

Université de Montréal

**EFFETS NEUROPHYSIOLOGIQUES DE LA STIMULATION DU
NERF VAGUE : IMPLICATION DANS LE TRAITEMENT DE LA
DÉPRESSION RÉSISTANTE ET OPTIMISATION DES
PARAMÈTRES DE STIMULATION**

par
Stella Manta

Département de physiologie
Faculté de médecine

Thèse présentée à la Faculté des études supérieures et postdoctorales
en vue de l'obtention du grade de PhD
en Sciences neurologiques

Janvier, 2012

© Stella Manta, 2012

Université de Montréal
Faculté des études supérieures et postdoctorales

Cette thèse intitulée:

EFFETS NEUROPHYSIOLOGIQUES DE LA STIMULATION DU NERF
VAGUE : IMPLICATION DANS LE TRAITEMENT DE LA
DÉPRESSION RÉSISTANTE ET OPTIMISATION DES PARAMÈTRES
DE STIMULATION

Présentée par :
Stella Manta

a été évaluée par un jury composé des personnes suivantes :

Dr Pierre-Paul Rompré, président-rapporteur
Dr Pierre Blier, directeur de recherche
Dr Laurent Descarries, co-directeur
Dr Paul Lespérance, membre du jury
Dr Bruno Giros, examinateur externe
Dr Pierre Rainville, représentant du doyen de la FES

RÉSUMÉ

La dépression est une pathologie grave qui, malgré de multiples stratégies thérapeutiques, demeure résistante chez un tiers des patients. Les techniques de stimulation cérébrale sont devenues une alternative intéressante pour les patients résistants à diverses pharmacothérapies. La stimulation du nerf vague (SNV) a ainsi fait preuve de son efficacité en clinique et a récemment été approuvée comme traitement additif pour la dépression résistante. Cependant, les mécanismes d'action de la SNV en rapport avec la dépression n'ont été que peu étudiés.

Cette thèse a donc eu comme premier objectif de caractériser l'impact de la SNV sur les différents systèmes monoaminergiques impliqués dans la pathophysiologie de la dépression, à savoir la sérotonine (5-HT), la noradrénaline (NA) et la dopamine (DA), grâce à l'utilisation de techniques électrophysiologiques et de la microdialyse *in vivo* chez le rat. Des études précliniques avaient déjà révélé qu'une heure de SNV augmente le taux de décharge des neurones NA du locus coeruleus, et que 14 jours de stimulation sont nécessaires pour observer un effet comparable sur les neurones 5-HT. Notre travail a démontré que la SNV modifie aussi le mode de décharge des neurones NA qui présente davantage de bouffées, influençant ainsi la libération terminale de NA, qui est significativement augmentée dans le cortex préfrontal et l'hippocampe après 14 jours. L'augmentation de la neurotransmission NA s'est également manifestée par une élévation de l'activation tonique des récepteurs postsynaptiques α_2 -adrénergiques de l'hippocampe. Après lésion des neurones NA, nous avons montré que l'effet de la SNV sur les neurones 5-HT était indirect, et médié par le système NA, *via* l'activation des récepteurs α_1 -adrénergiques présents sur les neurones du raphé. Aussi, tel que les antidépresseurs classiques, la SNV augmente l'activation tonique des hétérorécepteurs pyramidaux 5-

HT_{1A}, dont on connaît le rôle clé dans la réponse thérapeutique aux antidépresseurs. Par ailleurs, nous avons constaté que malgré une diminution de l'activité électrique des neurones DA de l'aire tegmentale ventrale, la SNV induit une augmentation de la DA extracellulaire dans le cortex préfrontal et particulièrement dans le noyau accumbens, lequel joue un rôle important dans les comportements de récompense et l'hédonie.

Un deuxième objectif a été de caractériser les paramètres optimaux de SNV agissant sur la dépression, en utilisant comme indicateur le taux de décharge des neurones 5-HT. Des modalités de stimulation moins intenses se sont avérées aussi efficaces que les stimulations standards pour augmenter l'activité électrique des neurones 5-HT. Ces nouveaux paramètres de stimulation pourraient s'avérer bénéfiques en clinique, chez des patients ayant déjà répondu à la SNV. Ils pourraient minimiser les effets secondaires reliés aux périodes de stimulation et améliorer ainsi la qualité de vie des patients.

Ainsi, ces travaux de thèse ont caractérisé l'influence de la SNV sur les trois systèmes monoaminergiques, laquelle s'avère en partie distincte de celle des antidépresseurs classiques tout en contribuant à son efficacité en clinique. D'autre part, les modalités de stimulation que nous avons définies seraient intéressantes à tester chez des patients recevant la SNV, car elles devraient contribuer à l'amélioration des bénéfices cliniques de cette thérapie.

Mots-clés : Dépression, Stimulation du nerf vague, Sérotonine, Noradrénaline, Dopamine, Paramètres de stimulation, Électrophysiologie, Microdialyse, Rat.

SUMMARY

Depression is a severe psychiatric disorder, in which a third of patients do not achieve remission, despite the wide variety of therapeutic strategies that are currently available. Brain stimulation has emerged as a promising alternative therapy in cases of treatment resistance. Vagus nerve stimulation (VNS) has shown promise in treating resistant-depressed patients, and it has been approved as an adjunctive treatment for resistant depression. However, the mechanism of action by which VNS exerts its antidepressant effects has remained elusive.

The first goal of this thesis was therefore to characterize the impact of VNS on monoaminergic systems known to be implicated in the pathophysiology of depression such as serotonin (5-HT), norepinephrine (NE) and dopamine (DA), by means of electrophysiologic techniques and microdialysis in the rat brain. Previous research has indicated that one hour of VNS increased the basal firing activity of locus coeruleus NE neurons and, secondarily, that of 5-HT neurons, but only after 14 days of stimulation. Our work demonstrated that VNS also modified the firing pattern of NE neurons towards a bursting mode of discharge. This mode of firing was shown to lead to enhanced NE release in the prefrontal cortex and hippocampus after 14 days. Increased NE neurotransmission was also evidenced by enhanced tonic activation of postsynaptic α_2 -adrenoceptors in the hippocampus. Selective lesioning of NE neurons was then used to demonstrate that the effects of VNS on the 5-HT system were indirect, and mediated by the activation of α_1 -adrenoceptors located on the dorsal raphe 5-HT neurons. Similar to classical antidepressants, VNS also enhanced the tonic activation of pyramidal 5-HT_{1A} heteroreceptors, which are known to play a key role in the antidepressant response. We also found that in spite of a diminished firing activity of ventral tegmental area DA

neurons after VNS, extracellular DA levels were significantly elevated in the prefrontal cortex, and particularly in the nucleus accumbens which plays an important role in reward behavior and hedonia.

A second objective was to characterize the optimal VNS parameters to treat depression using the firing activity of 5-HT neurons as an indicator. It was found that less stimulation was as effective as the standard levels to increase 5-HT neurons firing rate. These novel parameters could be helpful for clinical application in VNS responsive patients, to potentially minimize and/or even prevent stimulation-related side effects, thus improving their quality of life.

In brief, these studies reveal an influence of VNS on all three central monoamine systems, which differs in part from that of classical antidepressants while contributing to the clinical efficacy of this approach. It will also be interesting to determine whether the proposed lower stimulation parameters are as effective in providing antidepressant response in patients receiving VNS, which should contribute to improve the clinical benefits of that therapy.

Keywords : Depression, Vagus nerve stimulation, Serotonin, Norepinephrine, Dopamine, Stimulation parameters, Electrophysiology, Microdialysis, Rat.

TABLE DES MATIÈRES

RÉSUMÉ.....	i
SUMMARY.....	iii
TABLE DES MATIÈRES.....	v
LISTE DES TABLEAUX.....	viii
LISTE DES FIGURES.....	ix
LISTES DES SIGLES ET ABRÉVIATIONS.....	x
REMERCIEMENTS.....	xii
I. INTRODUCTION GÉNÉRALE.....	1
1. Dépression.....	1
1.1. Généralités.....	1
1.2. Étiologie de la dépression.....	2
1.2.1. <i>Dysfonction de l'axe hypothalamo-hypophysaire</i>	3
1.2.2. <i>Hypothèse neurodégénérative</i>	4
1.2.3. <i>Aspects génétiques</i>	5
2. Bases neurobiologiques de la dépression.....	6
2.1. Sérotonine et dépression.....	6
2.1.1. <i>Données de base</i>	6
2.1.2. <i>L'hypothèse sérotoninergique</i>	9
2.1.3. <i>Les récepteurs de la 5-HT</i>	11
2.1.4. <i>Les régions cérébrales d'intérêt</i>	14
2.1.5. <i>Le transporteur membranaire de la 5-HT</i>	16
2.2. Noradrénaline et dépression.....	17
2.2.1. <i>Données de base</i>	17
2.2.2. <i>L'hypothèse monoaminergique</i>	20
2.2.3. <i>Les récepteurs de la NA</i>	20
2.2.4. <i>Le transporteur membranaire de la NA</i>	22
2.3. Dopamine et dépression.....	23
2.3.1. <i>Données de base</i>	23
2.3.2. <i>Implication de la DA dans la dépression</i>	26
2.3.3. <i>Les récepteurs de la DA</i>	26
2.3.4. <i>Le transporteur membranaire de la DA</i>	28
2.4. Interactions entre les trois systèmes monoaminergiques.....	28
2.4.1. <i>Sérotonine-noradrénaline</i>	30
2.4.2. <i>Sérotonine-dopamine</i>	32
2.4.3. <i>Noradrénaline-dopamine</i>	34
3. Stratégies thérapeutiques pour la dépression.....	37
4. La stimulation du nerf vague (SNV).....	41
4.1. Anatomie du nerf vague.....	41
4.2. La stimulation du nerf vague (SNV).....	44
4.2.1. <i>Réalisation de la SNV</i>	44
4.2.2. <i>SNV et épilepsie</i>	45
4.2.3. <i>SNV et dépression</i>	48

4.2.3.1. La rationalité.....	48
4.2.3.2. Études cliniques (Tableau I).....	49
4.2.3.3. Mécanismes d'action.....	54
4.2.4. Paramètres de stimulation de la SNV.....	58
4.2.5. Autres applications cliniques de la SNV.....	59
5. Objectifs.....	60
5.1. Caractérisation des mécanismes d'action de la SNV dans le traitement de la dépression.....	60
5.2. Optimisation des paramètres de stimulation de la SNV.....	60
II. MATÉRIEL ET MÉTHODES.....	61
1. Animaux.....	61
2. Chirurgie.....	61
3. Électrophysiologie.....	62
3.1. Enregistrements des neurones 5-HT du NRD.....	63
3.2. Enregistrements des neurones DA de l'ATV.....	63
3.3. Enregistrements des neurones pyramidaux CA3 de l'hippocampe.....	64
4. Microdialyse <i>in vivo</i>.....	66
4.1. Microdialyse conventionnelle.....	66
4.2. Zero net flux.....	67
5. Lésion noradrénergique.....	68
III. ÉTUDES.....	69
1. Étude I : Enhancement of the function of rat serotonin and norepinephrine neurons by sustained vagus nerve stimulation.....	69
1.1. Abstract.....	71
1.2. Introduction.....	72
1.3. Methods and Materials.....	75
1.4. Results.....	80
1.5. Discussion.....	82
1.6. Acknowledgements.....	87
1.7. Conflict of Interest.....	88
1.8. Figures/Tables and Legends.....	89
1.9. References.....	96
2. Étude II: Electrophysiological and neurochemical effects of long-term vagus nerve stimulation on the rat monoaminergic systems.....	100
2.1. Abstract.....	102
2.2. Introduction.....	103
2.3. Methods and Material.....	105
2.4. Results.....	111
2.5. Discussion.....	113
2.6. Acknowledgements.....	119
2.7. Conflict of Interest.....	120
2.8. Figures and Legends.....	121
2.9. References.....	127
3. Étude III: Optimization of vagus nerve stimulation parameters using the firing activity of serotonin neurons in the rat dorsal raphe.....	133
3.1. Abstract.....	135
3.2. Introduction.....	136

3.3 Methods and Material.....	138
3.4. Results	141
3.5. Discussion.....	142
3.6. Acknowledgements	145
3.7. Conflict of Interest.....	145
3.8. Figures and Legends.....	146
3.9. References	150
4. Étude IV: Novel attempts to optimize vagus nerve stimulation parameters on serotonin neuronal firing activity in the rat brain	153
4.1. Abstract.....	155
4.2. Introduction	156
4.3. Methods and Materials	158
4.4. Results	161
4.5. Discussion.....	163
4.6. Acknowledgements	168
4.7. Conflict of Interest.....	168
4.8. Figures and Legends.....	169
4.9. References	177
IV. DISCUSSION GÉNÉRALE	180
1. SNV et système NA.....	180
2. SNV et système 5-HT.....	182
3. SNV et système DA.....	184
4. Autres impacts de la SNV	186
5. Amélioration des paramètres de la SNV	187
V. CONCLUSION	190
VI. BIBLIOGRAPHIE.....	191

LISTE DES TABLEAUX

Tableau I : Études cliniques de la SNV dans le traitement de la dépression résistante...53

LISTES DES FIGURES

Figure 1 : Le système sérotoninergique.....	8
Figure 2 : Le système noradrénergique.....	19
Figure 3 : Le système dopaminergique.....	26
Figure 4 : Schématisation des interactions entre les trois systèmes monoaminergiques...	30
Figure 5 : Représentation schématique des interactions sérotonine-noradrénaline.....	32
Figure 6 : Représentation schématique des interactions sérotonine-dopamine.....	34
Figure 7 : Représentation schématique des interactions noradrénaline-dopamine.....	37
Figure 8 : Projections schématiques des afférences vagales.....	43
Figure 9 : Dispositif d'implantation de la SNV.....	45

LISTE DES SIGLES ET ABRÉVIATIONS

5-HIAA	Acide 5-hydroxy-indole acétique
5-HT	Sérotonine ; 5-hydroxytryptamine
5-HTP	5-hydroxytryptophane
5-HTT	Transporteur membranaire de la sérotonine
8-OH-DPAT	8-hydroxy-2-(di-n-propylamino) tetraline
ACTH	Hormone adrénocorticotrope
AMPT	Alpha-méthyl-para-tyrosine
ARN	Acide ribonucléique
ATV	Aire tegmentale ventrale
BDNF	<i>Brain-Derived Neurotrophic Factor</i>
CGI-I	<i>Clinical Global Impression-Improvement</i>
CGI-S	<i>Clinical Global Impression-Severity</i>
COMT	Catéchol O-méthyltransférase
CRH	<i>Corticotropin-Releasing Hormone</i> ; corticolibérine
DA	Dopamine
DASB	3-amino-4-(2-diméthylaminométhyl-phenylsulfanyl)-benzonitrile
DAT	Transporteur membranaire de la dopamine
DOPA	Dihydroxyphénylalanine
DSM-IV	<i>Diagnostic and Statistical Manual of Mental Disorders</i>
DSP-4	N-(2-chloroéthyl)-N-éthyl-2-bromo-benzylamine
ECT	Thérapie électroconvulsive
GABA	Acide gamma-aminobutyrique
HDRS	<i>Hamilton Depression Rating Scale</i>
HVA	Acide homovanillique
IMAO	Inhibiteur de la monoamine oxydase
i.p.	Intra-péritonéale
IRMf	Imagerie par résonance magnétique fonctionnelle
ISRN	Inhibiteur sélectif de recapture de la NA
ISRS	Inhibiteur sélectif de recapture de la 5-HT
ISRSN	Inhibiteur mixte de recapture de la NA et de la 5-HT
LC	Locus coeruleus

LCR	Liquide céphalorachidien
MADRS	<i>Montgomery-Åsberg Depression Rating Scale</i>
MAO	Monoamine oxydase
MHPG	3-Méthoxy-4-hydroxyphénylglycol
NA	Noradrénaline
NET	Transporteur membranaire de la noradrénaline
NRD	Noyaux du raphé dorsal
NTS	Noyau du tractus solitaire
PA	Potentiel d'action
POP	<i>Pseudo-one-pulse</i>
SNV	Stimulation du nerf vague
TEMP	Tomographie par émission monophotonique
TEP	Tomographie à émission de positons
TrkB	Récepteurs tyrosine kinase de type B du BDNF
VMAT	Transporteur vésiculaire des monoamines
WAY 100635	N-{2-[4(2-methoxyphenyl)-1-piperazinyl]ethyl}-N-(2-pyridinyl) cyclohexanecarboxamide trihydrochloride
ZNF	<i>Zero net flux</i>

REMERCIEMENTS

Je souhaiterais commencer mes remerciements en rendant hommage au Dr Guy Debonnel, avec qui j'ai débuté ce projet de thèse mais qui nous a tristement quitté le 4 Novembre 2006. Ce projet lui tenait à cœur et je suis bien heureuse de le voir finalisé en ce jour.

C'est alors que je tiens à exprimer ma plus sincère gratitude au Dr Pierre Blier qui m'a tout de suite prise sous son aile et m'a permis de mener à bien et à terme ce projet de thèse. Ce fut un réel plaisir de pouvoir travailler avec un mentor exceptionnel et toujours prêt à partager son savoir scientifique, qui n'est d'ailleurs pas des moindres!

Je tiens également à remercier les Dr Mostafa ElMansari et Franck Chenu pour leur disponibilité et leur soutien technique, scientifique et amical tout au long de mon parcours.

Merci également au Dr Laurent Descarries, grâce à qui j'ai pu étudier à l'Université de Montréal et poursuivre ainsi mon cursus scolaire, en français...

Je souhaite également remercier particulièrement Fatiha, Lise, Matthieu, Morgane et Suzanne pour leur amitié, leur accueil et leur support à chaque instant.

Et puisqu'on dit souvent le meilleur pour la fin, je terminerai en remerciant chaleureusement tous les membres de ma famille qui, par leur amour et malgré la distance qui nous séparait, ont toujours été présents, et m'ont toujours soutenu, rassuré, réconforté tout au long de ce périple. Merci à tous.

I. INTRODUCTION GÉNÉRALE

1. Dépression

1.1. Généralités

La dépression est une maladie mentale grave, qui reste encore à ce jour un problème majeur de santé publique. En effet, cette pathologie ne touche pas moins de 121 millions de personnes à travers le monde et pourrait devenir, d'ici 2030, la première cause d'invalidité mondiale, après les maladies cardiaques ischémiques, selon l'Organisation Mondiale de la Santé (World Health Organization, 2008).

Cette maladie se caractérise principalement par une humeur dépressive et/ou une diminution de l'intérêt ou du plaisir pour la plupart des activités (anhédonie), l'un de ces deux symptômes majeurs devant être présent pour que le diagnostic de la maladie soit établi. Aussi, sept autres signes et symptômes référencés par le DSM-IV (*Diagnostic and Statistical Manual of Mental Disorders*) pour cette pathologie incluent la perte d'appétit et de poids (d'au moins 5 % par mois), des troubles du sommeil (insomnie ou hypersomnie), de l'agitation ou du retard psychomoteur, de la fatigue et une perte d'énergie, des sentiments de culpabilité ou de dévalorisation, une diminution de l'aptitude à se concentrer et finalement des pensées de mort ou de suicide. Également, afin que le diagnostic de dépression soit posé, l'individu doit avoir présenté au moins cinq des précédents symptômes sur une durée d'au moins deux semaines. Ces symptômes, qui peuvent devenir chroniques ou récurrents, empêchent les malades d'accomplir leurs tâches quotidiennes et d'assumer leurs responsabilités familiales et/ou professionnelles. De plus, le risque majeur lié à cette pathologie, qui affecte également toutes les générations, est le suicide, qui toucherait environ 15 % des sujets atteints (Nemeroff *et al.*, 2001).

De nombreuses recherches ont donc été entreprises pour combattre la dépression, qui, en plus de la catastrophe qu'elle représente pour un individu, s'avère également un fardeau socio-économique majeur (Murray & Lopez, 1996).

Cependant, malgré les nombreuses possibilités thérapeutiques mises en place depuis de nombreuses années, 30 % des patients souffrant de dépression majeure restent encore réfractaires à tout traitement (Dunner *et al.*, 2006; Rush *et al.*, 2006). On parle alors de dépression résistante. De plus, la dépression résistante est associée à un risque plus élevé de suicide, une faible réponse aux traitements, un fort taux de rechutes, outre des dépenses de santé considérables (Dunner *et al.*, 2006). Il n'existe pas encore de définition standardisée de la dépression résistante. En 1997, cependant, Thase et Rush ont proposé de distinguer différents stades de résistance, en fonction des traitements expérimentés, incluant les monothérapies, les polythérapies, la psychothérapie et les électrochocs (Thase & Rush, 1997). Globalement, plus le nombre de traitements employés est élevé, plus le degré de résistance est grand, et plus la probabilité de répondre à un autre antidépresseur devient faible.

Compte-tenu de l'efficacité réduite des traitements courants sur la dépression résistante, la recherche de nouvelles stratégies thérapeutiques, aussi bien pharmacologiques que non-pharmacologiques, reste donc un enjeu d'actualité.

1.2. Étiologie de la dépression

La dépression est une pathologie très hétérogène dont l'étiologie, qui n'a toujours pas été clairement définie, se base sur diverses hypothèses, et notamment l'hypothèse d'un dysfonctionnement monoaminergique, qui sera traitée en détails plus loin (paragraphe 2). Mais voyons d'abord brièvement les autres hypothèses qui ont été proposées afin de comprendre les mécanismes biologiques de la dépression majeure.

1.2.1. Dysfonction de l'axe hypothalamo-hypophysaire

Cette hypothèse neuroendocrinienne de la dépression postule qu'un dysfonctionnement de la réponse au cortisol face au stress pourrait sous-tendre la dépression.

En effet, en réponse au stress perçu par le cortex et l'amygdale, l'hypothalamus, recevant le signal de ces structures, libère la corticolibérine (également connue sous le nom de CRH pour *Corticotropin-Releasing Hormone*) qui va pouvoir agir sur ses récepteurs dans l'hypophyse antérieure. Suite à ce stimulus, l'hypophyse sécrète à son tour l'hormone adrénocorticotrope (ACTH) dans le plasma, laquelle va aller activer des récepteurs cibles présents dans les glandes corticosurrénales, induisant ainsi la libération de glucocorticoïdes (cortisol) dans le sang. En retour, le cortisol agit sur les récepteurs des glucocorticoïdes de l'hypothalamus afin de freiner par rétrocontrôle la production de CRH et d'ACTH et de maintenir l'homéostasie (Belmaker & Agam, 2008).

Aussi, de façon intéressante, une méta-analyse a rapporté des taux élevés de cortisol dans le plasma de patients souffrant de dépression, lors de la phase de récupération suivant un stress (Burke *et al.*, 2005). En revanche, l'hypercortisolémie observée chez les sujets dépressifs est renversée lors de l'apparition des effets thérapeutiques d'antidépresseurs (Holsboer, 2000). Par ailleurs, des niveaux plus importants de CRH ont été détectés dans le liquide céphalorachidien de patients dépressifs (Nemeroff *et al.*, 1984; Arborelius *et al.*, 1999), pouvant révéler une altération du rétrocontrôle négatif exercé sur la libération de cette hormone par le cortisol. Pour étayer cette hypothèse, des études ont utilisé le test à la dexaméthasone qui permet de mettre en évidence l'hypersecretion de cortisol. En effet, l'administration de dexaméthasone, cortisone synthétique, est censée freiner la CRH, et donc indirectement l'ACTH pour finalement diminuer la production de cortisol. Or, chez presque la moitié des patients atteints de dépression sévère,

l'administration de ce glucocorticoïde synthétique n'entraîne pas de chute de la concentration du cortisol plasmatique, suggérant un dysfonctionnement du système de rétrocontrôle endocrinien (Plotsky *et al.*, 1998; Carroll *et al.*, 2007; Belmaker & Agam, 2008).

