia) could serve as intermediates between CD8⁺ T cells and hippocampus to allow the changes in plasticity induced by EE, we sorted sequentially astrocytes and microglia out from hippocampi of mice raised in SE or EE and depleted or not from CD8⁺ T cells. We validated our sorting protocol by measuring with RT-qPCR the expression level of the specific microglial Cx3cr1 gene, which was significantly higher in microglia relative to astrocytes (Suppl Fig. 11 A).

Expression levels of the trophic factor genes Bdnf, Igf1 and NTF5 were determined by RT-qPCR in astrocytes and microglia. As illustrated in Suppl Fig. 11B, we found that CD8⁺ T cell depletion in mice raised in EE induced a significant decrease in expression level of Bdnf, Igf1 and Ntf5 in hippocampal astrocytes but not in microglia. CD8⁺ T cell depletion in mice raised in SE induced no significant changes of expression of hippocampus Bdnf, Igf1 and Ntf5 neither in astrocytes nor in microglia. Thus, astrocytes could play a critical role as intermediates between the immune system and the brain plasticity.

4. Discussion

In this study, we show that CD8⁺ T cells play a role in EEinduced effects on hippocampal plasticity and dependent behaviors. Although a role for CD4⁺ T cells in brain plasticity has been described previously (Kipnis et al., 2008; Schwartz and Kipnis, 2011; Schwartz and Shechter, 2011), the involvement of CD8⁺ T cells has never been demonstrated, to our knowledge, despite their presence in the brain in equal or even higher proportions compared to CD4⁺ T cells in both rodents ((Song et al., 2016) and our

Please cite this article in press as: Zarif, H., et al. CD8⁺ T cells are essential for graphe effects of enriched environment on hippocampus-dependent behavior, hippocampal neurogenesis and synaptic plasticity. Brain Behav. Immun. (2017), https://doi.org/10.1016/j.bbi.2017.11.016

14

data Suppl Fig. 10, respectively) and humans (Loeffler et al., 2011; Smolders et al., 2013).

We found that CD8⁺ T cell depletion blocked EE-induced neuronal proliferation and increased survival in the DG of the hippocampus. Neurogenesis has been largely shown to be under the control of several neurotrophic factors, in particular BDNF and IGF-1. In agreement, here we showed an increase in expression over time for Bdnf, Igf1, and to a lesser extent, the Ntf3 and Ntf5 genes in EE mice, which was abolished by CD8⁺ T cell depletion.

CD8⁺ T cell depletion also blocked the EE-induced synaptic changes in CA1 pyramidal neurons. Indeed, EE induced an increase in spine density measured at the basal dendrites of CA1 neurons. This response was in accordance with altered expression of CA genes that encode proteins which play a major role in the establishment of the glutamatergic synapse, both at the pre- and postsynaptic levels, including Bdnf gene expression. Interestingly, we also observed an increase in CX3CL1 (fractalkine) mRNA production, a chemokine known to be produced by neurons and acting on microglia to maintain a non-inflammatory state (Maggi et al., 2011). All of these changes were no longer present in CD8⁺ T cell depleted mice.

The expression peak for most of the genes analyzed in DG and CA was often observed as rapidly as 2–3 weeks following transition to EE conditions. In future, it will be interesting to determine if shorter EE periods are sufficient to observe significant changes in the hippocampus.

Our electrophysiological recordings performed in CA1 pyramidal neurons showed that the frequency of sEPSCs and mEPSCs was increased in EE compared to SE, while their mean amplitude or time constant of decay was unaffected by EE whereas we observed changes in morphology of the synapses (Fig. 4) and of post-synaptic protein expression levels in CA of the hippocampus (Fig. 5). This could be due to the fact that the synapses we analyzed morphologically are only a subset of the glutamatergic synapses



Please cite this article in press as: Zarif, H., et al. CD8⁺ T cells are essentia**<u>j</u> fa**r the effects of enriched environment on hippocampus-dependent behavior, hippocampal neurogenesis and synaptic plasticity. Brain Behav. Immun. (2017), https://doi.org/10.1016/j.bbi.2017.11.016

reaching the CA1 neurons, whereas all glutamatergic inputs to CA1 pyramidal neurons were recorded electrophysiologically. The LTP amplitude was smaller in mice raised for 4 weeks in EE compared to SE as previously described (Hosseiny et al., 2015). This is likely due to a higher weight of excitatory synapses in EE compared to SE mice due to increased neuronal activity in hippocampus in EE mice. This increase in the strength of the excitatory synapses in EE would lead to a ceiling effect for EE mice when the HFS protocol is applied, whereas SE mouse synapses starting with a lower weight can be potentiated more. CD8⁺ T cell depletion abolished all of these changes, suggesting that CD8⁺ T cells also influence spinogenesis and that synaptic plasticity changes are triggered by EE in the hippocampus. It is interesting to note that the CD8⁺ T cell depletion exerted some effects on synaptogenesis and the synaptic function of mice raised in SE. For instance, it significantly increased the head diameter (Fig. 4B) and increased the sEPSC frequency without affecting the mEPSC frequency (Fig. 6A). Therefore, CD8⁺ T cells could impact the brain even in SE, but to a lesser extent than in EE.

Overall, our data suggest that CD8⁺ T cell depletion blocked the EE-induced effects on hippocampal plasticity, and this correlated with the abolition of the beneficial effects on anxiety and spatial learning as revealed in behavioral tests that are known to involve the limbic system and particularly the hippocampus. CD8⁺ T cell depletion had no effect on EE-induced changes in locomotion, resignation and social interactions.

Previous studies on central CD4⁺ T cells suggested the requirement for brain antigen priming in T cell localization and function in the brain (Derecki et al., 2010). However, our results show that the EE-induced neurogenesis was still observed in OT-I mice (whose CD8⁺ T cells express a specific-TCR directed against OVA, an antigen absent from the mice), suggesting that CD8⁺ T cells can exert some effects on hippocampal plasticity by an antigenindependent mechanism. This is in agreement with recent data showing that effector-memory CD8 + T cells do not depend on TCR-signals to exert their regulatory functions. Indeed, effectormemory T cells migrate to peripheral tissues, including the brain, and some subpopulations have been shown to be associated with successful aging and cognitive functions (Arosa et al., 2016; Michel et al., 2016; Pereira and Akbar, 2016). However, in OT-1 mice, a small percentage of the T cells present an endogenous rearrangement of TCRs, which could drive the effects observed in CNS associated tissue.

T cells are present in the central nervous system, even under physiological conditions, both in rodents and humans (Loeffler et al., 2011; White et al., 2017). Interestingly, we and others have shown that the CD4⁺/CD8⁺ ratio among CD3⁺ T cells was different in the whole brain compared to the blood and spleen suggesting selective attraction and/or retention of those cells in the brain (Suppl. Fig. 10A and (Bradl et al., 2005; Ritzel et al., 2016; Smolders et al., 2013)). Moreover, we found that about 50% of the whole brain T cells (CD3⁺ cells among CD45⁺ CD11b⁻ cells) are concentrated at the choroid plexus. Interestingly, choroid plexus from the lateral and third ventricles are lining the hippocampus, and T cells that are present there could influence hippocampal plasticity. However, no EE-dependent change was observed in the expression of genes involved in lymphocyte retention and trafficking at the choroid plexus level (data not shown).

FACS analysis of CD8⁺ T cells revealed an increase in the CD44⁺ CD62L^{low} subpopulation (i.e. the effector memory subpopulation) in the whole brains of EE mice compared to SE mice, but the opposite was observed in the spleen. The CD62L^{low} memory T cell population is a heterogeneous population including CD69⁺ cells, known as "resident memory" (Farber et al., 2014; Mueller and Mackay, 2016). Their role under physiological conditions is yet to be elucidated, but in pathological conditions, they have been shown to play an important role in the brain (Park and Kupper, 2015; Steinbach et al., 2016). It will be interesting in the future to investigate their role in the hippocampal plasticity changes observed in EE.

EE housing affects CD8⁺ T cell characteristics, both at peripheral and central levels. Indeed, by comparing splenic CD8⁺ T cells of SE and EE mice, significant changes in gene expression were revealed by RNAseq analyses. IPA and GSEA analyses suggested that EE favors a CD8⁺ T cell memory profile compared to SE housing. A similar approach has been used previously in naive CD4⁺ and CD8⁺ T cells sorted from spleens of young and aged mice, which also revealed some differences between the populations (Mirza et al.,

Fig. 8. Transcriptomic analysis of CD8⁺ T cells from spleen of mice raised in EE and SE **A:** MA-plot for the comparison between enriched and standard environment for CD8⁺ T cells from spleen. X-axis: average gene expression levels measured as log_2 UMI counts + 1. Y-axis: log_2 fold-change between EE and SE. b Red dots: differentially expressed genes, selected based on a combination of p < .01, abs (log_2 fold-change) >1 and average expression >2. **B**: Gene expression levels of the 12 genes exhibiting the most significant differences between enriched and standard environments in CD8⁺ T cells from spleen. Data are expressed as UMI counts. **C**: Heatmap of the top 50 most differentially expressed genes when comparing spleen CD8⁺ T cells from enriched and standard environment. Expression levels were centered by genes. Hierarchical clustering of the samples and genes used Euclidean distance and complete linkage. (For interpretation of the references to colour in this figure legend, the reader is referred to the web version of this article.)

Symbol	BaseMean	log2FoldChange	p Value
Rmi1	2.08	2.09	.00
Ascc2	2.98	2.07	.00
Atmin	2.95	1.91	.00
Trav9n.3	2.57	1.76	.01
Qk	2.26	1.76	.01
Lpcat4	4.29	1.76	.00
Casc4	2.06	-1.61	.00
Det1	2.94	-1.65	.01
Zfp865	3.70	-1.68	.00
Ppp1r12b	2.73	-1.83	.00
Nenf	2.38	-2.20	.00
Carns1	2.06	-2.54	.00

Note: candidate DEG selected using the following criteria: p < .01, abs (log₂FoldChange) > 1, base Mean > 2.

Please cite this article in press as: Zarif, H., et al. CD8⁺ T cells are essential for the effects of enriched environment on hippocampus-dependent behavior, hippocampal neurogenesis and synaptic plasticity. Brain Behav. Immun. (2017), https://doi.org/10.1016/j.bbi.2017.11.016

H. Zarif et al. / Brain, Behavior, and Immunity xxx (2017) xxx-xxx



Fig. 9. Transcriptomic analysis of choroid plexus CD8⁺ T cells. **A:** MA-plot for the comparison between enriched and standard environments for CD8⁺ T cells from plexus choroid. X-axis: average gene expression levels. Y-axis: \log_2 fold-change between EE and SE. Red dots: p < .05 **B:** Gene expression levels of the 12 genes exhibiting the most significant differences between Enriched and Standard environments in CD8⁺ T cells from plexus choroid (p < .05). Data are expressed as UMI counts. **C:** Heatmap of the top 50 most differentially expressed genes when comparing enriched and standard environment in CD8⁺ T cells from plexus choroid. Expression levels were centered by genes. Hierarchical clustering of the samples and genes used Euclidean distance and complete linkage. (For interpretation of the references to colour in this figure legend, the reader is referred to the web version of this article.)

Symbol	BaseMean	log2FoldChange	p Value
Cst3	6.92	0.88	.01
Enpp2	18.00	0.82	.01
Rpl19.ps1	5.21	0.68	.03
Higd2a	2.66	0.66	.05
Rps17	6.31	0.60	.04
Lck	11.38	-0.57	.05
Lat	9.33	-0.59	.03
H2afz	7.55	-0.62	.05
Gm9800	4.10	-0.70	.05
Tuba1a	4.19	-0.76	.02
Tagln2	4.80	-1.05	.00

Note: Il17ra was added to the graph, the gene does not have a p < .05.

Please cite this article in press as: Zarif, H., et al. CD8⁺ T cells are essentiated for the effects of enriched environment on hippocampus-dependent behavior, hippocampal neurogenesis and synaptic plasticity. Brain Behav. Immun. (2017), https://doi.org/10.1016/j.bbi.2017.11.016



H. Zarif et al./Brain, Behavior, and Immunity xxx (2017) xxx-xxx



Fig. 10. Phenotypic characterization of CD8⁺ T cells from spleen and whole brain. **A: a-** Representative bivariate dot plots of isolated immune cells from spleen. CD8⁺ T cells were gated based on CD3⁺ CD11b⁻ CD4⁺ expression and CD62L^{high} and CD62L^{low} cells were identified among CD3⁺ CD8⁺ CD44⁺ cells. **b,c-** Histograms representing the spleen count of cells according to CD62L expression for a representative mouse raised in SE (**b**) or EE (**c**). **B: a-** Representative bivariate dot plots of Percoll isolated whole brain immune cells illustrating gating on CD45⁺/CD11b⁻ cells to exclude microglia. CD8⁺ T cells were gated based on CD3 expression and CD62L^{low} cells were identified among CD3⁺ CD8⁺ CD44⁺ cells. **b,c-** Histograms representing the brain count of cells according to CD62L expression and CD62L^{low} cells were identified among CD3⁺ CD8⁺ CD44⁺ cells. **b,c-** Histograms representing the brain count of cells according to CD62L expression for a representative bivariate dot plots of a representative cells were identified among CD3⁺ CD8⁺ CD44⁺ cells. **b,c-** Histograms representing the brain count of cells according to CD62L expression for a representative mouse raised in SE (**b**) or EE (**c**). **C-D**: Percentages of CD62L^{low} (**C**) and CD62L^{high} (**D**) cells among splenic (left) and whole brain (right) CD8⁺ CD44⁺ T cells in SE and EE housed mice. Mean ± SEM for 3 independent experiments. Number of mice used is indicated on the top. SE in white, EE in grey. Statistical analysis was performed using two-way analysis of variance (ANOVA), followed by post hoc *t*-test for comparison between groups for paired data. *: *p* < .05, **: *p* < .01, ***: *p* < .001.

Two-way ANOVA	p interaction (treatment vs housing)	p treatment (control vs anti-CD8 Ab)	p housing (SE vs EE)
CD62L low (C)	.0755	<.0001	.0003
CD62L high (D)	.0877	<.0001	.0004

2011). These results were consistent with the phenotypic characterization demonstrating that splenic CD8⁺ T cells of mice raised in EE were more reactive to *in vitro* stimulation compared to those from mice raised in SE, including when they were stimulated by a TCR-independent mechanism (PMA-Iono). Indeed, CD8⁺ T cells from EE released higher amounts of TNF α and proliferated more quickly, as revealed by CFSE-labeling (Fig. 7).

We also compared the gene expression of a small population of CD8⁺ T cells sorted from the choroid plexus of lateral and third ventricles of SE and EE housed mice, using a modified single-cell RNA sequencing technique. We found that genes were expressed differentially between SE and EE mice, confirming that whole brain CD8⁺ T cells are modified by EE compared to SE. Interestingly, we found that very few genes that were modulated in EE in CD8⁺ T

Please cite this article in press as: Zarif, H., et al. CD8⁺ T cells are essential for the effects of enriched environment on hippocampus-dependent behavior, hippocampal neurogenesis and synaptic plasticity. Brain Behav. Immun. (2017), https://doi.org/10.1016/j.bbi.2017.11.016

cells from the whole brain were common with genes positively regulated in EE in CD8⁺ T cells from the spleen, suggesting local modification pathways. It is important to note that in CD8⁺ T cells from the choroid plexus, genes coding for TCR-linked signaling molecules (Lck, Lat), the MHCII-linked signaling molecule (TagIn2), and the cytokine receptor IL17rA were down-regulated. This suggests that central CD8⁺ T cells adopt a profile that is less susceptible to activation in EE. Conversely, in the periphery we showed that peripheral CD8⁺ T cells from spleen become more reactive in EE relative to SE upon stimulation, proliferating faster and releasing more cytokines as compared to SE CD8⁺ T cells. This suggests that resident CD8⁺ T cells in the brain and peripheral CD8⁺ T cells behave differently in EE. This is consistent with recent findings showing that there is a resident population of "homing" CD8⁺ T cells in the brain (Korin et al., 2017).

Various cytokines have been shown to participate in the recruitment of T cells from the periphery (Qi et al., 2017). One can hypothesize that the changes observed in CD8⁺ T cells from the choroid plexus of EE vs. SE could be due to a variation in the concentration of factors locally released in the CSF by neurons or glial cells following increased synaptic activity in EE such as TGF- β as GSEA analysis indicated TGF- β pathway activation in EE versus SE CD8⁺ T cells of the choroid plexus.

Many questions remain to be elucidated. For instance, the respective contribution of peripheral vs. central CD8⁺ T cells in EE-induced hippocampal changes needs to be clarified. Indeed, our depletion protocol affects both whole-brain and peripheral CD8⁺ T cells and does not allow for the independent study of either of these two potentially different populations. The mechanisms by which CD8⁺ T cells are affecting plasticity are also unknown. Since there is no direct physical contact between T cells and neurons in the brain parenchyma, the intercellular dialogue mediated by soluble molecules may involve cellular intermediates, which could be perivascular or meningeal macrophages, microglia, and/or astrocytes (Qi et al., 2017). We have obtained interesting data suggesting that in EE mice, astrocytes may serve as intermediates in the cascade linking EE-CD8⁺ T cells to neuronal plasticity in hippocampus (Suppl Fig. 11). Indeed, in EE, but not in SE, CD8⁺ T cell depletion significantly decreased the expression of several trophic factor genes such as Bdnf, Igf1 and Ntf5, which are known to influence hippocampus plasticity (Aberg et al., 2003; Kang and Schuman, 1995). Microglia didn't seem to be affected but these points still are under investigation.

In conclusion, we demonstrated a major role of CD8⁺ T cells on EE-induced hippocampal plasticity for the first time. CD4⁺ T cells have been shown to be essential for correct brain function and plasticity (Kipnis et al., 2004b; Lewitus et al., 2007; Radjavi et al., 2014). Our work shows that CD8⁺ T cells also contribute to optimal brain plasticity in EE conditions. Subtle phenotypic modifications of CD8⁺ T cells in EE could promote neuronal plasticity directly or indirectly through astrocytes. Our study paves the way for the study of other immune cells, such as macrophages, mast cells and NK cells (Benaroya-Milshtein et al., 2004; Herz et al., 2017), which could also undergo changes in EE and participate in brain homeostasis and plasticity under non-pathological conditions.

Acknowledgments

We wish to thank Lucien Relmy and Alain Barbot for their assistance in the animal care facility, Iris Grosjean and Sophie Abelanet from the imaging platform of IPMC, Delphine Debayle, Anne Sophie Gay from the proteomic platform of IPMC, Emilie Murris and Cathy Widmann for helpful discussions. We thank Abby Curtis from the UCA Office of International Scientific Visibility for comments on the English version of the manuscript. We also warmly thank Caroline Vieuille from ANASTATS and Thomas Lorivel for their help on statistical analyses. Hadi Zarif was financed by a Labex ICST (Ion Channel Science and Therapeutics) fellowship. This work was partly supported by Fondation de l'Avenir (AP-rm-16-011-Chabry). It was developed in close collaboration with the UCAGenomiX, the functional genomics platform of Nice Sophia Antipolis, a partner of the National Infrastructure France Génomique (ANR-10-INBS-09-03).

Appendix A. Supplementary data

Supplementary data associated with this article can be found, in the online version, at https://doi.org/10.1016/j.bbi.2017.11.016.