Des recherches ont donc porté sur l'utilisation d'antagonistes des récepteurs de la CRH comme traitement de la dépression. Des données précliniques ont pu démontrer une activité de type antidépressive d'un de ces antagonistes dans des modèles animaux (Alonso *et al.*, 2004; Louis *et al.*, 2006; Johnson *et al.*, 2007). En clinique, une étude réalisée sur vingt patients souffrant d'épisodes dépressifs majeurs a montré que l'antagoniste des récepteurs CRH₁, le R121919, avait le potentiel d'améliorer l'humeur de ces sujets (Zobel *et al.*, 2000). Une revue de la littérature sur les résultats cliniques et précliniques obtenus avec différents antagonistes des récepteurs CRH₁ conclut à un avenir prometteur de ces différents composés pour le traitement de la dépression (Holsboer & Ising, 2008).

1.2.2. Hypothèse neurodégénérative

Une autre hypothèse explicative de la dépression repose sur une implication des facteurs neurotrophiques. En effet, différentes études d'imagerie cérébrale par résonance magnétique nucléaire ont mis en évidence une diminution du volume de l'hippocampe dans la dépression (Bremner *et al.*, 2000; Videbech & Ravnkilde, 2004). Or, l'hippocampe est l'une des deux régions du cerveau où une neurogénèse est démontrée à l'âge adulte (Leuner & Gould, 2010). De plus, une récupération de cette perte de volume de l'hippocampe a été associée à l'application d'un traitement antidépresseur (Sheline *et al.*, 2003), suggérant un effet neuroprotecteur des antidépresseurs. Des études ont donc été consacrées à l'un des facteurs neurotrophiques dérivés du cerveau, le BDNF (*Brain-Derived Neurotrophic Factor*). Cette protéine joue en effet un rôle critique dans la

croissance axonale, la survie neuronale, la plasticité synaptique et sa production pourrait être affectée par le stress et le cortisol (Belmaker & Agam, 2008). Le BDNF serait ainsi impliqué dans de nombreuses conditions pathologiques, y compris la dépression (Angelucci *et al.*, 2005). Ainsi, un traitement chronique aux antidépresseurs comme la désipramine, l'imipramine, la fluoxétine ou la sertraline augmente les concentrations de BDNF et de l'ARN messager codant pour son récepteur, TrkB, dans l'hippocampe (Nibuya *et al.*, 1995; Nibuya *et al.*, 1996).

Compte-tenu de l'importance de la neurogénèse hippocampique dans la réponse aux antidépresseurs (Santarelli *et al.*, 2003; Perera *et al.*, 2007), l'intérêt porté aux molécules agissant sur la plasticité neuronale et/ou la neurogénèse n'a cessé de croître, celles-ci pouvant être potentiellement ciblées dans le traitement de la dépression.

1.2.3. Aspects génétiques

Comme pour de nombreuses pathologies, une question récurrente est de savoir s'il existe un facteur génétique pouvant prédisposer un individu à la dépression.

Une méta-analyse comparant la concordance des taux de dépression entre jumeaux homozygotes et hétérozygotes suggère une héritabilité de la maladie d'environ 37 %, très inférieure à celle des troubles bipolaires et de la schizophrénie (Sullivan *et al.*, 2000). Certains aspects de la personnalité ont également une composante héréditaire (Bouchard, 1994) et les facteurs environnementaux jouent certainement un rôle. Il apparaît clair que la dépression n'est pas causée par un gène unique mais certaines variantes du polymorphisme génétique, telles que le polymorphisme du transporteur membranaire et celui des autorécepteurs de la sérotonine, pourraient prédisposer à la dépression et/ou à une réponse inadaptée aux antidépresseurs (Lesch *et al.*, 1996; Lemonde *et al.*, 2003; voir aussi le paragraphe 2.1).

2. Bases neurobiologiques de la dépression

Bien que les mécanismes biologiques qui sous-tendent la dépression majeure ne soient pas encore complètement élucidés, il est bien établi que différents neurotransmetteurs, comme la sérotonine ou 5-hydroxytryptamine (5-HT), la noradrénaline (NA) et la dopamine (DA) sont impliqués dans cette pathophysiologie (Dailly *et al.*, 2004; Millan, 2004; Dunlop & Nemeroff, 2007).

2.1. Sérotonine et dépression

En tant que neurotransmetteur, la 5-HT contribue à la régulation de nombreuses fonctions ou états physiologiques de l'organisme, tels que l'humeur, l'appétit, la température corporelle, les comportements sexuels, la mémoire, la vigilance, le sommeil et la cognition.

2.1.1. Données de base

La plupart des corps cellulaires des neurones 5-HT se situent dans le tronc cérébral, majoritairement dans les noyaux raphé dorsal (NRD) et raphé médian (Dahlström & Fuxe, 1964; Descarries *et al.*, 1982; Baker *et al.*, 1990). Les projections de ces neurones innervent la plupart des régions du système nerveux central (Steinbusch, 1981; figure 1A).

La 5-HT est synthétisée à partir du tryptophane, acide aminé essentiel apporté par l'alimentation. Après son absorption par les neurones *via* des transporteurs présents sur la membrane plasmique, le tryptophane est hydroxylé par une réaction catalysée par la tryptophane hydroxylase, l'enzyme limitante de la synthèse de la 5-HT, sélectivement localisée dans les neurones à 5-HT. Le produit dérivé de cette première réaction, le 5-hydroxytryptophane (5-HTP), perd à son tour un groupement carboxyle, sous l'action de la

5-HTP décarboxylase, pour devenir la 5-HT (figure 1B). Comme pour les autres monoamines, il est généralement admis que cette synthèse a principalement lieu au site même de la libération du transmetteur, soit les terminaisons ou varicosités axonales. Une fois synthétisée, la majeure partie de la 5-HT est en effet stockée dans les vésicules synaptiques, par l'intermédiaire du transporteur vésiculaire des monoamines nommé VMAT (pour *vesicular monoamine transporter*). En réponse à une dépolarisation de la cellule et l'entrée de calcium intracellulaire, ces vésicules fusionnent avec la membrane plasmique et libèrent leur contenu dans la fente synaptique : c'est l'exocytose. Une fois libérée, la 5-HT peut interagir avec ses récepteurs respectifs dont sept grandes familles comprenant au moins 14 sous-types ont déjà été répertoriées (Hoyer *et al.*, 2002). Ces récepteurs, à l'exception du récepteur 5-HT₃ qui est un canal ionique activé par un ligand, sont des récepteurs métabotropiques, couplés à des protéines G de différents types selon la fonction du récepteur. Un transporteur spécifique, présent sur la membrane plasmique des neurones 5-HT, entre ensuite en jeu, afin de recapter la 5-HT extracellulaire (figure 1B). La voie de dégradation de la 5-HT, quant à elle, met en jeu une enzyme mitochondriale, la monoamine oxydase (MAO), qui entraîne la production d'un produit intermédiaire, le 5-hydroxy-indole acétaldéhyde, rapidement converti en acide 5-hydroxy-indole acétique (5-HIAA) par l'enzyme aldéhyde déshydrogénase.

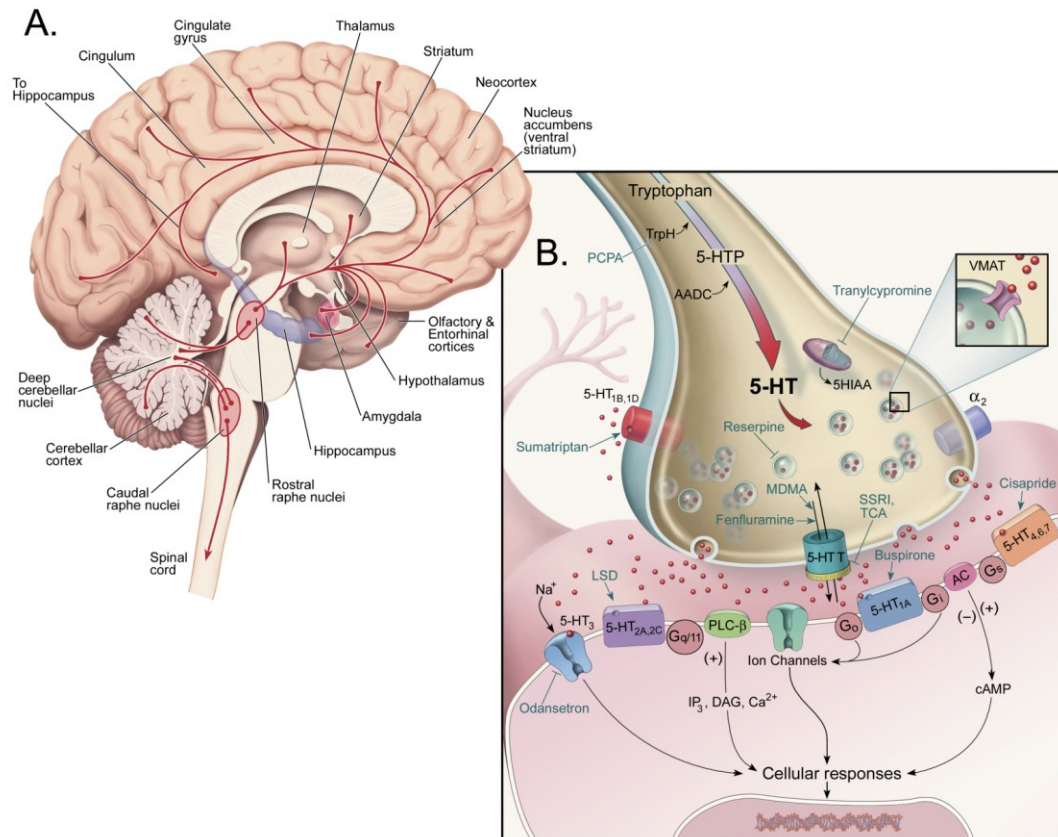


Figure 1. Le système sérotoninergique

(A) Représentation schématique du cerveau humain et des projections des neurones 5-HT (en rouge) issues des noyaux du raphé et qui innervent la plupart des régions du système nerveux central.

(B) Diagramme d'une terminaison axonale sérotoninergique, incluant les étapes de synthèse de la 5-HT, les différents récepteurs 5-HT, ainsi que des exemples de leurs ligands spécifiques (agonistes ou antagonistes). Les mécanismes de transduction du signal et le transporteur membranaire de la 5-HT (5-HTT) sont également représentés.

(Images tirées du *Textbook of Psychopharmacology*, Chapter 1, 4th edition, 2009, reproduites avec la permission du Dr Steven Szabo)

2.1.2. L'hypothèse sérotoninergique

En plus du rôle joué par la 5-HT dans diverses fonctions physiologiques, son implication dans la pathophysiologie de la dépression est reconnue depuis plus de quarante ans (Coppen, 1967; Lapin & Oxenkrug, 1969). Cette notion est issue de la théorie monoaminergique de la dépression, initialement formulée pour expliquer deux types d'observations cliniques. Premièrement, le fait que les inhibiteurs de la MAO (IMAO), qui augmentent les niveaux de monoamines dans le cerveau en bloquant leur catabolisme, ont une activité antidépressive. Deuxièmement, le fait que la réserpine (d'abord utilisée comme agent hypertenseur), qui inhibe l'accumulation de la 5-HT et de la NA dans les vésicules synaptiques et entraîne ainsi une déplétion de ces neurotransmetteurs dans le cerveau, induit au contraire des symptômes dépressifs (Coppen, 1967). Cette théorie suggérait donc que l'état dépressif puisse résulter d'une déficience fonctionnelle de la neurotransmission monoaminergique (5-HT et NA), d'autant plus que de nombreuses substances dont l'action vise à augmenter la neurotransmission de la 5-HT et/ou de la NA, comme les antidépresseurs tricycliques (qui bloquent la recapture à la fois de la 5-HT et de la NA), les IMAO et les inhibiteurs sélectifs de la recapture de 5-HT (ISRS), s'avéraient tous dotés d'une certaine efficacité pour le traitement pharmacologique de la dépression.

S'agissant de la 5-HT et de son implication dans la pathophysiologie de la maladie, des études biochimiques post-mortem ont révélé une diminution de la 5-HT dans le cerveau de patients déprimés (Birkmayer & Riederer, 1975). D'autres études ont également montré une baisse du 5-HIAA, le métabolite majeur de la 5-HT, dans le liquide céphalorachidien de sujets dépressifs (Schildkraut, 1974; Gibbons & Davis, 1986). Par contre, de nombreuses divergences ont été rapportées sur ce point, du fait que ces diminutions du 5-HIAA sont apparues associées à l'impulsivité des sujets, les rendant plus susceptibles de commettre des tentatives de suicide de nature violente (Schildkraut, 1974;

Asberg *et al.*, 1976; Cremniter *et al.*, 1999). Plus en amont de la chaîne métabolique de la 5-HT, d'autres études ont démontré qu'une déplétion alimentaire ponctuelle en tryptophane, induisant une diminution transitoire de la synthèse de 5-HT, entraîne rapidement une humeur de type dépressif chez des sujets sains (Young *et al.*, 1985; Nishizawa *et al.*, 1997). Ce même régime est également capable de provoquer des symptômes dépressifs transitoires chez des patients sous antidépresseurs ayant déjà atteint le stade de rémission (Delgado *et al.*, 1990; Delgado *et al.*, 1999; Van der Does, 2001; Booij *et al.*, 2002). À l'inverse, l'administration de précurseurs de la 5-HT a été proposée comme traitement antidépresseur (van Praag, 1982). L'ensemble de ces données, ajouté au fait qu'une augmentation de la neurotransmission 5-HT puisse être à l'origine de l'action thérapeutique des antidépresseurs (Blier & de Montigny, 1994; Owens, 1996), laisse peu de doutes quant à l'importance du rôle joué par la 5-HT dans la physiopathologie de la dépression et son traitement.

L'intérêt porté à la 5-HT dans la dépression ne s'arrête pas au neurotransmetteur lui-même, mais inclut également les autres composantes du système 5-HT comme ses différents récepteurs, ses transporteurs et ses mécanismes de régulation. Une meilleure connaissance de chacun de ces éléments s'avère essentielle pour une meilleure compréhension de la pathophysiologie de la dépression, mais aussi du mode d'action des antidépresseurs, en vue d'améliorer l'efficacité thérapeutique des différentes substances pouvant combattre cette pathologie. Chacun des éléments nerveux, agents pharmacologiques ou procédé clinique susceptible d'exercer une modulation de la neurotransmission sérotoninergique, est ainsi devenu une cible potentielle pour le traitement de la dépression.

2.1.3. Les récepteurs de la 5-HT

Plusieurs éléments cellulaires sont maintenant reconnus comme autant de mécanismes d'action pouvant exercer une fonction autorégulatrice du système sérotoninergique. Parmi les principaux on retiendra ici l'existence des autorécepteurs somatodendritiques et des hétérorécepteurs 5-HT_{1A}, celle des autorécepteurs terminaux 5-HT_{1B/D}, mais aussi celle du transporteur membranaire, 5-HTT ou SERT, qui assure la recapture de 5-HT par les neurones utilisant ce transmetteur (Barnes & Sharp, 1999; Pineyro & Blier, 1999).

Les autorécepteurs somatodendritiques 5-HT_{1A} jouent un rôle essentiel en tant que régulateur du taux de décharge des neurones 5-HT. Une augmentation de la concentration de 5-HT sur le corps cellulaire des neurones du NRD entraîne une activation de ces autorécepteurs, qui exercent un rétrocontrôle négatif sur l'activité des neurones 5-HT (Wang & Aghajanian, 1978; Hery *et al.*, 1982; Blier *et al.*, 1998). C'est ainsi que l'administration aiguë d'antidépresseurs tels que les IMAO ou les ISRS, qui induit une augmentation de la concentration extracellulaire de 5-HT, active ces autorécepteurs et diminue le taux de décharge des neurones 5-HT. Cependant, après un traitement à long terme avec ces antidépresseurs, les autorécepteurs sont désensibilisés, et le taux de décharge des neurones 5-HT revient à son niveau de base (Blier & De Montigny, 1983; Blier & de Montigny, 1985; Chaput *et al.*, 1986b) sans qu'un rétrocontrôle négatif ne vienne désormais freiner leur activité lors de la libération de 5-HT. Ainsi, même si ces traitements à long terme n'augmentent pas le taux de décharge des neurones 5-HT au-delà de leur niveau de base, la neurotransmission 5-HT peut s'en trouver augmentée dans les aires terminales (Bel & Artigas, 1993; Rutter *et al.*, 1994; Kreiss & Lucki, 1995; Haddjeri *et al.*, 1998b).

Ces différentes étapes pourraient expliquer le délai de deux à trois semaines requis pour observer une amélioration clinique des symptômes chez les patients dépressifs. Cependant, les mécanismes par lesquels les autorécepteurs 5-HT_{1A} se désensibilisent restent mal connus. Une internalisation de ces autorécepteurs a été observée dans le NRD suite à l'administration aiguë d'un agoniste des récepteurs 5-HT_{1A} ou de l'ISRS fluoxétine, chez le rat (Riad *et al.*, 2001; Riad *et al.*, 2004). Étonnamment, à la suite de l'administration chronique de fluoxétine, la densité de ces autorécepteurs demeure inchangée sur la membrane des neurones 5-HT du NRD (Riad *et al.*, 2008) et ce, malgré les données probantes à la fois biochimiques et électrophysiologiques démontrant leur désensibilisation (Kreiss & Lucki, 1995; Le Poul *et al.*, 1995; Invernizzi *et al.*, 1996). Une hypothèse pouvant expliquer ces phénomènes, serait le remplacement de l'autorécepteur 5-HT_{1A} par des récepteurs non couplés à leur protéine G et donc non-fonctionnels consécutivement à son internalisation et son recyclage répété vers la membrane plasmique (Riad *et al.*, 2008).

Il est important de mentionner aussi que ces autorécepteurs sont impliqués non seulement dans les mécanismes d'actions des antidépresseurs, mais également dans la pathophysiologie de la dépression elle-même. Des études post-mortem ont en effet montré une diminution du nombre des autorécepteurs 5-HT_{1A} dans le NRD de patients souffrant de dépression récurrente et/ou victimes de suicide, suggérant une adaptation homéostatique visant à compenser un déficit en 5-HT, mais qui resterait cependant insuffisante (Drevets *et al.*, 1999; Arango *et al.*, 2001). D'autres études de radioliation, à l'inverse, ont montré une augmentation du nombre d'autorécepteurs 5-HT_{1A} dans cette même structure chez des victimes de suicide qui souffraient de dépression (Stockmeier *et al.*, 1998; Boldrini *et al.*, 2008), ce qui aurait pu avoir comme conséquence de réduire l'activité des neurones 5-HT. En appui avec cette dernière hypothèse, des polymorphismes du gène codant pour les

récepteurs 5-HT_{1A} ont été identifiés, et il semblerait que les patients déprimés ou victimes de suicide soient davantage homozygotes pour l'allèle G(1019) du récepteur 5-HT_{1A} (Lemondé *et al.*, 2003), alors que l'hétérozygocité C(1019)G ou l'homozygocité C(1019) prévalent chez une population saine (Wu & Comings, 1999). Ce qui rend cette constatation intéressante, c'est que l'allèle C(1019) serait impliqué dans la répression de l'expression de l'autorécepteur 5-HT_{1A}, alors que la présence de l'allèle G(1019) entraînerait une dérégulation de cette expression, conduisant alors à une diminution de la neurotransmission 5-HT qui prédisposerait les porteurs de cet allèle à la dépression et au suicide (Lemondé *et al.*, 2003).

En raison de l'importance des autorécepteurs 5-HT_{1A} en tant que régulateurs de l'activité des neurones 5-HT, on comprend que les recherches visant à mieux comprendre leur rôle pathophysiologique, leur réponse aux traitements antidépresseurs, ainsi que les mécanismes de leur désensibilisation, impliqués dans le retardement de l'effet thérapeutique, soient toujours d'actualité.

Les récepteurs 5-HT_{1B/1D}, situés sur les terminaisons axonales 5-HT, sont un autre sous-type de récepteurs jouant un rôle crucial dans la régulation de la neurotransmission 5-HT. Le rôle de ces autorécepteurs est de contrôler la libération de 5-HT induite par le potentiel d'action *via* un rétrocontrôle négatif sur cette libération lors de leur activation (Chaput *et al.*, 1986a; Blier *et al.*, 1989; Adell *et al.*, 2001). Comme dans le cas des autorécepteurs 5-HT_{1A}, un traitement à long terme aux ISRS entraîne une désensibilisation des autorécepteurs 5-HT_{1B/1D} (Chaput *et al.*, 1986a; Blier *et al.*, 1988; Blier, 1991; de Montigny & Blier, 1991), ce qui augmente la disponibilité de la 5-HT au site de libération et contribue donc à une augmentation de la neurotransmission 5-HT dans les territoires d'innervation. En plus d'être présent sur les terminaisons axonales des neurones 5-HT, des

études sur la distribution des ARN messagers codant pour ce récepteur ont démontré qu'il se retrouve également dans les neurones non 5-HT de diverses régions du cerveau où il agit en tant qu'hétérorécepteur, pour contrôler la libération des neurotransmetteurs contenus dans ces neurones, comme, par exemple, la DA, le GABA, le glutamate et l'acétylcholine (Ruf & Bhagwagar, 2009). Différentes études ont également révélé un dysfonctionnement des récepteurs 5-HT_{1B} dans la pathophysiologie de la dépression, laissant supposer qu'il pourrait être avantageux de cibler de façon plus spécifique ce récepteur dans le traitement de la dépression (Chenu *et al.*, 2005; Ruf & Bhagwagar, 2009).

D'autres récepteurs 5-HT, qui n'entrent pas en jeu dans l'autorégulation du système 5-HT, se sont avérés être impliqués dans la pathophysiologie de la dépression et sont devenus la cible de nouvelles stratégies thérapeutiques visant à améliorer l'efficacité des antidépresseurs actuels. Brièvement, il s'agit de la famille des 5-HT₂, notamment du fait que ces récepteurs sont mis en jeu dans les interactions existant entre les différents systèmes monoaminergiques, tel que discuté plus loin (au paragraphe 2.4.). Mentionnons également la famille des récepteurs 5-HT₄ (Lucas *et al.*, 2007) et 5-HT₇ (Stahl, 2010; Mnie-Filali *et al.*, 2011).