References

- Aberg, M.A., Aberg, N.D., Palmer, T.D., Alborn, A.M., Carlsson-Skwirut, C., Bang, P., Rosengren, L.E., Olsson, T., Gage, F.H., Eriksson, P.S., 2003. IGF-I has a direct proliferative effect in adult hippocampal progenitor cells. Mol Cell. Neurosci. 24, 23–40.
- Arguel, M.J., LeBrigand, K., Paquet, A., Ruiz Garcia, S., Zaragosi, L.E., Barbry, P., Waldmann, R., 2017. A cost effective 5 selective single cell transcriptome profiling approach with improved UMI design. Nucl. Acids Res. 45, e48.
- Arosa, F.A., Esgalhado, A.J., Padrao, C.A., Cardoso, E.M., 2016. Divide, conquer, and sense: CD8+CD28- T cells in perspective. Front. Immunol. 7, 665.
- Bailey, M.T., Kinsey, S.G., Padgett, D.A., Sheridan, J.F., Leblebicioglu, B., 2009. Social stress enhances IL-1beta and TNF-alpha production by Porphyromonas gingivalis lipopolysaccharide-stimulated CD11b+ cells. Physiol. Behav. 98, 351–358.
- Benaroya-Milshtein, N., Hollander, N., Apter, A., Kukulansky, T., Raz, N., Wilf, A., Yaniv, I., Pick, C.G., 2004. Environmental enrichment in mice decreases anxiety, attenuates stress responses and enhances natural killer cell activity. Eur. J. Neurosci. 20, 1341–1347.
- Bradl, M., Bauer, J., Flugel, A., Wekerle, H., Lassmann, H., 2005. Complementary contribution of CD4 and CD8 T lymphocytes to T-cell infiltration of the intact and the degenerative spinal cord. Am. J. Pathol. 166, 1441–1450.
- Brynskikh, A., Warren, T., Zhu, J., Kipnis, J., 2008. Adaptive immunity affects learning behavior in mice. Brain Behav. Immun. 22, 861–869.
- Cardona, A.E., Huang, D., Sasse, M.E., Ransohoff, R.M., 2006. Isolation of murine microglial cells for RNA analysis or flow cytometry. Nat. Protoc. 1, 1947–1951.
- Cazareth, J., Guyon, A., Heurteaux, C., Chabry, J., Petit-Paitel, A., 2014. Molecular and cellular neuroinflammatory status of mouse brain after systemic lipopolysaccharide challenge: importance of CCR2/CCL2 signaling. J. Neuroinflamm. 11, 132.
- Derecki, N.C., Cardani, A.N., Yang, C.H., Quinnies, K.M., Crihfield, A., Lynch, K.R., Kipnis, J., 2010. Regulation of learning and memory by meningeal immunity: a key role for IL-4. J. Exp. Med. 207, 1067–1080.
- Donzis, E.J., Tronson, N.C., 2014. Modulation of learning and memory by cytokines: signaling mechanisms and long term consequences. Neurobiol. Learning Memory 115, 68–77.
- Farber, D.L., Yudanin, N.A., Restifo, N.P., 2014. Human memory T cells: generation, compartmentalization and homeostasis. Nat. Rev. Immunol. 14, 24–35.
- Goldschmidt, T.J., Holmdahl, R., Klareskog, L., 1988. Depletion of murine T cells by in vivo monoclonal antibody treatment is enhanced by adding an autologous anti-rat kappa chain antibody. J. Immunol. Meth. 111, 219–226.
- Hagihara, H., Toyama, K., Yamasaki, N., Miyakawa, T., 2009. Dissection of hippocampal dentate gyrus from adult mouse. J. Vis. Exp.
- Herz, J., Filiano, A.J., Smith, A., Yogev, N., Kipnis, J., 2017. Myeloid cells in the central nervous system. Immunity 46, 943–956.
- Heurteaux, C., Lucas, G., Guy, N., El Yacoubi, M., Thummler, S., Peng, X.D., Noble, F., Blondeau, N., Widmann, C., Borsotto, M., Gobbi, G., Vaugeois, J.M., Debonnel, G., Lazdunski, M., 2006. Deletion of the background potassium channel TREK-1 results in a depression-resistant phenotype. Nat. Neurosci. 9, 1134–1141.
- Hosseiny, S., Pietri, M., Petit-Paitel, A., Zarif, H., Heurteaux, C., Chabry, J., Guyon, A., 2015. Differential neuronal plasticity in mouse hippocampus associated with various periods of enriched environment during postnatal development. Brain Struct. Funct. 220, 3435–3448.
- Kang, H., Schuman, E.M., 1995. Long-lasting neurotrophin-induced enhancement of synaptic transmission in the adult hippocampus. Science 267, 1658–1662.
- Kempermann, G., Kuhn, H.G., Gage, F.H., 1997. More hippocampal neurons in adult mice living in an enriched environment. Nature 386, 493–495.
- Kinsey, S.G., Bailey, M.T., Sheridan, J.F., Padgett, D.A., Avitsur, R., 2007. Repeated social defeat causes increased anxiety-like behavior and alters splenocyte function in C57BL/6 and CD-1 mice. Brain Behav. Immun. 21, 458–466.
- Kipnis, J., Avidan, H., Caspi, R.R., Schwartz, M., 2004a. Dual effect of CD4+CD25+ regulatory T cells in neurodegeneration: a dialogue with microglia. PNAS 101 (Suppl 2), 14663–14669.
- Kipnis, J., Cohen, H., Cardon, M., Ziv, Y., Schwartz, M., 2004b. T cell deficiency leads to cognitive dysfunction: implications for therapeutic vaccination for schizophrenia and other psychiatric conditions. PNAS 101, 8180–8185.

Please cite this article in press as: Zarif, H., et al. CD8⁺ T cells are essentiad **19** r the effects of enriched environment on hippocampus-dependent behavior, hippocampal neurogenesis and synaptic plasticity. Brain Behav. Immun. (2017), https://doi.org/10.1016/j.bbi.2017.11.016

H. Zarif et al./Brain, Behavior, and Immunity xxx (2017) xxx-xxx

ARTICLE IN PRESS

- Kipnis, J., Derecki, N.C., Yang, C., Scrable, H., 2008. Immunity and cognition: what do age-related dementia, HIV-dementia and 'chemo-brain' have in common? Trends Immunol. 29, 455–463.
- Korin, B., Ben-Shaanan, T.L., Schiller, M., Dubovik, T., Azulay-Debby, H., Boshnak, N. T., Koren, T., Rolls, A., 2017. High-dimensional, single-cell characterization of the brain's immune compartment. Nat. Neurosci.
- Krueger, J.M., Obal, F.J., Fang, J., Kubota, T., Taishi, P., 2001. The role of cytokines in physiological sleep regulation. Ann. N. Y. Acad. Sci. 933, 211–221.
- Lewitus, G.M., Zhu, J., Xiong, H., Hallworth, R., Kipnis, J., 2007. CD4(+)CD25(-) effector T-cells inhibit hippocampal long-term potentiation in vitro. Eur. J. Neurosci. 26, 1399–1406.
- Loeffler, C., Dietz, K., Schleich, A., Schlaszus, H., Stoll, M., Meyermann, R., Mittelbronn, M., 2011. Immune surveillance of the normal human CNS takes place in dependence of the locoregional blood-brain barrier configuration and is mainly performed by CD3(+)/CD8(+) lymphocytes. Neuropathology 31, 230– 238.
- Love, M.I., Huber, W., Anders, S., 2014. Moderated estimation of fold change and dispersion for RNA-seq data with DESeq2. Genome Biol. 15, 550.
- Macosko, E.Z., Basu, A., Satija, R., Nemesh, J., Shekhar, K., Goldman, M., Tirosh, I., Bialas, A.R., Kamitaki, N., Martersteck, E.M., Trombetta, J.J., Weitz, D.A., Sanes, J. R., Shalek, A.K., Regev, A., McCarroll, S.A., 2015. Highly parallel genome-wide expression profiling of individual cells using nanoliter droplets. Cell 161, 1202– 1214.
- Maggi, L., Scianni, M., Branchi, I., D'Andrea, I., Lauro, C., Limatola, C., 2011. CX(3)CR1 deficiency alters hippocampal-dependent plasticity phenomena blunting the effects of enriched environment. Front. Cell. Neurosci. 5, 22.
- Michel, J.J., Griffin, P., Vallejo, A.N., 2016. Functionally diverse NK-Like T cells are effectors and predictors of successful aging. Front. Immunol. 7, 530.
- Mirza, N., Pollock, K., Hoelzinger, D.B., Dominguez, A.L., Lustgarten, J., 2011. Comparative kinetic analyses of gene profiles of naive CD4+ and CD8+ T cells from young and old animals reveal novel age-related alterations. Aging Cell 10, 853–867.
- Moy, S.S., Nadler, J.J., Perez, A., Barbaro, R.P., Johns, J.M., Magnuson, T.R., Piven, J., Crawley, J.N., 2004. Sociability and preference for social novelty in five inbred strains: an approach to assess autistic-like behavior in mice. Genes Brain Behav. 3, 287–302.
- Mueller, S.N., Mackay, L.K., 2016. Tissue-resident memory T cells: local specialists in immune defence. Nat. Rev Immunol. 16, 79–89.
- Opp, M.R., 2005. Cytokines and sleep. Sleep Med. Rev. 9, 355-364.
- Park, C.O., Kupper, T.S., 2015. The emerging role of resident memory T cells in protective immunity and inflammatory disease. Nat. Med. 21, 688–697.
- Pechnick, R.N., Chesnokova, V.M., Kariagina, A., Price, S., Bresee, C.J., Poland, R.E., 2004. Reduced immobility in the forced swim test in mice with a targeted deletion of the leukemia inhibitory factor (LIF) gene. Neuropsychopharmacology 29, 770–776.
- Pereira, B.İ., Akbar, A.N., 2016. Convergence of innate and adaptive immunity during human aging. Front. Immunol. 7, 445.
- Peters, A., Kaiserman-Abramof, I.R., 1970. The small pyramidal neuron of the rat cerebral cortex. The perikaryon, dendrites and spines. Am. J. Anat. 127, 321–355.
- Picelli, S., Faridani, O.R., Bjorklund, A.K., Winberg, G., Sagasser, S., Sandberg, R., 2014. Full-length RNA-seq from single cells using Smart-seq2. Nat. Protoc. 9, 171– 181.

- Porsolt, R.D., Bertin, A., Jalfre, M., 1977. Behavioral despair in mice: a primary screening test for antidepressants. Arch. Int. Pharmacodyn. Ther. 229, 327–336.
- Qi, F., Zuo, Z., Yang, J., Hu, S., Yang, Y., Yuan, Q., Zou, J., Guo, K., Yao, Z., 2017. Combined effect of BCG vaccination and enriched environment promote neurogenesis and spatial cognition via a shift in meningeal macrophage M2 polarization. J. Neuroinflamm. 14, 32.
- Radjavi, A., Smirnov, I., Kipnis, J., 2014. Brain antigen-reactive CD4+ T cells are sufficient to support learning behavior in mice with limited T cell repertoire. Brain Behav. Immun. 35, 58–63.
- Ritzel, R.M., Crapser, J., Patel, A.R., Verma, R., Grenier, J.M., Chauhan, A., Jellison, E.R., McCullough, L.D., 2016. Age-Associated Resident Memory CD8 T Cells in the Central Nervous System Are Primed To Potentiate Inflammation after Ischemic Brain Injury. J. Immunol. 196, 3318–3330.
- Ron-Harel, N., Segev, Y., Lewitus, G.M., Cardon, M., Ziv, Y., Netanely, D., Jacob-Hirsch, J., Amariglio, N., Rechavi, G., Domany, E., Schwartz, M., 2008. Age-dependent spatial memory loss can be partially restored by immune activation. Rejuvenation Res. 11, 903–913.
- Schwartz, M., Kipnis, J., 2011. A conceptual revolution in the relationships between the brain and immunity. Brain Behav. Immun. 25, 817–819.
- Schwartz, M., Shechter, R., 2011. Protective autoimmunity functions by intracranial immunosurveillance to support the mind: the missing link between health and disease. Mol. Psychiatry 15, 342–354.
- Smolders, J., Remmerswaal, E.B., Schuurman, K.G., Melief, J., van Eden, C.G., van Lier, R.A., Huitinga, I., Hamann, J., 2013. Characteristics of differentiated CD8(+) and CD4 (+) T cells present in the human brain. Acta Neuropathol. 126, 525–535.
- Song, C., Nicholson, J.D., Clark, S.M., Li, X., Keegan, A.D., Tonelli, L.H., 2016. Expansion of brain T cells in homeostatic conditions in lymphopenic Rag2(-/-) mice. Brain Behav. Immun. 57, 161–172.
- Steinbach, K., Vincenti, I., Kreutzfeldt, M., Page, N., Muschaweckh, A., Wagner, I., Drexler, I., Pinschewer, D., Korn, T., Merkler, D., 2016. Brain-resident memory T cells represent an autonomous cytotoxic barrier to viral infection. J. Exp. Med. 213, 1571–1587.
- Tough, D.F., 2003. Deciphering the relationship between central and effector memory CD8+ T cells. Trends Immunol. 24, 404–407.
- Vitkovic, L., Bockaert, J., Jacque, C., 2000. "Inflammatory" cytokines: neuromodulators in normal brain? J. Neurochem. 74, 457–471.
- White, J.T., Cross, E.W., Kedl, R.M., 2017. Antigen-inexperienced memory CD8+ T cells: where they come from and why we need them. Nat. Rev. Immunol. 17, 391–400.
- Wohleb, E.S., Hanke, M.L., Corona, A.W., Powell, N.D., Stiner, L.M., Bailey, M.T., Nelson, R.J., Godbout, J.P., Sheridan, J.F., 2011. beta-Adrenergic receptor antagonism prevents anxiety-like behavior and microglial reactivity induced by repeated social defeat. J. Neurosci. 31, 6277–6288.
- Wojtowicz, J.M., Kee, N., 2006. BrdU assay for neurogenesis in rodents. Nat. Protoc. 1, 1399–1405.
- Wolf, G., Yirmiya, R., Goshen, I., Iverfeldt, K., Holmlund, L., Takeda, K., Shavit, Y., 2003. Impairment of interleukin-1 (IL-1) signaling reduces basal pain sensitivity in mice: genetic, pharmacological and developmental aspects. Pain 104, 471– 480.
- Yirmiya, R., Goshen, I., 2011. Immune modulation of learning, memory, neural plasticity and neurogenesis. Brain Behav. Immun. 25, 181–213.

Please cite this article in press as: Zarif, H., et al. CD8⁺ T cells are essential for the effects of enriched environment on hippocampus-dependent behavior, hippocampal neurogenesis and synaptic plasticity. Brain Behav. Immun. (2017), https://doi.org/10.1016/j.bbi.2017.11.016

20

RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES

Α

Abbasi, S.H., Hosseini, F., Modabbernia, A., Ashrafi, M., and Akhondzadeh, S. (2012). Effect of celecoxib add-on treatment on symptoms and serum IL-6 concentrations in patients with major depressive disorder: randomized double-blind placebo-controlled study. Journal of affective disorders *141*, 308-314.

Abbott, N.J., Ronnback, L., and Hansson, E. (2006). Astrocyte-endothelial interactions at the blood-brain barrier. Nature reviews Neuroscience 7, 41-53.

Aberg, M.A., Aberg, N.D., Hedbacker, H., Oscarsson, J., and Eriksson, P.S. (2000). Peripheral infusion of IGF-I selectively induces neurogenesis in the adult rat hippocampus. The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience *20*, 2896-2903.

Agudelo, L.Z., Femenia, T., Orhan, F., Porsmyr-Palmertz, M., Goiny, M., Martinez-Redondo, V., Correia, J.C., Izadi, M., Bhat, M., Schuppe-Koistinen, I., *et al.* (2014). Skeletal muscle PGC-1alpha1 modulates kynurenine metabolism and mediates resilience to stress-induced depression. Cell *159*, 33-45.

Ahima, R.S. (2006). Metabolic actions of adipocyte hormones: focus on adiponectin. Obesity (Silver Spring) 14 Suppl 1, 9S-15S.

Akhondzadeh, S., Jafari, S., Raisi, F., Nasehi, A.A., Ghoreishi, A., Salehi, B., Mohebbi-Rasa, S., Raznahan, M., and Kamalipour, A. (2009). Clinical trial of adjunctive celecoxib treatment in patients with major depression: a double blind and placebo controlled trial. Depress Anxiety *26*, 607-611.

Alexopoulos, G.S., Meyers, B.S., Young, R.C., Campbell, S., Silbersweig, D., and Charlson, M. (1997). 'Vascular depression' hypothesis. Arch Gen Psychiatry 54, 915-922.

Almeida, O.P., Flicker, L., Yeap, B.B., Alfonso, H., McCaul, K., and Hankey, G.J. (2012). Aspirin decreases the risk of depression in older men with high plasma homocysteine. Translational psychiatry 2, e151.

Althoff, T., Sosic, R., Hicks, J.L., King, A.C., Delp, S.L., and Leskovec, J. (2017). Large-scale physical activity data reveal worldwide activity inequality. Nature *547*, 336-339.

Altshuler, L.L., Abulseoud, O.A., Foland-Ross, L., Bartzokis, G., Chang, S., Mintz, J., Hellemann, G., and Vinters, H.V. (2010). Amygdala astrocyte reduction in subjects with major depressive disorder but not bipolar disorder. Bipolar Disord *12*, 541-549.

Ambree, O., Leimer, U., Herring, A., Gortz, N., Sachser, N., Heneka, M.T., Paulus, W., and Keyvani, K. (2006). Reduction of amyloid angiopathy and Abeta plaque burden after enriched housing in TgCRND8 mice: involvement of multiple pathways. Am J Pathol *169*, 544-552.

Amin, F.U., Hoshiar, A.K., Do, T.D., Noh, Y., Shah, S.A., Khan, M.S., Yoon, J., and Kim, M.O. (2017). Osmotin-loaded magnetic nanoparticles with electromagnetic guidance for the treatment of Alzheimer's disease. Nanoscale *9*, 10619-10632.

Anacker, C., Zunszain, P.A., Carvalho, L.A., and Pariante, C.M. (2011). The glucocorticoid receptor: pivot of depression and of antidepressant treatment? Psychoneuroendocrinology *36*, 415-425.

Anagnostis, P., Athyros, V.G., Tziomalos, K., Karagiannis, A., and Mikhailidis, D.P. (2009). Clinical review: The pathogenetic role of cortisol in the metabolic syndrome: a hypothesis. J Clin Endocrinol Metab *94*, 2692-2701.

Andreelli, F., Foretz, M., Knauf, C., Cani, P.D., Perrin, C., Iglesias, M.A., Pillot, B., Bado, A., Tronche, F., Mithieux, G., *et al.* (2006). Liver adenosine monophosphate-activated kinase-alpha2 catalytic subunit is a key target for the control of hepatic glucose production by adiponectin and leptin but not insulin. Endocrinology *147*, 2432-2441.

Arendash, G.W., Garcia, M.F., Costa, D.A., Cracchiolo, J.R., Wefes, I.M., and Potter, H. (2004). Environmental enrichment improves cognition in aged Alzheimer's transgenic mice despite stable beta-amyloid deposition. Neuroreport *15*, 1751-1754.

Asnis, G.M., and De La Garza, R., 2nd (2005). Interferon-induced depression: strategies in treatment. Progress in neuro-psychopharmacology & biological psychiatry *29*, 808-818.

Aulich, D. (1976). Escape versus exploratory activity: An interpretation of rats' behaviour in the open field and a light-dark preference test. Behav Processes 1, 153-164.

Aumann, T.D., Tomas, D., and Horne, M.K. (2013). Environmental and behavioral modulation of the number of substantia nigra dopamine neurons in adult mice. Brain Behav *3*, 617-625.

Auvergne, R., Lere, C., El Bahh, B., Arthaud, S., Lespinet, V., Rougier, A., and Le Gal La Salle, G. (2002). Delayed kindling epileptogenesis and increased neurogenesis in adult rats housed in an enriched environment. Brain research *954*, 277-285.

Awazawa, M., Ueki, K., Inabe, K., Yamauchi, T., Kubota, N., Kaneko, K., Kobayashi, M., Iwane, A., Sasako, T., Okazaki, Y., *et al.* (2011). Adiponectin enhances insulin sensitivity by increasing hepatic IRS-2 expression via a macrophage-derived IL-6-dependent pathway. Cell metabolism *13*, 401-412.

B Lerer, F.M., RH Segman, R Adolfsson, D Blackwood, S Blairy, J Del Favero, DG Dikeos, R Kaneva, R Lilli, I Massat, V Milanova, W Muir, M Noethen, L Oruc, T Petrova, GN Papadimitriou, M Rietschel, A Serretti, D Souery, S Van Gestel, C Van Broeckhoven and J Mendlewicz (2001). Variability of 5-HT2C receptor cys23ser polymorphism among European populations and vulnerability to affective disorder. Molecular psychiatry.

Bacon, K., Baggiolini, M., Broxmeyer, H., Horuk, R., Lindley, I., Mantovani, A., Maysushima, K., Murphy, P., Nomiyama, H., Oppenheim, J., *et al.* (2002). Chemokine/chemokine receptor nomenclature. J Interferon Cytokine Res *22*, 1067-1068.

Balland, E., Dam, J., Langlet, F., Caron, E., Steculorum, S., Messina, A., Rasika, S., Falluel-Morel, A., Anouar, Y., Dehouck, B., et al. (2014). Hypothalamic tanycytes are an ERK-gated conduit for leptin into the brain. Cell metabolism *19*, 293-301.

Balu, D.T., Hoshaw, B.A., Malberg, J.E., Rosenzweig-Lipson, S., Schechter, L.E., and Lucki, I. (2008). Differential regulation of central BDNF protein levels by antidepressant and non-antidepressant drug treatments. Brain research *1211*, 37-43.

Banasr, M., and Duman, R.S. (2008). Glial loss in the prefrontal cortex is sufficient to induce depressive-like behaviors. Biological psychiatry *64*, 863-870.

Banasr, M., Hery, M., Printemps, R., and Daszuta, A. (2004). Serotonin-induced increases in adult cell proliferation and neurogenesis are mediated through different and common 5-HT receptor subtypes in the dentate gyrus and the subventricular zone. Neuropsychopharmacology : official publication of the American College of Neuropsychopharmacology 29, 450-460.

Baskys, A., Bayazitov, I., Fang, L., Blaabjerg, M., Poulsen, F.R., and Zimmer, J. (2005). Group I metabotropic glutamate receptors reduce excitotoxic injury and may facilitate neurogenesis. Neuropharmacology *49 Suppl 1*, 146-156.

Batzina, A., Dalla, C., Tsopelakos, A., Papadopoulou-Daifoti, Z., and Karakatsouli, N. (2014). Environmental enrichment induces changes in brain monoamine levels in gilthead seabream Sparus aurata. Physiology & behavior *130*, 85-90.

Beauquis, J., Roig, P., De Nicola, A.F., and Saravia, F. (2010). Short-term environmental enrichment enhances adult neurogenesis, vascular network and dendritic complexity in the hippocampus of type 1 diabetic mice. PloS one *5*, e13993.

Bengel, D., Murphy, D.L., Andrews, A.M., Wichems, C.H., Feltner, D., Heils, A., Mossner, R., Westphal, H., and Lesch, K.P. (1998). Altered brain serotonin homeostasis and locomotor insensitivity to 3, 4-methylenedioxymethamphetamine ("Ecstasy") in serotonin transporter-deficient mice. Mol Pharmacol *53*, 649-655.

Bernardino, A.L., Myers, T.A., Alvarez, X., Hasegawa, A., and Philipp, M.T. (2008). Toll-like receptors: insights into their possible role in the pathogenesis of lyme neuroborreliosis. Infect Immun *76*, 4385-4395.

Berry, A., Bellisario, V., Capoccia, S., Tirassa, P., Calza, A., Alleva, E., and Cirulli, F. (2012). Social deprivation stress is a triggering factor for the emergence of anxiety- and depression-like behaviours and leads to reduced brain BDNF levels in C57BL/6J mice. Psychoneuroendocrinology *37*, 762-772.

Bessis, A., Bechade, C., Bernard, D., and Roumier, A. (2007). Microglial control of neuronal death and synaptic properties. Glia *55*, 233-238.

Blanca Gutierrez, M.J.A., David A. Collier, Vicenc Valles, Roser Guillamat, Jaume Bertranpetit, Robin M. Murray, and Lourdes Fananas (1998). Serotonin Transporter Gene and Risk for Bipolar Affective Disorder: An Association Study in a Spanish Population. Biological psychiatry.

Blasey, C.M., Debattista, C., Roe, R., Block, T., and Belanoff, J.K. (2009). A multisite trial of mifepristone for the treatment of psychotic depression: a site-by-treatment interaction. Contemp Clin Trials *30*, 284-288.

Bodnoff, S.R., Suranyi-Cadotte, B., Aitken, D.H., Quirion, R., and Meaney, M.J. (1988). The effects of chronic antidepressant treatment in an animal model of anxiety. Psychopharmacology *95*, 298-302.

Bohus, B., Koolhaas, J.M., Heijnen, C.J., and de Boer, O. (1993). Immunological responses to social stress: dependence on social environment and coping abilities. Neuropsychobiology 28, 95-99.

Boldrini, M., Underwood, M.D., Hen, R., Rosoklija, G.B., Dwork, A.J., John Mann, J., and Arango, V. (2009). Antidepressants increase neural progenitor cells in the human hippocampus. Neuropsychopharmacology : official publication of the American College of Neuropsychopharmacology *34*, 2376-2389. Branchi, I., Santarelli, S., Capoccia, S., Poggini, S., D'Andrea, I., Cirulli, F., and Alleva, E. (2013). Antidepressant treatment outcome depends on the quality of the living environment: a pre-clinical investigation in mice. PloS one *8*, e62226.

Braniste, V., Al-Asmakh, M., Kowal, C., Anuar, F., Abbaspour, A., Toth, M., Korecka, A., Bakocevic, N., Ng, L.G., Kundu, P., *et al.* (2014). The gut microbiota influences blood-brain barrier permeability in mice. Sci Transl Med *6*, 263ra158.

Brenes, J.C., Rodriguez, O., and Fornaguera, J. (2008). Differential effect of environment enrichment and social isolation on depressive-like behavior, spontaneous activity and serotonin and norepinephrine concentration in prefrontal cortex and ventral striatum. Pharmacology, biochemistry, and behavior *89*, 85-93.

Brochu-Gaudreau, K., Rehfeldt, C., Blouin, R., Bordignon, V., Murphy, B.D., and Palin, M.F. (2010). Adiponectin action from head to toe. Endocrine *37*, 11-32.

Brod, S., Gobbetti, T., Gittens, B., Ono, M., Perretti, M., and D'Acquisto, F. (2017). The impact of environmental enrichment on the murine inflammatory immune response. JCI Insight *2*, e90723.

Bruce Alberts, A.J., Julian Lewis, Martin Raff, Keith Roberts, and Peter Walter (2002). Molecular Biology of the cell, 4th edition. New York; Garland Science.

Buechler, C., Wanninger, J., and Neumeier, M. (2010). Adiponectin receptor binding proteins--recent advances in elucidating adiponectin signalling pathways. FEBS Lett *584*, 4280-4286.

С

Cameron, H.A., and Gould, E. (1994). Adult neurogenesis is regulated by adrenal steroids in the dentate gyrus. Neuroscience *61*, 203-209.

Cao, L., Choi, E.Y., Liu, X., Martin, A., Wang, C., Xu, X., and During, M.J. (2011). White to brown fat phenotypic switch induced by genetic and environmental activation of a hypothalamic-adipocyte axis. Cell metabolism *14*, 324-338.

Cao, L., Liu, X., Lin, E.J., Wang, C., Choi, E.Y., Riban, V., Lin, B., and During, M.J. (2010). Environmental and genetic activation of a brain-adipocyte BDNF/leptin axis causes cancer remission and inhibition. Cell *142*, 52-64.

Capuron, L., and Miller, A.H. (2011). Immune system to brain signaling: neuropsychopharmacological implications. Pharmacology & therapeutics *130*, 226-238.

Cardona, A.E., Pioro, E.P., Sasse, M.E., Kostenko, V., Cardona, S.M., Dijkstra, I.M., Huang, D., Kidd, G., Dombrowski, S., Dutta, R., *et al.* (2006). Control of microglial neurotoxicity by the fractalkine receptor. Nature neuroscience *9*, 917-924.

Carvalho, L.A., Bergink, V., Sumaski, L., Wijkhuijs, J., Hoogendijk, W.J., Birkenhager, T.K., and Drexhage, H.A. (2014). Inflammatory activation is associated with a reduced glucocorticoid receptor alpha/beta expression ratio in monocytes of inpatients with melancholic major depressive disorder. Translational psychiatry *4*, e344.

Castren, E., and Rantamaki, T. (2010). Role of brain-derived neurotrophic factor in the aetiology of depression: implications for pharmacological treatment. CNS Drugs 24, 1-7.

Cazareth, J., Guyon, A., Heurteaux, C., Chabry, J., and Petit-Paitel, A. (2014). Molecular and cellular neuroinflammatory status of mouse brain after systemic lipopolysaccharide challenge: importance of CCR2/CCL2 signaling. Journal of neuroinflammation *11*, 132.

Chadman, K.K., Yang, M., and Crawley, J.N. (2009). Criteria for validating mouse models of psychiatric diseases. Am J Med Genet B Neuropsychiatr Genet *150B*, 1-11.

Chamizo, V.D., Rodriguez, C.A., Sanchez, J., and Marmol, F. (2016). Sex differences after environmental enrichment and physical exercise in rats when solving a navigation task. Learn Behav *44*, 227-238.

Chandrasekar, B., Boylston, W.H., Venkatachalam, K., Webster, N.J., Prabhu, S.D., and Valente, A.J. (2008). Adiponectin blocks interleukin-18-mediated endothelial cell death via APPL1-dependent AMP-activated protein kinase (AMPK) activation and IKK/NF-kappaB/PTEN suppression. The Journal of biological chemistry *283*, 24889-24898.

Chen, M.C., Lee, C.J., Yang, C.F., Chen, Y.C., Wang, J.H., and Hsu, B.G. (2017). Low serum adiponectin level is associated with metabolic syndrome and is an independent marker of peripheral arterial stiffness in hypertensive patients. Diabetol Metab Syndr *9*, 49.

Chen, Z.Y., Bath, K., McEwen, B., Hempstead, B., and Lee, F. (2008). Impact of genetic variant BDNF (Val66Met) on brain structure and function. Novartis Found Symp *289*, 180-188; discussion 188-195.

Chimen, M., McGettrick, H.M., Apta, B., Kuravi, S.J., Yates, C.M., Kennedy, A., Odedra, A., Alassiri, M., Harrison, M., Martin, A., *et al.* (2015). Homeostatic regulation of T cell trafficking by a B cell-derived peptide is impaired in autoimmune and chronic inflammatory disease. Nature medicine *21*, 467-475.

Cho, H.J., Savitz, J., Dantzer, R., Teague, T.K., Drevets, W.C., and Irwin, M.R. (2017). Sleep disturbance and kynurenine metabolism in depression. J Psychosom Res *99*, 1-7.

Civitarese, A.E., Ukropcova, B., Carling, S., Hulver, M., DeFronzo, R.A., Mandarino, L., Ravussin, E., and Smith, S.R. (2006). Role of adiponectin in human skeletal muscle bioenergetics. Cell metabolism *4*, 75-87.

Clarke, G., Grenham, S., Scully, P., Fitzgerald, P., Moloney, R.D., Shanahan, F., Dinan, T.G., and Cryan, J.F. (2013). The microbiome-gut-brain axis during early life regulates the hippocampal serotonergic system in a sex-dependent manner. Molecular psychiatry *18*, 666-673.

Clarke, L.E., and Barres, B.A. (2013). Emerging roles of astrocytes in neural circuit development. Nature reviews Neuroscience 14, 311-321.

Cohn, D.W., Kinoshita, D., and Palermo-Neto, J. (2012). Antidepressants prevent hierarchy destabilization induced by lipopolysaccharide administration in mice: a neurobiological approach to depression. Annals of the New York Academy of Sciences *1262*, 67-73.

Combs, T.P., Berg, A.H., Obici, S., Scherer, P.E., and Rossetti, L. (2001). Endogenous glucose production is inhibited by the adipose-derived protein Acrp30. The Journal of clinical investigation *108*, 1875-1881.

Connor, T.J., Starr, N., O'Sullivan, J.B., and Harkin, A. (2008). Induction of indolamine 2,3-dioxygenase and kynurenine 3-monooxygenase in rat brain following a systemic inflammatory challenge: a role for IFN-gamma? Neuroscience letters *441*, 29-34.

Conover, J.C., Erickson, J.T., Katz, D.M., Bianchi, L.M., Poueymirou, W.T., McClain, J., Pan, L., Helgren, M., Ip, N.Y., Boland, P., *et al.* (1995). Neuronal deficits, not involving motor neurons, in mice lacking BDNF and/or NT4. Nature *375*, 235-238.

Cordas, G., Gazal, M., Schuch, E.M., Spessato, B.C., Branco, J., Jansen, K., Oses, J.P., Quevedo, L.A., Souza, L.D., Pinheiro, R.T., *et al.* (2015). Leptin in depressive episodes: is there a difference between unipolar and bipolar depression? Neuroendocrinology *101*, 82-86.

Cotter, D., Hudson, L., and Landau, S. (2005). Evidence for orbitofrontal pathology in bipolar disorder and major depression, but not in schizophrenia. Bipolar Disord *7*, 358-369.

Cotter, D., Mackay, D., Landau, S., Kerwin, R., and Everall, I. (2001). Reduced glial cell density and neuronal size in the anterior cingulate cortex in major depressive disorder. Arch Gen Psychiatry *58*, 545-553.

Cryan, J.F., and Mombereau, C. (2004). In search of a depressed mouse: utility of models for studying depression-related behavior in genetically modified mice. Molecular psychiatry *9*, 326-357.

Cui, M., Yang, Y., Yang, J., Zhang, J., Han, H., Ma, W., Li, H., Mao, R., Xu, L., Hao, W., *et al.* (2006). Enriched environment experience overcomes the memory deficits and depressive-like behavior induced by early life stress. Neuroscience letters *404*, 208-212.

Cuthbertson, D.P. (1982). The metabolic response to injury and other related explorations in the field of protein metabolism: an autobiographical account. Scott Med J *27*, 158-171.

Czeh, B., and Lucassen, P.J. (2007). What causes the hippocampal volume decrease in depression? Are neurogenesis, glial changes and apoptosis implicated? Eur Arch Psychiatry Clin Neurosci *257*, 250-260.

Czigner, A., Mihaly, A., Farkas, O., Buki, A., Krisztin-Peva, B., Dobo, E., and Barzo, P. (2007). Kinetics of the cellular immune response following closed head injury. Acta Neurochir (Wien) *149*, 281-289.

D

Dantzer, R. (2001). Cytokine-induced sickness behavior: mechanisms and implications. Annals of the New York Academy of Sciences *933*, 222-234.

Dantzer, R. (2004). Cytokine-induced sickness behaviour: a neuroimmune response to activation of innate immunity. European journal of pharmacology *500*, 399-411.

Dantzer, R., O'Connor, J.C., Freund, G.G., Johnson, R.W., and Kelley, K.W. (2008). From inflammation to sickness and depression: when the immune system subjugates the brain. Nature reviews Neuroscience *9*, 46-56.

Dantzer, R., O'Connor, J.C., Lawson, M.A., and Kelley, K.W. (2011). Inflammation-associated depression: from serotonin to kynurenine. Psychoneuroendocrinology *36*, 426-436.

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., *et al.* (2009). Neurogenesis-dependent and -independent effects of fluoxetine in an animal model of anxiety/depression. Neuron *62*, 479-493.

Davies, C.A., Loddick, S.A., Toulmond, S., Stroemer, R.P., Hunt, J., and Rothwell, N.J. (1999). The progression and topographic distribution of interleukin-1beta expression after permanent middle cerebral artery occlusion in the rat. J Cereb Blood Flow Metab *19*, 87-98.

Deborah Young, P.A.L., Paola Leone, Michael Dragunow & Matthew J. During (1999). Environmental enrichment ²⁴⁴

prevents seizures and is neuroprotective.

Dedic N, W.S., and Deussing JM. (2011). Mouse Models of Depression, Psychiatric Disords - Trends and Developments. In Tech Open.

Deepa, S.S., and Dong, L.Q. (2009). APPL1: role in adiponectin signaling and beyond. American journal of physiology Endocrinology and metabolism *296*, E22-36.

Dermietzel., O.v.B.u.H.a.R. (2007). Neurotransmitters and Neuromodulators: Handbook of Receptors and Biological Effects. The Quarterly Review of Biology.

Desbonnet, L., Clarke, G., Traplin, A., O'Sullivan, O., Crispie, F., Moloney, R.D., Cotter, P.D., Dinan, T.G., and Cryan, J.F. (2015). Gut microbiota depletion from early adolescence in mice: Implications for brain and behaviour. Brain, behavior, and immunity *48*, 165-173.

Deuschle, M., Gilles, M., Scharnholz, B., Lederbogen, F., Lang, U.E., and Hellweg, R. (2013). Changes of serum concentrations of brain-derived neurotrophic factor (BDNF) during treatment with venlafaxine and mirtazapine: role of medication and response to treatment. Pharmacopsychiatry *46*, 54-58.

Diniz, B.S., Teixeira, A.L., Campos, A.C., Miranda, A.S., Rocha, N.P., Talib, L.L., Gattaz, W.F., and Forlenza, O.V. (2012). Reduced serum levels of adiponectin in elderly patients with major depression. Journal of psychiatric research *46*, 1081-1085.

Donner, N.C., Montoya, C.D., Lukkes, J.L., and Lowry, C.A. (2012). Chronic non-invasive corticosterone administration abolishes the diurnal pattern of tph2 expression. Psychoneuroendocrinology *37*, 645-661.

Du, X., Leang, L., Mustafa, T., Renoir, T., Pang, T.Y., and Hannan, A.J. (2012). Environmental enrichment rescues female-specific hyperactivity of the hypothalamic-pituitary-adrenal axis in a model of Huntington's disease. Translational psychiatry *2*, e133.

Ε

Eckel, R.H., Grundy, S.M., and Zimmet, P.Z. (2005). The metabolic syndrome. Lancet 365, 1415-1428.

Ekstrand, J., Hellsten, J., and Tingstrom, A. (2008). Environmental enrichment, exercise and corticosterone affect endothelial cell proliferation in adult rat hippocampus and prefrontal cortex. Neuroscience letters *442*, 203-207.

El Yacoubi, M., Bouali, S., Popa, D., Naudon, L., Leroux-Nicollet, I., Hamon, M., Costentin, J., Adrien, J., and Vaugeois, J.M. (2003). Behavioral, neurochemical, and electrophysiological characterization of a genetic mouse model of depression. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America *100*, 6227-6232.

Eliwa, H., Belzung, C., and Surget, A. (2017). Adult hippocampal neurogenesis: Is it the alpha and omega of antidepressant action? Biochem Pharmacol 141, 86-99.