2.1.4. Les régions cérébrales d'intérêt

L'hippocampe est une structure cérébrale qui apparaît essentielle dans l'action thérapeutique de nombreuses classes d'antidépresseurs (Santarelli *et al.*, 2003). Plus spécifiquement, le degré d'activation tonique des hétérorécepteurs 5-HT_{1A} de cette région est augmenté après un traitement à long terme avec une variété de classes d'antidépresseurs, incluant les tricycliques, les IMAO, les ISRS, les antagonistes des récepteurs α_2 -adrénergiques, les agonistes des récepteurs 5-HT_{1A}, ou encore les

électrochocs (Haddjeri *et al.*, 1998b; El Mansari *et al.*, 2005). Cette augmentation du degré d'activation des hétérorécepteurs 5-HT_{1A} hippocampiques traduit une augmentation de la neurotransmission 5-HT et semble jouer un rôle clé dans la réponse aux traitements antidépresseurs (Blier & de Montigny, 1994). Le cortex préfrontal médian est une autre région où les récepteurs 5-HT_{1A} ont été impliqués dans la pathophysiologie de la dépression et la réponse aux antidépresseurs. Ils feraient partie d'une longue boucle de rétroaction inhibitrice sur l'activité des neurones 5-HT du NRD (Casanovas *et al.*, 1999; Hajos *et al.*, 1999). Des études autoradiographiques post-mortem ont montré une augmentation de la liaison de l'agoniste [³H]8-OH-DPAT aux hétérorécepteurs 5-HT_{1A} dans le cortex préfrontal ventrolatéral de victimes de suicide comparativement à des sujets contrôles (Arango *et al.*, 1995). Par contre, des études d'imagerie de tomographie à émission de positons (TEP) ont conclu à une diminution du potentiel de liaison de l'antagoniste des récepteurs 5-HT_{1A} [¹¹C]WAY100635 dans le cortex temporal, frontal et limbique de sujets atteints de dépression, qu'ils soient traités ou non avec des antidépresseurs, suggérant une diminution de la densité des hétérorécepteurs 5-HT_{1A} (Sargent *et al.*, 2000; Drevets *et al.*, 2007). D'autres études, utilisant le même ligand, ont cependant montré une augmentation généralisée du potentiel de liaison aux récepteurs 5-HT_{1A} dans toutes les régions du cerveau étudiées, y compris le NRD (Parsey *et al.*, 2010). Il existe donc de nombreuses divergences dans la littérature concernant une diminution ou une augmentation de la densité des récepteurs 5-HT_{1A} dans les différentes structures cérébrales qui l'expriment chez les patients atteints de dépression. Quoiqu'il en soit, il est clair que ces récepteurs 5-HT_{1A} jouent un rôle dans cette pathologie à un moment donné, mais il reste à savoir si les différences observées au niveau de la densité de ces récepteurs peuvent rendre initialement un individu plus vulnérable à développer une dépression, ou si

elles sont plutôt le résultat d'adaptations physiologiques en réponse à une modification de la transmission 5-HT.

2.1.5. Le transporteur membranaire de la 5-HT

Un autre mécanisme de régulation important du système 5-HT est le système de recapture du neurotransmetteur par un transporteur actif situé sur la membrane plasmique des neurones 5-HT. Ce transporteur (5-HTT ou SERT) représente une cible de choix pour le traitement pharmacologique de la dépression depuis l'avènement des ISRS, qui visent à bloquer la recapture de 5-HT de façon à augmenter sa neurotransmission. On a cherché à mesurer l'abondance de ces transporteurs en TEP, à l'aide d'un ligand sélectif marqué ($[^{11}\text{C}]$ -DASB), chez des patients souffrant de dépression comparativement à des sujets sains. Il a alors été rapporté que le potentiel de liaison au 5-HTT était plus élevé chez les individus présentant des troubles dépressifs majeurs avec des symptômes aggravés de pessimisme (Meyer *et al.*, 2004; Cannon *et al.*, 2007; Meyer, 2007). Cette plus forte densité de transporteurs contribuerait à une recapture excessive de la 5-HT, et possiblement une diminution de sa transmission. Le transporteur 5-HTT et son implication dans la dépression a également fait l'objet d'études de polymorphisme génétique. En effet, le gène codant pour le 5-HTT présente un polymorphisme caractérisé par l'insertion ou la délétion de paires de bases dans sa région promotrice, donnant lieu à l'existence d'un allèle court (s) et d'un allèle long (l). Or, l'allèle "s" serait beaucoup moins actif sur le plan transcriptionnel que l'allèle de type "l", ce qui conduirait à une plus faible efficacité des transporteurs 5-HTT (Collier *et al.*, 1996; Heils *et al.*, 1996; Lesch *et al.*, 1996). De plus, il semblerait que les individus porteurs d'une ou deux copies de l'allèle court "s" présenteraient un taux de suicide plus élevé ainsi qu'un risque accru de développer une dépression en réponse aux événements stressants de la vie (Caspi *et al.*, 2003; Karg *et al.*,

2011). Une méta-analyse récente a également rapporté que le génotype de type s/s était associé à une augmentation de 41 % des risques de développer une dépression majeure dans une population de type caucasien (Kiyohara & Yoshimasu, 2010). Ces données sont d'une importance considérable sur le plan thérapeutique, puisque des stratégies de traitements différentes pourraient être envisagées en fonction du génotype des sujets dépressifs.

2.2. Noradrénaline et dépression

La NA est un neurotransmetteur faisant partie du groupe des catécholamines, auquel appartiennent également la DA et l'adrénaline, en raison du noyau catéchol qu'elles contiennent. La NA joue un rôle important dans diverses fonctions physiologiques et notamment l'attention, les émotions, le sommeil, l'apprentissage ; elle est également associée à la réponse au stress.

2.2.1. Données de base

Les corps cellulaires des neurones noradrénergiques sont principalement localisés dans le locus coeruleus (LC), à partir duquel ils se projettent sur de nombreuses régions cérébrales y compris les structures limbiques et l'ensemble du cortex cérébral (Dahlström & Fuxe, 1964; Moore & Bloom, 1979; Levitt *et al.*, 1984 ; figure 2A).

La NA est synthétisée à partir d'un acide aminé aromatique dérivé de la protéine alimentaire, L-tyrosine, laquelle est transportée activement depuis la circulation sanguine vers le cytoplasme des neurones catécholaminergiques. La première étape de synthèse de la NA fait intervenir la tyrosine hydroxylase, qui est également l'enzyme limitante des processus de synthèse des autres catécholamines. Le produit dérivé de cette hydroxylation, le dihydroxyphénylalanine (DOPA), subit ensuite une décarboxylation catalysée par

l'enzyme DOPA décarboxylase, qui conduit à la formation de DA. La DA est ensuite convertie en NA, grâce à l'intervention de la DA β -hydroxylase spécifiquement présente dans les neurones NA. De la même manière que la 5-HT, la NA est stockée dans les vésicules synaptiques à l'aide du transporteur vésiculaire VMAT. Après sa libération, la NA peut se lier à ses différents récepteurs couplés aux protéines G, les récepteurs α - et β -adrénergiques, subdivisés en sous-groupes selon leurs profils pharmacologiques et fonctionnels (Bylund, 1992). Comme la 5-HT, la NA fait également l'objet de recapture, grâce à l'existence d'un transporteur membranaire dépendant du Na^+ . La dégradation métabolique de la NA s'effectue à la fois à l'intérieur et à l'extérieur de la cellule nerveuse et met en jeu deux enzymes principales, à savoir la catéchol O-méthyltransférase (COMT) et la MAO. Le métabolite principal de la NA, dérivant d'une succession de réactions enzymatiques, est le 3-méthoxy-4-hydroxyphénylglycol (MHPG ; figure 2B).

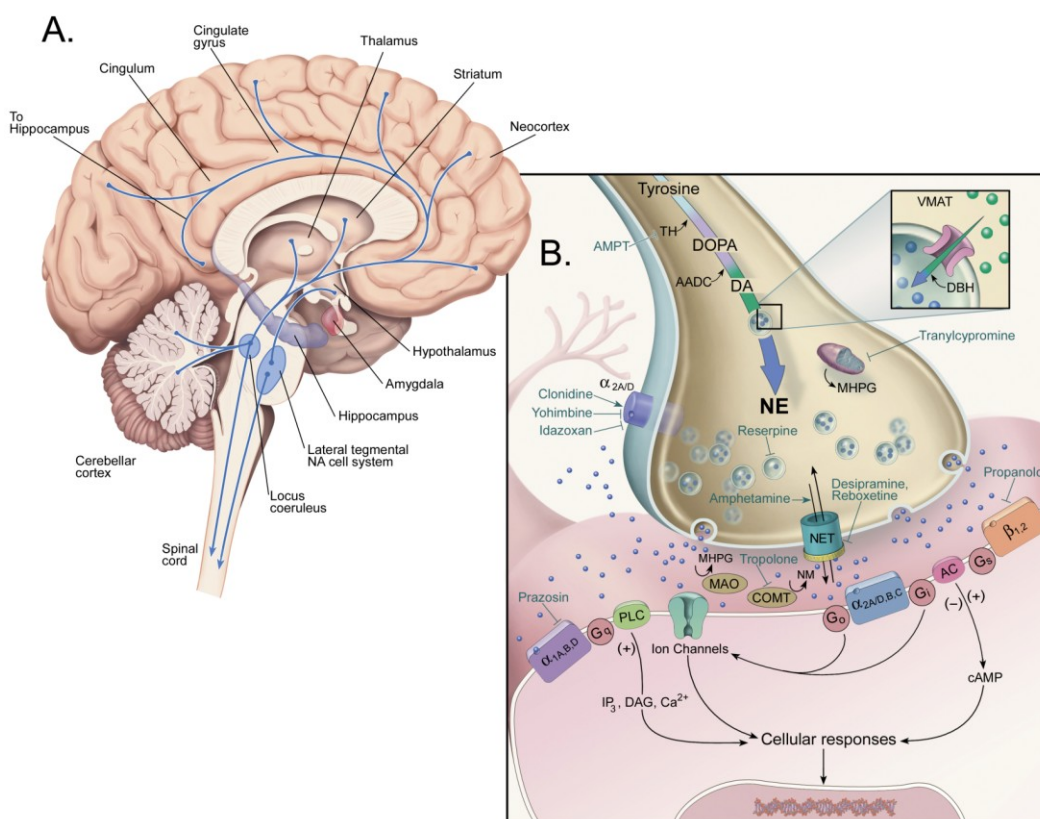


Figure 2. Le système noradrénergique

(A) Représentation schématique du cerveau humain et des projections des neurones NA (en bleu) issues majoritairement du locus coeruleus et qui innervent la plupart des régions du système nerveux central.

(B) Diagramme d'une terminaison axonale noradrénergique, incluant les étapes de synthèse de la NA, les différents récepteurs NA, ainsi que des exemples de leurs ligands spécifiques (agonistes ou antagonistes). Les mécanismes de transduction du signal et le transporteur membranaire sélectif de la NA (NET) sont également représentés.

(Images tirées du *Textbook of Psychopharmacology, Chapter 1, 4th edition, 2009*, reproduites avec la permission du Dr Steven Szabo)

2.2.2. L'hypothèse monoaminergique

L'implication de la NA dans la physiopathologie de la dépression a été proposée avant même que l'accent soit mis sur celle de la 5-HT (Schildkraut, 1965). Comme pour la 5-HT, l'agent antihypertenseur réserpine, capable d'induire des symptômes dépressifs, empêchait l'accumulation de NA dans les vésicules synaptiques et provoquait une déplétion de ce neurotransmetteur dans le cerveau, laissant supposer un dysfonctionnement noradrénergique dans la pathophysiologie de la dépression. Diverses études ont aussi révélé une diminution des niveaux du métabolite principal de la NA, le MHPG, dans le liquide céphalorachidien ainsi que l'urine de certains patients dépressifs (Schildkraut, 1974; Lambert *et al.*, 2000). Une autre donnée probante, mettant en avant l'implication de la NA dans la dépression, émane de l'utilisation de l' α -méthyl-para-tyrosine (AMPT). Cet inhibiteur de la tyrosine hydroxylase empêche la synthèse de DA et de NA, et l'administration de ce composé a induit des rechutes chez des patients dépressifs ayant déjà atteints le stade de rémission (Delgado *et al.*, 1993; Miller *et al.*, 1996).

En raison du rôle présumé de la NA dans la dépression, divers antidépresseurs ciblent donc directement la neurotransmission NA, tels que, par exemple, les inhibiteurs sélectifs de recapture de la NA (ISRN), les inhibiteurs mixtes de recapture de la NA et de la 5-HT, ou encore les antagonistes des récepteurs noradrénergiques.

2.2.3. Les récepteurs de la NA

Tout comme celle de la 5-HT, l'activité des neurones NA est régulée par divers types et sous-types de récepteurs. Ainsi, les neurones NA du LC sont munis d'autorécepteurs α_2 -adrénergiques, tant au niveau somatodendritique que terminal, lesquels exercent une rétroaction négative sur l'activité et la libération de NA par ces neurones

(Svensson *et al.*, 1975; Schoffelmeer & Mulder, 1983). L'administration aiguë d'ISRN, par exemple, qui augmente la disponibilité extracellulaire de NA, diminue le taux de décharge des neurones NA du LC en réponse à l'activation des autorécepteurs α_2 -adrénergiques (Mateo *et al.*, 1998; Szabo & Blier, 2001a). Cependant, contrairement au phénomène observé pour les neurones 5-HT, l'administration soutenue d'ISRN ne permet pas aux neurones NA de récupérer leur taux de décharge initial car leurs autorécepteurs somatodendritiques α_2 -adrénergiques ne sont pas sujets à désensibilisation (Mateo *et al.*, 2001; Szabo & Blier, 2001a). En revanche, ceux des terminaisons neuronales, qui régulent la quantité de NA libérée par potentiel d'action, se désensibilisent (L'Heureux *et al.*, 1986; Invernizzi *et al.*, 2001; Parini *et al.*, 2005). C'est pourquoi, une inhibition prolongée de la recapture de NA va conduire à une augmentation significative de la libération synaptique de ce neurotransmetteur, et cela, malgré une diminution du taux de décharge des neurones d'origine.

Divers changements des propriétés des récepteurs α_2 -adrénergiques ont été rapportés chez des patients atteints de dépression, témoignant encore une fois de l'implication du système NA dans la pathologie et son traitement. Ainsi, une augmentation de la liaison spécifique d'agonistes des récepteurs α_2 -adrénergiques, et plus spécifiquement de leur sous-type α_{2A} , a été mesurée dans le cortex frontal et l'hypothalamus de sujets victimes de suicide ayant préalablement reçu un diagnostic de dépression, comparativement à des sujets contrôles ou souffrant d'autres troubles psychiatriques (Meana & Garcia-Sevilla, 1987; Meana *et al.*, 1992; Callado *et al.*, 1998). Ces études ont également rapporté une augmentation de l'affinité de la NA pour ses récepteurs α_2 -adrénergiques, appuyant l'hypothèse voulant que la dépression endogène soit reliée à une sensibilité excessive de ces récepteurs dans le système nerveux central, tel qu'observé dans les plaquettes sanguines (Garcia-Sevilla *et al.*, 1986). Une densité accrue des

autorécepteurs α_2 -adrénergiques a également été observée post-mortem dans le LC de patients qui souffraient de dépression et/ou victimes de suicide (Ordway *et al.*, 1994; Ordway *et al.*, 2003). Ainsi, une plus forte densité et affinité des récepteurs α_2 -adrénergiques, dont l'activation réduit la libération de NA, engendreraient une déficience en NA dans certaines régions cérébrales et pourraient conduire à la dépression. On notera aussi que, chez le rat, l'administration chronique d'antidépresseurs est susceptible d'entraîner une réduction de la densité et de l'activité des récepteurs α_2 -adrénergiques dans diverses régions cérébrales, notamment le cortex et l'hippocampe (Smith *et al.*, 1981; Invernizzi *et al.*, 2001; Parini *et al.*, 2005) tel que rapporté également chez des sujets dépressifs (Garcia-Sevilla *et al.*, 1986; De Paermentier *et al.*, 1997).

2.2.4. Le transporteur membranaire de la NA

Un autre élément important de la neurotransmission noradrénergique met en jeu le système de recapture de la NA par l'intermédiaire de son transporteur spécifique (NET). De façon intéressante, l'expression de ce transporteur augmente ou diminue en fonction d'une élévation ou d'une réduction de la concentration extracellulaire de la NA (Lee *et al.*, 1983). Il est ainsi concevable que des changements de la teneur en NET dans le cerveau puissent être en partie responsables d'un dysfonctionnement de la neurotransmission NA associé à la dépression majeure. Une étude postmortem utilisant la forte affinité du radioligand [3 H]nisoxétine pour le NET, a révélé une plus faible liaison de ce radioligand au transporteur dans le LC de sujets ayant eu un diagnostic de dépression (Klimek *et al.*, 1997). Une telle baisse de densité du NET chez les sujets souffrant de dépression pourrait être le résultat d'adaptations physiologiques consécutives à la diminution de la neurotransmission NA déjà mise en cause dans la pathophysiologie de la dépression.

2.3. Dopamine et dépression

La DA est l'autre neurotransmetteur majeur appartenant au groupe des catécholamines. En plus de son rôle bien établi dans le contrôle de la motricité, elle intervient également dans de nombreuses fonctions comme l'apprentissage, la motivation, la cognition et le système de récompense. La DA est aussi fortement impliquée dans diverses pathologies, et notamment la maladie de Parkinson, la schizophrénie, les comportements d'addiction et les troubles affectifs.

2.3.1. Données de base

Il existe au moins cinq principaux sous-systèmes dopaminergiques dans le système nerveux central (figure 3A). Deux prennent origine dans l'aire tegmentale ventrale (ATV) : le système méso-cortical, dont les neurones se projettent sur le cortex cérébral (gyrus cingulaire antérieur, aire enthorinale, cortex préfrontal) et le système méso-limbique contribuant à l'innervation DA du noyau accumbens, de l'hippocampe, de l'amygdale, et du noyau du lit de la strie terminale. L'autre sous-système DA originaire du mésencéphale ventral est la voie nigrostriatale, qui prend naissance dans la substance noire, zone compacte, et cible majoritairement le striatum. Un quatrième sous-système DA est la voie tubéroinfundibulaire, qui va de l'hypothalamus à l'éminence médiane. Un cinquième sous-système, plus récemment décrit chez les primates et qui serait moins développé chez le rat est thalamique. Contrairement aux précédents, ce sous-système aurait des origines multiples, provenant notamment bilatéralement de l'hypothalamus, de la substance grise périaqueducule, du mésencéphale ventral et du noyau parabrachial latéral (Sanchez-Gonzalez *et al.*, 2005; Garcia-Cabezas *et al.*, 2009).

La DA est synthétisée à partir de la L-tyrosine, qui subit en premier lieu une hydroxylation catalysée par l'enzyme limitante de la synthèse des catécholamines, la tyrosine hydroxylase. La L-DOPA, issue de cette réaction, est ensuite décarboxylée par la L-DOPA décarboxylase pour produire la DA. Comme la 5-HT ou la NA, la DA est stockée par le transporteur vésiculaire VMAT2 dans les vésicules synaptiques, qui libéreront leur transmetteur par exocytose en réponse à une dépolarisation de la cellule. La DA libérée peut interagir avec divers types de récepteurs dopaminergiques, subdivisés en deux sous-familles, à savoir les récepteurs DA de type D₁ (D₁ et D₅), couplés à la protéine G_s, activatrice de l'adénylyl cyclase, et les récepteurs de type D₂ (D₂, D₃ et D₄), généralement couplés à la protéine G_i, inhibitrice de l'adénylyl cyclase (Missale *et al.*, 1998). Ici encore, il existe un système de recapture hautement sélectif, par l'intermédiaire d'un transporteur présent sur la membrane axonale des neurones DA, le DAT. Cependant, le DAT serait présent en très faible concentration sur les terminaisons axonales DA de certaines régions cérébrales, comme le cortex préfrontal et l'hippocampe, où la recapture de la DA serait principalement assurée par le transporteur NET des terminaisons NA (Sesack *et al.*, 1998; Bymaster *et al.*, 2002a; Guiard *et al.*, 2008b). La DA recaptée est ensuite soit recyclée soit dégradée en acide 3,4-dihydroxyphényle acétique (DOPAC), sous l'action de la MAO intracellulaire. La DA extracellulaire peut être catabolisée à la fois par la MAO et par la COMT, aboutissant à la formation d'acide homovanillique (HVA ; figure 3B).

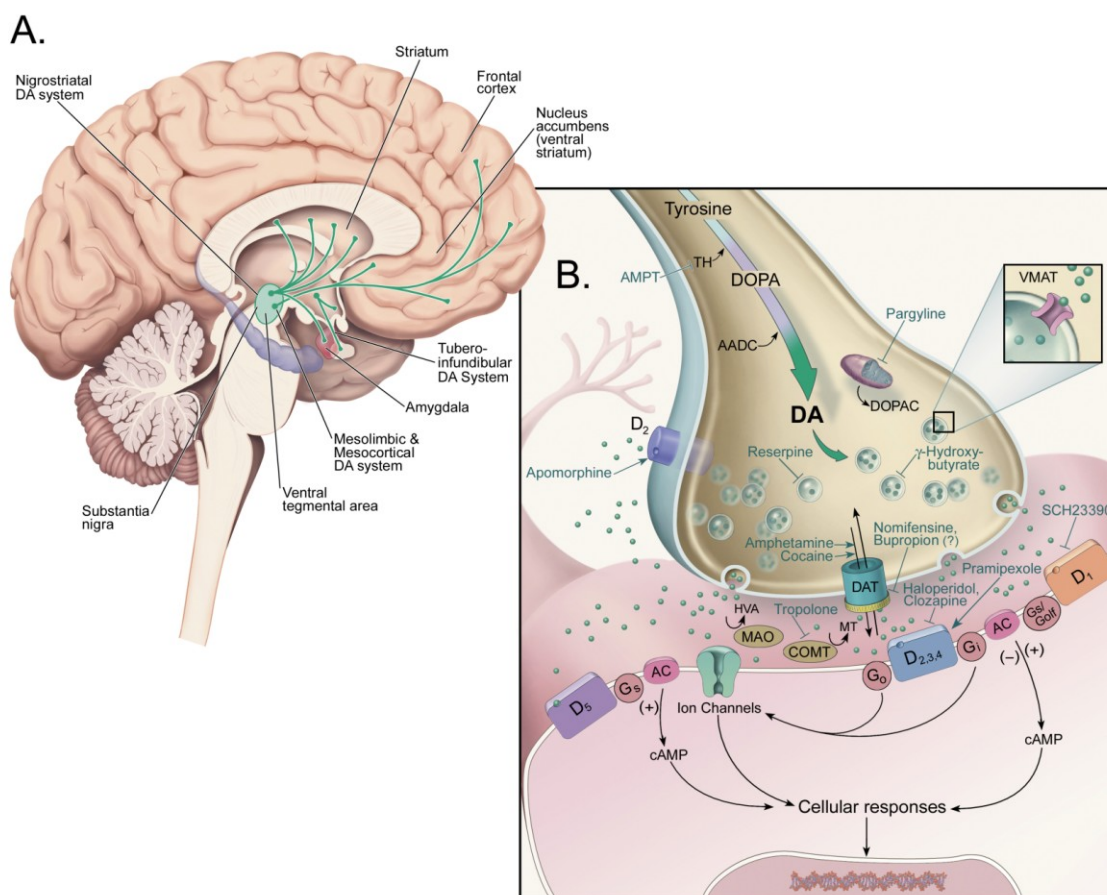


Figure 3. Le système dopaminergique

(A) Représentation schématique du cerveau humain et ses différentes voies de projection DA.

(B) Diagramme d'une terminaison axonale dopaminergique, incluant les étapes de synthèse de la DA, les différents récepteurs DA, ainsi que des exemples de leurs ligands spécifiques (agonistes ou antagonistes). Les mécanismes de transduction du signal et le transporteur membranaire sélectif de la DA (DAT) sont également représentés.