EM, E.L., Zeid, M.S., Kawy, H.S., Hendawy, N., and Baher, W. (2016). Celecoxib attenuates depressive-like behavior associated with immunological liver injury in C57BL/6 mice through TNF-alpha and NF-kappab dependent mechanisms. Life Sci *163*, 23-37.

Engelhardt, B., and Ransohoff, R.M. (2005). The ins and outs of T-lymphocyte trafficking to the CNS: anatomical sites and molecular mechanisms. Trends in immunology *26*, 485-495.

Eric J. Nestler, M.B., Ralph J. DiLeone, Amelia J. Eisch, Stephen J. Gold,, and Monteggia, a.L.M. (2002). Neurobiology of depression. Neuron.

Escobar-Morreale, H.F., Villuendas, G., Botella-Carretero, J.I., Alvarez-Blasco, F., Sanchon, R., Luque-Ramirez, M., and San Millan, J.L. (2006). Adiponectin and resistin in PCOS: a clinical, biochemical and molecular genetic study. Hum Reprod *21*, 2257-2265.

Esel, E., Ozsoy, S., Tutus, A., Sofuoglu, S., Kartalci, S., Bayram, F., Kokbudak, Z., and Kula, M. (2005). Effects of antidepressant treatment and of gender on serum leptin levels in patients with major depression. Progress in neuro-psychopharmacology & biological psychiatry *29*, 565-570.

F

Faherty, C.J., Raviie Shepherd, K., Herasimtschuk, A., and Smeyne, R.J. (2005). Environmental enrichment in adulthood eliminates neuronal death in experimental Parkinsonism. Brain Res Mol Brain Res *134*, 170-179.

Fain, J.N. (2013). Impact of glucocorticoid hormones on adipokine secretion and human adipose tissue metabolism. Horm Mol Biol Clin Investig 14, 25-32.

Falkenberg, T., Mohammed, A.K., Henriksson, B., Persson, H., Winblad, B., and Lindefors, N. (1992). Increased expression of brain-derived neurotrophic factor mRNA in rat hippocampus is associated with improved spatial memory and enriched environment. Neuroscience letters *138*, 153-156.

Fanselow, M.S., Dong, H.W. (2010). Are the dorsal ang yentral hippocampus functionally distinct structures ? Neuron.

Fares, R.P., Belmeguenai, A., Sanchez, P.E., Kouchi, H.Y., Bodennec, J., Morales, A., Georges, B., Bonnet, C., Bouvard, S., Sloviter, R.S., *et al.* (2013). Standardized environmental enrichment supports enhanced brain plasticity in healthy rats and prevents cognitive impairment in epileptic rats. PloS one *8*, e53888.

Farrell, R., Evans, S., and Corbett, D. (2001). Environmental enrichment enhances recovery of function but exacerbates ischemic cell death. Neuroscience *107*, 585-592.

Ferrari, A.J., Charlson, F.J., Norman, R.E., Patten, S.B., Freedman, G., Murray, C.J., Vos, T., and Whiteford, H.A. (2013). Burden of depressive disorders by country, sex, age, and year: findings from the global burden of disease study 2010. PLoS Med *10*, e1001547.

Ferre, P. (2004). The biology of peroxisome proliferator-activated receptors: relationship with lipid metabolism and insulin sensitivity. Diabetes *53 Suppl 1*, S43-50.

Flint, J., and Kendler, K.S. (2014). The genetics of major depression. Neuron 81, 484-503.

Fournier, N.M., and Duman, R.S. (2012). Role of vascular endothelial growth factor in adult hippocampal neurogenesis: implications for the pathophysiology and treatment of depression. Behavioural brain research *227*, 440-449.

Fruebis, J., Tsao, T.S., Javorschi, S., Ebbets-Reed, D., Erickson, M.R., Yen, F.T., Bihain, B.E., and Lodish, H.F. (2001). Proteolytic cleavage product of 30-kDa adipocyte complement-related protein increases fatty acid oxidation in muscle and causes weight loss in mice. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America *98*, 2005-2010.

Fu, Z., Lofqvist, C.A., Liegl, R., Wang, Z., Sun, Y., Gong, Y., Liu, C.H., Meng, S.S., Burnim, S.B., Arellano, I., *et al.* (2018). Photoreceptor glucose metabolism determines normal retinal vascular growth. EMBO Mol Med *10*, 76-90. Fuchs, D., Moller, A.A., Reibnegger, G., Werner, E.R., Werner-Felmayer, G., Dierich, M.P., and Wachter, H. (1991). Increased endogenous interferon-gamma and neopterin correlate with increased degradation of tryptophan in human immunodeficiency virus type 1 infection. Immunol Lett *28*, 207-211.

Fumie Naka, T.S., MasaeYaguchi and Nobuo Okado. (2002). An enriched environment increases noradrenaline concentration in the mouse brain. Brain research.

Fureix, C., Walker, M., Harper, L., Reynolds, K., Saldivia-Woo, A., and Mason, G. (2016). Stereotypic behaviour in standard non-enriched cages is an alternative to depression-like responses in C57BL/6 mice. Behavioural brain research *305*, 186-190.

G

Gable, D.R., Hurel, S.J., and Humphries, S.E. (2006). Adiponectin and its gene variants as risk factors for insulin resistance, the metabolic syndrome and cardiovascular disease. Atherosclerosis *188*, 231-244.

Ge, J.F., Qi, C.C., and Zhou, J.N. (2013). Imbalance of leptin pathway and hypothalamus synaptic plasticity markers are associated with stress-induced depression in rats. Behavioural brain research *249*, 38-43.

Gentsch, C., Lichtsteiner, M., and Feer, H. (1981). Locomotor activity, defecation score and corticosterone levels during an openfield exposure: a comparison among individually and group-housed rats, and genetically selected rat lines. Physiology & behavior 27, 183-186.

Ginhoux, F., Greter, M., Leboeuf, M., Nandi, S., See, P., Gokhan, S., Mehler, M.F., Conway, S.J., Ng, L.G., Stanley, E.R., *et al.* (2010). Fate mapping analysis reveals that adult microglia derive from primitive macrophages. Science *330*, 841-845.

Glintborg, D., Frystyk, J., Hojlund, K., Andersen, K.K., Henriksen, J.E., Hermann, A.P., Hagen, C., Flyvbjerg, A., and Andersen, M. (2008). Total and high molecular weight (HMW) adiponectin levels and measures of glucose and lipid metabolism following pioglitazone treatment in a randomized placebo-controlled study in polycystic ovary syndrome. Clin Endocrinol (Oxf) *68*, 165-174.

Gobbo, O.L., and O'Mara, S.M. (2004). Impact of enriched-environment housing on brain-derived neurotrophic factor and on cognitive performance after a transient global ischemia. Behavioural brain research *152*, 231-241.

Golden, S.H., Lazo, M., Carnethon, M., Bertoni, A.G., Schreiner, P.J., Diez Roux, A.V., Lee, H.B., and Lyketsos, C. (2008). Examining a bidirectional association between depressive symptoms and diabetes. JAMA *299*, 2751-2759. Goldsmith, D.R., Haroon, E., Woolwine, B.J., Jung, M.Y., Wommack, E.C., Harvey, P.D., Treadway, M.T., Felger, J.C., and Miller, A.H. (2016). Inflammatory markers are associated with decreased psychomotor speed in patients with major depressive disorder. Brain, behavior, and immunity *56*, 281-288.

Gomez-Casati, M.E., Murtie, J.C., Rio, C., Stankovic, K., Liberman, M.C., and Corfas, G. (2010). Nonneuronal cells regulate synapse formation in the vestibular sensory epithelium via erbB-dependent BDNF expression. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America *107*, 17005-17010.

Gosselin, R.D., Gibney, S., O'Malley, D., Dinan, T.G., and Cryan, J.F. (2009). Region specific decrease in glial fibrillary acidic protein immunoreactivity in the brain of a rat model of depression. Neuroscience *159*, 915-925.

Gourley, S.L., Wu, F.J., and Taylor, J.R. (2008). Corticosterone regulates pERK1/2 map kinase in a chronic depression model. Annals of the New York Academy of Sciences *1148*, 509-514.

Grant, B.F. (1995). Comorbidity between DSM-IV drug use disorders and major depression: results of a national survey of adults. J Subst Abuse 7, 481-497.

Greenwood, B.N., Foley, T.E., Day, H.E., Campisi, J., Hammack, S.H., Campeau, S., Maier, S.F., and Fleshner, M. (2003). Freewheel running prevents learned helplessness/behavioral depression: role of dorsal raphe serotonergic neurons. The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience *23*, 2889-2898.

Grohmann, U., Fallarino, F., and Puccetti, P. (2003). Tolerance, DCs and tryptophan: much ado about IDO. Trends in immunology *24*, 242-248.

Gross, C., Santarelli, L., Brunner, D., Zhuang, X., and Hen, R. (2000). Altered fear circuits in 5-HT(1A) receptor KO mice. Biological psychiatry *48*, 1157-1163.

Gross, C., Zhuang, X., Stark, K., Ramboz, S., Oosting, R., Kirby, L., Santarelli, L., Beck, S., and Hen, R. (2002). Serotonin1A receptor acts during development to establish normal anxiety-like behaviour in the adult. Nature *416*, 396-400.

Guerre-Millo, M. (2008). Adiponectin: an update. Diabetes Metab 34, 12-18.

Guo, J.Y., Li, C.Y., Ruan, Y.P., Sun, M., Qi, X.L., Zhao, B.S., and Luo, F. (2009). Chronic treatment with celecoxib reverses chronic unpredictable stress-induced depressive-like behavior via reducing cyclooxygenase-2 expression in rat brain. European journal of pharmacology *612*, 54-60.

Guo, M., Li, C., Lei, Y., Xu, S., Zhao, D., and Lu, X.Y. (2017). Role of the adipose PPARgamma-adiponectin axis in susceptibility to stress and depression/anxiety-related behaviors. Molecular psychiatry *22*, 1056-1068.

Guyenet, S.J., and Schwartz, M.W. (2012). Clinical review: Regulation of food intake, energy balance, and body fat mass: implications for the pathogenesis and treatment of obesity. J Clin Endocrinol Metab *97*, 745-755.

Η

Haenisch, B., Bilkei-Gorzo, A., Caron, M.G., and Bonisch, H. (2009). Knockout of the norepinephrine transporter and pharmacologically diverse antidepressants prevent behavioral and brain neurotrophin alterations in two chronic stress models of depression. Journal of neurochemistry *111*, 403-416.

Hamer, M., Batty, G.D., and Kivimaki, M. (2011). Haemoglobin A1c, fasting glucose and future risk of elevated depressive symptoms over 2 years of follow-up in the English Longitudinal Study of Ageing. Psychol Med *41*, 1889-1896.

Hamer, M., Batty, G.D., and Kivimaki, M. (2012). Risk of future depression in people who are obese but metabolically healthy: the English longitudinal study of ageing. Molecular psychiatry 17, 940-945.

Hanisch, U.K. (2013). Proteins in Microglial Activation - Inputs and Outputs by Subsets. Curent Protein and Peptide Science.

Hanke, M.L., and Kielian, T. (2011). Toll-like receptors in health and disease in the brain: mechanisms and therapeutic potential. Clin Sci (Lond) *121*, 367-387.

Haroon, E., Raison, C.L., and Miller, A.H. (2012). Psychoneuroimmunology meets neuropsychopharmacology: translational implications of the impact of inflammation on behavior. Neuropsychopharmacology : official publication of the American College of Neuropsychopharmacology *37*, 137-162.

Hattori, Y., Hattori, S., Akimoto, K., Nishikimi, T., Suzuki, K., Matsuoka, H., and Kasai, K. (2007). Globular adiponectin activates nuclear factor-kappaB and activating protein-1 and enhances angiotensin II-induced proliferation in cardiac fibroblasts. Diabetes *56*, 804-808.

Hattori, Y., Suzuki, M., Hattori, S., and Kasai, K. (2003). Globular adiponectin upregulates nitric oxide production in vascular endothelial cells. Diabetologia *46*, 1543-1549.

Haugen, F., and Drevon, C.A. (2007). Activation of nuclear factor-kappaB by high molecular weight and globular adiponectin. Endocrinology *148*, 5478-5486.

Haydon, P.G. (2001). GLIA: listening and talking to the synapse. Nature reviews Neuroscience 2, 185-193.

Hebb, D. (1947). The effects of early experience on problem solving at maturity. American Psychologist 2.

Helbig, S., and Backhaus, J. (2017). "Sex differences in a real academic stressor, cognitive appraisal and the cortisol response". Physiology & behavior *179*, 67-74.

Hendriksen, H., Prins, J., Olivier, B., and Oosting, R.S. (2010). Environmental enrichment induces behavioral recovery and enhanced hippocampal cell proliferation in an antidepressant-resistant animal model for PTSD. PloS one *5*, e11943.

Henriette van Praag, G.K.a.F.H.G. (2000). NEURAL CONSEQUENCES OF ENVIRONMENTAL ENRICHMENT. Henry, B.A., and Clarke, I.J. (2008). Adipose tissue hormones and the regulation of food intake. Journal of neuroendocrinology *20*, 842-849. Herring, A., Blome, M., Ambree, O., Sachser, N., Paulus, W., and Keyvani, K. (2010). Reduction of cerebral oxidative stress following environmental enrichment in mice with Alzheimer-like pathology. Brain Pathol *20*, 166-175.

Heshmati, M., Aleyasin, H., Menard, C., Christoffel, D.J., Flanigan, M.E., Pfau, M.L., Hodes, G.E., Lepack, A.E., Bicks, L.K., Takahashi, A., *et al.* (2018). Cell-type-specific role for nucleus accumbens neuroligin-2 in depression and stress susceptibility. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America *115*, 1111-1116. Hidese, S., Ota, M., Matsuo, J., Ishida, I., Hiraishi, M., Yoshida, S., Noda, T., Sato, N., Teraishi, T., Hattori, K., *et al.*

(2018). Association of obesity with cognitive function and brain structure in patients with major depressive disorder. Journal of affective disorders 225, 188-194.

Hoban, A.E., Moloney, R.D., Golubeva, A.V., McVey Neufeld, K.A., O'Sullivan, O., Patterson, E., Stanton, C., Dinan, T.G., Clarke, G., and Cryan, J.F. (2016). Behavioural and neurochemical consequences of chronic gut microbiota depletion during adulthood in the rat. Neuroscience *339*, 463-477.

Hockly, E., Cordery, P.M., Woodman, B., Mahal, A., van Dellen, A., Blakemore, C., Lewis, C.M., Hannan, A.J., and Bates, G.P. (2002). Environmental enrichment slows disease progression in R6/2 Huntington's disease mice. Annals of neurology *51*, 235-242.

Holsboer, F. (2000). The Corticosteroid Receptor Hypothesis of Depression. Neuropsychopharmacology : official publication of the American College of Neuropsychopharmacology.

Hong, K., Lee, S., Li, R., Yang, Y., Tanner, M.A., Wu, J., and Hill, M.A. (2016). Adiponectin Receptor Agonist, AdipoRon, Causes Vasorelaxation Predominantly Via a Direct Smooth Muscle Action. Microcirculation *23*, 207-220.

Hooper, L.V., Littman, D.R., and Macpherson, A.J. (2012). Interactions between the microbiota and the immune system. Science *336*, 1268-1273.

Hosseiny, S., Pietri, M., Petit-Paitel, A., Zarif, H., Heurteaux, C., Chabry, J., and Guyon, A. (2015). Differential neuronal plasticity in mouse hippocampus associated with various periods of enriched environment during postnatal development. Brain Struct Funct *220*, 3435-3448.

Hoyda, T.D., and Ferguson, A.V. (2010). Adiponectin modulates excitability of rat paraventricular nucleus neurons by differential modulation of potassium currents. Endocrinology *151*, 3154-3162.

Hoyda, T.D., Fry, M., Ahima, R.S., and Ferguson, A.V. (2007). Adiponectin selectively inhibits oxytocin neurons of the paraventricular nucleus of the hypothalamus. The Journal of physiology *585*, 805-816.

Hryhorczuk, C., Sharma, S., and Fulton, S.E. (2013). Metabolic disturbances connecting obesity and depression. Frontiers in neuroscience 7, 177.

Hu, E., Liang, P., and Spiegelman, B.M. (1996). AdipoQ is a novel adipose-specific gene dysregulated in obesity. The Journal of biological chemistry *271*, 10697-10703.

Hug, C., Wang, J., Ahmad, N.S., Bogan, J.S., Tsao, T.S., and Lodish, H.F. (2004). T-cadherin is a receptor for hexameric and high-molecular-weight forms of Acrp30/adiponectin. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America *101*, 10308-10313.

Hunter, C.A., and Jones, S.A. (2015). IL-6 as a keystone cytokine in health and disease. Nature immunology 16, 448-457.

Hyde, C.L., Nagle, M.W., Tian, C., Chen, X., Paciga, S.A., Wendland, J.R., Tung, J.Y., Hinds, D.A., Perlis, R.H., and Winslow, A.R. (2016). Identification of 15 genetic loci associated with risk of major depression in individuals of European descent. Nat Genet *48*, 1031-1036.

I/J

Isingrini, E., Belzung, C., Freslon, J.L., Machet, M.C., and Camus, V. (2012). Fluoxetine effect on aortic nitric oxidedependent vasorelaxation in the unpredictable chronic mild stress model of depression in mice. Psychosomatic medicine *74*, 63-72.

Iyengar, R.L., Gandhi, S., Aneja, A., Thorpe, K., Razzouk, L., Greenberg, J., Mosovich, S., and Farkouh, M.E. (2013). NSAIDs are associated with lower depression scores in patients with osteoarthritis. Am J Med *126*, 1017 e1011-1018.

Jacobs BL, v.P.H., Gage FH (2000). Adult brain neurogenesis and psychiatry: a novel theory of depression. Molecular psychiatry.

Jadavji, N.M., Kolb, B., and Metz, G.A. (2006). Enriched environment improves motor function in intact and unilateral dopamine-depleted rats. Neuroscience *140*, 1127-1138.

Janelidze, S., Mattei, D., Westrin, A., Traskman-Bendz, L., and Brundin, L. (2011). Cytokine levels in the blood may distinguish suicide attempters from depressed patients. Brain, behavior, and immunity *25*, 335-339.

Janeway, C.A., Jr. (1989). Approaching the asymptote? Evolution and revolution in immunology. Cold Spring Harb Symp Quant Biol *54 Pt 1*, 1-13. Jankowsky, J.L., Melnikova, T., Fadale, D.J., Xu, G.M., Slunt, H.H., Gonzales, V., Younkin, L.H., Younkin, S.G., Borchelt, D.R., and Savonenko, A.V. (2005). Environmental enrichment mitigates cognitive deficits in a mouse model of Alzheimer's disease. The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience *25*, 5217-5224.

Janowsky, D.S., Overstreet, D.H., and Nurnberger, J.I., Jr. (1994). Is cholinergic sensitivity a genetic marker for the affective disorders? Am J Med Genet *54*, 335-344.

Jantaratnotai, N., Mosikanon, K., Lee, Y., and McIntyre, R.S. (2017). The interface of depression and obesity. Obes Res Clin Pract *11*, 1-10.

Jauréguiberry, F. (2013). Déconnexion volontaire aux technologies de l'information et de la communication.

Jeong, H.G., Min, B.J., Lim, S., Kim, T.H., Lee, J.J., Park, J.H., Lee, S.B., Han, J.W., Choi, S.H., Park, Y.J., *et al.* (2012). Plasma adiponectin elevation in elderly individuals with subsyndromal depression. Psychoneuroendocrinology *37*, 948-955.

Jerome Sarris, A.O.N., Carolyn E Coulson, Isaac Schweitzer and Michael Berk (2014). Lifestyle medicine for depression. BMC Psychiatry.

Jha, S., Dong, B., and Sakata, K. (2011). Enriched environment treatment reverses depression-like behavior and restores reduced hippocampal neurogenesis and protein levels of brain-derived neurotrophic factor in mice lacking its expression through promoter IV. Translational psychiatry *1*, e40.

Jin, K., Zhu, Y., Sun, Y., Mao, X.O., Xie, L., and Greenberg, D.A. (2002). Vascular endothelial growth factor (VEGF) stimulates neurogenesis in vitro and in vivo. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America *99*, 11946-11950.

Jin, X., Li, T., Zhang, L., Ma, J., Yu, L., Li, C., and Niu, L. (2017). Environmental Enrichment Improves Spatial Learning and Memory in Vascular Dementia Rats with Activation of Wnt/beta-Catenin Signal Pathway. Med Sci Monit 23, 207-215.

Joels, M., Karst, H., DeRijk, R., and de Kloet, E.R. (2008). The coming out of the brain mineralocorticoid receptor. Trends in neurosciences *31*, 1-7.

Johansson, B.B., and Ohlsson, A.L. (1996). Environment, social interaction, and physical activity as determinants of functional outcome after cerebral infarction in the rat. Experimental neurology *139*, 322-327.

Jokela, M., Hamer, M., Singh-Manoux, A., Batty, G.D., and Kivimaki, M. (2014). Association of metabolically healthy obesity with depressive symptoms: pooled analysis of eight studies. Molecular psychiatry *19*, 910-914.

Jones, B.J., and Roberts, D.J. (1968). A rotarod suitable for quantitative measurements of motor incoordination in naive mice. Naunyn Schmiedebergs Arch Exp Pathol Pharmakol *259*, 211.

Jurgens, H.A., and Johnson, R.W. (2012). Environmental enrichment attenuates hippocampal neuroinflammation and improves cognitive function during influenza infection. Brain, behavior, and immunity *26*, 1006-1016.

Κ

Kadowaki, T., and Yamauchi, T. (2005). Adiponectin and adiponectin receptors. Endocr Rev 26, 439-451.

Kalynchuk, L.E., Gregus, A., Boudreau, D., and Perrot-Sinal, T.S. (2004). Corticosterone increases depression-like behavior, with some effects on predator odor-induced defensive behavior, in male and female rats. Behavioral neuroscience *118*, 1365-1377.

Kan, C., Silva, N., Golden, S.H., Rajala, U., Timonen, M., Stahl, D., and Ismail, K. (2013). A systematic review and meta-analysis of the association between depression and insulin resistance. Diabetes Care *36*, 480-489.

Kanda, H., Tateya, S., Tamori, Y., Kotani, K., Hiasa, K., Kitazawa, R., Kitazawa, S., Miyachi, H., Maeda, S., Egashira, K., *et al.* (2006). MCP-1 contributes to macrophage infiltration into adipose tissue, insulin resistance, and hepatic steatosis in obesity. The Journal of clinical investigation *116*, 1494-1505.

Katz, R.J., Roth, K.A., and Carroll, B.J. (1981). Acute and chronic stress effects on open field activity in the rat: implications for a model of depression. Neuroscience and biobehavioral reviews *5*, 247-251.

Kempermann, G., Kuhn, H.G., and Gage, F.H. (1997). More hippocampal neurons in adult mice living in an enriched environment. Nature *386*, 493-495.

Keohane, A., Ryan, S., Maloney, E., Sullivan, A.M., and Nolan, Y.M. (2010). Tumour necrosis factor-alpha impairs neuronal differentiation but not proliferation of hippocampal neural precursor cells: Role of Hes1. Mol Cell Neurosci *43*, 127-135.

Kettenmann, H., Hanisch, U.K., Noda, M., and Verkhratsky, A. (2011). Physiology of microglia. Physiological reviews *91*, 461-553.

Khakh, B.S., and Sofroniew, M.V. (2015). Diversity of astrocyte functions and phenotypes in neural circuits. Nature neuroscience 18, 942-952.

Kharroubi, I., Rasschaert, J., Eizirik, D.L., and Cnop, M. (2003). Expression of adiponectin receptors in pancreatic beta cells. Biochemical and biophysical research communications *312*, 1118-1122.

Kim, Y.K., and Maes, M. (2003). The role of the cytokine network in psychological stress. Acta Neuropsychiatr *15*, 148-155.

Klein, J., Winter, C., Coquery, N., Heinz, A., Morgenstern, R., Kupsch, A., and Juckel, G. (2010). Lesion of the medial prefrontal cortex and the subthalamic nucleus selectively affect depression-like behavior in rats. Behavioural brain research *213*, 73-81.

Klimek V, R.G., Luker SN, Dilley G, Meltzer HY, Overholser JC,, and Stockmeier CA, O.G. (1999). Brain noradrenergic receptors in major depression and

schizophrenia. Neuropsychopharmacology : official publication of the American College of Neuropsychopharmacology.

Kling MA, C.V., Schulkin J. (2009). Glucocorticoid inhibition in the treatment of depression: can we think outside the endocrine hypothalamus? Depress Anxiety.

Kobayashi, H., Ouchi, N., Kihara, S., Walsh, K., Kumada, M., Abe, Y., Funahashi, T., and Matsuzawa, Y. (2004). Selective suppression of endothelial cell apoptosis by the high molecular weight form of adiponectin. Circulation research *94*, e27-31.

Kokoeva, M.V., Yin, H., and Flier, J.S. (2005). Neurogenesis in the hypothalamus of adult mice: potential role in energy balance. Science *310*, 679-683.

Kopschina Feltes, P., Doorduin, J., Klein, H.C., Juarez-Orozco, L.E., Dierckx, R.A., Moriguchi-Jeckel, C.M., and de Vries, E.F. (2017). Anti-inflammatory treatment for major depressive disorder: implications for patients with an elevated immune profile and non-responders to standard antidepressant therapy. J Psychopharmacol *31*, 1149-1165.

Korin, B., Ben-Shaanan, T.L., Schiller, M., Dubovik, T., Azulay-Debby, H., Boshnak, N.T., Koren, T., and Rolls, A. (2017). High-dimensional, single-cell characterization of the brain's immune compartment. Nature neuroscience *20*, 1300-1309.

Kos, K., Harte, A.L., da Silva, N.F., Tonchev, A., Chaldakov, G., James, S., Snead, D.R., Hoggart, B., O'Hare, J.P., McTernan, P.G., *et al.* (2007). Adiponectin and resistin in human cerebrospinal fluid and expression of adiponectin receptors in the human hypothalamus. J Clin Endocrinol Metab *92*, 1129-1136.

Kreutzberg, G.W. (1996). Microglia: a sensor for pathological events in the CNS. Trends in neurosciences *19*, 312-318.

Krishnan, V., and Nestler, E.J. (2008). The molecular neurobiology of depression. Nature 455, 894-902.

Kubota, N., Yano, W., Kubota, T., Yamauchi, T., Itoh, S., Kumagai, H., Kozono, H., Takamoto, I., Okamoto, S., Shiuchi, T., *et al.* (2007). Adiponectin stimulates AMP-activated protein kinase in the hypothalamus and increases food intake. Cell metabolism *6*, 55-68.

Kuffler, S.W. (1967). Neuroglial cells: physiological properties and a potassium mediated effect of neuronal activity on the glial membrane potential. Proc R Soc Lond B Biol Sci *168*, 1-21.

Kumar, P., Smith, T., Rahman, K., Thorn, N.E., and Anania, F.A. (2014). Adiponectin agonist ADP355 attenuates CCl4-induced liver fibrosis in mice. PloS one *9*, e110405.

Kurhe, Y., and Mahesh, R. (2016). Pioglitazone, a PPARgamma agonist rescues depression associated with obesity using chronic unpredictable mild stress model in experimental mice. Neurobiol Stress *3*, 114-121.

Kurhe, Y., Mahesh, R., and Gupta, D. (2014). Effect of a selective cyclooxygenase type 2 inhibitor celecoxib on depression associated with obesity in mice: an approach using behavioral tests. Neurochem Res *39*, 1395-1402.

Kusminski, C.M., McTernan, P.G., Schraw, T., Kos, K., O'Hare, J.P., Ahima, R., Kumar, S., and Scherer, P.E. (2007). Adiponectin complexes in human cerebrospinal fluid: distinct complex distribution from serum. Diabetologia *50*, 634-642.

Kuter, K., Kolasiewicz, W., Golembiowska, K., Dziubina, A., Schulze, G., Berghauzen, K., Wardas, J., and Ossowska, K. (2011). Partial lesion of the dopaminergic innervation of the ventral striatum induces "depressive-like" behavior of rats. Pharmacol Rep *63*, 1383-1392.

Kuzumaki, N., Ikegami, D., Imai, S., Narita, M., Tamura, R., Yajima, M., Suzuki, A., Miyashita, K., Niikura, K., Takeshima, H., *et al.* (2010). Enhanced IL-1beta production in response to the activation of hippocampal glial cells impairs neurogenesis in aged mice. Synapse *64*, 721-728.

L

Laing, K.J., and Secombes, C.J. (2004). Chemokines. Dev Comp Immunol 28, 443-460.
Lanquillon, S., Krieg, J.C., Bening-Abu-Shach, U., and Vedder, H. (2000). Cytokine production and treatment response in major depressive disorder. Neuropsychopharmacology : official publication of the American College of Neuropsychopharmacology *22*, 370-379.

Lanzenberger, R., Baldinger, P., Hahn, A., Ungersboeck, J., Mitterhauser, M., Winkler, D., Micskei, Z., Stein, P., Karanikas, G., Wadsak, W., *et al.* (2013). Global decrease of serotonin-1A receptor binding after electroconvulsive therapy in major depression measured by PET. Molecular psychiatry *18*, 93-100.

Lapin, I.P. (1978). Stimulant and convulsive effects of kynurenines injected into brain ventricles in mice. J Neural Transm *42*, 37-43.

Larsson, E., Mandel, R.J., Klein, R.L., Muzyczka, N., Lindvall, O., and Kokaia, Z. (2002). Suppression of insult-induced neurogenesis in adult rat brain by brain-derived neurotrophic factor. Experimental neurology *177*, 1-8.

Lasselin, J., and Capuron, L. (2014). Chronic low-grade inflammation in metabolic disorders: relevance for behavioral symptoms. Neuroimmunomodulation 21, 95-101.

Laviola, G., Hannan, A.J., Macri, S., Solinas, M., and Jaber, M. (2008). Effects of enriched environment on animal models of neurodegenerative diseases and psychiatric disorders. Neurobiology of disease *31*, 159-168.

Lazarov, O., Robinson, J., Tang, Y.P., Hairston, I.S., Korade-Mirnics, Z., Lee, V.M., Hersh, L.B., Sapolsky, R.M., Mirnics, K., and Sisodia, S.S. (2005). Environmental enrichment reduces Abeta levels and amyloid deposition in transgenic mice. Cell *120*, 701-713.

Le Strat, Y., Dubertret, C., and Le Foll, B. (2011). Prevalence and correlates of major depressive episode in pregnant and postpartum women in the United States. Journal of affective disorders *135*, 128-138.

Leal-Galicia, P., Castaneda-Bueno, M., Quiroz-Baez, R., and Arias, C. (2008). Long-term exposure to environmental enrichment since youth prevents recognition memory decline and increases synaptic plasticity markers in aging. Neurobiol Learn Mem *90*, 511-518.

Lee, K.J., Jung, K.H., Cho, J.Y., Lee, S.T., Kim, H.S., Shim, J.H., Lee, S.K., Kim, M., and Chu, K. (2017). High-Fat Diet and Voluntary Chronic Aerobic Exercise Recover Altered Levels of Aging-Related Tryptophan Metabolites along the Kynurenine Pathway. Exp Neurobiol *26*, 132-140.

Lee, M.C., Ting, K.K., Adams, S., Brew, B.J., Chung, R., and Guillemin, G.J. (2010). Characterisation of the expression of NMDA receptors in human astrocytes. PloS one *5*, e14123.

Lee, W.Y., Rhee, E.J., Oh, K.W., Kim, S.Y., Jung, C.H., Yun, E.J., Baek, K.H., Kang, M.I., and Kim, S.W. (2006). Identification of adiponectin and its receptors in human osteoblast-like cells and association of T45G polymorphism in exon 2 of adiponectin gene with lumbar spine bone mineral density in Korean women. Clin Endocrinol (Oxf) *65*, 631-637.

Leo, R., Di Lorenzo, G., Tesauro, M., Cola, C., Fortuna, E., Zanasi, M., Troisi, A., Siracusano, A., Lauro, R., and Romeo, F. (2006). Decreased plasma adiponectin concentration in major depression. Neuroscience letters *407*, 211-213.

Leonard, B.E., and Tuite, M. (1981). Anatomical, physiological, and behavioral aspects of olfactory bulbectomy in the rat. Int Rev Neurobiol 22, 251-286.

Lewis, O., Odeyemi, Y., Joseph, V., Mehari, A., and Gillum, R.F. (2017). Screen Hours and Sleep Symptoms: The US National Health and Nutrition Examination Survey. Fam Community Health *40*, 231-235.

Li, P., Sun, F., Cao, H.M., Ma, Q.Y., Pan, C.M., Ma, J.H., Zhang, X.N., Jiang, H., Song, H.D., and Chen, M.D. (2009). Expression of adiponectin receptors in mouse adrenal glands and the adrenocortical Y-1 cell line: adiponectin regulates steroidogenesis. Biochemical and biophysical research communications *390*, 1208-1213.

Liu, J., Guo, M., Zhang, D., Cheng, S.Y., Liu, M., Ding, J., Scherer, P.E., Liu, F., and Lu, X.Y. (2012a). Adiponectin is critical in determining susceptibility to depressive behaviors and has antidepressant-like activity. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America *109*, 12248-12253.

Liu, M., and Liu, F. (2009). Transcriptional and post-translational regulation of adiponectin. Biochem J 425, 41-52. Liu, W., Liu, J., Xia, J., Xue, X., Wang, H., Qi, Z., and Ji, L. (2017). Leptin receptor knockout-induced depression-like behaviors and attenuated antidepressant effects of exercise are associated with STAT3/SOCS3 signaling. Brain, behavior, and immunity *61*, 297-305.

Liu, X., Wang, Q., Haydar, T.F., and Bordey, A. (2005). Nonsynaptic GABA signaling in postnatal subventricular zone controls proliferation of GFAP-expressing progenitors. Nature neuroscience *8*, 1179-1187.

Liu, Y., Ho, R.C., and Mak, A. (2012b). Interleukin (IL)-6, tumour necrosis factor alpha (TNF-alpha) and soluble interleukin-2 receptors (sIL-2R) are elevated in patients with major depressive disorder: a meta-analysis and meta-regression. Journal of affective disorders *139*, 230-239.

London, A., Cohen, M., and Schwartz, M. (2013). Microglia and monocyte-derived macrophages: functionally distinct populations that act in concert in CNS plasticity and repair. Frontiers in cellular neuroscience 7, 34.

Lopresti, A.L., Hood, S.D., and Drummond, P.D. (2013). A review of lifestyle factors that contribute to important pathways associated with major depression: diet, sleep²⁵Ad exercise. Journal of affective disorders *148*, 12-27.

Louveau, A., Smirnov, I., Keyes, T.J., Eccles, J.D., Rouhani, S.J., Peske, J.D., Derecki, N.C., Castle, D., Mandell, J.W., Lee, K.S., *et al.* (2015). Structural and functional features of central nervous system lymphatic vessels. Nature *523*, 337-341.

Lucassen, P.J., Tilders, F.J., Salehi, A., and Swaab, D.F. (1997). Neuropeptides vasopressin (AVP), oxytocin (OXT) and corticotropin-releasing hormone (CRH) in the human hypothalamus: activity changes in aging, Alzheimer's disease and depression. Aging (Milano) *9*, 48-50.

Ludescher, B., Machann, J., Eschweiler, G.W., Thamer, C., Maenz, C., Hipp, A., Claussen, C.D., and Schick, F. (2011). Active depression is associated with regional adiposity in the upper abdomen and the neck. Int J Psychiatry Med *41*, 271-280.

Luppino FS, d.W.L., Bouvy PF, Stijnen T, Cuijpers P, Penninx BW, Zitman FG. (2010). Overweight, Obesity, and Depression. Arch Gen Psychiatry.

Lynette L. Craft, a.F.M.P. (2004). The benefits of Exercise for the clinically depressed. J Clin Psychiatry.

Μ

Maciel, I.S., Silva, R.B., Morrone, F.B., Calixto, J.B., and Campos, M.M. (2013). Synergistic effects of celecoxib and bupropion in a model of chronic inflammation-related depression in mice. PloS one *8*, e77227.

MacQueen, G.M., Ramakrishnan, K., Croll, S.D., Siuciak, J.A., Yu, G., Young, L.T., and Fahnestock, M. (2001). Performance of heterozygous brain-derived neurotrophic factor knockout mice on behavioral analogues of anxiety, nociception, and depression. Behavioral neuroscience *115*, 1145-1153.

Maddineni, S., Metzger, S., Ocon, O., Hendricks, G., 3rd, and Ramachandran, R. (2005). Adiponectin gene is expressed in multiple tissues in the chicken: food deprivation influences adiponectin messenger ribonucleic acid expression. Endocrinology *146*, 4250-4256.

Maeda, K., Okubo, K., Shimomura, I., Funahashi, T., Matsuzawa, Y., and Matsubara, K. (1996). cDNA cloning and expression of a novel adipose specific collagen-like factor, apM1 (AdiPose Most abundant Gene transcript 1). Biochemical and biophysical research communications *221*, 286-289.

Maes, M.M., H.Y. (1995). The serotonergic hypothesis of depression. Psychopharmacology: the fourth Generation of Progress.

Magdy, Y.M., El-Kharashi, O.A., Nabih, E.S., Shaker, S.M., Abd-Elaziz, L.F., and Aboul-Fotouh, S. (2017). Potential involvement of JNK1 repression in the hepatic effect of sitagliptin and metformin in rats subjected to high fat diet and chronic mild distress. Biomed Pharmacother *85*, 225-238.

Majd, M., Hashemian, F., Hosseini, S.M., Vahdat Shariatpanahi, M., and Sharifi, A. (2015). A Randomized, Doubleblind, Placebo-controlled Trial of Celecoxib Augmentation of Sertraline in Treatment of Drug-naive Depressed Women: A Pilot Study. Iran J Pharm Res *14*, 891-899.

Malih, S., Saidijam, M., Mansouri, K., Pourjafar, M., Tafakh, M.S., Talebzadeh, F., and Najafi, R. (2017). Promigratory and proangiogenic effects of AdipoRon on bone marrow-derived mesenchymal stem cells: an in vitro study. Biotechnol Lett *39*, 39-44.

Mamalakis, G., Kiriakakis, M., Tsibinos, G., Hatzis, C., Flouri, S., Mantzoros, C., and Kafatos, A. (2006). Depression and serum adiponectin and adipose omega-3 and omega-6 fatty acids in adolescents. Pharmacology, biochemistry, and behavior *85*, 474-479.

Mandolesi, L., De Bartolo, P., Foti, F., Gelfo, F., Federico, F., Leggio, M.G., and Petrosini, L. (2008). Environmental enrichment provides a cognitive reserve to be spent in the case of brain lesion. J Alzheimers Dis *15*, 11-28.

Manji HK, D.W., Charney DS. (2001). The cellular neurobiology of depression. Nature medicine.