(Images tirées du *Textbook of Psychopharmacology, Chapter 1, 4th edition, 2009*, et reproduites avec la permission du Dr Steven Szabo)

2.3.2. Implication de la DA dans la dépression

De nombreuses observations cliniques témoignent d'une prévalence importante de la dépression dans d'autres pathologies où le système dopaminergique est plus directement mis en cause, comme la maladie de Parkinson ou la schizophrénie (Tandberg *et al.*, 1996; Kulhara & Avasthi, 2003; Merschdorf *et al.*, 2003). Néanmoins, des études plus anciennes avaient déjà soulevé la possibilité que la formation du métabolite principal de la DA, le HVA, puisse être diminué chez certains patients atteints de troubles affectifs (Schildkraut, 1974). Dans la même perspective, une diminution des niveaux de l'HVA a aussi été rapportée chez des patients atteints de dépression et réfractaires aux traitements antidépresseurs (Lambert *et al.*, 2000). De plus, tel que déjà mentionné, l'utilisation d'AMPT induit une recrudescence de symptômes dépressifs, dont l'anhédonie, chez des patients sous ISRN (Delgado *et al.*, 1993; Miller *et al.*, 1996).

Ainsi, à ce jour, existe-t-il certaines classes d'antidépresseurs qui agissent directement sur le système DA, comme, par exemple, les IMAO, le bupropion qui active la libération de DA (Meyer *et al.*, 2002) ainsi que de NA (Dong & Blier, 2001), ou d'autres composés agissant plus spécifiquement sur les récepteurs DA, comme le pramipexole (Corrigan *et al.*, 2000; Trivedi *et al.*, 2006; Zisook *et al.*, 2006; Chernoloz *et al.*, 2011).

2.3.3. Les récepteurs de la DA

Les systèmes de régulation de la DA mettent principalement en jeu les autorécepteurs D₂. Comme les récepteurs α_2 -adrénergiques, ces autorécepteurs se retrouvent aussi bien sur les corps cellulaires et dendrites que sur les terminaisons axonales des neurones DA, où ils contrôlent, respectivement, le taux de décharge des neurones et la quantité de DA libérée par potentiel d'action (Adell & Artigas, 2004). Ainsi, l'administration à court-terme de l'agoniste des récepteurs D_{2/3} pramipexole, ou de

l'inhibiteur sélectif de la recapture de DA et NA, nomifensine, entraîne une diminution du taux de décharge des neurones DA de l'ATV (Chernoloz *et al.*, 2009b; Katz *et al.*, 2010). Cependant, l'administration prolongée de ces deux composés permet ensuite aux neurones DA de récupérer leur taux de décharge initial, en raison d'une désensibilisation de l'autorécepteur somatodendritique D₂ (Chernoloz *et al.*, 2009b; Katz *et al.*, 2010). Il existe toutefois de nombreuses divergences quant à l'implication des récepteurs D₂ dans la pathophysiologie de la dépression. Certains résultats de neuroimagerie montrent une augmentation du potentiel de liaison du ligand de haute-affinité [¹²³I]iodobenzamide aux récepteurs D₂ dans le striatum de patients dépressifs, pouvant indiquer une augmentation de la densité de ces récepteurs dans la dépression (D'Haenen & Bossuyt, 1994; Shah *et al.*, 1997). Cependant, cette élévation du taux de liaison du radioligand aux récepteurs D₂ pourrait également refléter une augmentation de l'affinité du récepteur pour son ligand, ou encore une baisse de la disponibilité de la DA extracellulaire qui entre normalement en compétition avec le radioligand (Dunlop & Nemeroff, 2007). Une autre étude utilisant le même radioligand n'observe aucune différence de liaison aux récepteurs D₂ entre les sujets dépressifs non médicamenteux et les sujets contrôles, avant ou après trois semaines de traitement antidépresseur, sauf chez les patients ayant un retard psychomoteur, chez qui la réponse aux antidépresseurs est associée à une diminution du potentiel de liaison de la [¹²³I]iodobenzamide (Ebert *et al.*, 1996). Par ailleurs, de nombreuses études animales utilisant divers types d'antidépresseurs suggèrent une augmentation de la sensibilité des récepteurs D₂ du noyau accumbens en réponse aux différents traitements (Gershon *et al.*, 2007). Il faudra donc d'autres recherches afin de bien caractériser le rôle des récepteurs D₂ dans la dépression, ainsi que la réponse aux antidépresseurs. Néanmoins, les données cliniques et précliniques ciblant directement ces récepteurs témoignent clairement de leur implication dans la dépression (Corrigan *et al.*, 2000; Chernoloz *et al.*, 2011).

2.3.4. Le transporteur membranaire de la DA

Une étude post-mortem, combinant l'immunohistochimie et l'autoradiographie, a démontré une réduction de la densité du DAT dans l'amygdale de patients dépressifs, la plupart victimes de suicide, par rapport à des sujets contrôles sains (Klimek *et al.*, 2002). En harmonie avec ces données, une étude d'imagerie TEP a montré une baisse du potentiel de liaison pour le DAT dans le striatum de patients déprimés durant des épisodes dépressifs majeurs, laissant croire à une adaptation de l'expression du DAT en réponse à une diminution de la neurotransmission DA (Meyer *et al.*, 2001). De même, une réduction du potentiel de liaison au DAT avait déjà été démontrée chez l'animal, suite à une déplétion répétée de la DA, et, inversement, une augmentation de la densité des DAT était observée après un traitement à l'amantadine, laquelle augmente la libération de DA (Kilbourn *et al.*, 1992; Gordon *et al.*, 1996). D'autre part, des effets de type antidépresseurs ont été observés dans divers tests comportementaux, chez des souris invalidées pour le gène codant pour le transporteur DAT, suggérant la possibilité d'un effet thérapeutique du blocage de ces transporteurs lors de la dépression (Perona *et al.*, 2008).

2.4. Interactions entre les trois systèmes monoaminergiques

La mise en évidence d'une implication de chacun des trois systèmes monoaminergiques dans la pathophysiologie de la dépression a certes été une grande avancée pour l'élaboration de nouveaux traitements antidépresseurs visant l'un ou l'autre de ces systèmes en particulier. Cependant, de nouvelles données ont révélé des interactions réciproques entre ces différents systèmes, laissant donc supposer que l'altération de l'un ou l'autre de ces systèmes puisse affecter en retour les deux autres (figure 4).

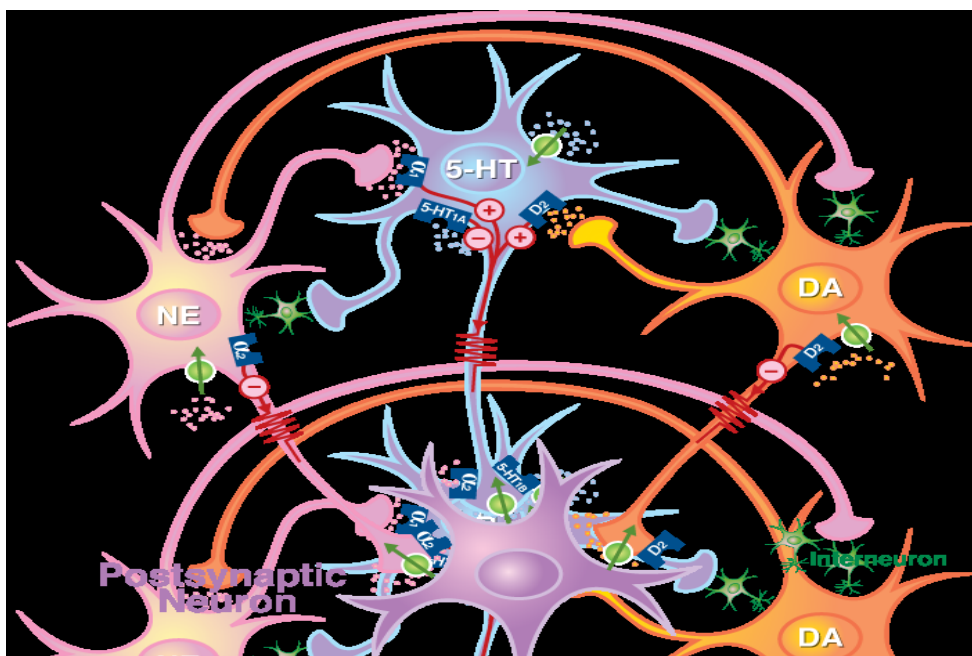


Figure 4. Schématisation des interactions réciproques entre les trois systèmes monoaminergiques : NA, 5-HT et DA.

Le signe (+) indique une action excitatrice et le signe (-) une action inhibitrice. Les interneurons ont été identifiés comme étant GABAergiques, médiant une action inhibitrice via les récepteurs 5-HT_{2A} pour les neurones NA et 5-HT_{2C} pour les neurones DA. (Image tirée de Trivedi *et al.*, 2008).

2.4.1. Sérotonine-noradrénaline

Il y a plusieurs années que des interactions réciproques existant entre le LC et le NRD ont été mises en évidence. Tout d'abord, d'un point de vue anatomique, l'utilisation de techniques de microscopie électronique et d'autoradiographie a permis d'identifier des projections du LC sur le NRD et inversement (Cedarbaum & Aghajanian, 1978; Léger & Descarries, 1978; Baraban & Aghajanian, 1981), suggérant que chacun de ces noyaux puisse moduler l'activité de l'autre.

Par la suite, il a été constaté qu'une lésion du NRD entraîne une augmentation de l'activité des neurones NA (Haddjeri *et al.*, 1997). Le même phénomène est également observé après une stimulation de l'autorécepteur somatodendritique 5-HT_{1A} avec l'agoniste 8-OH-DPAT qui, en induisant une inhibition des neurones 5-HT, entraîne en conséquence une élévation du taux de décharges des neurones NA du LC (Szabo *et al.*, 2000). Inversement, l'administration systémique de l'antagoniste des récepteurs 5-HT_{1A}, WAY 100635, induit une inhibition du taux de décharge des neurones NA du LC (Haddjeri *et al.*, 1997). Ces données suggèrent donc une action inhibitrice des neurones 5-HT sur les neurones NA. On comprend ainsi pourquoi les traitements avec divers antidépresseurs de type ISRS, qui induisent à long terme une augmentation de la neurotransmission 5-HT, entraînent une diminution du taux de décharge des neurones NA (Szabo *et al.*, 2000; Szabo & Blier, 2001b). Il s'agirait ici d'un effet indirect, résultant d'une activation des interneurones GABA (acide gamma-aminobutyrique) *via* leurs récepteurs 5-HT_{2A} excitateurs, inhibant ensuite les neurones NA (Szabo & Blier, 2001b). C'est pourquoi, l'administration à long-terme du composé YM992, qui s'avère être à la fois un ISRS et un puissant antagoniste des récepteurs 5-HT_{2A}, induit une diminution initiale de l'activité électrique des neurones NA mais qui est par la suite restaurée grâce à la désensibilisation

des autorécepteurs α_2 -adrénergiques (Szabo & Blier, 2002). Ainsi, le composé YM992 est capable d'augmenter la neurotransmission 5-HT par sa propriété ISRS mais également la neurotransmission NA par son action antagoniste sur les récepteurs 5-HT_{2A} (Hatanaka *et al.*, 2000; Blier & Szabo, 2005).

S'agissant de l'action des neurones NA sur les neurones 5-HT, l'administration i.v. de l'agoniste α_2 -adrénergique clonidine, qui inhibe dans un premier temps les neurones NA, entraîne une diminution du taux de décharge des neurones 5-HT du NRD (Svensson *et al.*, 1975), suggérant alors une action excitatrice des neurones NA sur les neurones 5-HT. Cette action excitatrice serait médiée par des récepteurs α_1 -adrénergiques somato-dendritiques de ces neurones. En effet, une libération endogène de NA dans le NRD entraîne une augmentation de l'activité électrique des neurones 5-HT via l'activation des récepteurs α_1 -adrénergiques (Baraban & Aghajanian, 1980). Cependant, les terminaisons des neurones 5-HT sont pourvues d'hétérorécepteurs inhibiteurs α_2 -adrénergiques, qui contrôlent la libération de 5-HT (Mongeau *et al.*, 1993). De ce fait, l'antidépresseur mirtazapine, un antagoniste des récepteurs α_2 -adrénergiques, induit en administration aiguë une augmentation du taux de décharge des neurones 5-HT et des neurones NA en antagonisant l'autorécepteur α_2 -adrénergiques des neurones du LC, cette augmentation étant abolie par une lésion du LC (Haddjeri *et al.*, 1995; Haddjeri *et al.*, 1998a). En administration chronique, la mirtazapine entraîne une augmentation encore plus marquée de l'activité des neurones 5-HT en raison de la désensibilisation des hétérorécepteurs α_2 -adrénergiques qui résulte de la disponibilité accrue de la NA (Haddjeri *et al.*, 1998a).

Ainsi, alors que les neurones 5-HT exercent une action inhibitrice et indirecte sur les neurones NA du LC via les récepteurs 5-HT_{2A} des neurones GABA, le système NA

exerce une activité excitatrice sur les neurones 5-HT via les récepteurs α_1 -adrénergiques, mais qui est modulée par les récepteurs α_2 -adrénergiques (Figure 5).

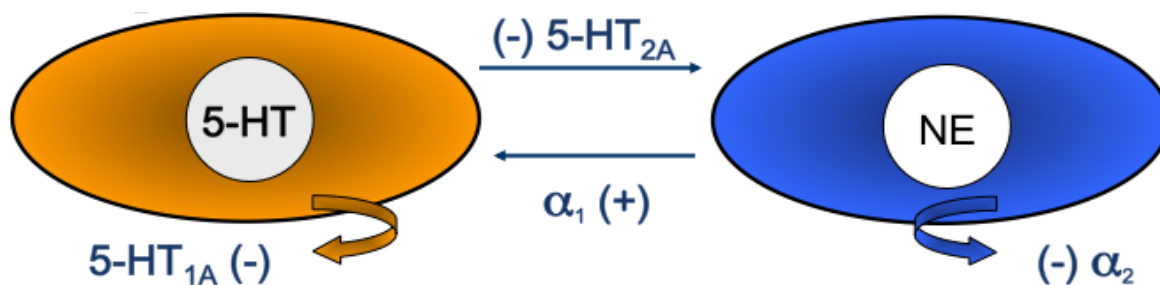


Figure 5. Représentation schématique des interactions Sérotonine-Noradrénaline.

Les neurones 5-HT exercent une action inhibitrice (-) et indirecte sur les neurones NA via les récepteurs 5-HT_{2A} des neurones GABA, alors que le système NA exerce une activité excitatrice (+) sur les neurones 5-HT via les récepteurs α_1 -adrénergiques.

2.4.2. Sérotonine-dopamine

De nombreuses études ont pu démontrer la présence de fibres 5-HT issues du NRD dans la substance noire et l'ATV, ainsi que dans les aires de projections principales des systèmes DA nigrostrié et mésolimbique (Di Giovanni *et al.*, 2008). De même, l'innervation DA du NRD a été confirmée maintes fois (Di Giovanni *et al.*, 2008).

S'agissant de l'action des neurones DA sur les neurones 5-HT, il a d'abord été montré que les neurones 5-HT expriment des récepteurs DA, et plus précisément de type D_2 (Mansour *et al.*, 1990; Suzuki *et al.*, 1998), suggérant une action exercée par la DA sur les neurones 5-HT. Aussi, des études neurochimiques et électrophysiologiques ont révélé que les agonistes des récepteurs D_2 (comme l'apomorphine ou le quinpirole) induisaient

une augmentation du taux de décharge des neurones 5-HT du NRD, ainsi qu'une plus forte libération locale de 5-HT (Ferre & Artigas, 1993; Martin-Ruiz *et al.*, 2001). Des expériences d'électrophysiologie *in vitro* ont par la suite montré que l'activation des récepteurs D₂ situés sur les neurones 5-HT du NRD produit une dépolarisation membranaire et donc une élévation de leur excitabilité (Haj-Dahmane, 2001; Aman *et al.*, 2007). En effet, contrairement à leur couplage conventionnel à la protéine G_i qui inhibe l'adénylyl cyclase et hyperpolarise la membrane, les récepteurs D₂ du NRD sont couplés à des protéines G qui activent la phospholipase C (Aman *et al.*, 2007). L'activité excitatrice des neurones DA sur les neurones 5-HT a également été confirmée par des expériences de lésion des neurones DA qui réduisent la fréquence de décharge des neurones 5-HT du NRD de 60 % (Guiard *et al.*, 2008c).

À l'opposé, une lésion spécifique des neurones 5-HT augmente significativement le taux de décharge des neurones DA de l'ATV (Guiard *et al.*, 2008c), laissant croire à une action inhibitrice des neurones 5-HT sur les neurones DA. Il en va de même par l'activation des autorécepteurs 5-HT_{1A}, laquelle induit une augmentation de l'activité électrique DA, cette dernière étant abolie par l'antagoniste spécifique des récepteurs 5-HT_{1A}, le WAY100635 (Lejeune & Millan, 1998). Cependant, l'application locale d'un agoniste des récepteurs 5-HT_{1A}, le 8-OH-DPAT, dans l'ATV n'induit aucun changement de fréquence des neurones DA suggérant un autre mode d'action (Prisco *et al.*, 1994). Aussi, il a été montré que l'agoniste des récepteurs 5-HT_{2C} (le Ro60-175) supprime la décharge spontanée des neurones DA de l'ATV, de même que la libération de DA dans le cortex, le noyau accumbens et le striatum, ces effets étant complètement bloqués par un antagoniste des récepteurs 5-HT_{2C} (Di Giovanni *et al.*, 2000; Di Matteo *et al.*, 2000; Gobert *et al.*, 2000). Ce sous-type de récepteur pourrait donc être en partie responsable de l'action

des neurones 5-HT sur les neurones DA. Cependant d'autres sous-types de récepteurs 5-HT, largement distribués dans le système DA, pourraient également rendre compte des effets de la 5-HT sur les neurones DA (Di Giovanni *et al.*, 2008).

Somme toute, il semblerait que l'effet global des projections 5-HT sur le système DA soit de nature inhibitrice, alors que les neurones DA exercent une action excitatrice sur les neurones 5-HT (figure 6).

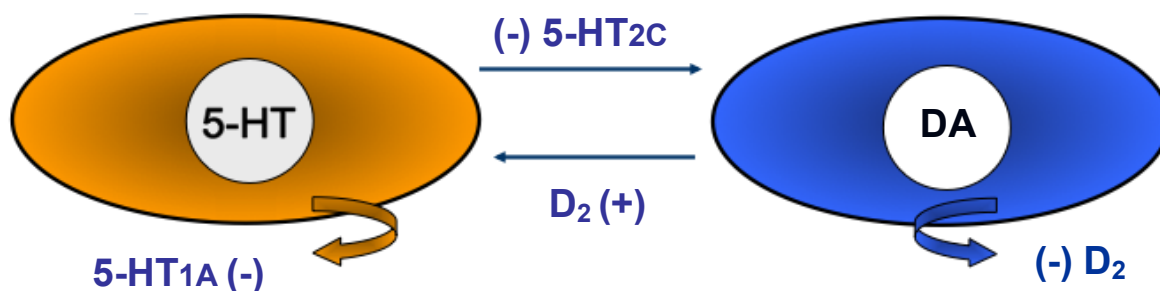


Figure 6. Représentation schématique des interactions Sérotonine-Dopamine.

Les neurones 5-HT exerceraient une action inhibitrice (-) et indirecte sur les neurones DA *via* les récepteurs 5-HT_{2C} des neurones GABA, alors que le système DA exerce une activité excitatrice (+) sur les neurones 5-HT *via* les récepteurs D₂.

2.4.3. Noradrénaline-dopamine

Des expériences de traçage rétrograde ont révélé l'existence de projections de l'ATV sur le LC (Swanson, 1982). Réciproquement, des projections du LC vers l'ATV ont été rapportées (Jones & Moore, 1977). La destruction des neurones DA de l'ATV, qui entraîne une baisse du contenu en DA et de l'innervation DA du LC, permet aussi de mettre en évidence l'interaction DA-NA (Ornstein *et al.*, 1987).

La lésion sélective des neurones DA de l'ATV provoque une augmentation du taux de décharge des neurones NA du LC, révélant une action inhibitrice des neurones DA sur le LC (Guiard *et al.*, 2008c). En accord avec cette hypothèse, une application locale de DA dans le LC produit une nette inhibition de l'activité électrique des neurones NA (Elam *et al.*, 1986; Guiard *et al.*, 2008b). Des recherches visant à caractériser les récepteurs impliqués dans cette action inhibitrice des neurones DA sur le LC, ont évoqué des récepteurs DA de type D₂, compte-tenu du fait que l'administration d'un antagoniste des récepteurs D₂, l'halopéridol, augmente l'activité électrique spontanée des neurones NA du LC (Piercey *et al.*, 1994). Cependant, il s'avère que les récepteurs responsables de l'activité inhibitrice exercée par les neurones DA sur les neurones NA seraient plutôt de type α_2 -adrénergiques. En effet, une étude de microiontophorèse plus ancienne avait déjà démontré que l'effet inhibiteur de la DA sur le LC était médié par ce type de récepteurs (Cedarbaum & Aghajanian, 1977). Plus récemment, il a aussi été montré que la suppression de l'activité électrique des neurones NA induite par l'application locale de NA ou de DA, pouvait être contrecarrée par un antagoniste des récepteurs α_2 -adrénergiques, l'idazoxan, mais non par un antagoniste des récepteurs de type D₂, le raclopride. Ainsi, seuls les récepteurs α_2 -adrénergiques seraient impliqués dans l'effet inhibiteur de la DA sur le LC (Guiard *et al.*, 2008b).

Au sujet de l'action possible des neurones NA du LC sur les neurones DA, les données de la littérature ne sont pas encore concluantes. En effet, la stimulation électrique des neurones NA du LC induit principalement une excitation des neurones DA de l'ATV, laquelle est contrecarrée par un antagoniste des récepteurs α_1 -adrénergiques, le prazosin, suggérant une action excitatrice des neurones du LC sur les neurones DA de l'ATV par l'intermédiaire de ce type de récepteurs (Grenhoff *et al.*, 1993). De la même manière, un

antagoniste des récepteurs α_2 -adrénergiques, l'idazoxan, qui augmente le taux de décharge et de libération des neurones NA du LC, régule positivement l'activité des neurones DA de l'ATV (Grenhoff & Svensson, 1993). Cependant, une étude plus récente, après une lésion sélective des neurones NA du LC, a montré un effet excitateur sur les neurones DA de l'ATV, suggérant donc une influence inhibitrice du LC sur l'ATV (Guiard *et al.*, 2008c). De même, l'application locale par microiontophorèse de NA dans l'ATV produit un effet inhibiteur sur l'activité électrique des neurones DA, partiellement antagonisée par l'idazoxan (Guiard *et al.*, 2008b). Il a aussi été montré que cette action inhibitrice de la NA sur les neurones DA de l'ATV peut être bloquée par l'antagoniste des récepteurs de type D_2 , le sulpiride (White & Wang, 1984), suggérant alors que ce neurotransmetteur peut agir sur les neurones DA à la fois *via* les récepteurs α_2 -adrénergiques et les récepteurs de type D_2 (Guiard *et al.*, 2008b; El Mansari *et al.*, 2010).

Ces études soulignent la complexité des mécanismes par lesquels la NA régule l'activité neuronale de l'ATV, alors qu'il paraît plus clair que la DA exerce quant à elle une activité inhibitrice sur les neurones NA du LC. Quoiqu'il en soit, il est à présent très clair qu'en affectant l'un des systèmes monoaminergiques par divers traitements, les autres systèmes sont également affectés. Il est dès lors possible d'envisager un nombre considérable de stratégies thérapeutiques en vue d'améliorer l'efficacité des traitements qui touchent l'un ou l'autre de ces différents systèmes (Figure 7).

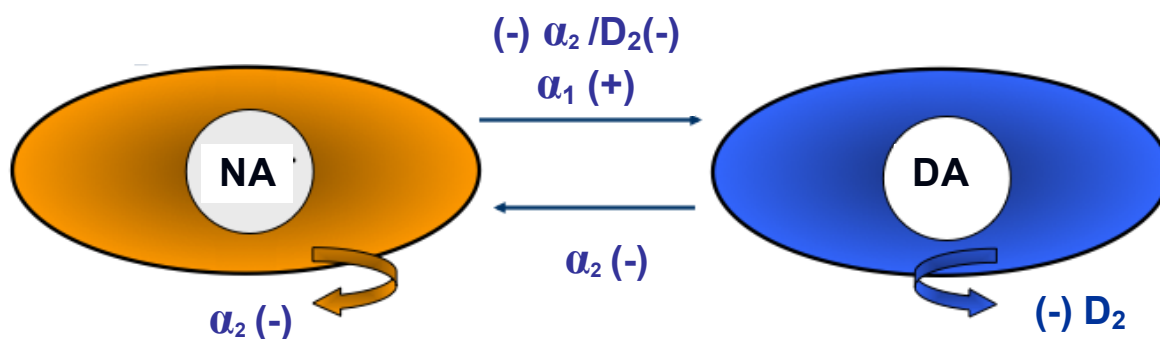


Figure 7. Représentation schématique des interactions Noradrénaline-Dopamine.

Les neurones NA influencerait les neurones DA *via* les récepteurs inhibiteurs α_2 -adrénergiques et les récepteurs D_2 et probablement aussi *via* les récepteurs excitateurs α_1 -adrénergiques alors que le système DA exerce une activité inhibitrice (-) sur les neurones NA *via* les récepteurs α_2 -adrénergiques.

3. Stratégies thérapeutiques pour la dépression

Une meilleure connaissance des systèmes neurobiologiques impliqués dans la dépression a conduit depuis des décennies à l'élaboration d'une variété de stratégies thérapeutiques visant à combattre cette pathologie. Quelques-unes de ces stratégies seront brièvement décrites ci-dessous.

Les premières médications ayant révélé une action antidépressive ont été découvertes vers la fin des années 1950, et incluaient les IMAO, qui empêchent la dégradation des monoamines par inhibition irréversible de l'enzyme mitochondriale et extracellulaire MAO, ainsi que les antidépresseurs tricycliques, bloquant la recapture de la NA et de la 5-HT. C'est d'ailleurs en partie grâce à ces observations qu'émana la théorie monoaminergique de la dépression (Schildkraut, 1965; Coppen, 1967; Schildkraut, 1974). La mise en évidence de l'implication de la 5-HT et des catécholamines dans la dépression conduisit rapidement à l'élaboration de molécules capables de cibler plus spécifiquement

l'un ou l'autre de ces systèmes. C'est alors que les ISRS, tels que la fluoxétine, le citalopram, la paroxétine, la fluvoxamine ou encore la sertraline, qui agissent directement sur la neurotransmission 5-HT en bloquant spécifiquement son transporteur membranaire, sont devenus les traitements antidépresseurs de première ligne. Les inhibiteurs sélectifs de la recapture de la NA, ISRN, comme la désipramine et la réboxétine, ayant aussi révélé une efficacité thérapeutique contre les troubles dépressifs, sont également utilisés (Scates & Doraiswamy, 2000; Brunello *et al.*, 2003). Cependant, la moitié des patients traités pour dépression ne répondent pas adéquatement aux monothérapies de première ligne (Hirschfeld *et al.*, 2002).

Il existe à ce jour diverses classes d'antidépresseurs qui pourraient être regroupées en plusieurs familles en fonction de leurs mécanismes d'action biochimique. Ces familles comprennent les ISRS, les ISRN, les inhibiteurs sélectifs à la fois de la recapture de 5-HT et NA (ISRSN), les IMAO, les antidépresseurs tricycliques et les antidépresseurs dits atypiques, comme le bupropion et la mirtazapine.

En règle générale, lorsqu'un patient souffrant de dépression ne répond pas au traitement de première intention, on utilise un antidépresseur de classe différente, afin de mettre en jeu des mécanismes d'action différents de ceux qui n'ont apporté aucune amélioration clinique des symptômes dépressifs (Hirschfeld *et al.*, 2002; Nemeroff, 2007).

En cas de réponse partielle au premier traitement, deux stratégies thérapeutiques peuvent être envisagées pour, d'une part, maintenir cette réponse préalable et, d'autre part, l'améliorer. Il s'agit des stratégies de potentialisation et d'association. La potentialisation consiste à rajouter à la thérapie initiale un agent non reconnu comme antidépresseur, tel le lithium ou l'un ou l'autre des antipsychotiques atypiques. Le lithium a été la thérapie de

potentialisation la plus étudiée depuis de nombreuses années; il a prouvé maintes fois son efficacité en clinique, avec des taux de réponses pouvant atteindre jusqu'à 50 % (De Montigny *et al.*, 1981; de Montigny *et al.*, 1983; Heninger *et al.*, 1983; Stein & Bernadt, 1993; Bauer *et al.*, 2003). Des études précliniques ont montré que l'addition de lithium à différentes classes d'antidépresseurs induit une augmentation accrue de la neurotransmission 5-HT dans l'hippocampe du rat, comparativement aux antidépresseurs standards administrés seuls, ce qui pourrait en partie expliquer son efficacité clinique (Haddjeri *et al.*, 2000).

L'utilisation des antipsychotiques atypiques dans la stratégie de potentialisation est quant à elle relativement récente. Le potentiel antidépresseur de ces molécules a été découvert à la suite d'observations cliniques d'une amélioration des symptômes dépressifs après addition de rispéridone ou d'olanzapine chez des patients recevant déjà un traitement aux ISRS (Ostroff & Nelson, 1999; Shelton *et al.*, 2001). Une méta-analyse a par la suite confirmé l'efficacité de l'usage de divers antipsychotiques administrés à faible dose, comme traitement de potentialisation pour les troubles dépressifs majeurs (Nelson & Papakostas, 2009). Ces bénéfices cliniques seraient en partie attribuables aux propriétés antagonistes des récepteurs 5-HT_{2A} de ces molécules. En effet, dans la mesure où les ISRS par exemple atténuent l'activité électrique de la NA *via* l'activation des récepteurs 5-HT_{2A} présents sur des interneurons GABA, le blocage de ces récepteurs par l'addition d'antipsychotiques atypiques permet de restaurer la neurotransmission NA et d'améliorer ainsi l'effet antidépresseur du traitement initial (Szabo & Blier, 2001b; Seager *et al.*, 2004; Dremencov *et al.*, 2007; Chernolet *et al.*, 2009a).

La stratégie d'association consiste, quant à elle, à combiner une autre classe d'antidépresseurs à la monothérapie de départ. À cet effet, la combinaison d'un ISRS avec l'antidépresseur atypique bupropion est devenue très utilisée en clinique. En effet, des

essais cliniques ont permis d'observer une réponse antidépressive plus efficace lors de cette association chez des patients souffrant de dépression résistante (Trivedi *et al.*, 2006). Les mécanismes d'action alternatifs du bupropion, à savoir une stimulation de la libération de NA et de DA (Dong & Blier, 2001; Meyer *et al.*, 2002) et une augmentation des neurotransmissions 5-HT et NA dans l'hippocampe (Ghanbari *et al.*, 2011), apportent des bénéfices additionnels hors d'atteinte de la monothérapie. De même, la mirtazapine, qui est un puissant antagoniste des récepteurs α_2 -adrénergiques, améliore la réponse des patients recevant un antidépresseur de la famille des ISRS (Carpenter *et al.*, 2002; Blier *et al.*, 2009). En effet, à l'inverse des ISRS qui inhibent l'activité des neurones NA (Szabo *et al.*, 2000; Dremencov *et al.*, 2007; Kawahara *et al.*, 2007), des études électrophysiologiques et de microdialyse chez le rat montrent que l'administration de mirtazapine, de par son profil pharmacologique, augmente le taux de décharge de ces neurones, ainsi que la libération de NA dans le cortex préfrontal (Haddjeri *et al.*, 1996; Devoto *et al.*, 2004), ajoutant ainsi aux effets de la monothérapie de première ligne.

La thérapie électroconvulsive (ECT) ou sismothérapie, utilisée depuis les années 1930, a également prouvé maintes fois son efficacité en tant que traitement somatique d'association ou en utilisation unique chez les patients dépressifs résistants (Gagne *et al.*, 2000; Husain *et al.*, 2004). Les mécanismes d'actions des ECT sont multiples, mais il a notamment été démontré que des ECT répétés augmentaient la neurotransmission globale 5-HT en sensibilisant les hétérorécepteurs 5-HT_{1A} de l'hippocampe, contribuant ainsi à faciliter la réponse 5-HT dans cette région cible (de Montigny, 1984; Haddjeri *et al.*, 1998b).

Cependant, en dépit de cette vaste variété de traitements existant déjà pour cette pathologie, il n'en demeure pas moins qu'un tiers de ces patients n'atteindra jamais le

stade de rémission et ce, malgré de multiples stratégies thérapeutiques (Rush *et al.*, 2006). Par conséquent, de nouvelles approches sont encore nécessaires en vue d'améliorer l'efficacité clinique des traitements pour la dépression résistante.

4. La stimulation du nerf vague (SNV)

Les techniques de stimulation cérébrale sont devenues une alternative intéressante pour les patients réfractaires à de nombreuses pharmacothérapies. Parmi ces méthodes de neurostimulation, la plus connue est sans doute l'électroconvulsivothérapie, évoquée au chapitre précédent, qui a maintes fois prouvé son efficacité et qui est utilisée depuis des décennies pour le traitement de la dépression résistante. Plus récemment, la stimulation du nerf vague (SNV), déjà utilisée pour le traitement de l'épilepsie réfractaire, s'est avérée prometteuse pour les patients souffrant de troubles dépressifs et réfractaires à de nombreuses thérapies pharmacologiques, ce qui lui a valu d'être approuvée comme traitement additif pour la dépression résistante.

4.1. Anatomie du nerf vague

Le nerf vague ou nerf pneumogastrique, qui forme la X^{ème} paire de nerfs crâniens, est une branche parasympathique du système nerveux autonome. Les nerfs vagues sont composés de différentes fibres, désignées A, B et C en fonction de leur diamètre et de leur myélinisation, ce qui leur confère également différents seuils d'excitation en réponse à un stimulus. Ainsi, les fibres vagues de type A, de gros diamètre et fortement myélinisées, possèdent le seuil de recrutement le plus bas (0.02-0.2 mA) et sont activées en premier. Les fibres de type B, également myélinisées et de diamètre intermédiaire, sont ensuite recrutées suite à des stimulations dont l'intensité varie entre 0.04 à 0.6 mA. Enfin, les fibres de type

C, qui sont les plus petites non myélinisées, possèdent le seuil de recrutement le plus élevé (> 2 mA; Woodbury & Woodbury, 1990; Henry, 2002). Des recherches précliniques visant à caractériser les mécanismes d'actions thérapeutiques de la SNV dans le traitement de l'épilepsie ont rapidement démontré qu'une lésion des fibres vagues de type C n'empêchait pas la SNV de supprimer les convulsions induites par le pentylènetétrazol chez le rat, suggérant alors que seules les fibres de type A et B seraient impliquées dans les mécanismes d'action de la SNV (Krahl *et al.*, 2001). Ces données sont également cohérentes avec le fait que l'intensité de stimulation thérapeutique généralement utilisée chez les patients recevant la SNV est en dessous du seuil d'activation des fibres vagues de type C.

Les efférences parasympathiques du nerf vague émergent principalement du noyau dorsal du vague et du noyau ambigu du bulbe rachidien, pour innerver les muscles striés du pharynx et du larynx, ainsi que le cœur, les poumons, l'estomac, l'intestin, le foie, le pancréas et les reins. Les nerfs vagues droit et gauche sont asymétriques du point de vue de leurs efférences cardiovasculaires, qui régulent la fréquence cardiaque et la pression sanguine. En effet, le nerf vague gauche innerve les ventricules, alors que le droit innerve densément les oreillettes. C'est pourquoi, la SNV est pratiquée sur le nerf vague gauche, afin d'éviter au maximum d'éventuels effets indésirables sur le rythme cardiaque.

Il est important de mentionner que le nerf vague est en fait un nerf mixte, composé majoritairement de fibres afférentes, lesquelles représentent environ 80 % des fibres totales qui le composent, et transmettent des informations au cerveau (Foley & Dubois, 1937). La plupart des afférences vagues font synapse dans le noyau du tractus solitaire (NTS) du bulbe rachidien, et chaque nerf vague innerve bilatéralement le NTS. Ce dernier, par l'intermédiaire de projections directes et indirectes, relaie l'information dans diverses régions cérébrales impliquées dans la régulation de l'humeur, l'activité épileptique, et bien

d'autres fonctions (Henry, 2002; figure 8). Les régions cérébrales affectées par les afférences vagales et associées à des troubles psychiatriques sont principalement le locus coeruleus, les noyaux du raphé, l'amygdale, l'hypothalamus, le thalamus, l'hippocampe, le cortex orbito-frontal et le gyrus cingulaire (Rutecki, 1990; Van Bockstaele *et al.*, 1999; George *et al.*, 2003). Il est ainsi logique qu'une altération des impulsions électriques issues du nerf vague puisse au final affecter ces diverses aires cérébrales et, moins directement, d'autres structures elles-mêmes innervées par ces aires cérébrales.

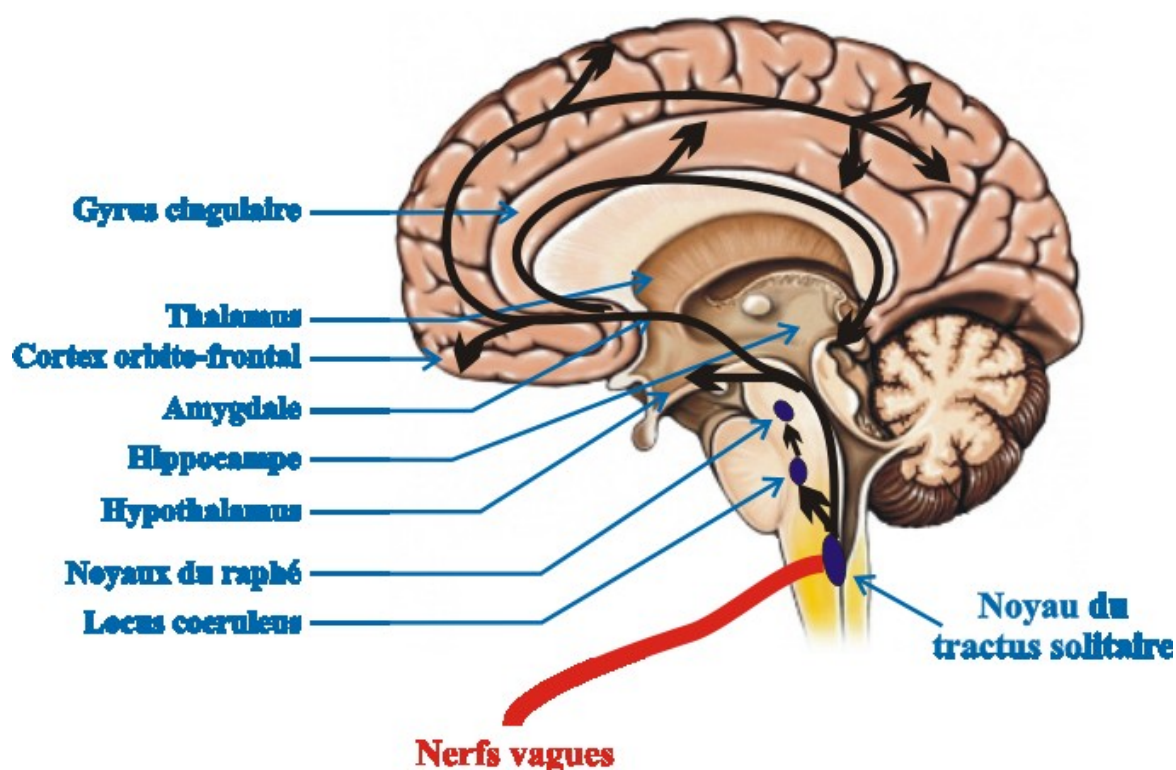


Figure 8. Projections schématisques des afférences vagales.

Les afférences vagales font synapse dans le noyau du tractus solitaire, qui relaie l'information à de nombreuses structures cérébrales incluant le locus coeruleus, les noyaux du raphé, l'hypothalamus, l'hippocampe, l'amygdale, le thalamus, le cortex orbito-frontal et le gyrus cingulaire.

4.2. La stimulation du nerf vague (SNV)

4.2.1. Réalisation de la SNV

La SNV est une technique chirurgicale relativement récente, accomplie généralement par un neurochirurgien et s'effectuant sous anesthésie générale, voire même locale. Cette chirurgie, qui dure approximativement de 30 minutes à une heure, consiste en l'implantation sous cutanée d'un petit générateur, similaire à un pacemaker, dans la région gauche du thorax du patient (figure 9). Une incision est alors pratiquée dans le cou et deux électrodes hélicoïdales sont enroulées autour du nerf vague gauche et connectées au stimulateur *via* un tunnel sous-cutané. Après une ou deux semaines de convalescence, le générateur peut être activé et programmé de façon non-invasive, à l'aide d'un dispositif appliqué à la paroi thoracique au dessus du stimulateur, qui permet de communiquer par télémétrie l'information du système de contrôle vers le stimulateur et de modifier les paramètres de stimulation au besoin. Les paramètres de stimulation susceptibles d'être modifiés sont l'intensité du courant (en milliampères), la fréquence de stimulation (en hertz), la durée de l'impulsion électrique (en microsecondes), ainsi que la durée des cycles de stimulation. Il est également possible d'activer ou de désactiver magnétiquement le stimulateur de façon temporaire. En effet, les patients sont pourvus d'un aimant qui, une fois apposé sur le stimulateur, entraîne l'arrêt immédiat de ce dernier, avec la capacité de redémarrer automatiquement, une fois l'aimant retiré, avec les mêmes réglages qu'auparavant. Cette procédure permet aux patients recevant la SNV de contrer momentanément les effets secondaires liés à la stimulation, comme les tremblements de la voix lors d'un discours en public, ou un léger essoufflement pouvant survenir lors d'exercices physiques intenses (George *et al.*, 2003).

Le générateur fonctionne grâce à une pile dont la durée de vie dépend de plusieurs facteurs, à savoir le modèle du générateur, les paramètres de stimulation employés,

l'impédance des électrodes, ainsi que la fréquence d'utilisation de l'aimant. Le modèle le plus récent, dénommé *Demipulse model 103* a une longévité d'environ 6 à 8 ans, après quoi il doit être remplacé.

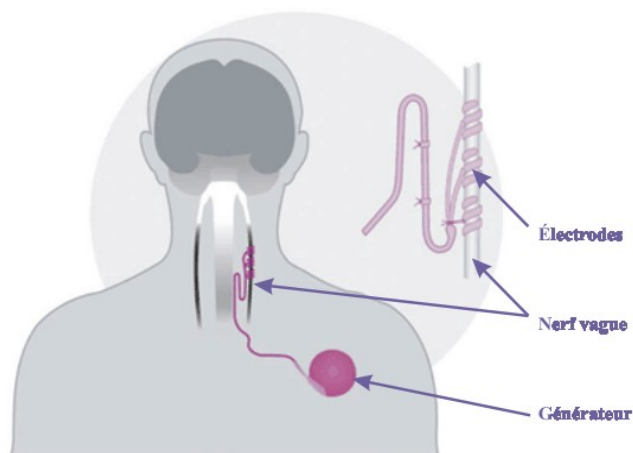


Figure 9. Dispositif d'implantation pour la SNV

Implantation, dans la région gauche du thorax du patient, d'un petit générateur connecté à des électrodes hélicoïdales enroulées autour du nerf vague gauche. L'ensemble de ce dispositif permet d'envoyer de petites impulsions électriques au nerf vague.

4.2.2. SNV et épilepsie

L'histoire de la SNV remonte au 19^{ème} siècle, lorsqu'un neurologue américain, James L. Corning, a constaté qu'une pression appliquée sur l'artère carotide en association avec une stimulation transcutanée du nerf vague avait la potentialité de stopper une crise convulsive. Cette technique n'a cependant pas été adoptée par les autres neurologistes et a été abandonnée à la fin du 19^{ème} siècle (Lanska, 2002). Quelques décennies plus tard, en 1938, Bailey and Bremer ont réintroduit la notion de SNV, en démontrant une synchronisation de l'activité du cortex orbital du chat lors de la stimulation du nerf vague

(Bailey & Bremer, 1938). De plus, des changements électroencéphalographiques corticaux et sous-corticaux ont été observés chez l'animal subissant une stimulation des afférences vagales (Zanchetti *et al.*, 1952; Chase *et al.*, 1966). Il devenait alors clair que la SNV avait le potentiel d'affecter l'excitabilité corticale. Finalement, en 1985, Zabara a démontré que la SNV pouvait bloquer les crises convulsives motrices induites expérimentalement chez le chien (Zabara, 1985a; Zabara, 1985b). En 1988, un dispositif de stimulation du nerf vague a été implanté pour la première fois chez l'humain, dans le but de traiter l'épilepsie réfractaire (Penry & Dean, 1990). Il s'en est suivi de nombreuses études cliniques.

Deux études pilotes ont ainsi été menées en simple-aveugle sur 14 patients souffrant de crises convulsives partielles et réfractaires aux traitements pharmacologiques (Uthman *et al.*, 1993). Chez ces patients, et tant à court qu'à long-terme, l'ajout de la SNV à leur médication usuelle, a induit une diminution de la fréquence des crises et n'a engendré que peu d'effets secondaires, limités à un enrrouement de la voix, de la toux et une sensation de gêne dans la gorge au moment même de la stimulation (Uthman *et al.*, 1993). Parallèlement, deux études multicentriques randomisées en double-aveugle (Ben-Menachem *et al.*, 1994; Handforth *et al.*, 1998) comptant au total 313 compléteurs ont été effectuées chez des patients souffrant d'épilepsie résistante. Un des buts de ces études était aussi de caractériser l'efficacité de paramètres de stimulation élevés (30 Hz, impulsions de 500 μ secondes, 30 secondes ON-5 minutes OFF), comparativement à des paramètres de stimulation plus faibles (1 Hz, impulsions de 130 μ secondes, 30 secondes ON-90 à 180 minutes OFF), sur une période de 12 à 16 semaines. Les résultats de chaque étude ont montré un meilleur impact de la SNV chez le groupe de patients traités avec des paramètres de stimulation élevés, avec une diminution de 30 % de la fréquence des crises convulsives chez ces sujets, alors que la réduction n'était que de 10 à 15% chez le groupe traité avec des paramètres de faibles intensités. Compte-tenu des résultats obtenus avec des

paramètres de stimulation adéquats, chez des sujets ne répondant pas à de nombreux traitements pharmacologiques, la SNV a été approuvée en 1994 en Europe et en 1997 par le Canada et les États-Unis, comme traitement additif pour l'épilepsie réfractaire.