Mao, X., Kikani, C.K., Riojas, R.A., Langlais, P., Wang, L., Ramos, F.J., Fang, Q., Christ-Roberts, C.Y., Hong, J.Y., Kim, R.Y., *et al.* (2006). APPL1 binds to adiponectin receptors and mediates adiponectin signalling and function. Nat Cell Biol *8*, 516-523.

Martinez, M., Phillips, P.J., and Herbert, J. (1998). Adaptation in patterns of c-fos expression in the brain associated with exposure to either single or repeated social stress in male rats. The European journal of neuroscience *10*, 20-33.

Matheus, F.C., Rial, D., Real, J.I., Lemos, C., Takahashi, R.N., Bertoglio, L.J., Cunha, R.A., and Prediger, R.D. (2016). Temporal Dissociation of Striatum and Prefrontal Cortex Uncouples Anhedonia and Defense Behaviors Relevant to Depression in 6-OHDA-Lesioned Rats. Mol Neurobiol *53*, 3891-3899.

Matthew J. Kempton, Z.S., Marcus R. Munafò, John R. Geddes, Andrew Simmons, Sophia Frangou, Steven C. R. Williams. (2011). Structural Neuroimaging Studies in Major Depressive DisorderMeta-analysis and Comparison With Bipolar Disorder. Arch Gen Psychiatry.

Matzinger, P. (2002). The Danger Model: A renewed Sense of Self. Science.

Mayer, J.L., Klumpers, L., Maslam, S., de Kloet, E.R., Joels, M., and Lucassen, P.J. (2006). Brief treatment with the glucocorticoid receptor antagonist mifepristone normalises the corticosterone-induced reduction of adult hippocampal neurogenesis. Journal of neuroendocrinology *18*, 629-631.

McIntyre, R.S., Soczynska, J.K., Konarski, J.Z., Woldeyohannes, H.O., Law, C.W., Miranda, A., Fulgosi, D., and Kennedy, S.H. (2007). Should Depressive Syndromes Be Reclassified as "Metabolic Syndrome Type II"? Ann Clin Psychiatry *19*, 257-264.

McKinney, W.T., Jr., and Bunney, W.E., Jr. (1969). Animal model of depression. I. Review of evidence: implications for research. Arch Gen Psychiatry *21*, 240-248.

McNally, L., Bhagwagar, Z., and Hannestad, J. (2008). Inflammation, glutamate, and glia in depression: a literature review. CNS Spectr *13*, 501-510.

McQuaid, R.J., Audet, M.C., Jacobson-Pick, S., and Anisman, H. (2013a). The differential impact of social defeat on mice living in isolation or groups in an enriched environment: plasma corticosterone and monoamine variations. Int J Neuropsychopharmacol *16*, 351-363.

McQuaid, R.J., Audet, M.C., Jacobson-Pick, S., and Anisman, H. (2013b). Environmental enrichment influences brain cytokine variations elicited by social defeat in mice. Psychoneuroendocrinology *38*, 987-996.

Medawar, P.B. (1948). Immunity to homologous grafted skin; the fate of skin homografts transplanted to the brain, to subcutaneous tissue, and to the anterior chamber of the eye. Br J Exp Pathol *29*, 58-69.

Medzhitov, R. (2007). Recognition of microorganisms and activation of the immune response. Nature 449, 819-826.

Meshi, D., Drew, M.R., Saxe, M., Ansorge, M.S., David, D., Santarelli, L., Malapani, C., Moore, H., and Hen, R. (2006). Hippocampal neurogenesis is not required for behavioral effects of environmental enrichment. Nature neuroscience *9*, 729-731.

Migaud, M., Batailler, M., Segura, S., Duittoz, A., Franceschini, I., and Pillon, D. (2010). Emerging new sites for adult neurogenesis in the mammalian brain: a comparative study between the hypothalamus and the classical neurogenic zones. The European journal of neuroscience *32*, 2042-2052.

Miguel-Hidalgo, J.J., Baucom, C., Dilley, G., Overholser, J.C., Meltzer, H.Y., Stockmeier, C.A., and Rajkowska, G. (2000). Glial fibrillary acidic protein immunoreactivity in the prefrontal cortex distinguishes younger from older adults in major depressive disorder. Biological psychiatry *48*, 861-873.

Millan, M.J. (2006). Multi-target strategies for the improved treatment of depressive states: Conceptual foundations and neuronal substrates, drug discovery and therapeutic application. Pharmacology & therapeutics *110*, 135-370.

Miller, N.E., Michel, C.C., Nanjee, M.N., Olszewski, W.L., Miller, I.P., Hazell, M., Olivecrona, G., Sutton, P., Humphreys, S.M., and Frayn, K.N. (2011). Secretion of adipokines by human adipose tissue in vivo: partitioning between capillary and lymphatic transport. American journal of physiology Endocrinology and metabolism *301*, E659-667.

Misra, M., and Klibanski, A. (2014). Endocrine consequences of anorexia nervosa. Lancet Diabetes Endocrinol 2, 581-592.

Mohapel, P., Leanza, G., Kokaia, M., and Lindvall, O. (2005). Forebrain acetylcholine regulates adult hippocampal neurogenesis and learning. Neurobiology of aging *26*, 939-946.

Molteni R, W.A., Vaynman S, Ying Z, Barnard RJ, Gómez-Pinilla F. (2004). Exercise reverses the harmful effects of consumption of a high-fat diet on synaptic and behavioral plasticity associated to the action of brain-derived neurotrophic factor. Neuroscience.

Monda, V., Villano, I., Messina, A., Valenzano, A., Esposito, T., Moscatelli, F., Viggiano, A., Cibelli, G., Chieffi, S., Monda, M., *et al.* (2017). Exercise Modifies the Gut Microbiota with Positive Health Effects. Oxid Med Cell Longev *2017*, 3831972.

Monteggia, L.M., Barrot, M., Powell, C.M., Berton, O., Galanis, V., Gemelli, T., Meuth, S., Nagy, A., Greene, R.W., and Nestler, E.J. (2004). Essential role of brain-derived neurotrophic factor in adult hippocampal function. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America *101*, 10827-10832.

Monteggia, L.M., Luikart, B., Barrot, M., Theobold, D., Malkovska, I., Nef, S., Parada, L.F., and Nestler, E.J. (2007). Brain-derived neurotrophic factor conditional knockouts show gender differences in depression-related behaviors. Biological psychiatry *61*, 187-197.

Moret, C., and Briley, M. (2011). The importance of norepinephrine in depression. Neuropsychiatr Dis Treat 7, 9-13.

Morley-Fletcher S, R.M., Maccari S, Laviola G. (2003). Environmental enrichment during adolescence reverses the effects of prenatal stress on play behaviour and HPA axis reactivity in rats. The European journal of neuroscience.

Motivala, S.J., Sarfatti, A., Olmos, L., and Irwin, M.R. (2005). Inflammatory markers and sleep disturbance in major depression. Psychosomatic medicine *67*, 187-194.

Mouihate, A. (2014). TLR4-mediated brain inflammation halts neurogenesis: impact of hormonal replacement therapy. Frontiers in cellular neuroscience 8, 146.

Moy, S.S., Nadler, J.J., Perez, A., Barbaro, R.P., Johns, J.M., Magnuson, T.R., Piven, J., and Crawley, J.N. (2004). Sociability and preference for social novelty in five inbred strains: an approach to assess autistic-like behavior in mice. Genes Brain Behav *3*, 287-302.

Muglia, L., Jacobson, L., Dikkes, P., and Majzoub, J.A. (1995). Corticotropin-releasing hormone deficiency reveals major fetal but not adult glucocorticoid need. Nature *373*, 427-432.

Muller, N., and Schwarz, M.J. (2007). The immune-mediated alteration of serotonin and glutamate: towards an integrated view of depression. Molecular psychiatry *12*, 988-1000.

Muller, N., and Schwarz, M.J. (2008). A psychoneuroimmunological perspective to Emil Kraepelins dichotomy: schizophrenia and major depression as inflammatory CNS disorders. Eur Arch Psychiatry Clin Neurosci 258 Suppl 2, 97-106.

Munhoz, C.D., Sorrells, S.F., Caso, J.R., Scavone, C., and Sapolsky, R.M. (2010). Glucocorticoids exacerbate lipopolysaccharide-induced signaling in the frontal cortex and hippocampus in a dose-dependent manner. The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience *30*, 13690-13698.

Murphy, J.M., Horton, N.J., Laird, N.M., Monson, R.R., Sobol, A.M., and Leighton, A.H. (2004). Anxiety and depression: a 40-year perspective on relationships regarding prevalence, distribution, and comorbidity. Acta Psychiatr Scand *109*, 355-375.

Myint, A.M., and Kim, Y.K. (2014). Network beyond IDO in psychiatric disorders: revisiting neurodegeneration hypothesis. Progress in neuro-psychopharmacology & biological psychiatry 48, 304-313.

Myint, A.M., Steinbusch, H.W., Goeghegan, L., Luchtman, D., Kim, Y.K., and Leonard, B.E. (2007). Effect of the COX-2 inhibitor celecoxib on behavioural and immune changes in an olfactory bulbectomised rat model of depression. Neuroimmunomodulation *14*, 65-71.

Ν

Nachat-Kappes, R., Pinel, A., Combe, K., Lamas, B., Farges, M.C., Rossary, A., Goncalves-Mendes, N., Caldefie-Chezet, F., Vasson, M.P., and Basu, S. (2012). Effects of enriched environment on COX-2, leptin and eicosanoids in a mouse model of breast cancer. PloS one 7, e51525.

Nakano, Y., Tobe, T., Choi-Miura, N.H., Mazda, T., and Tomita, M. (1996). Isolation and characterization of GBP28, a novel gelatin-binding protein purified from human plasma. J Biochem *120*, 803-812.

Narasimhan, M.L., Coca, M.A., Jin, J., Yamauchi, T., Ito, Y., Kadowaki, T., Kim, K.K., Pardo, J.M., Damsz, B., Hasegawa, P.M., *et al.* (2005). Osmotin is a homolog of mammalian adiponectin and controls apoptosis in yeast through a homolog of mammalian adiponectin receptor. Mol Cell *17*, 171-180.

Narita, K., Murata, T., Takahashi, T., Kosaka, H., Omata, N., and Wada, Y. (2006). Plasma levels of adiponectin and tumor necrosis factor-alpha in patients with remitted major depression receiving long-term maintenance antidepressant therapy. Progress in neuro-psychopharmacology & biological psychiatry *30*, 1159-1162.

Nedergaard, M., Ransom, B., and Goldman, S.A. (2003). New roles for astrocytes: redefining the functional architecture of the brain. Trends in neurosciences *26*, 523-530.

Nestler, E.J., and Hyman, S.E. (2010). Animal models of neuropsychiatric disorders. Nature neuroscience 13, 1161-1169.

Neumeier, M., Weigert, J., Buettner, R., Wanninger, J., Schaffler, A., Muller, A.M., Killian, S., Sauerbruch, S., Schlachetzki, F., Steinbrecher, A., *et al.* (2007). Detection of adiponectin in cerebrospinal fluid in humans. American journal of physiology Endocrinology and metabolism *293*, E965-969.

Ng, F., Berk, M., Dean, O., and Bush, A.I. (2008). Oxidative stress in psychiatric disorders: evidence base and therapeutic implications. Int J Neuropsychopharmacol *11*, 851-876.

Nimmerjahn, A., Kirchhoff, F., and Helmchen, F. (2005). Resting microglial cells are highly dynamic surveillants of brain parenchyma in vivo. Science *308*, 1314-1318.

Nithianantharajah, J., Barkus, C., Vijiaratnam, N., Clement, O., and Hannan, A.J. (2009). Modeling brain reserve: experience-dependent neuronal plasticity in healthy and Huntington's disease transgenic mice. Am J Geriatr Psychiatry *17*, 196-209.

Noble, E.E., Hsu, T.M., Jones, R.B., Fodor, A.A., Goran, M.I., and Kanoski, S.E. (2017a). Early-Life Sugar Consumption Affects the Rat Microbiome Independently of Obesity. J Nutr *147*, 20-28.

Noble, E.E., Hsu, T.M., and Kanoski, S.E. (2017b). Gut to Brain Dysbiosis: Mechanisms Linking Western Diet Consumption, the Microbiome, and Cognitive Impairment. Frontiers in behavioral neuroscience 11, 9.

Novaes, L.S., Dos Santos, N.B., Batalhote, R.F.P., Malta, M.B., Camarini, R., Scavone, C., and Munhoz, C.D. (2017). Environmental enrichment protects against stress-induced anxiety: Role of glucocorticoid receptor, ERK, and CREB signaling in the basolateral amygdala. Neuropharmacology *113*, 457-466.

0

O'Farrell, A.M., Liu, Y., Moore, K.W., and Mui, A.L. (1998). IL-10 inhibits macrophage activation and proliferation by distinct signaling mechanisms: evidence for Stat3-dependent and -independent pathways. The EMBO journal *17*, 1006-1018.

Oades, R.D.a.H., G.M. (1986). Ventral Tegmental (A10) system: neurobiology. Anatomy and connectivity. Brain Research Review.

Oakes, P., Loukas, M., Oskouian, R.J., and Tubbs, R.S. (2017). The neuroanatomy of depression: A review. Clin Anat *30*, 44-49.

Ogawa, T., Matson, W.R., Beal, M.F., Myers, R.H., Bird, E.D., Milbury, P., and Saso, S. (1992). Kynurenine pathway abnormalities in Parkinson's disease. Neurology *42*, 1702-1706.

Oitzl MS, v.H.A., de Kloet ER (1997). Behavioral and neuroendocrine responses controlled by the concerted action of central mineralocorticoid (MRS) and glucocorticoid receptors (GRS). Psychoneuroendocrinology.

Okada-Iwabu, M., Iwabu, M., Ueki, K., Yamauchi, T., and Kadowaki, T. (2015). Perspective of Small-Molecule AdipoR Agonist for Type 2 Diabetes and Short Life in Obesity. Diabetes & metabolism journal *39*, 363-372.

Okada-Iwabu, M., Yamauchi, T., Iwabu, M., Honma, T., Hamagami, K., Matsuda, K., Yamaguchi, M., Tanabe, H., Kimura-Someya, T., Shirouzu, M., *et al.* (2013). A small-molecule AdipoR agonist for type 2 diabetes and short life in obesity. Nature *503*, 493-499.

Okamoto, M., Ohara-Imaizumi, M., Kubota, N., Hashimoto, S., Eto, K., Kanno, T., Kubota, T., Wakui, M., Nagai, R., Noda, M., *et al.* (2008). Adiponectin induces insulin secretion in vitro and in vivo at a low glucose concentration. Diabetologia *51*, 827-835.

Okamoto, Y., Arita, Y., Nishida, M., Muraguchi, M., Ouchi, N., Takahashi, M., Igura, T., Inui, Y., Kihara, S., Nakamura, T., *et al.* (2000). An adipocyte-derived plasma protein, adiponectin, adheres to injured vascular walls. Horm Metab Res *32*, 47-50.

Olson, A.K., Eadie, B.D., Ernst, C., and Christie, B.R. (2006). Environmental enrichment and voluntary exercise massively increase neurogenesis in the adult hippocampus via dissociable pathways. Hippocampus *16*, 250-260.

Olson, J.K., Girvin, A.M., and Miller, S.D. (2001). Direct activation of innate and antigen-presenting functions of microglia following infection with Theiler's virus. J Virol *75*, 9780-9789.

Opel, N., Redlich, R., Grotegerd, D., Dohm, K., Heindel, W., Kugel, H., Arolt, V., and Dannlowski, U. (2015). Obesity and major depression: Body-mass index (BMI) is associated with a severe course of disease and specific neurostructural alterations. Psychoneuroendocrinology *51*, 219-226.

Orihuela R, M.C.a.H.G. (2015). Microglial M1/M2 polarization and metabolic states. British journal of pharmacology.

Ortega Millán A, G.P.A., San Román Villalón P. (1981). Multifactorial etiology and evolution of chronic depression. Actas Luso Esp Neurol Psychiatric.

Otvos, L., Jr., Haspinger, E., La Russa, F., Maspero, F., Graziano, P., Kovalszky, I., Lovas, S., Nama, K., Hoffmann, R., Knappe, D., et al. (2011). Design and development of a peptide-based adiponectin receptor agonist for cancer treatment. BMC biotechnology *11*, 90.

Overstreet, D.H., Pucilowski, O., Rezvani, A.H., and Janowsky, D.S. (1995). Administration of antidepressants, diazepam and psychomotor stimulants further confirms the utility of Flinders Sensitive Line rats as an animal model of depression. Psychopharmacology *121*, 27-37.

P/Q

Pace, T.W., Hu, F., and Miller, A.H. (2007). Cytokine-effects on glucocorticoid receptor function: relevance to glucocorticoid resistance and the pathophysiology and treatment of major depression. Brain, behavior, and immunity *21*, 9-19.

Pajvani, U.B., Hawkins, M., Combs, T.P., Rajala, M.W., Doebber, T., Berger, J.P., Wagner, J.A., Wu, M., Knopps, A., Xiang, A.H., *et al.* (2004). Complex distribution, not absolute amount of adiponectin, correlates with thiazolidinedione-mediated improvement in insulin sensitivity. The Journal of biological chemistry *279*, 12152-12162.

Palanivel, R., Fang, X., Park, M., Eguchi, M., Pallan, S., De Girolamo, S., Liu, Y., Wang, Y., Xu, A., and Sweeney, G. (2007). Globular and full-length forms of adiponectin mediate specific changes in glucose and fatty acid uptake and metabolism in cardiomyocytes. Cardiovasc Res *75*, 148-157.

Pan, A., Ye, X., Franco, O.H., Li, H., Yu, Z., Wang, J., Qi, Q., Gu, W., Pang, X., Liu, H., *et al.* (2008). The association of depressive symptoms with inflammatory factors and adipokines in middle-aged and older Chinese. PloS one *3*, e1392.

Pan, W., Tu, H., and Kastin, A.J. (2006). Differential BBB interactions of three ingestive peptides: obestatin, ghrelin, and adiponectin. Peptides 27, 911-916.

Pang, T.Y., and Hannan, A.J. (2010). Environmental enrichment: a cure for cancer? It's all in the mind. Journal of molecular cell biology *2*, 302-304.

Papp, M., Willner, P., and Muscat, R. (1991). An animal model of anhedonia: attenuation of sucrose consumption and place preference conditioning by chronic unpredictable mild stress. Psychopharmacology *104*, 255-259.

Pariante, C. (2009). Risk factors for development of depression and psychosis. Glucocorticoid receptors and pituitary implications for treatment with antidepressant and glucocorticoids. Annals of the New York Academy of Sciences.

Pasco, J.A., Jacka, F.N., Williams, L.J., Henry, M.J., Nicholson, G.C., Kotowicz, M.A., and Berk, M. (2010). Clinical implications of the cytokine hypothesis of depression: the association between use of statins and aspirin and the risk of major depression. Psychother Psychosom *79*, 323-325.

Paul, W.E. (2015). History of interleukin-4. Cytokine 75, 3-7.

Paz-Filho, G., Mastronardi, C., Franco, C.B., Wang, K.B., Wong, M.L., and Licinio, J. (2012). Leptin: molecular mechanisms, systemic pro-inflammatory effects, and clinical implications. Arq Bras Endocrinol Metabol *56*, 597-607.

Penka, L.L., Bond, T.L., and Heinrichs, S.C. (2004). Non-specific effect of fear conditioning and specific effect of social defeat on social recognition memory performance in female rats. Stress 7, 63-72.