Des études à long-terme ont par la suite démontré une augmentation de l'efficacité de la SNV avec le temps. En effet, les patients recevant la SNV peuvent atteindre un taux de réduction de leurs crises convulsives supérieur à 50 % après deux ou trois ans de traitement, avec des effets secondaires relatifs à la stimulation qui s'atténuent au cours du temps (Morris & Mueller, 1999). La SNV est ainsi devenue le traitement non pharmacologique le plus utilisé à travers le monde pour traiter l'épilepsie résistante aux médicaments.

Par ailleurs, il a été progressivement reconnu que la dépression est la comorbidité psychiatrique la plus commune chez les patients épileptiques (Wiegartz *et al.*, 1999; Harden, 2002; Kanner & Balabanov, 2002). Aussi, peu après son approbation pour l'épilepsie, des études préliminaires ont constaté une amélioration de l'humeur chez des patients souffrant d'épilepsie et recevant la SNV, et de façon encore plus intéressante, des améliorations survenaient également chez des sujets chez lesquels la SNV n'avait pas d'effet sur la fréquence des crises convulsives (Harden *et al.*, 2000; Klinkenberg *et al.*, 2011). Comme cette amélioration de l'humeur n'apparaissait pas corrélée à une amélioration de la qualité de vie résultant d'une baisse de la fréquence de crises convulsives, cela a conduit à évaluer le potentiel de la SNV pour le traitement de la dépression résistante.

4.2.3. SNV et dépression

4.2.3.1. La rationalité

D'autres facteurs ont contribué à l'idée d'étudier la SNV comme approche pour le traitement de la dépression résistante. Certes, l'amélioration de l'humeur chez les patients épileptiques recevant la SNV était un précieux indice (Harden *et al.*, 2000; Klinkenberg *et al.*, 2011). Ces observations concordaient également avec l'utilisation répandue d'anticonvulsivants (tels que la carbamazépine, l'acide valproïque ou encore la lamotrigine) comme stabilisateurs de l'humeur et/ou comme antidépresseurs chez des sujets souffrant de troubles bipolaires (Post *et al.*, 1996; Calabrese *et al.*, 1999). De plus, des études de neuroimagerie avaient préalablement montré des changements de l'activité fonctionnelle de structures cérébrales corticales et sous-corticales induits par la SNV, notamment dans des structures limbiques (Henry *et al.*, 1998), établissant alors un lien entre la SNV, l'humeur et les émotions. Ajoutées à ces éléments suggérant une action possible de la SNV comme traitement de la dépression, d'autres données ont mis en évidence un lien entre la SNV et les régions associées aux systèmes NA (Krahl *et al.*, 1998) et 5-HT (Ben-Menachem *et al.*, 1995), qui, nous l'avons vu précédemment, sont étroitement impliquées dans la pathophysiologie de la dépression et l'efficacité thérapeutique des antidépresseurs.

Diverses études, aussi bien cliniques que fondamentales, laissaient donc supposer une possible efficacité de la SNV pour le traitement des troubles de l'humeur, ce qui conduisit à son évaluation, en clinique, pour le traitement de la dépression résistante.

4.2.3.2. Études cliniques (Tableau I)

La première étude ouverte, multicentrique, de la SNV comme traitement de la dépression a été réalisée sur trente patients souffrant de dépression sévère non psychotique n'ayant pas répondu à un minimum de deux traitements antidépresseurs robustes. Un critère de sélection additionnel était que les patients devaient présenter, au moment de l'étude, un épisode dépressif majeur d'une durée minimale de deux ans, et avoir développé au cours de leur existence plus de quatre épisodes de ce type. Les patients, maintenus sous médications, ont été implantés d'un stimulateur et suivis pendant une période de dix semaines, dont huit durant lesquelles les paramètres de stimulation sont restés inchangés. La réponse de ces patients à la SNV a été évaluée sous forme d'une réduction de 50 % ou plus des résultats sur des échelles de dépression telles que la *Hamilton Depression Rating Scale* de 28 items (HDRS₂₈), la *Montgomery-Åsberg Depression Rating Scale* de 10 items (MADRS), ainsi que les échelles traduisant une impression clinique globale sur la sévérité de la pathologie (*Clinical Global Impression-Severity*; CGI-S) ou son amélioration (*Clinical Global Impression-Improvement*; CGI-I). Après dix semaines de SNV, les taux de réponse de ces patients ont atteint 40 % sur les échelles HDRS₂₈ et CGI, et 50 % sur l'échelle MADRS. De plus, un taux de rémission de 17 % a été observé en se basant sur l'HDRS₂₈ (Rush *et al.*, 2000). Cependant, en raison de la taille relativement faible de l'échantillon étudié, ces données restaient considérées comme des résultats préliminaires, tout en suggérant déjà fortement une efficacité de la SNV pour le traitement de la dépression résistante.

D'autres études plus vastes ont rapidement suivi. Ainsi, l'équipe du Dr Sackeim, en 2001, a agrandi la précédente étude en y incluant trente patients supplémentaires. Les taux de réponses des deux études combinées (classifiées étude D-01), après dix semaines de

SNV, se sont élevés à 31 % pour l'HDRS₂₈, 34 % pour le MADRS et 37 % en accord avec le CGI (Sackeim *et al.*, 2001). Cette étude avait également pour but de caractériser les effets secondaires éventuels de la SNV, lesquels se sont avérés être, principalement, une altération de la voix ou un enrrouement généralement mineurs et bien tolérés, en lien avec l'intensité du courant de stimulation. Les patients étaient également susceptibles d'expérimenter de la toux, des essoufflements lors d'exercices physiques intenses et une douleur dans la région du cou associée aux périodes de stimulation. Il importe aussi de mentionner que les effets indésirables généralement observés avec la prise d'antidépresseurs courants, à savoir la dysfonction sexuelle, la rétention urinaire, l'assèchement de la bouche et la prise de poids, n'ont pas été rapportés suite à la SNV. De plus, contrairement aux électrochocs, qui peuvent altérer les fonctions cognitives de façon néfaste, la SNV s'est avérée conduire à une amélioration de la cognition (Sackeim *et al.*, 2001).

Comme les études précédentes ont été menées sur une période de temps relativement courte, et compte-tenu de l'efficacité grandissante de la SNV au cours du temps observée chez les patients souffrant d'épilepsie (Morris & Mueller, 1999), les sujets issus de l'étude ouverte décrite ci-dessus ont ensuite été suivis durant deux ans. Après un an de SNV, le taux de réponse de ces patients déprimés est passé de 31 % (après trois mois) à 44 % (selon l'échelle HDRS₂₈), alors que le taux de rémission, qui était de 15 % à trois mois, a atteint 27 % après douze mois de SNV (Marangell *et al.*, 2002; Nahas *et al.*, 2005). Au bout de deux ans de SNV, les taux de réponse et de rémission n'ont pas augmenté davantage, cependant, les bénéfices acquis au bout d'un an de SNV se sont maintenus, alors que les effets secondaires de la stimulation ont quant à eux diminué (Nahas *et al.*, 2005).

Des résultats similaires ont également été obtenus récemment, lors d'une étude multicentrique européenne (l'étude D-03) conduite chez des patients souffrant de dépression majeure et résistant aux traitements. Ainsi, après trois mois de SNV, 37 % des patients ont atteint les critères de réponse sur l'échelle HDRS₂₈, et ce taux a augmenté à 53 % après douze et vingt-quatre mois de SNV. De même, le pourcentage de rémission obtenu est passé de 17 % à trois mois, à 33 % après douze mois, pour finalement atteindre 39 % après vingt-quatre mois de SNV (Schlaepfer *et al.*, 2008; Bajbouj *et al.*, 2010).

Les résultats positifs de ces études supportaient donc largement l'efficacité potentielle de la SNV pour traiter la dépression résistante aux traitements. Cependant, cet effet thérapeutique de la SNV se devait d'être confirmé par des études randomisées en double aveugle, telle que l'étude D-02, publiée en 2005 (Rush *et al.*, 2005a). Cette étude multicentrique a été réalisée selon les mêmes critères de résistance que les précédentes, sur un total de 235 patients dont 210 souffrant d'épisodes dépressifs majeurs non-psychotiques et 25 présentant la phase dépressive des troubles bipolaires. Tous les sujets ont été implantés avec le dispositif de la SNV, mais le stimulateur n'a été activé que chez la moitié d'entre eux. À la fin de la période de stimulation de dix semaines, aucune différence significative n'a pu être discernée entre le groupe recevant la SNV, dont le taux de réponse s'élevait à 15 %, et le groupe témoin (sham), qui a obtenu un taux de réponse de 10 %. Toutefois, une amélioration significative dans l'échelle d'inventaire subjectif de la symptomatologie dépressive (*Inventory of Depressive Symptomatology Self-Report*) a été rapportée dans le groupe actif pour la SNV par rapport au groupe non stimulé (17 % versus 7 %, respectivement). Cette unique étude en double-aveugle n'a donc pas permis de confirmer l'efficacité à court-terme de l'ajout de la SNV chez les patients atteints de dépression résistante. Cependant, diverses raisons pourraient expliquer ce résultat négatif. Un mauvais dosage de la stimulation comparativement aux études D-01 et D-03 pourrait

être en cause (moyenne de stimulation de 0.67 ± 0.33 mA dans D-02 *versus* 0.96 ± 0.54 mA et 1.2 ± 0.3 mA pour D-01 et D-03, respectivement), mais également la durée relativement courte de l'essai clinique. Aussi, à la fin de la période de dix semaines de l'étude D-02, les patients du groupe sham ont eu leur stimulateur activé pour une période de douze mois, et les patients ayant déjà reçu la SNV pendant trois mois ont reçu neuf mois de traitement additionnel. Durant cette période, tant les traitements antidépresseurs que les paramètres de stimulation de la SNV pouvaient être ajustés. L'étude a alors montré un taux de réponse de 27 % et un taux de rémission de 16 %, révélant ainsi une réduction significative des symptômes de dépression et suggérant une meilleure efficacité de la SNV à long-terme pour le traitement de la dépression résistante (Rush *et al.*, 2005b). Afin de déterminer si les bénéfices obtenus chez ces patients étaient réellement attribuables à la SNV et non aux modifications apportées à leur pharmacothérapie, les données précédentes sur les effets à douze mois de la SNV associée aux traitements usuels (SNV+TAU; TAU pour *treatment as usual*) ont été comparées à celles des patients recevant uniquement TAU (étude D-04). Chaque groupe a reçu des TAU similaires, qu'il s'agisse de médicaments ou d'électrochocs, durant toute la période de suivi. Les taux de réponses obtenus sur l'échelle HDRS de 24 items ont été de 27 % pour le groupe SNV+TAU et de 13 % pour le groupe TAU, démontrant alors que la SNV+TAU avait une meilleure efficacité thérapeutique après cette période de douze mois (George *et al.*, 2005). Il est également intéressant de noter, qu'en dépit d'une grande gamme de traitements disponibles pour la dépression, les taux de réponse et de rémission, ainsi que la qualité de vie de la plupart des patients ayant un degré de résistance important, ont une très faible probabilité de se maintenir, même après deux ans de TAU et toutes stratégies thérapeutiques confondues (Dunner *et al.*, 2006). Par exemple, même lorsque que les critères de rémission sont atteints avec un traitement aux électrochocs, la probabilité de rechute dans les douze mois suivants est

évaluée à 60-70 % chez les patients n'ayant pas répondu au préalable à un ou plusieurs traitements antidépresseurs (Sackeim *et al.*, 1990). En revanche, parmi les 30 % de patients ayant répondu à la SNV au cours de la première année, environ les deux-tiers ont maintenu les bénéfices cliniques acquis au préalable durant les vingt-et-un mois de suivi, ce qui représente un taux remarquablement élevé, compte-tenu du fort degré de résistance aux antidépresseurs des patients impliqués dans cette étude (Sackeim *et al.*, 2007).

Tableau 1. Études cliniques de la SNV dans le traitement de la dépression résistante.

Étude	Auteurs	Type	Nb de patients	Durée	Taux de réponse *	Taux de rémission *
	Rush <i>et al</i> , 2000	Étude ouverte	30	10 semaines	40 %	17 %
	Marangell <i>et al</i> , 2002	Étude ouverte	30	12 mois	46 %	29 %
D-01	Sackeim <i>et al</i> , 2001	Étude ouverte	59	10 semaines	31 %	15 %
	Nahas <i>et al</i> , 2005	Étude ouverte	59	12 mois 24 mois	44 % 42 %	27 % 22 %
D-02	Rush <i>et al</i> , 2005a	Étude randomisée en double-aveugle	112 SNV active 110 Sham	10 semaines	SNV active 15.2 % Groupe Sham 10 %	- -
	Rush <i>et al</i> , 2005b	Étude ouverte	202	12 mois	27 %	16 %
D-03	Shlaepfer <i>et al</i> , 2008	Étude ouverte	74	3 mois 12 mois	37 % 53 %	17 % 33 %
	Bajbouj <i>et al</i> , 2010	Étude ouverte	49	24 mois	53 %	39 %
D-04	George <i>et al</i> , 2005	Étude ouverte	205 SNV +TAU	12 mois	27 %	-
			124 TAU		13 %	-

* Taux de réponse et rémission selon les échelles HDRS de 24 or 28-item

SNV = Stimulation du nerf vague

TAU = Traitement usuel

Finalement, la SNV, qui avait déjà été acceptée en Europe et au Canada depuis 2001, a donc été approuvée aux États-Unis par la *Food and Drug Administration* en 2005, en tant que thérapie adjointe pour le traitement de la dépression non-psychotique unipolaire ou bipolaire chez des patients n'ayant pas répondu à au moins quatre formes de traitement aux antidépresseurs.

4.2.3.3. Mécanismes d'action

Bien que la SNV se soit avérée efficace en clinique pour le traitement de la dépression réfractaire, les mécanismes d'action responsables de cet effet étaient encore méconnus et ne sont d'ailleurs toujours pas complètement élucidés. Une grande partie des travaux de cette thèse a donc visé une caractérisation de ces mécanismes d'actions, qui seront discutés plus en détails ultérieurement. En guise d'introduction à ces travaux, il est quand même intéressant de rappeler les données dont nous pouvions disposer au moment où ils ont été entrepris.

Études de neuroimageries

Les études d'imageries cérébrales fonctionnelles ont fourni des indices sur les mécanismes d'actions potentiels de la SNV, que ce soit pour le traitement de l'épilepsie ou pour celui de la dépression, en identifiant les diverses régions cérébrales dont cette thérapie modifie l'activité.

Avant même que la SNV ne soit étudiée pour le traitement de la dépression résistante, des études d'imagerie par TEP avaient déjà démontré des diminutions significatives du flux sanguin cérébral, équivalant à une réduction de l'activité métabolique, dans des structures limbiques telles que l'amygdale, l'hippocampe et le gyrus

cingulaire (Henry *et al.*, 1998). Or, ces structures cérébrales sont impliquées dans la régulation de l'humeur. En effet, d'autres études TEP effectuées chez des patients dépressifs traités aux antidépresseurs ISRS, fluoxétine ou sertraline, ont montré qu'un traitement chronique avec ces molécules, ainsi que la réponse clinique au traitement étaient associés à des diminutions limbiques et sous-corticales et des augmentations corticales du métabolisme du glucose cérébral (Mayberg *et al.*, 2000; Drevets *et al.*, 2002). De même, une autre étude en TEP, chez quatre patients souffrant de dépression réfractaire, a montré une augmentation du flux sanguin cérébrale régional dans certaines aires corticales, telles que le cortex orbitofrontal bilatéral, le cortex cingulaire bilatéral ainsi que le cortex frontal médian et supérieur droit lors de la SNV en aigu (Conway *et al.*, 2006). Les effets à long terme de la combinaison de la SNV avec les antidépresseurs usuels ont également été explorés chez des patients déprimés. Comme lors des études pharmacologiques décrites précédemment, la technique de tomographie par émission mono-photonique (TEMP) a révélé après quatre semaines de SNV une diminution du flux sanguin cérébral régional dans le système limbique et ses régions associées, à savoir l'hippocampe, l'amygdale, le cortex cingulaire ventral antérieur et subgenuel, le cortex orbitofrontal postérieur et les lobes temporaux antérieures inférieures (Mayberg *et al.*, 2000; Drevets *et al.*, 2002; Zobel *et al.*, 2005). Seul le gyrus frontal moyen présentait une augmentation du débit sanguin dans cette étude, or, l'activité métabolique de cette région cérébrale augmente également chez les patients répondants aux traitements antidépresseurs (Mayberg *et al.*, 2000; Kennedy *et al.*, 2001; Zobel *et al.*, 2005). Après dix semaines de SNV, le débit sanguin est également augmenté dans le cortex préfrontal dorsolatéral/ventromédian, lequel a déjà été associé à une amélioration de la dépression (Kosel *et al.*, 2011).

Une étude d'imagerie par résonance magnétique fonctionnelle (IRMf), profitant d'une plus grande résolution spatiale et temporelle, a montré des changements dans

l'hypothalamus, le cortex orbitofrontal, l'amygdale, l'hippocampe, le cortex préfrontal médian et le gyrus cingulaire lors de la SNV chez des patients dépressifs (Bohning *et al.*, 2001). D'autres études d'IRMf ont également été effectuées pour examiner les changements immédiats de l'activité cérébrale lors de l'application de différents paramètres de SNV (Lomarev *et al.*, 2002; Mu *et al.*, 2004), lesquels seront discutés plus amplement ultérieurement (paragraphe 3.2.4).

Ainsi, alors que la dépression est généralement associée à une hypoactivité frontale accompagnée d'une hyperactivité de certaines structures limbiques, les études d'imageries cérébrales montrent globalement un effet contraire de la SNV sur l'activité métabolique de ces régions, mettant alors en relief l'effet antidépresseur potentiel de cette thérapie.

Études neurochimiques et électrophysiologiques

Parmi les différentes données suggérant un rôle de la SNV dans le traitement de la dépression résistante, certaines ont démontré une contribution des régions cérébrales associées au système NA et 5-HT, respectivement le LC et le NRD, aux effets de cette stimulation. En effet, une lésion du LC, qui représente la source principale de NA dans le cerveau, supprime l'effet anticonvulsif de la SNV chez le rat, suggérant alors une implication majeure de la NA dans l'action antiépileptique de la SNV (Krahl *et al.*, 1998). D'autre part, alors que le métabolite principal de la 5-HT, le 5-HIAA, serait diminué dans le liquide céphalorachidien (LCR) de certains patients atteints de dépression (Schildkraut, 1974; Gibbons & Davis, 1986), une augmentation de 33 % de ce composé a été observée dans le LCR de patients déprimés soumis à trois mois de SNV (Ben-Menachem *et al.*, 1995). Une autre étude, réalisée sur vingt-et-un patients dépressifs résistant aux traitements conventionnels, n'a pas révélé de changement significatif de la NA ou du 5-HIAA dans le

LCR après douze ou vingt-quatre semaines de SNV par rapport à un groupe témoin. Cependant, une augmentation de HVA associée à la SNV a été rapportée chez ces sujets (Carpenter *et al.*, 2004) alors que la concentration de ce métabolite est souvent plus faible dans le LCR des sujets souffrant de troubles dépressifs (Lambert *et al.*, 2000; Mitani *et al.*, 2006).

C'est à la suite de ces études qu'ont été entreprises les premières recherches fondamentales visant à comprendre le mode d'action de la SNV spécifiquement en relation avec la dépression.

Ainsi, des rats implantés d'un stimulateur du nerf vague ont été soumis au test de la nage forcée (Krahl *et al.*, 2004; Cunningham *et al.*, 2008), lequel possède une validité prédictive de l'action clinique des antidépresseurs (Lucki, 1997). La diminution significative du temps d'immobilité des rats recevant la SNV dans ce modèle était une première démonstration de l'effet de type antidépresseur induit par la SNV chez l'animal (Krahl *et al.*, 2004; Cunningham *et al.*, 2008). Des études électrophysiologiques chez le rat ont ensuite exploré l'effet de la SNV sur l'activité électrique basale des neurones NA et 5-HT du LC et du NRD, respectivement. Ainsi, il a été montré qu'une heure de SNV était suffisante pour augmenter significativement le taux de décharge des neurones NA du LC, alors que 14 jours de stimulation étaient nécessaires pour observer ce phénomène dans le cas des neurones 5-HT (Groves *et al.*, 2005; Dorr & Debonnel, 2006). Une élévation additionnelle de la fréquence de décharge des neurones 5-HT et NA a également été rapportée après 90 jours de stimulation (Dorr & Debonnel, 2006), reflétant l'effet observé dans les études cliniques où la sévérité des symptômes sur l'échelle de dépression HDRS, tend à diminuer progressivement avec le temps, suggérant une amélioration dépendante de la durée de stimulation (Marangell *et al.*, 2002; Nahas *et al.*, 2005; Bajbouj *et al.*, 2010).

Cette même étude électrophysiologique a également révélé que la SNV n'entraîne aucune désensibilisation des autorécepteurs somatodendritiques 5-HT_{1A} et α_2 -adrénergiques (Dorr & Debonnel, 2006), suggérant la mise en œuvre de mécanismes d'actions alternatifs pour expliquer l'augmentation de l'activité électrique des neurones NA et 5-HT. Ces premières données ont été le principal point de départ du projet de cette thèse.

4.2.4. Paramètres de stimulation de la SNV

Le dispositif de stimulation de la SNV est multi-programmable et les paramètres de stimulation incluent l'intensité du courant (en milliampères), la fréquence de stimulation (en Hertz), la durée de l'impulsion (en μ secondes) et les périodes ON et OFF de stimulation. Ces paramètres peuvent être modifiés pour chaque patient, afin de maximiser l'efficacité de la SNV sur la pathologie en cause.

En 1992, une étude fondamentale a été conduite sur des chiens, afin de déterminer, à l'aide d'enregistrements électroencéphalographiques et électromyographiques, les paramètres de la SNV les plus efficaces contre l'épilepsie (Zabara, 1992). Les mêmes paramètres ont ensuite été employés dans les essais cliniques initiaux pour l'épilepsie (Ben-Menachem *et al.*, 1994; Handforth *et al.*, 1998), puis lors des études cliniques réalisées sur les patients souffrant de dépression (George *et al.*, 2000a; George *et al.*, 2000b; Rush *et al.*, 2000; Sackeim *et al.*, 2001).

Les études cliniques ont également montré qu'une modification des paramètres de stimulation pouvait accroître l'efficacité de la SNV chez les patients réfractaires et/ou modifier son impact sur les fonctions cérébrales. Ainsi, les changements observés par imagerie cérébrale chez les patients dépressifs, étaient plus marqués dans certaines régions du cerveau lorsque la SNV était appliquée à une fréquence de 20 Hz plutôt que 5 Hz (Lomarev *et al.*, 2002). De la même manière, une durée d'impulsion électrique de 130

microsecondes était insuffisante pour activer diverses régions cérébrales comparativement à des impulsions de 250 ou 500 microsecondes (Mu *et al.*, 2004).

À ce jour, les réglages thérapeutiques typiques pour traiter la dépression résistante sont une intensité de courant variant entre 1 et 1.5 milliampères, une fréquence généralement de 20 Hertz, une durée d'impulsion électrique variant entre 250 et 500 microsecondes et un cycle de stimulation recommandé de 30 secondes ON suivi de 5 minutes OFF (Labiner & Ahern, 2007).

4.2.5. Autres applications cliniques de la SNV

En plus de son efficacité prouvée et de son utilisation dans le traitement de la dépression et de l'épilepsie réfractaire, il est possible que la SNV possède également un potentiel thérapeutique pour d'autres conditions pathologiques. En effet, certaines études ont suggéré que la SNV puisse jouer un rôle dans la modulation de la douleur (Bohotin *et al.*, 2003a; Bohotin *et al.*, 2003b), améliorer les fonctions cognitives des sujets atteints de la maladie d'Alzheimer (Sjogren *et al.*, 2002; Merrill *et al.*, 2006), être bénéfique pour le traitement des migraines (Hord *et al.*, 2003; Mauskop, 2005), de l'obésité (Pardo *et al.*, 2007) et de l'anxiété résistante (George *et al.*, 2008).

Une telle variété de champs d'application clinique pourrait refléter la vaste étendue des fonctions du nerf vague et mérite d'être davantage étudiée.

5. Objectifs

5.1. Caractérisation des mécanismes d'action de la SNV dans le traitement de la dépression

Compte-tenu de la rareté des données précliniques alors présentes concernant le mode d'action de la SNV dans le traitement de la dépression, le premier objectif de cette thèse était de caractériser les mécanismes d'action de la SNV en tant que traitement antidépresseur, à l'aide de techniques d'électrophysiologie et de microdialyse chez le rat. L'hypothèse qui a guidé ce travail était celle d'une implication des trois systèmes monoaminergiques, déjà mis en cause dans la pathophysiologie de la dépression et l'efficacité thérapeutique des antidépresseurs.

5.2. Optimisation des paramètres de stimulation de la SNV

Considérant l'effet de la SNV sur l'activité électrique des neurones 5-HT du NRD, le second but de cette thèse a été de caractériser et d'optimiser les paramètres de SNV en fonction du taux de décharge des neurones 5-HT chez le rat, dans l'hypothèse de pouvoir ainsi améliorer l'efficacité de la SNV lors de son utilisation comme adjuvant pour le traitement de la dépression résistante.

II. MATÉRIEL ET MÉTHODES

1. Animaux

Toutes les expériences ont été réalisées sur des rats mâles adultes de souche Sprague Dawley (Charles River, Canada), pesant un minimum de 275 grammes au moment de l'implantation du dispositif de SNV. Après la chirurgie, les rats ont été placés dans des cages individuelles et gardés dans des conditions standards de laboratoire (cycle lumière/obscurité de douze heures et accès illimité à l'eau et à la nourriture). La température corporelle des animaux a été maintenue à 37° Celsius au cours des chirurgies et tout au long des expériences d'électrophysiologie et de microdialyse. Toutes les procédures expérimentales ont été conformes aux directives du Conseil Canadien de Protection des Animaux et du Comité local de Protection des Animaux.

2. Chirurgie

Les rats sont opérés sous équithésine (mélange comprenant 4.26 % d'hydrate de chloral et 0.96 % de pentobarbital sodique) à raison de 1 ml par 300 g de rat en intra péritonéal (i.p.). Des doses supplémentaires d'équithésine sont injectées, 0.1 ml à la fois, afin de maintenir une anesthésie constante et prévenir une quelconque réaction nociceptive en réponse au pincement d'une patte. Une incision horizontale est pratiquée à l'avant du cou et la peau et les muscles sont méticuleusement séparés. Le nerf vague gauche, accolé à l'artère carotide, peut alors être isolé. Les électrodes hélicoïdales sont enroulées autour du nerf vague gauche et de l'artère carotide, afin de permettre un meilleur contact entre le nerf et les électrodes, et suturées aux muscles adjacents pour les maintenir en place. L'extrémité des électrodes est ensuite connectée au stimulateur par l'intermédiaire d'un tunnel sous-cutané rejoignant une incision dorsale dans laquelle le stimulateur est inséré dans une

poche sous-cutanée. Les animaux du groupe témoin (sham) subissent la même procédure chirurgicale, mais avec l'implantation d'un stimulateur factice. L'impédance des électrodes est vérifiée après chaque opération et avant chaque expérimentation, afin de s'assurer d'une étroite connexion entre le nerf et les électrodes, grâce au dispositif de programmation et de diagnostic communiquant par télémétrie les informations issues du générateur vers un système de contrôle informatisé et vice versa. Après deux jours de récupération, le stimulateur est activé chez les rats recevant la SNV, et programmé avec les paramètres de stimulation couramment utilisés en clinique pour la dépression (0.25 mA, 20 Hz, impulsion de 500 μ secondes et 30 secondes de stimulation toutes les 5 minutes) ou les différents paramètres détaillés dans le matériel et méthodes de chaque étude.

3. Électrophysiologie

Toutes les expériences d'électrophysiologie ont été effectuées avec le stimulateur de la SNV en place, mais inactivé à l'aide d'un aimant, afin d'éviter toute interférence électrique avec le matériel d'enregistrement. Les rats sont anesthésiés à l'hydrate de chloral à raison de 400 mg/kg i.p. et montés sur un appareil stéréotaxique. Les enregistrements unitaires extracellulaires utilisent des micropipettes de verre simples ou à plusieurs canaux, en fonction de la structure étudiée. Cette technique d'électrophysiologie permet d'enregistrer l'activité électrique basale d'un neurone à la fois chez l'animal vivant.

3.1. Enregistrements des neurones 5-HT du NRD

Pour l'enregistrement des neurones 5-HT du NRD, une microélectrode à simple canal est positionnée selon les coordonnées stéréotaxiques suivantes (en mm par rapport au point lambda) : antéro-postériorité (AP), de + 0.8 à + 1.2 ; latéralité (L), de 0 à ± 0.1 ; ventralité (V) de -5 à -7 depuis la surface du cerveau.

Les neurones enregistrés sont identifiés comme étant 5-HT selon les critères établis par Aghajanian et Vandermaelen (Aghajanian & Vandermaelen, 1982), à savoir un taux de décharge relativement lent (0.5-2.5 Hz) et régulier, avec une composante positive du potentiel d'action (PA) relativement longue (0.8-1.2 msec) et une forme globale bi- ou triphasique.

Les neurones 5-HT sont également susceptibles de décharger en bouffées, qui consiste la plupart du temps en doublets ou en triplets de PA, avec un intervalle très court entre les PA, inférieur à 10 msec (Hajos *et al.*, 1995). Ce mode de décharge en bouffées est censé augmenter la quantité de 5-HT libérée comparativement au même nombre de PA survenant à intervalle régulier (Gartside *et al.*, 2000).

Le degré d'activation des récepteurs postsynaptiques α_1 -adrénergiques présents sur le soma des neurones 5-HT du NRD a été évalué en mesurant la réponse inhibitrice de ces neurones suite à l'injection intraveineuse de différentes doses de l'antagoniste spécifique de ces récepteurs, le prazosin, *via* un cathéter préalablement inséré dans une veine latérale de la queue du rat.

3.2. Enregistrements des neurones DA de l'ATV

L'enregistrement des neurones DA de l'ATV requiert le positionnement d'une microélectrode à simple canal aux coordonnées stéréotaxiques suivantes (en mm par

rapport au point lambda) : AP, de + 3 à + 3.8 ; L, de +0.6 à + 0.8 ; V, de -6.5 à -9 depuis la surface du cerveau.

Les neurones sont identifiés comme DA à l'aide de critères électrophysiologiques bien établis *in vivo*, à savoir, une fréquence de décharge régulière et comprise entre 0.5 et 9 Hz ; un PA typique triphasique, avec une déflexion négative marquée ; un PA de longue durée (supérieure à 2.5 msec) avec généralement la présence d'une inflexion ou 'notch' sur la phase ascendante positive, et un pattern de décharge irrégulier alternant des PA simples ou regroupés en bouffées (Grace & Bunney, 1983). Un critère additionnel caractéristique est la durée entre le début du PA et sa phase négative, qui doit excéder 1.1 msec (Ungless *et al.*, 2004).

Le mode de décharge en bouffées des neurones DA peut contenir de 2 à 10 PA dans une même salve. Le début d'une bouffée, aussi bien pour les neurones DA que NA, est caractérisé par l'apparition de deux PA séparés par un intervalle inférieur à 80 msec. La fin de la bouffée est définie par un intervalle entre PA supérieur à 160 msec (Grace & Bunney, 1984). Des études ont montré qu'un mode de décharge en bouffée augmente la libération de NA (Florin-Lechner *et al.*, 1996) ou DA (Gonon, 1988) comparativement à une même fréquence de décharge comportant des PA simples seulement.

3.3. Enregistrements des neurones pyramidaux CA3 de l'hippocampe

L'enregistrement des neurones pyramidaux hippocampiques nécessite l'utilisation d'une micropipette de verre à 5 canaux. Le canal central est rempli d'une solution saline à 2 M servant à l'enregistrement unitaire. Les canaux latéraux servent à l'application microiontophorétique de diverses substances, telles que la 5-HT, la NA, le quisqualate ou du NaCl pour balancer le courant. La micropipette est ensuite descendue aux coordonnées

stéréotaxiques suivantes (en mm par rapport au point lambda) : AP, de + 4 à + 4.2 ; L, de +4 à +4.4 ; V, de -3.5 à -4.5 depuis la surface du cerveau.

Étant donné que les neurones pyramidaux ne déchargent pas spontanément chez les rats anesthésiés à l'hydrate de chloral, un faible courant de quisqualate est éjecté de manière à activer ces neurones à un niveau équivalant à leur taux de décharge physiologique (10-15 Hz ; Ranck, 1973). Les neurones pyramidaux sont identifiés par la grande amplitude de leur PA (0.5-1.2 mV), leur longue durée (0.8-1.2 ms) et la présence de PA simples alternant avec des complexes de PA (Kandel & Spencer, 1961).

Lorsqu'un neurone pyramidal est identifié, sa réponse à l'application microiontophorétique de NA et 5-HT peut être mesurée. À cette fin, différents courants de 5-HT et NA (5, 10, 20 nA) sont éjectés durant 50 sec et l'inhibition qui en résulte est déterminée par le nombre de PA supprimés par nA et par Hz. Cette donnée permet d'évaluer la sensibilité des hétérorécepteurs 5-HT_{1A} pour la 5-HT et α_2 - et α_1 -adrénergiques pour la NA.

Le degré d'activation des hétérorécepteurs 5-HT_{1A} est quant à lui mesuré grâce à l'utilisation d'un antagoniste sélectif des récepteurs 5-HT_{1A}, le WAY-100635. Chez le rat contrôle anesthésié, l'injection systémique de WAY-100635 est sans effet sur le taux de décharge des neurones pyramidaux de l'hippocampe, indiquant l'absence d'activation tonique des hétérorécepteurs 5-HT_{1A}. Cependant, suite à un traitement à long-terme aux antidépresseurs (Haddjeri *et al.*, 1998b; El Mansari *et al.*, 2005; Chernoloz *et al.*, 2011; Ghanbari *et al.*, 2011), l'injection de WAY-100635 provoque une augmentation du taux de décharge des neurones pyramidaux de l'hippocampe dorsal, ce qui montre que les traitements ont induit une élévation de l'activation tonique des hétérorécepteurs 5-HT_{1A}. Au cours de nos expériences, quelques minutes avant l'injection du WAY-100635, le taux de décharge du neurone pyramidal testé est abaissé à environ 5 Hz (par un courant

d'éjection plus faible de quisqualate), de manière à pouvoir détecter tout changement de son activité électrique. Le WAY-100635 est ensuite administré *via* un cathéter préalablement placé dans la veine latérale de la queue du rat, et le taux de décharge du neurone pyramidal est mesuré.

Le degré d'activation des récepteurs postsynaptiques α_2 - et α_1 -adrénergiques est caractérisé de la même façon, à l'aide d'antagonistes spécifiques, l'idazoxan et le prazosin respectivement.

4. Microdialyse *in vivo*

4.1. Microdialyse conventionnelle

La technique de microdialyse *in vivo* permet de mesurer la concentration extracellulaire en neurotransmetteurs dans une région cérébrale d'intérêt, grâce à l'introduction d'une membrane semi-perméable dans cette zone, au travers de laquelle les molécules peuvent migrer par diffusion passive selon leur gradient de concentration. Tel que pour les enregistrements électrophysiologiques, les rats anesthésiés à l'hydrate de chloral à raison de 400 mg/kg i.p. sont montés sur un appareil stéréotaxique. La canule de microdialyse est descendue aux coordonnées stéréotaxiques suivantes (en mm par rapport au point lambda) : AP, +1.1 ; L, 0 ; V, -7 pour le NRD, AP, +4 ; L, +4.8 ; V, -6 pour l'hippocampe, AP, +12.7 ; L, +0.6 ; V, -4.6 pour le cortex préfrontal et AP, +11 ; L, +1.5 ; V, -8 pour le noyau accumbens. Différentes longueurs de membrane sont utilisées selon la structure étudiée, à savoir une longueur de 1 mm pour le NRD, 2 mm pour le noyau accumbens et 3 mm pour l'hippocampe et le cortex préfrontal.

Une fois implantée, la canule est perfusée continuellement avec du liquide céphalorachidien artificiel, à raison de 1 μ l/minute. Après 2 heures de stabilisation, des

échantillons de 30 μ l sont collectés toutes les 30 minutes durant 3 heures, afin d'y mesurer la concentration extracellulaire en 5-HT, NA ou DA.

Les dialysats collectés sont ensuite analysés par un système de chromatographie en phase liquide à haute performance couplée à un détecteur électrochimique. Cette technique d'analyse permet la séparation des différents composants de l'échantillon en fonction de leur taille et de leur hydrophobicité (pour les détails, voir la section matériel et méthode de l'étude II).

4.2. Zero net flux

La méthode du zéro net flux (ZNF), plus sensible que la microdialyse conventionnelle, a été utilisée pour évaluer la concentration basale en 5-HT dans l'hippocampe et le cortex préfrontal. La procédure initiale est identique à celle de la microdialyse conventionnelle, sauf qu'après avoir collecté 5 fractions pour déterminer le niveau basal de 5-HT, des concentrations croissantes de 5-HT exogène (5, 10 et 20 nM) sont perfusées localement *via* la canule. Les concentrations en 5-HT des dialysats obtenus ($[5\text{-HT}]_{\text{out}}$) aux différentes concentrations de 5-HT exogène perfusées ($[5\text{-HT}]_{\text{in}}$) sont utilisées pour construire une courbe de régression linéaire. Le changement net entre la quantité de 5-HT injectée et celle collectée ($[5\text{-HT}]_{\text{in}} - [5\text{-HT}]_{\text{out}}$) se trouve ainsi représenté en ordonnée et la quantité de 5-HT injectée en abscisse. La concentration basale est estimée comme celle à laquelle $[5\text{-HT}]_{\text{in}} - [5\text{-HT}]_{\text{out}}$ est égale à zéro, soit le point d'équilibre pour lequel il n'y a pas de diffusion nette de 5-HT à travers la membrane de la canule (Guiard *et al.*, 2008a).

Lésion noradrénergique

Une lésion sélective des neurones noradrénergiques a été produite par injection intra-péritonéale d'une seule dose de DSP-4 (N(2-chloroethyl)-N-ethyl-2-bromobenzylamine), à raison de 50 mg/kg, 5 jours avant l'implantation du dispositif de SNV. Tel que décrit dans des études antérieures, cette dose de DSP-4 induit une diminution drastique des niveaux de NA dans de nombreuses régions cérébrales et notamment l'hippocampe (91 %) et le cortex cérébral (86 %; Logue *et al.*, 1985), en détruisant sélectivement les axones du LC (Grzanna *et al.*, 1989). L'utilisation de cette toxine est également judicieuse du fait qu'elle n'affecte pas en soit l'activité électrique des neurones 5-HT du NRD (Gobbi *et al.*, 2007; Haddjeri & Blier, 2008).

III. ÉTUDES

1. Étude I

Cette étude a été publiée en 2009 dans le *Journal of Psychiatry and Neuroscience* 34(4):272-280.

ENHANCEMENT OF THE FUNCTION OF RAT SEROTONIN AND NOREPINEPHRINE NEURONS BY SUSTAINED VAGUS NERVE STIMULATION

Stella Manta, Jianming Dong, Guy Debonnel et Pierre Blier

Contributions des co-auteurs:

Cette étude a été élaborée par le Dr Guy Debonnel.

Toutes les données ont été collectées par Stella Manta et Jianming Dong.

Les résultats ont été analysés par Stella Manta et Pierre Blier.

Le manuscrit a été écrit par Stella Manta et revu puis approuvé par Pierre Blier.

Title page

**ENHANCEMENT OF THE FUNCTION OF RAT SEROTONIN AND
NOREPINEPHRINE NEURONS BY SUSTAINED
VAGUS NERVE STIMULATION**

Stella Manta,¹ Jianming Dong,² Guy Debonnel,^{2,+} Pierre Blier^{1,2}

1.1. Abstract

Objective. Vagus nerve stimulation (VNS) is a recent intervention for treatment-resistant depression. Electrophysiological recordings in the rat brain showed that VNS increases the firing rate of noradrenaline (NE) neurons after only one day of stimulation, and that of serotonin (5-HT) neurons after 14 days. This study was carried out to further characterize these effects.

Methods. Rats were implanted with a VNS electrode and stimulator. DSP-4 was used to lesion NE neurons of the locus coeruleus. Dorsal raphe 5-HT neurons were recorded under chloral hydrate anesthesia. Hippocampus CA₃ pyramidal neurons were recorded using five-barreled-iontophoretic pipettes.

Results. Analysis of a previously published data set revealed that not only were spontaneous firing rates of NE neurons increased by VNS, but as well the percentage of neurons firing in bursts. The enhancement of 5-HT neurons firing rate by VNS was abolished by lesioning NE neurons. VNS increased the degree of activation of postsynaptic α_1 -adrenoceptors on 5-HT neurons, probably through an increased release of endogenous NE. The tonic activation of postsynaptic 5-HT_{1A} receptors in the hippocampus was enhanced after 14 days of VNS, as for other antidepressant treatments.

Conclusion. VNS initially increases the firing activity and pattern of NE neurons, and subsequently those of 5-HT neurons, presumably as a cascade effect *via* α_1 -postsynaptic adrenoceptors. To date, VNS appears to be a unique antidepressant treatment increasing 5-HT transmission as well as robustly enhancing the firing activity of NE neurons. These effects could contribute to the effectiveness of VNS in treatment-resistant depression.

1.2. Introduction

The vagus nerve is usually considered as a parasympathetic efferent nerve. However, this nerve is in fact composed of about 80% afferent sensory fibres carrying information to the brain (Foley & Dubois, 1937). Stimulating the afferent fibres has proven to be effective as an antiepilepsy treatment modality (Buoni *et al.*, 2004) and vagus nerve stimulation (VNS) has become the most widely used non-pharmacological treatment for refractory epilepsy. Mood improvement was observed in epileptic patients treated with VNS, even in those with no change in seizure frequency (Elger *et al.*, 2000; Schachter, 2004), suggesting that VNS might have antidepressant effects. Clinical studies in patients with treatment-resistant depression and without epilepsy found a 31% response rate and 15% remission rate after 10 weeks of VNS treatment (Sackeim *et al.*, 2001). These response and remission rates were sustained at one year (Marangell *et al.*, 2002) and improved two years after surgery (Nahas *et al.*, 2005). In a recent open label study, VNS has shown again antidepressant efficacy in patient with treatment-resistant depression with the level of clinical response increased to 53% and the remission rates reached 33% after one year of treatment (Schlaepfer *et al.*, 2008). Recently, it has been shown that VNS produces an antidepressant-like effect in the forced-swim test in rat (Krahl *et al.*, 2004) with approximately the same efficacy as that of the tricyclic antidepressant desipramine and electroconvulsive shock (ECS). VNS therapy was approved for use in drug-resistant depression in 2001 in both Canada and Europe and by the Food and Drug Administration (FDA) in the United States in July 2005, but further clinical trials are needed to ascertain its degree of effectiveness in major depression (Daban *et al.*, 2008).

The mechanism of action for this therapy is not fully understood. However, it is believed to be mediated by the central projections of the vagus nerve *via* the nucleus of the

tractus solitarius (NTS), which in turn innervates multiple brain areas implicated in mood regulation. Functional neuroimaging studies have confirmed that VNS alters the activity of many of such cortical and subcortical regions (Chae *et al.*, 2003). It is well established that the antidepressant efficacy of medications is mediated through monoaminergic neurotransmission, primarily the serotonin (5-HT) and/or norepinephrine (NE) systems.

Serotonin neurons are mainly concentrated in the dorsal raphe nucleus (DRN) and the median raphe nuclei and project throughout the brain. In turn, 5-HT acts *via* on a variety of subtypes of receptors. The 5-HT_{1A} receptors are located either on the soma of 5-HT neurons where they subserve an autoreceptor function, and on postsynaptic neurons with their greatest density in the hippocampus and septal nuclei. The somatodendritic 5-HT_{1A} autoreceptors are important in the regulation of the firing activity of 5-HT neurons. An enhanced activation of these autoreceptors by an increased level of 5-HT decreases the firing activity of 5-HT neurons through a negative feedback action. Thus, acute administration of antidepressant drugs such as the selective serotonin reuptake inhibitors (SSRIs), which initially enhance extracellular 5-HT levels, decrease the firing rate of 5-HT neurons. However, following long-term administration of SSRIs, 5-HT_{1A} autoreceptors desensitize and DRN 5-HT neurons recover their normal firing rate (Pineyro & Blier, 1999).

Postsynaptic 5-HT_{1A} receptors also induce, when activated, a suppression of neuronal firing. These receptors appear to be important in the mediation of antidepressant effect (Blier & de Montigny, 1994; Santarelli *et al.*, 2003). In particular, long-term administration of various classes of antidepressant drugs and repeated ECS leads to their enhanced tonic activation by 5-HT (Hadjjeri *et al.*, 1998).

Locus coeruleus (LC) neurons give rise to 90% of the noradrenergic innervation of the forebrain. This brainstem nucleus receives afferent fibres from the NTS and sends a

monosynaptic projection to the DRN. The firing activity of NE neurons is also controlled by autoreceptors of the α_2 -adrenergic subtype located on their cell bodies (Svensson *et al.*, 1975). The same subtype of α_2 -adrenergic autoreceptors is located on NE terminals and regulates the amount of NE released per action potential (Curet & de Montigny, 1989; Schoffelmeer & Mulder, 1983). Long-term administration of NE reuptake inhibitors desensitize terminal α_2 -autoreceptors but not their somatodendritic counterparts (Crews & Smith, 1978; McMillen *et al.*, 1980). Nevertheless, this still results in a net increase of NE levels in the forebrain despite an attenuated firing activity.

At the postsynaptic level, α_1 -adrenoceptors are present on the soma of 5-HT neurons in the DRN. When these receptors are activated by an exogenous agonist, like phenylephrine or cirazoline, the firing activity of the neurons on which they are located is increased (Millan *et al.*, 1994; Vandermaelen & Aghajanian, 1983). Endogenously released NE activates these α_1 -adrenoceptors on the cell body of DRN 5-HT neurons, as revealed by their inhibition produced by the selective α_1 -adrenoceptor antagonist prazosin.

Recent electrophysiological studies have shown that the basal firing rates of DRN and LC neurons are significantly increased following a two-week VNS treatment, but the enhancement of LC neurons firing activity occurs before that of 5-HT DRN neurons (Dorr & Debonnel, 2006). Unexpectedly, a desensitization of 5-HT_{1A} and α_2 -autoreceptors was not observed following VNS (Dorr & Debonnel, 2006), therefore suggesting that other mechanisms might be at play in the enhancement of firing of 5-HT and NE neurons by VNS.