Pepping, J.K., Otvos, L., Jr., Surmacz, E., Gupta, S., Keller, J.N., and Bruce-Keller, A.J. (2014). Designer adiponectin receptor agonist stabilizes metabolic function and prevents brain injury caused by HIV protease inhibitors. Journal of neuroimmune pharmacology : the official journal of the Society on NeuroImmune Pharmacology *9*, 388-398.

Pereira, V.H., Marques, F., Lages, V., Pereira, F.G., Patchev, A., Almeida, O.F., Almeida-Palha, J., Sousa, N., and Cerqueira, J.J. (2016). Glucose intolerance after chronic stress is related with downregulated PPAR-gamma in adipose tissue. Cardiovasc Diabetol *15*, 114.

Perez-Alvarez, A., and Araque, A. (2013). Astrocyte-neuron interaction at tripartite synapses. Curr Drug Targets 14, 1220-1224.

Perona, M.T., Waters, S., Hall, F.S., Sora, I., Lesch, K.P., Murphy, D.L., Caron, M., and Uhl, G.R. (2008). Animal models of depression in dopamine, serotonin, and norepinephrine transporter knockout mice: prominent effects of dopamine transporter deletions. Behav Pharmacol *19*, 566-574.

Peter J. Carek, M., MS, Sarah E. Laibstain, MD, Stephen M. Carek (2011). Exercise for the Treatment of Depression and Anxiety . The international Journal of psychiatry in medicine.

Pham, T.M., Ickes, B., Albeck, D., Soderstrom, S., Granholm, A.C., and Mohammed, A.H. (1999). Changes in brain nerve growth factor levels and nerve growth factor receptors in rats exposed to environmental enrichment for one year. Neuroscience *94*, 279-286.

Phillips, S.A., and Kung, J.T. (2010). Mechanisms of adiponectin regulation and use as a pharmacological target. Curr Opin Pharmacol 10, 676-683.

Pineiro, R., Iglesias, M.J., Gallego, R., Raghay, K., Eiras, S., Rubio, J., Dieguez, C., Gualillo, O., Gonzalez-Juanatey, J.R., and Lago, F. (2005). Adiponectin is synthesized and secreted by human and murine cardiomyocytes. FEBS Lett *579*, 5163-5169.

Pinna, F., Sardu, C., Orru, W., Velluzzi, F., Loviselli, A., Contu, P., and Carpiniello, B. (2016). Psychopathology, psychosocial factors and obesity. Riv Psichiatr *51*, 30-36.

Pitchot W, H.M., Gonzalez Moreno A, Pinto E, Reggers J, Fuchs S, Pirard S, Ansseau M. (2001). Reduced dopamine function in depressed patients is related to suicidal behavior but not its lethality. Psychoneuroendocrinology.

Plotkin SR, B.W., Kastin AJ (1996). Comparison of saturable transport and extracellular pathways in the passage of interleukin-1 across the blood-brain barrier

. Journal of neuroimmunology.

Porsolt, R.D. (1979). Animal model of depression. Biomedicine 30, 139-140.

Post RM, G.R., Carman JS, Gillin JC, Jimerson DC, Goodwin FK, Bunney WE Jr. (1978). Effects of a dopamine agonist piribedil in depressed patients: relationship of pretreatment homovanillic acid to antidepressant response. Arch Gen Psychiatry. 256

Price, J.L., and Drevets, W.C. (2010). Neurocircuitry of mood disorders. Neuropsychopharmacology : official publication of the American College of Neuropsychopharmacology *35*, 192-216.

Probert, L. (2015). TNF and its receptors in the CNS: The essential, the desirable and the deleterious effects. Neuroscience *302*, 2-22.

Prusky, G.T., Reidel, C., and Douglas, R.M. (2000). Environmental enrichment from birth enhances visual acuity but not place learning in mice. Behavioural brain research *114*, 11-15.

Psilopanagioti, A., Papadaki, H., Kranioti, E.F., Alexandrides, T.K., and Varakis, J.N. (2009). Expression of adiponectin and adiponectin receptors in human pituitary gland and brain. Neuroendocrinology *89*, 38-47.

Qi, Y., Takahashi, N., Hileman, S.M., Patel, H.R., Berg, A.H., Pajvani, U.B., Scherer, P.E., and Ahima, R.S. (2004). Adiponectin acts in the brain to decrease body weight. Nature medicine *10*, 524-529.

Qiu, G., Wan, R., Hu, J., Mattson, M.P., Spangler, E., Liu, S., Yau, S.Y., Lee, T.M., Gleichmann, M., Ingram, D.K., et al. (2011). Adiponectin protects rat hippocampal neurons against excitotoxicity. Age 33, 155-165.

R

Ragu Varman, D., and Rajan, K.E. (2015). Environmental Enrichment Reduces Anxiety by Differentially Activating Serotonergic and Neuropeptide Y (NPY)-Ergic System in Indian Field Mouse (Mus booduga): An Animal Model of Post-Traumatic Stress Disorder. PloS one *10*, e0127945.

Rahman, S.A., Marcu, S., Kayumov, L., and Shapiro, C.M. (2010). Altered sleep architecture and higher incidence of subsyndromal depression in low endogenous melatonin secretors. Eur Arch Psychiatry Clin Neurosci *260*, 327-335.

Raison, C.L., Lowry, C.A., and Rook, G.A. (2010). Inflammation, sanitation, and consternation: loss of contact with coevolved, tolerogenic microorganisms and the pathophysiology and treatment of major depression. Arch Gen Psychiatry *67*, 1211-1224.

Rajkowska, G. (2000). Postmortem studies in mood disorders indicate altered numbers of neurons and glial cells. Biological psychiatry *48*, 766-777.

Raju, T.N. (1998). The Nobel chronicles. 1927: Julius Wagner-Jauregg (1857-1940). Lancet 352, 1714.

Ransohoff, R.M., and Perry, V.H. (2009). Microglial physiology: unique stimuli, specialized responses. Annual review of immunology 27, 119-145.

Ransom, B., Behar, T., and Nedergaard, M. (2003). New roles for astrocytes (stars at last). Trends in neurosciences *26*, 520-522.

Restivo, L., Ferrari, F., Passino, E., Sgobio, C., Bock, J., Oostra, B.A., Bagni, C., and Ammassari-Teule, M. (2005). Enriched environment promotes behavioral and morphological recovery in a mouse model for the fragile X syndrome. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America *102*, 11557-11562.

Reynolds, B.A., and Weiss, S. (1996). Clonal and population analyses demonstrate that an EGF-responsive mammalian embryonic CNS precursor is a stem cell. Dev Biol *175*, 1-13.

Reynolds, G.P., and Pearson, S.J. (1989). Increased brain 3-hydroxykynurenine in Huntington's disease. Lancet 2, 979-980.

Richard M Quetsch, R.W.A., Edward M Litin, and Robert L Faucett. (1959). Depressive Reactions in Hypertensive Patients : A Comparison of Those Treated with Rauwolfia and Those Receiving No Specific Antihypertensive Treatment. Circulation.

Rodrigo T. Lopes, M.M.G., Daniel B. Fassnacht, Paulo P.P. Machado, Inês Sousa (2014). Long-term effects of psychotherapy on moderate depression: A comparative study of narrative therapy and cognitive-behavioral therapy. Journal of affective disorders *167*, 64-73.

Rodriguez-Pacheco, F., Martinez-Fuentes, A.J., Tovar, S., Pinilla, L., Tena-Sempere, M., Dieguez, C., Castano, J.P., and Malagon, M.M. (2007). Regulation of pituitary cell function by adiponectin. Endocrinology *148*, 401-410.

Ronald S. Duman, G.R.H., Eric J. Nestler. (1997). A Molecular and Cellular Theory of Depression. Arch Gen Psychiatry.

Rotella, F., and Mannucci, E. (2013). Depression as a risk factor for diabetes: a meta-analysis of longitudinal studies. J Clin Psychiatry 74, 31-37.

Round, J.L., and Mazmanian, S.K. (2009). The gut microbiota shapes intestinal immune responses during health and disease. Nature reviews Immunology *9*, 313-323.

Rudy, C.C., Hunsberger, H.C., Weitzner, D.S., and Reed, M.N. (2015). The role of the tripartite glutamatergic synapse in the pathophysiology of Alzheimer's disease. Aging Dis *6*, 131-148.

Rupp, H.A., and Wallen, K. (2008). Sex differences in response to visual sexual stimuli: a review. Arch Sex Behav 37, 206-218.

Sakata, K., Jin, L., and Jha, S. (2010). Lack of promoter IV-driven BDNF transcription results in depression-like behavior. Genes Brain Behav 9, 712-721.

Salazar, A., Gonzalez-Rivera, B.L., Redus, L., Parrott, J.M., and O'Connor, J.C. (2012). Indoleamine 2,3-dioxygenase mediates anhedonia and anxiety-like behaviors caused by peripheral lipopolysaccharide immune challenge. Hormones and behavior *62*, 202-209.

Sale, A., Berardi, N., and Maffei, L. (2009). Enrich the environment to empower the brain. Trends in neurosciences *32*, 233-239.

Sale, A., Putignano, E., Cancedda, L., Landi, S., Cirulli, F., Berardi, N., and Maffei, L. (2004). Enriched environment and acceleration of visual system development. Neuropharmacology *47*, 649-660.

Samuels BA, H.R. (2011). Neurogenesis and affective disorders. The European journal of neuroscience.

Sánchez-Villegas A, D.-R.M., Alonso A et al (2009). Association of the mediterranean dietary pattern with the incidence of depression: The seguimiento universidad de navarra/university of navarra follow-up (sun) cohort. Arch Gen Psychiatry.

Sapolsky, R.M. (2000). Glucocorticoids and hippocampal atrophy in neuropsychiatric disorders. Arch Gen Psychiatry *57*, 925-935.

Savitz, J., Drevets, W.C., Wurfel, B.E., Ford, B.N., Bellgowan, P.S., Victor, T.A., Bodurka, J., Teague, T.K., and Dantzer, R. (2015). Reduction of kynurenic acid to quinolinic acid ratio in both the depressed and remitted phases of major depressive disorder. Brain, behavior, and immunity *46*, 55-59.

Scantamburlo, G., Hansenne, M., Fuchs, S., Pitchot, W., Marechal, P., Pequeux, C., Ansseau, M., and Legros, J.J. (2007). Plasma oxytocin levels and anxiety in patients with major depression. Psychoneuroendocrinology *32*, 407-410.

Scapagnini, G., Davinelli, S., Drago, F., De Lorenzo, A., and Oriani, G. (2012). Antioxidants as antidepressants: fact or fiction? CNS Drugs *26*, 477-490.

Schatzberg, A.F., Shildkraut, J.J (1995). Recent studies on norepinephrine systems in mood disorders. Psychopharmacology: the fourth Generation of Progress.

Scherer, P.E., Williams, S., Fogliano, M., Baldini, G., and Lodish, H.F. (1995). A novel serum protein similar to C1q, produced exclusively in adipocytes. The Journal of biological chemistry *270*, 26746-26749.

Schiepers, O.J., Wichers, M.C., and Maes, M. (2005). Cytokines and major depression. Progress in neuro-psychopharmacology & biological psychiatry 29, 201-217.

Schloesser, R.J., Lehmann, M., Martinowich, K., Manji, H.K., and Herkenham, M. (2010). Environmental enrichment requires adult neurogenesis to facilitate the recovery from psychosocial stress. Molecular psychiatry *15*, 1152-1163.

Schramm, N.L., McDonald, M.P., and Limbird, L.E. (2001). The alpha(2a)-adrenergic receptor plays a protective role in mouse behavioral models of depression and anxiety. The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience *21*, 4875-4882.

Schulz, C., Gomez Perdiguero, E., Chorro, L., Szabo-Rogers, H., Cagnard, N., Kierdorf, K., Prinz, M., Wu, B., Jacobsen, S.E., Pollard, J.W., *et al.* (2012). A lineage of myeloid cells independent of Myb and hematopoietic stem cells. Science *336*, 86-90.

Schwarcz, R., and Du, F. (1991). Quinolinic acid and kynurenic acid in the mammalian brain. Adv Exp Med Biol *294*, 185-199.

Segovia, G., Del Arco, A., De Blas, M., Garrido, P., and Mora, F. (2010). Environmental enrichment increases the in vivo extracellular concentration of dopamine in the nucleus accumbens: a microdialysis study. J Neural Transm (Vienna) *117*, 1123-1130.

Seligman, M.E., and Beagley, G. (1975). Learned helplessness in the rat. J Comp Physiol Psychol 88, 534-541.

Seong, H.H., Park, J.M., and Kim, Y.J. (2018). Antidepressive Effects of Environmental Enrichment in Chronic Stress-Induced Depression in Rats. Biol Res Nurs *20*, 40-48.

Sequeira-Cordero, A., Mora-Gallegos, A., Cuenca-Berger, P., and Fornaguera-Trias, J. (2014). Individual differences in the forced swimming test and the effect of environmental enrichment: searching for an interaction. Neuroscience *265*, 95-107.

Shalev, H., Serlin, Y., and Friedman, A. (2009). Breaching the blood-brain barrier as a gate to psychiatric disorder. Cardiovasc Psychiatry Neurol *2009*, 278531.

Sheline, Y.I., Wang, P.W., Gado, M.H., Csernansky, J.G., and Vannier, M.W. (1996). Hippocampal atrophy in recurrent major depression. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America *93*, 3908-3913.

Shibata, R., Sato, K., Pimentel, D.R., Takemura, Y., Kihara, S., Ohashi, K., Funahashi, T., Ouchi, N., and Walsh, K. (2005). Adiponectin protects against myocardial ischemia-reperfusion injury through AMPK- and COX-2-dependent mechanisms. Nature medicine *11*, 1096-1103.

Shilpa, B.M., Bhagya, V., Harish, G., Srinivas Bharath, M.M., and Shankaranarayana Rao, B.S. (2017). Environmental enrichment ameliorates chronic immobilisation stress-induced spatial learning deficits and restores the expression of BDNF, VEGF, GFAP and glucocorticoid receptors. Progress in neuro-psychopharmacology & biological psychiatry *76*, 88-100.

Shin, J.Y., Park, M.J., Lee, S.H., Choi, S.H., Kim, M.H., Choi, N.K., Lee, J., and Park, B.J. (2015). Risk of intracranial haemorrhage in antidepressant users with concurrent use of non-steroidal anti-inflammatory drugs: nationwide propensity score matched study. BMJ *351*, h3517.

Sibille, E., Pavlides, C., Benke, D., and Toth, M. (2000). Genetic inactivation of the Serotonin(1A) receptor in mice results in downregulation of major GABA(A) receptor alpha subunits, reduction of GABA(A) receptor binding, and benzodiazepine-resistant anxiety. The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience 20, 2758-2765.

Sierra, A., Encinas, J.M., Deudero, J.J., Chancey, J.H., Enikolopov, G., Overstreet-Wadiche, L.S., Tsirka, S.E., and Maletic-Savatic, M. (2010). Microglia shape adult hippocampal neurogenesis through apoptosis-coupled phagocytosis. Cell stem cell *7*, 483-495.

Sifonios, L., Trinchero, M., Cereseto, M., Ferrero, A., Cladouchos, M.L., Macedo, G.F., Reines, A., and Wikinski, S. (2009). An enriched environment restores normal behavior while providing cytoskeletal restoration and synaptic changes in the hippocampus of rats exposed to an experimental model of depression. Neuroscience *164*, 929-940. Sillaber, I., Rammes, G., Zimmermann, S., Mahal, B., Zieglgansberger, W., Wurst, W., Holsboer, F., and Spanagel, R. (2002). Enhanced and delayed stress-induced alcohol drinking in mice lacking functional CRH1 receptors. Science *296*, 931-933.

Simonetti, T., Lee, H., Bourke, M., Leamey, C.A., and Sawatari, A. (2009). Enrichment from birth accelerates the functional and cellular development of a motor control area in the mouse. PloS one 4, e6780.

Singh, A.K., Shree, S., Chattopadhyay, S., Kumar, S., Gurjar, A., Kushwaha, S., Kumar, H., Trivedi, A.K., Chattopadhyay, N., Maurya, R., *et al.* (2017). Small molecule adiponectin receptor agonist GTDF protects against skeletal muscle atrophy. Mol Cell Endocrinol *439*, 273-285.

Slater, A.M., and Cao, L. (2015). A Protocol for Housing Mice in an Enriched Environment. J Vis Exp, e52874.

Smith, R. (1991). The Macrophages Theory of Depression. Medical Hypotheses.

Snehalatha, C., Mukesh, B., Simon, M., Viswanathan, V., Haffner, S.M., and Ramachandran, A. (2003). Plasma adiponectin is an independent predictor of type 2 diabetes in Asian indians. Diabetes Care *26*, 3226-3229.

Song, C., and Leonard, B.E. (2005). The olfactory bulbectomised rat as a model of depression. Neuroscience and biobehavioral reviews *29*, 627-647.

Sorrells, A.D., Corcoran-Gomez, K., Eckert, K.A., Fahey, A.G., Hoots, B.L., Charleston, L.B., Charleston, J.S., Roberts, C.R., and Markowitz, H. (2009). Effects of environmental enrichment on the amyotrophic lateral sclerosis mouse model. Lab Anim *43*, 182-190.

Souza, L.C., Jesse, C.R., Del Fabbro, L., de Gomes, M.G., Goes, A.T.R., Filho, C.B., Luchese, C., Pereira, A.A.M., and Boeira, S.P. (2017). Swimming exercise prevents behavioural disturbances induced by an intracerebroventricular injection of amyloid-beta1-42 peptide through modulation of cytokine/NF-kappaB pathway and indoleamine-2,3-dioxygenase in mouse brain. Behavioural brain research *331*, 1-13.

Spires, T.L., Grote, H.E., Varshney, N.K., Cordery, P.M., van Dellen, A., Blakemore, C., and Hannan, A.J. (2004). Environmental enrichment rescues protein deficits in a mouse model of Huntington's disease, indicating a possible disease mechanism. The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience *24*, 2270-2276.

Spranger, J., Verma, S., Gohring, I., Bobbert, T., Seifert, J., Sindler, A.L., Pfeiffer, A., Hileman, S.M., Tschop, M., and Banks, W.A. (2006). Adiponectin does not cross the blood-brain barrier but modifies cytokine expression of brain endothelial cells. Diabetes *55*, 141-147.

Sprengelmeyer, R., Steele, J.D., Mwangi, B., Kumar, P., Christmas, D., Milders, M., and Matthews, K. (2011). The insular cortex and the neuroanatomy of major depression. Journal of affective disorders *133*, 120-127.

Stachowicz, M., Janas-Kozik, M., Olszanecka-Glinianowicz, M., and Chudek, J. (2013). [Role of leptin in eating disorders--current concept]. Psychiatr Pol 47, 897-907.

Stanford, K.I., and Goodyear, L.J. (2016). Exercise regulation of adipose tissue. Adipocyte 5, 153-162.

Steinbusch, H. (1981). Distribution of serotonin-immunoreactivity in the central nervous system of the rat - cell bodies and terminals. Neuroscience.

Steiner, J., Walter, M., Gos, T., Guillemin, G.J., Bernstein, H.G., Sarnyai, Z., Mawrin, C., Brisch, R., Bielau, H., Meyer zu Schwabedissen, L., *et al.* (2011). Severe depression is associated with increased microglial quinolinic acid in subregions of the anterior cingulate gyrus: evidence for an immune-modulated glutamatergic neurotransmission? Journal of neuroinflammation *8*, 94.

Stenzel-Poore, M.P., Duncan, J.E., Rittenberg, M.B., Bakke, A.C., and Heinrichs, S.C. (1996). CRH overproduction in transgenic mice: behavioral and immune system modulation. Annals of the New York Academy of Sciences *780*, 36-48.

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

Stetler, C., and Miller, G.E. (2011). Depression and hypothalamic-pituitary-adrenal activation: a quantitative summary of four decades of research. Psychosomatic medicine 73, 114-126.

Strasser, B., Becker, K., Fuchs, D., and Gostner, J.M. (2017). Kynurenine pathway metabolism and immune activation: Peripheral measurements in psychiatric and co-morbid conditions. Neuropharmacology *112*, 286-296. Strawbridge, R., Arnone, D., Danese, A., Papadopoulos, A., Herane Vives, A., and Cleare, A.J. (2015). Inflammation and clinical response to treatment in depression: A meta-analysis. European neuropsychopharmacology : the journal of the European College of Neuropsychopharmacology *25*, 1532-1543.

Su, S.C., Sun, M.T., Wen, M.J., Lin, C.J., Chen, Y.C., and Hung, Y.J. (2011). Brain-derived neurotrophic factor, adiponectin, and proinflammatory markers in various subtypes of depression in young men. Int J Psychiatry Med *42*, 211-226.

Sun, L., Yang, X., Li, Q., Zeng, P., Liu, Y., Liu, L., Chen, Y., Yu, M., Ma, C., Li, X., *et al.* (2017). Activation of Adiponectin Receptor Regulates Proprotein Convertase Subtilisin/Kexin Type 9 Expression and Inhibits Lesions in ApoE-Deficient Mice. Arterioscler Thromb Vasc Biol *37*, 1290-1300.

Sun, Y., Zang, Z., Zhong, L., Wu, M., Su, Q., Gao, X., Zan, W., Lin, D., Zhao, Y., and Zhang, Z. (2013). Identification of adiponectin receptor agonist utilizing a fluorescence polarization based high throughput assay. PloS one *8*, e63354.

Т

Taira, R., Yamaguchi, S., Shimizu, K., Nakamura, K., Ayabe, T., and Taira, T. (2015). Bacterial cell wall components regulate adipokine secretion from visceral adipocytes. J Clin Biochem Nutr *56*, 149-154.

Takeuchi, T., Adachi, Y., Ohtsuki, Y., and Furihata, M. (2007). Adiponectin receptors, with special focus on the role of the third receptor, T-cadherin, in vascular disease. Med Mol Morphol *40*, 115-120.

Takeuchi, T., Nakao, M., Nomura, K., Inoue, M., Tsurugano, S., Shinozaki, Y., and Yano, E. (2009). Association of the metabolic syndrome with depression and anxiety in Japanese men: a 1-year cohort study. Diabetes Metab Res Rev *25*, 762-767.

Takikawa, O., Yoshida, R., Kido, R., and Hayaishi, O. (1986). Tryptophan degradation in mice initiated by indoleamine 2,3-dioxygenase. The Journal of biological chemistry *261*, 3648-3653.

Tanapat, P., Galea, L.A., and Gould, E. (1998). Stress inhibits the proliferation of granule cell precursors in the developing dentate gyrus. International journal of developmental neuroscience : the official journal of the International Society for Developmental Neuroscience *16*, 235-239.

Tang, C.H., Lu, D.Y., Yang, R.S., Tsai, H.Y., Kao, M.C., Fu, W.M., and Chen, Y.F. (2007). Leptin-induced IL-6 production is mediated by leptin receptor, insulin receptor substrate-1, phosphatidylinositol 3-kinase, Akt, NF-kappaB, and p300 pathway in microglia. Journal of immunology *179*, 1292-1302.

Tang, Y.T., Hu, T., Arterburn, M., Boyle, B., Bright, J.M., Emtage, P.C., and Funk, W.D. (2005). PAQR proteins: a novel membrane receptor family defined by an ancient 7-transmembrane pass motif. J Mol Evol *61*, 372-380.

Tanti, A., Westphal, W.P., Girault, V., Brizard, B., Devers, S., Leguisquet, A.M., Surget, A., and Belzung, C. (2013). Region-dependent and stage-specific effects of stress, environmental enrichment, and antidepressant treatment on hippocampal neurogenesis. Hippocampus *23*, 797-811.

Thundyil, J., Pavlovski, D., Sobey, C.G., and Arumugam, T.V. (2012). Adiponectin receptor signalling in the brain. British journal of pharmacology *165*, 313-327.

Tomizawa, A., Hattori, Y., Kasai, K., and Nakano, Y. (2008). Adiponectin induces NF-kappaB activation that leads to suppression of cytokine-induced NF-kappaB activation in vascular endothelial cells: globular adiponectin vs. high molecular weight adiponectin. Diab Vasc Dis Res *5*, 123-127.

Toni A Azar, J.L.S., and David M Lawson (2012). Effects of Cage Enrichment on Heart Rate, Blood Pressure, and Activity of Female Sprague–Dawley and Spontaneously Hypertensive Rats at Rest and after Acute Challenges. Journal of the American Association for Laboratory Animal Science.

Torroglosa, A., Murillo-Carretero, M., Romero-Grimaldi, C., Matarredona, E.R., Campos-Caro, A., and Estrada, C. (2007). Nitric oxide decreases subventricular zone stem cell proliferation by inhibition of epidermal growth factor receptor and phosphoinositide-3-kinase/Akt pathway. Stem cells 25, 88-97.

Trejo, J.L., Llorens-Martin, M.V., and Torres-Aleman, I. (2008). The effects of exercise on spatial learning and anxiety-like behavior are mediated by an IGF-I-dependent mechanism related to hippocampal neurogenesis. Mol Cell Neurosci 37, 402-411.

Tremblay, M.E., Lecours, C., Samson, L., Sanchez-Zafra, V., and Sierra, A. (2015). From the Cajal alumni Achucarro and Rio-Hortega to the rediscovery of never-resting microglia. Front Neuroanat 9, 45.

Tremblay, M.E., Stevens, B., Sierra, A., Wake, H., Bessis, A., and Nimmerjahn, A. (2011). The role of microglia in the healthy brain. The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience 31, 16064-16069.

Trotti, R., Cestaro, B., Cazzola, R., Ferrari, E., and Rondanelli, M. (2001). Adipose tissue and cytokines. Minerva Gastroenterol Dietol 47, 205-207.

Tsigos C, C.G. (2002). Hypothalamic-pituitary-adrenal axis, neuroendocrine factors and stress. J Psychosom Res.

Tucci, V., Lad, H.V., Parker, A., Polley, S., Brown, S.D., and Nolan, P.M. (2006). Gene-environment interactions differentially affect mouse strain behavioral parameters. Mamm Genome 17, 1113-1120.

Tzeng, W.Y., Wu, H.H., Wang, C.Y., Chen, J.C., Yu, L., and Cherng, C.G. (2016). Sex Differences in Stress and Group Housing Effects on the Number of Newly Proliferated Cells and Neuroblasts in Middle-Aged Dentate Gyrus. Frontiers in behavioral neuroscience 10, 249.

U/V

Urani, A., Chourbaji, S., and Gass, P. (2005). Mutant mouse models of depression: candidate genes and current mouse lines. Neuroscience and biobehavioral reviews 29, 805-828.

Valenzuela, M.J., and Sachdev, P. (2006). Brain reserve and dementia: a systematic review. Psychol Med 36, 441-454.

van Dellen, A., Blakemore, C., Deacon, R., York, D., and Hannan, A.J. (2000). Delaying the onset of Huntington's in mice. Nature 404, 721-722.

van Donkelaar, E.L., Vaessen, K.R., Pawluski, J.L., Sierksma, A.S., Blokland, A., Canete, R., and Steinbusch, H.W. (2014). Long-term corticosterone exposure decreases insulin sensitivity and induces depressive-like behaviour in the C57BL/6NCrl mouse. PloS one 9, e106960.

Van Kampen, J.M., Hagg, T., and Robertson, H.A. (2004). Induction of neurogenesis in the adult rat subventricular zone and neostriatum following dopamine D3 receptor stimulation. The European journal of neuroscience 19, 2377-2387.

Vancampfort, D., Correll, C.U., Wampers, M., Sienaert, P., Mitchell, A.J., De Herdt, A., Probst, M., Scheewe, T.W., and De Hert, M. (2014). Metabolic syndrome and metabolic abnormalities in patients with major depressive disorder: a meta-analysis of prevalences and moderating variables. Psychol Med 44, 2017-2028.

Varney, A., Womersley, K., and Agius, M. (2017). What are the risks associated with the use of NSAIDs as an adjunct to SSRIs for treatment of depression? An evaluation of current evidence. Psychiatr Danub 29, 375-382.

Veen, G., Giltay, E.J., DeRijk, R.H., van Vliet, I.M., van Pelt, J., and Zitman, F.G. (2009). Salivary cortisol, serum lipids, and adiposity in patients with depressive and anxiety disorders. Metabolism: clinical and experimental 58, 821-827.

Veena, J., Srikumar, B.N., Raju, T.R., and Shankaranarayana Rao, B.S. (2009). Exposure to enriched environment restores the survival and differentiation of new born cells in the hippocampus and ameliorates depressive symptoms in chronically stressed rats. Neuroscience letters 455, 178-182.

Vega-Rivera, N.M., Ortiz-Lopez, L., Gomez-Sanchez, A., Oikawa-Sala, J., Estrada-Camarena, E.M., and Ramirez-Rodriguez, G.B. (2016). The neurogenic effects of an enriched environment and its protection against the behavioral consequences of chronic mild stress persistent after enrichment cessation in six-month-old female Balb/C mice. Behavioural brain research 301, 72-83.

Ventorp, F., Bay-Richter, C., Nagendra, A.S., Janelidze, S., Matsson, V.S., Lipton, J., Nordstrom, U., Westrin, A., Brundin, P., and Brundin, L. (2017). Exendin-4 Treatment Improves LPS-Induced Depressive-Like Behavior Without Affecting Pro-Inflammatory Cytokines. J Parkinsons Dis 7, 263-273.

Vienberg, S.G., and Bjornholm, M. (2014). Chronic glucocorticoid treatment increases de novo lipogenesis in visceral adipose tissue. Acta Physiol (Oxf) 211, 257-259.

Villanueva, R. (2013). Neurobiology of major depressive disorder. Neural plasticity 2013, 873278.

Vykoukal, D., and Davies, M.G. (2011). Vascular biology of metabolic syndrome. J Vasc Surg 54, 819-831.

Wagner-Jauregg, J., and Bruetsch, W.L. (1946). The history of the malaria treatment of general paralysis. The American journal of psychiatry *102*, 577-582.

Wan, Z., Mah, D., Simtchouk, S., Klegeris, A., and Little, J.P. (2014). Globular adiponectin induces a proinflammatory response in human astrocytic cells. Biochemical and biophysical research communications 446, 37-42.

Wang, A., Li, T., An, P., Yan, W., Zheng, H., Wang, B., and Mu, Y. (2017a). Exendin-4 Upregulates Adiponectin Level in Adipocytes via Sirt1/Foxo-1 Signaling Pathway. PloS one *12*, e0169469.

Wang, B., Yu, Y., and Han, L. (2012). Adiponectin improves endothelial dysfunction caused by elevated FFAs levels, partially through cAMP-dependent pathway. Diabetes Res Clin Pract *97*, 119-124.

Wang, Y., Liang, B., Lau, W.B., Du, Y., Guo, R., Yan, Z., Gan, L., Yan, W., Zhao, J., Gao, E., *et al.* (2017b). Restoring diabetes-induced autophagic flux arrest in ischemic/reperfused heart by ADIPOR (adiponectin receptor) activation involves both AMPK-dependent and AMPK-independent signaling. Autophagy *13*, 1855-1869.

Wang, Y., Wan, Y., Ye, G., Wang, P., Xue, X., Wu, G., and Ye, B. (2016). Hepatoprotective effects of AdipoRon against d-galactosamine-induced liver injury in mice. Eur J Pharm Sci *93*, 123-131.

Warner-Schmidt, J.L., Vanover, K.E., Chen, E.Y., Marshall, J.J., and Greengard, P. (2011). Antidepressant effects of selective serotonin reuptake inhibitors (SSRIs) are attenuated by antiinflammatory drugs in mice and humans. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America *108*, 9262-9267.

Watanabe, S. (2011). Empathy and reversed empathy of stress in mice. PloS one 6, e23357.

Weber-Hamann, B., Kratzsch, J., Kopf, D., Lederbogen, F., Gilles, M., Heuser, I., and Deuschle, M. (2007). Resistin and adiponectin in major depression: the association with free cortisol and effects of antidepressant treatment. Journal of psychiatric research *41*, 344-350.

Weisberg, S.P., McCann, D., Desai, M., Rosenbaum, M., Leibel, R.L., and Ferrante, A.W., Jr. (2003). Obesity is associated with macrophage accumulation in adipose tissue. The Journal of clinical investigation *112*, 1796-1808. Wilhelm, C.J., Choi, D., Huckans, M., Manthe, L., and Loftis, J.M. (2013). Adipocytokine signaling is altered in Flinders sensitive line rats, and adiponectin correlates in humans with some symptoms of depression. Pharmacology, biochemistry, and behavior *103*, 643-651.

Willner, P. (1995). Dopaminergic mechanisms in depression and mania. . Psychopharmacology: the fourth Generation of Progress.

Willner, P., Scheel-Kruger, J., and Belzung, C. (2013). The neurobiology of depression and antidepressant action. Neuroscience and biobehavioral reviews *37*, 2331-2371.

Winand, J., Furnelle, J., Hebbelinck, M., and Christophe, J. (1974). Control of lipid metabolism in adipose-tissue homogenates of fasted refed rats. Eur J Biochem 43, 299-305.

Woodcock, T., and Morganti-Kossmann, M.C. (2013). The role of markers of inflammation in traumatic brain injury. Front Neurol *4*, 18.

Wooters, T.E., Bardo, M.T., Dwoskin, L.P., Midde, N.M., Gomez, A.M., Mactutus, C.F., Booze, R.M., and Zhu, J. (2011). Effect of environmental enrichment on methylphenidate-induced locomotion and dopamine transporter dynamics. Behavioural brain research *219*, 98-107.

Wu, T., Yang, L., Jiang, J., Ni, Y., Zhu, J., Zheng, X., Wang, Q., Lu, X., and Fu, Z. (2018). Chronic glucocorticoid treatment induced circadian clock disorder leads to lipid metabolism and gut microbiota alterations in rats. Life Sci *192*, 173-182.

Υ

Yamada, N., Katsuura, G., Ochi, Y., Ebihara, K., Kusakabe, T., Hosoda, K., and Nakao, K. (2011). Impaired CNS leptin action is implicated in depression associated with obesity. Endocrinology *152*, 2634-2643.

Yamauchi, T., Kamon, J., Ito, Y., Tsuchida, A., Yokomizo, T., Kita, S., Sugiyama, T., Miyagishi, M., Hara, K., Tsunoda, M., *et al.* (2003). Cloning of adiponectin receptors that mediate antidiabetic metabolic effects. Nature *423*, 762-769.

Yamauchi, T., Kamon, J., Minokoshi, Y., Ito, Y., Waki, H., Uchida, S., Yamashita, S., Noda, M., Kita, S., Ueki, K., *et al.* (2002). Adiponectin stimulates glucose utilization and fatty-acid oxidation by activating AMP-activated protein kinase. Nature medicine *8*, 1288-1295.

Yamauchi, T., Kamon, J., Waki, H., Terauchi, Y., Kubota, N., Hara, K., Mori, Y., Ide, T., Murakami, K., Tsuboyama-Kasaoka, N., *et al.* (2001). The fat-derived hormone adiponectin reverses insulin resistance associated with both lipoatrophy and obesity. Nature medicine *7*, 941-946.

Yapici Eser, H., Bora, H.A., and Kuruoglu, A. (2017). Depression and Parkinson disease: prevalence, temporal relationship. and determinants. Turk J Med Sci 47. 499-503.

Yau, S.Y., Li, A., Hoo, R.L., Ching, Y.P., Christie, B.R., Lee, T.M., Xu, A., and So, K.F. (2014). Physical exercise-induced hippocampal neurogenesis and antidepressant effects are mediated by the adipocyte hormone adiponectin. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America *111*, 15810-15815.

Yildiz, G., Senturk, M.B., Yildiz, P., Cakmak, Y., Budak, M.S., and Cakar, E. (2017). Serum serotonin, leptin, and adiponectin changes in women with postpartum depression: controlled study. Arch Gynecol Obstet *295*, 853-858. You, Z., Luo, C., Zhang, W., Chen, Y., He, J., Zhao, Q., Zuo, R., and Wu, Y. (2011). Pro- and anti-inflammatory cytokines expression in rat's brain and spleen exposed to chronic mild stress: involvement in depression. Behavioural brain research *225*, 135-141.

Young, D., Lawlor, P.A., Leone, P., Dragunow, M., and During, M.J. (1999). Environmental enrichment inhibits spontaneous apoptosis, prevents seizures and is neuroprotective. Nature medicine *5*, 448-453.

Young, E.A., Altemus, M., Lopez, J.F., Kocsis, J.H., Schatzberg, A.F., DeBattista, C., and Zubieta, J.K. (2004). HPA axis activation in major depression and response to fluoxetine: a pilot study. Psychoneuroendocrinology *29*, 1198-1204.

Yu, J., Yu, B., He, J., Zheng, P., Mao, X., Han, G., and Chen, D. (2014). Chronic glucocorticoid exposure-induced epididymal adiposity is associated with mitochondrial dysfunction in white adipose tissue of male C57BL/6J mice. PloS one *9*, e112628.

Yue, L., Zhao, L., Liu, H., Li, X., Wang, B., Guo, H., Gao, L., Feng, D., and Qu, Y. (2016). Adiponectin Protects against Glutamate-Induced Excitotoxicity via Activating SIRT1-Dependent PGC-1alpha Expression in HT22 Hippocampal Neurons. Oxid Med Cell Longev 2016, 2957354.

Ζ

Zarif, H., Nicolas, S., Guyot, M., Hosseiny, S., Lazzari, A., Canali, M.M., Cazareth, J., Brau, F., Golzne, V., Dourneau, E., *et al.* (2017). CD8(+) T cells are essential for the effects of enriched environment on hippocampus-dependent behavior, hippocampal neurogenesis and synaptic plasticity. Brain, behavior, and immunity.

Zhang, D., Wang, X., Wang, B., Garza, J.C., Fang, X., Wang, J., Scherer, P.E., Brenner, R., Zhang, W., and Lu, X.Y. (2016). Adiponectin regulates contextual fear extinction and intrinsic excitability of dentate gyrus granule neurons through AdipoR2 receptors. Molecular psychiatry.

Zhang, L., Zhang, J., Sun, H., Liu, H., Yang, Y., and Yao, Z. (2011). Exposure to enriched environment restores the mRNA expression of mineralocorticoid and glucocorticoid receptors in the hippocampus and ameliorates depressive-like symptoms in chronically stressed rats. Curr Neurovasc Res *8*, 286-293.

Zhang, Y., Zhao, J., Li, R., Lau, W.B., Yuan, Y.X., Liang, B., Li, R., Gao, E.H., Koch, W.J., Ma, X.L., *et al.* (2015). AdipoRon, the first orally active adiponectin receptor activator, attenuates postischemic myocardial apoptosis through both AMPK-mediated and AMPK-independent signalings. American journal of physiology Endocrinology and metabolism *309*, E275-282.

Zunszain, P.A., Anacker, C., Cattaneo, A., Carvalho, L.A., and Pariante, C.M. (2011). Glucocorticoids, cytokines and brain abnormalities in depression. Progress in neuro-psychopharmacology & biological psychiatry *35*, 722-729.