The present study was thus aimed at further elucidating the role of 5-HT neurons in the mechanism of action of VNS using electrophysiological paradigms in anaesthetized rat. First, the firing pattern of NE and 5-HT neurons was analysed after VNS to determine if burst activity alterations could contribute to enhance neurotransmitter release. Second, the

role of NE neurons in altering the firing of 5-HT neurons by VNS was investigated by determining whether the lesion of NE neurons would prevent the effect of VNS on 5-HT neurons. Third, the degree of activation of α_1 -adrenoceptors on 5-HT neurons was examined as a possible mechanism by which VNS could enhance the firing rate of these neurons. Finally, the tonic activation of postsynaptic 5-HT_{1A} receptors in the hippocampus was assessed after sustained VNS to ascertain that a net enhancement of 5-HT transmission could be obtained by this intervention.

1.3. Methods and Materials

Animals.

The experiments were carried out on male Sprague-Dawley rats (Charles River Canada) weighing a minimum of 275 g at the time of the implantation of the VNS device and housing under standard laboratory conditions (12:12 light-dark cycle with access to food and water ad libitum). Body temperature was kept at 37°C during the surgery and electrophysiological experiments. Experiments were approved by McGill University Animal Care Committee.

Surgery.

Using sterile surgical techniques, animals were operated on under equithesine, 1ml i.p./300 g rat (4,26% chloral hydrate and 0,96% sodium pentobarbital). Supplemental doses of equithesine were given i.p., 0,1 ml at a time, to maintain constant anesthesia and to prevent any nociceptive reaction to a tail pinch. A horizontal incision was made in the ventral aspect of the neck. The skin and muscles were carefully separated and the left vagus nerve, which lies lateral to the carotid artery, was isolated. Bipolar leads were

wrapped around the left carotid artery and vagus nerve, allowing close contact between the vagus nerve and the electrodes. The leads were sutured in place to the underlying muscle. The leads were tunneled subcutaneously toward an incision made in the back and were then connected to the stimulator. The stimulator was then placed in a dorsal pocket made under the back skin wiped with iodine and antibiotics and fluid replacements were given to ease recovery. Sham animals underwent the same surgical procedure with leads and a dummy 102-pulse stimulator in place as a control group. The lead impedance was checked to ensure a tight connection between the nerve and the coil, using the device diagnostic setting on the NeuroCybernetic Prosthesis (NCP) handheld computer and programming wand from Cyberonics Inc. After a two-day recovery, the stimulator was turned on for two weeks in treated rats and programmed with output similar to those used in humans (30 second on, 5 minutes off; continuous cycle; frequency of 20 Hz, pulse width of 500 microseconds and intensity of 0,25 milliamps (Sackeim *et al.*, 2001).

Noradrenergic neuronal lesion.

Animals were injected with a single dose of a selective noradrenergic toxin DSP-4 (N-(2-chloroethyl)-N-ethyl-2-bromo-benzylamine; Sigma) i.p at 50 mg/kg in a volume of 2 ml/kg, 5 days before the stimulator implant. DSP-4 has been shown to produce a robust decrease (90%) of NE level in the hippocampus and its action is restricted to LC axons (Grzanna *et al.*, 1989; Logue *et al.*, 1985).

Electrophysiological experiments.

Rats were anaesthetized with chloral hydrate 400 mg/kg i.p. and were mounted on a stereotaxic apparatus. A catheter was installed, prior the recording, in a lateral tail vein for intravenous administration of drugs. Experiments were performed with the VNS device in place, but inactivated at the beginning of the recording session for the duration of the experiment (for a 2 to 3 hours period) to avoid electrical interference.

Recordings of Dorsal Raphe 5-HT neurons.

In vivo electrophysiological extracellular unitary recordings were carried out using single glass micropipettes. The electrodes were filled with a 2 M NaCl solution, with an impedance range of 2 to 4 M Ω . A burr hole was drilled on the midline 1 mm anterior to lambda and dorsal raphe 5-HT neurons were encountered over a distance of 1 mm starting immediately below the ventral border of the Sylvius aqueduct. 5-HT DRN neurons were identified using the criteria of Aghajanian and Vandermaelen (Aghajanian & Vandermaelen, 1982): a slow flow (0.5-2.5 Hz) and regular firing rate and long duration (0.8-1.2 ms) positive action potentials. In order to determine the average firing rate for each group, at least five electrode descents were made per rat at 100 μ m distance from the first descent. Each neuron was recorded for at least 1 minute. Neuronal firing rates were calculated by adding each discharge per 10-s histogram (as obtained by the Spike2 program during recording) and divided by length of time recoded in seconds. All neuronal firing rates for one group were added together and divided by the number of neurons recorded per group. Five to six rats were used per group.

The responsiveness of DRN neurons to the i.v administration of the α_1 -adrenoceptor antagonist prazosin was assessed after the injection. The change in firing rate

due to the antagonist was expressed for each neuron as a percentage of basal firing rate. One neuron was analysed per rats. Two to nine rats were used per dose of prazosin.

Analysis of the firing pattern of NE and 5-HT neurons.

The firing pattern of NE neurons was analysed by interspike interval burst analysis, using five to nine rats per group, following the criteria set by Grace and Bunney, 1984 (Grace & Bunney, 1984). The onset of a burst was defined as the occurrence of two spikes with an interspike interval shorter than 0.08s. The termination of burst was defined as an interspike interval of 0.16s or longer.

The firing pattern of 5-HT neurons was analysed by interspike interval burst analysis, using five to seven rats per group, following the criteria set by Hajos (Hajos *et al.*, 1995). The onset of a burst was defined as the occurrence of two spikes with an interspike interval shorter than 0.01s. The termination of burst was defined as an interspike interval of 0.012s or longer.

Recordings from CA₃ dorsal hippocampus pyramidal neurons.

Recording and microiontophoresis were performed with five-barelled glass micropipettes. The central barrel was filled with a 2 M NaCl solution and used for extracellular unitary recordings. The side barrels contained 5-HT creatinine sulfate (Sigma; 5 mM in 200 mM NaCl, pH 4), quisqualate (Sigma, 1,5 mM in 400 mM NaCl, pH 8), and 2 M NaCl used for automatic current balancing. The microelectrodes were lowered at 4,2 mm lateral and 4,2 mm anterior to lambda into the CA₃ region of the dorsal hippocampus. The pyramidal neurons were identified by their large amplitude (0,5-1,2 mV) and long duration (0,8-1,2 msec), simple spikes alternating with complex spike discharges (Kandel & Spencer, 1961). Because most hippocampus pyramidal neurons are not spontaneously

active under chloral hydrate anesthesia, a leak or a small ejection current of quisqualate (+1 to -2 nA) was used to activate them within their physiological range (Ranck, 1973). Two minutes before the intravenous administration of WAY 100635, the firing activity of the quisqualate-activated CA₃ pyramidal neurons tested was decreased (by a lower ejection current of quisqualate) to less than 5 Hz to allow the detection of possible changes in firing activity after the 5-HT_{1A} receptor antagonist WAY 100635 administration in control and treated rats. Six rats were used per group.

Drugs and Materials.

All drugs, DSP-4 (Sigma, ON, Canada), Prazosin (Sigma, ON, Canada) and WAY 100635 (Sigma, ON, Canada) were dissolved in distilled water. Cyberonics (Houston, Texas) provided the leads, 102 pulse stimulators, and dummy stimulators.

Statistics.

Electrophysiological data were expressed as mean \pm S.E.M. of the firing rate, number of bursts, percentage of spike occurring in bursts, mean spikes per burst and mean burst length. Statistical comparisons among control and VNS treated rats were carried out using linear mixed model analysis in order to address the number of neurons nested in each rat since there were several neurons tested in each rat (Type 3 Tests of Fixed Effects were reported). Statistical comparison among the control and two-week VNS treated group following DSP-4 lesion were carried out using linear mixed model, in which rats were treated as a random effect (Type 3 Tests of Fixed Effects were reported). Logistic regression analysis was used for dose-response curve construction and assessment of the effective dose for inhibiting neuronal activity by 50% (ED₅₀). Statistical comparison of dose-response curves of the effects of WAY 100635 on CA₃ pyramidal neuron firing rate

among control and VNS treated rats were carried out using two-way repeated measures analysis of variance. The percentage of 5-HT and NE neurons discharging in a burst mode in controls and treated rats were compared separately using generalized estimating equations (GEE model) in order to take into account the effect of repeated measures taken from the same rats. When running the GEE model, exchangeable working correlation matrix was used (Score Statistics for Type 3 GEE Analysis were reported).

1.4. Results

Firing pattern of NE and 5-HT neurons.

The reanalysis of a published data set (Dorr & Debonnel, 2006), using the same parameters as those in the present study, showed that VNS treatment doubled the percentage of NE neurons displaying bursts after 14 days of treatment compared with control rats (table 1; $\chi^2_1=7.6$; $p=0.006$). A two-week VNS treatment did not change the mean burst length, but significantly enhanced the mean spikes per burst by 19% ($F_{1,15}=4.8$; $p=0.04$), the number of bursts per minute by 151% ($F_{1,15}=48.6$; $p<0.0001$) and the percentage of spikes occurring in bursts by 148% ($F_{1,15}=47.5$; $p<0.0001$) of LC NE neurons (fig. 1A-D).

After 90 days of VNS treatment, the percentage of NE neurons displaying burst activity remained twice as high as in control rats (table 1; $\chi^2_1=5.0$; $p=0.03$). The burst length was significantly increased by 110% ($F_{1,12}=23.1$; $p=0.0004$) and also the mean number of spikes per burst by 80% ($F_{1,12}=39.4$; $p<0.0001$). The number of bursts per minute remained stable compared to the two-week VNS treatment and the percentage of spikes occurring in bursts was further increased to 365% of the control value (fig. 1A-D).

In the case of 5-HT neurons, the mean spikes per burst, mean burst length, number of bursts per minute and the percentage of spikes in bursts were not significantly altered (data not shown). The percentage of 5-HT neurons discharging in bursts was increased by more than 50% after 90 days of VNS treatment (table 2), although it did not reach statistical significance.

Effect of VNS on 5-HT DRN neurons following DSP-4 lesion.

In the current study, a two-week VNS treatment significantly increased by 44% the basal firing rate of 5-HT DRN neurons when compared with control rats ($F_{1,9}=45.4$; $p<0.0001$) (fig. 2A). A selective lesion of LC NE neurons following the administration of the selective noradrenergic toxin DSP-4 completely prevented the enhancing action of VNS on 5-HT DRN neuron firing activity (fig. 2B).

Effect of VNS on the degree of activation of α_1 -adrenoceptors on 5-HT neurons.

Dose-response curves for the α_1 -adrenoceptor antagonist prazosin were constructed to assess the degree of activation of these receptors. Various doses of prazosin were administered i.v (from 5 to 200 $\mu\text{g}/\text{kg}$). The ED_{50} value for controls was 116 $\mu\text{g}/\text{kg}$ (fig. 3 and 4A). A selective lesion of LC NE neurons following DSP-4 administration nearly abolished the inhibitory effect of prazosin (fig. 4B), therefore indicating the noradrenergic nature of this effect. The ED_{50} for prazosin in the two-week VNS treated rats was 19 $\mu\text{g}/\text{kg}$ (fig. 3 and 4C), thus indicating an enhanced NE activation of 5-HT neurons.

Effect of VNS on 5-HT_{1A} postsynaptic receptors.

The intravenous administration of the selective 5-HT_{1A} receptor antagonist WAY 100635 (from 25 to 200 $\mu\text{g}/\text{kg}$) did not modify the firing activity of dorsal hippocampus

CA₃ pyramidal neurons in control rats, as previously reported (Haddjeri *et al.*, 1998). In contrast, in the two-week VNS treated rats, the administration of WAY 100635 significantly increased the firing activity of CA₃ pyramidal neurons ($F_{1,69}=9.320$; $p=0.012$), therefore indicating a greater tonic activation of the inhibitory postsynaptic 5-HT_{1A} receptor (fig. 5).

1.5. Discussion

The present results confirmed the enhancing action of VNS on the firing rate of 5-HT neurons, and revealed that VNS markedly enhanced the burst firing activity of NE neurons. In addition, the stimulatory effect of VNS on 5-HT neuronal firing was shown to be mediated by a noradrenergic mechanism. Finally, the VNS-induced changes in the activity of 5-HT neurons produced a net increase in 5-HT transmission in the hippocampus.

Prior experiments showed that sustained VNS enhanced the spontaneous firing rate of NE and 5-HT neurons in a time-dependent manner (Dorr & Debonnel, 2006). Further re-analysis of this data set showed that the firing pattern of these two types of neurons was also altered, *albeit* not to the same extent. After 14 days of VNS, the percentage of NE neurons displaying bursts and the number of bursts per minute were more than doubled, which lead to a similar enhancement of the percentage of spikes occurring in bursts (fig. 1D). The latter parameter likely reflects the more reliable indicator that a subset of neurons has significantly shifted its overall firing pattern from single spiking activity to burst discharging. Presumably, this shift would be the most reliable indicator of robust enhancement of NE release. Indeed, this mode of firing was shown to lead to greater NE release than single pulses in the rat frontal cortex (Florin-Lechner *et al.*, 1996). After 90

days of VNS, the percentage of neurons displaying bursts remained stable compared to the 14 days of VNS treatment, but an increase in spikes per burst and burst length were then detectable, presumably contributing to the further increase in the mean firing rate of NE neurons. Finally, it is important to note that the percentage of spikes occurring in bursts was enhanced approximately four fold after 90 days of VNS when compared to the control value (fig. 1D).

None of the abovementioned firing pattern parameters of 5-HT neurons was affected after 14 and 90 days of VNS. However, after 90 days of VNS, the percentage of 5-HT neurons discharging in bursts was increased to 32% from a value of 20% in control although this more than 50% increase did not reach statistical significance. Taken together, these re-analyses indicate that, despite the observation that the mean firing rate of both NE and 5-HT neurons is doubled by 90 days of VNS (Dorr & Debonnel, 2006), NE neurons undergo the most important shift of firing activity. Consequently, based on such parameters, it is expected that VNS would lead to a greater increase in NE than 5-HT release in postsynaptic structures. This hypothesis is currently being tested using microdialysis experiments. It is noteworthy that sustained administration of the NE and dopamine releaser bupropion for 14 days significantly increases the percentage of both NE and 5-HT neurons discharging in bursts, but that only the mean firing rate of 5-HT neurons is significantly increased (El Mansari *et al.*, 2008; Ghanbari *et al.*, 2008). Therefore, while VNS and bupropion have some commonality in their action on NE and 5-HT neurons, VNS doubles NE firing rate and triples the percentage of spikes occurring in bursts after 14 days of treatment (fig. 1D). Thus, VNS seems to exert a more important action on NE neurons, than bupropion.

The increase of NE neuronal firing activity appeared sooner and was of a greater extent than that observed in 5-HT neurons by VNS (Dorr & Debonnel, 2006). Such an

increase in firing rate of NE neurons likely explains the prompt increase in extracellular NE in postsynaptic areas (Follesa *et al.*, 2007; Roosevelt *et al.*, 2006). This suggested that the effect of VNS on 5-HT neurons is indirect and might be mediated through an activation of the NE system. To test this hypothesis, the effect of a specific lesion of LC neurons on the capacity of VNS to alter the firing of 5-HT neurons was examined using the selective toxin DSP-4. This lesion, which leaves unaltered the firing rate of 5-HT neurons (Gobbi *et al.*, 2007), completely prevented the effect of VNS on 5-HT DRN neuronal firing activity. This confirms the crucial role of NE neurons on the effect of VNS on 5-HT neurons. This observation is therefore consistent with the fact that the vagus nerve sends afferents to the nucleus tractus solitarius (NTS), which in turn sends direct inputs to the LC, but not the DRN (Henry, 2002; Van Bockstaele *et al.*, 1999). In fact, the NTS projects to the LC through disynaptic pathways: a system localized in the nucleus paragigantocellularis containing excitatory amino acids (Ennis & Aston-Jones, 1988) and a γ -amino-butyric acid (GABA)-ergic inhibitory system localized in the nucleus prepositus hypoglossi, acting primarily at the GABA_A receptor subtypes on LC neurons (Ennis & Aston-Jones, 1989). The present results strongly suggest that VNS facilitates the excitatory pathway to the LC neurons more than the inhibitory one. The LC would then modify the firing rate of 5-HT neurons through its monosynaptic input to the DRN. VNS is therefore believed to act first on the LC, and then indirectly on DRN 5-HT neurons (Fig. 6). This hypothesis is also consistent with the fact that VNS produced an acute activation of the LC which is revealed by an increase of the short-term neurone activation biomarker c-fos, but a more delayed activation of the DRN showed by a significant increase of Δ FosB after chronic treatment (Cunningham *et al.*, 2007). It remains to be determined whether the firing activity of

median raphe 5-HT neurons, the second most important source of 5-HT innervation of the forebrain, could also be affected by VNS.

An increase in firing rate of 5-HT neurons is usually associated with an increase in endogenous 5-HT release (Bosker *et al.*, 1994; Hery *et al.*, 1986) that activates the somatodendritic autoreceptors. However, with VNS no change in 5-HT_{1A} autoreceptor sensitivity was observed suggesting that the increase firing was obtained through an alternative mechanism (Dorr & Debonnel, 2006). The basal firing activity of DRN 5-HT neurons is stimulated by NE input (Baraban & Aghajanian, 1980) *via* α_1 -adrenergic receptors. It has been established that these receptors are tonically activated, as demonstrated by a reduction of the firing activity of 5-HT neurons following the acute administration of a α_1 -adrenoceptor antagonist (Baraban & Aghajanian, 1980; Svensson *et al.*, 1975). Thus, the effect of acute administration of the α_1 -adrenergic antagonist prazosin was compared in control rats and in two-week VNS treated rats. The effect of prazosin on the firing activity of 5-HT neurons was much greater in VNS rats than in controls, suggesting that the tonic activation of these DRN α_1 -adrenoceptors was increased through an enhanced release of endogenous NE.

The hippocampus is a structure that appears central in the mediation of the therapeutic effect of various classes of antidepressant treatments (Santarelli *et al.*, 2003). More specifically, the degree of activation of postsynaptic 5-HT_{1A} receptors in this brain region is enhanced after long-term administration of a variety of antidepressant strategies, including electroconvulsive shock (Blier & de Montigny, 1994; Haddjeri *et al.*, 1998). The CA₃ region of the dorsal hippocampus receives its serotonergic input from raphe nuclei. In freely moving rats, the intravenous administration of the 5-HT_{1A} antagonist WAY100635 increases the firing rate of hippocampal pyramidal neurons, whereas in anaesthetized rats this antagonist is without effect indicating that there is no tonic

activation of these receptors, presumably resulting from the lower firing rate of 5-HT neurons under the latter condition (Kasamo *et al.*, 2001). However, after long-term treatment with different antidepressant strategies, including drug combinations, the administration of the 5-HT_{1A} receptor antagonist WAY100635 markedly increases the firing activity of CA₃ pyramidal neurons (Besson *et al.*, 2000; Haddjeri *et al.*, 1998; Szabo & Blier, 2001). These results indicate that these treatments increase the tonic activation of such receptors. In the same way in the current study, the acute administration of WAY100635 markedly increased the firing activity of CA₃ hippocampal pyramidal neurons in the two-week VNS treated rats, suggesting that VNS, like classical antidepressant treatments, enhances the tonic activation of forebrain postsynaptic 5-HT_{1A} receptors.

Limitations

There are some limitations of this study. First, the stimulator was turned off during the electrophysiological recordings which likely decreased the vagal tone to the brain. Nevertheless, firing rates higher than those recorded in sham rats were still observed, thus indicating that sustained changes had been triggered due only to prolonged stimulation. Therefore, this enhanced activity of the neurons represents their firing rate when the stimulator is OFF during the 5 minutes of each duty cycle. Second, the data were obtained while the animals were under anaesthesia and it is known that in anaesthetised animals the firing activity of presumed 5-HT neurons corresponds to that occurring during slow-wave sleep (~1 Hz; Trulson & Jacobs, 1979). Recordings would therefore need to be carried out in unanaesthetized rats to ascertain that the difference between the sham and the VNS treated rats observed herein is not influenced by the anaesthetic agent. Third, the extent of the NE depletion by DSP-4 was not verified in these experiments. In addition, it was not

deemed necessary to protect 5-HT neurons using a SSRI when injecting DSP-4 because results from our laboratory showed that the firing rate of 5-HT neurons remains unchanged by DSP-4, as well as 5-HT content in the dorsal raphe (Gobbi *et al.*, 2007; Haddjeri & Blier, 2008).

In conclusion, this study showed that the effects of VNS on the 5-HT system are mediated through its robust effect on increasing the rate and altering the pattern of firing of NE neurons. In keeping with all the other forms of antidepressant treatments, VNS increased the tonic activation of postsynaptic 5-HT_{1A} receptors. Since VNS appears to be efficient in treatment-resistant depression (Sackeim *et al.*, 2001), its effects should not be expected to be the same as the other treatments. Indeed, despite some similarities of VNS and various antidepressant drugs (used alone or in combination) on the 5-HT and NE systems, only VNS has been shown thus far to double the firing rate of NE neurons in a sustained manner and quadruple their number of action potentials occurring in the bursting mode. These features of VNS can therefore begin to provide an explanation for its effectiveness in treatment-resistant depression. Investigation of the effects of VNS on other chemospecific neuronal systems should provide additional insights into its mechanism of action, and ultimately in optimizing its therapeutic benefits in depression.

1.6. Acknowledgements

This work was supported by the Canadian Institute in Health Research (University-Industry program-Operating Grant UOP-71713) and by Cyberonics Inc. Houston, Texas. P.B received the Canadian Research Chair and is a paid consultant for Cyberonics. We would like to thank Mrs. Lise Martin and Dr. Guillaume Lucas for great assistance.

1.7. Conflict of Interest

None declared for Ms. Manta and Dr. Dong. Dr. Blier serves as president of Medical Multimedia Inc. and is a contract employee of Bristol-Myers Squibb, Forest Laboratories, Janssen Pharmaceuticals and Steelbeach Productions. He has received grant funding from AstraZeneca, Bristol-Myers Squibb, Eli Lilly, Forest Laboratories, Janssen Pharmaceuticals, Lundbeck, Mitsubishi Pharma, Organon Pharmaceuticals and Wyeth-Ayerst. He acts as a consultant to Biovail, Bristol-Myers Squibb, Eli Lilly, Forest Laboratories, Janssen Pharmaceuticals, Lundbeck, Novartis, Organon Pharmaceuticals, Pfizer, Sanofi-Aventis, Sepracor, Takeda and Wyeth-Ayerst and served on the speakers bureaus of Cyberonics, Eli Lilly, Forest Laboratories, Janssen Pharmaceuticals, Lundbeck, Organon Pharmaceuticals and Wyeth-Ayerst. Dr. Debonnel was a paid consultant for Cyberonics.

1.8. Figures/Tables and Legends

Table 1. Effect of VNS treatment on LC NE neurons firing pattern.

	NE neurons analyzed	NE neurons displaying bursts	% of NE neurons displaying bursts
Control	59	24	41%
VNS 2 weeks	33	29	88%**
VNS 90 days	20	17	85%*

* $P < 0.05$; ** $P < 0.01$ using GEE model and compare to control rats.

Table 2. Effect of VNS treatment on DRN 5-HT neurons firing pattern.

	5-HT neurons analyzed	5-HT neurons displaying bursts	% of 5-HT neurons displaying bursts
Control	56	11	20%
VNS 2 weeks	70	15	21%
VNS 90 days	65	21	32%

Firing activity of NE LC neurons

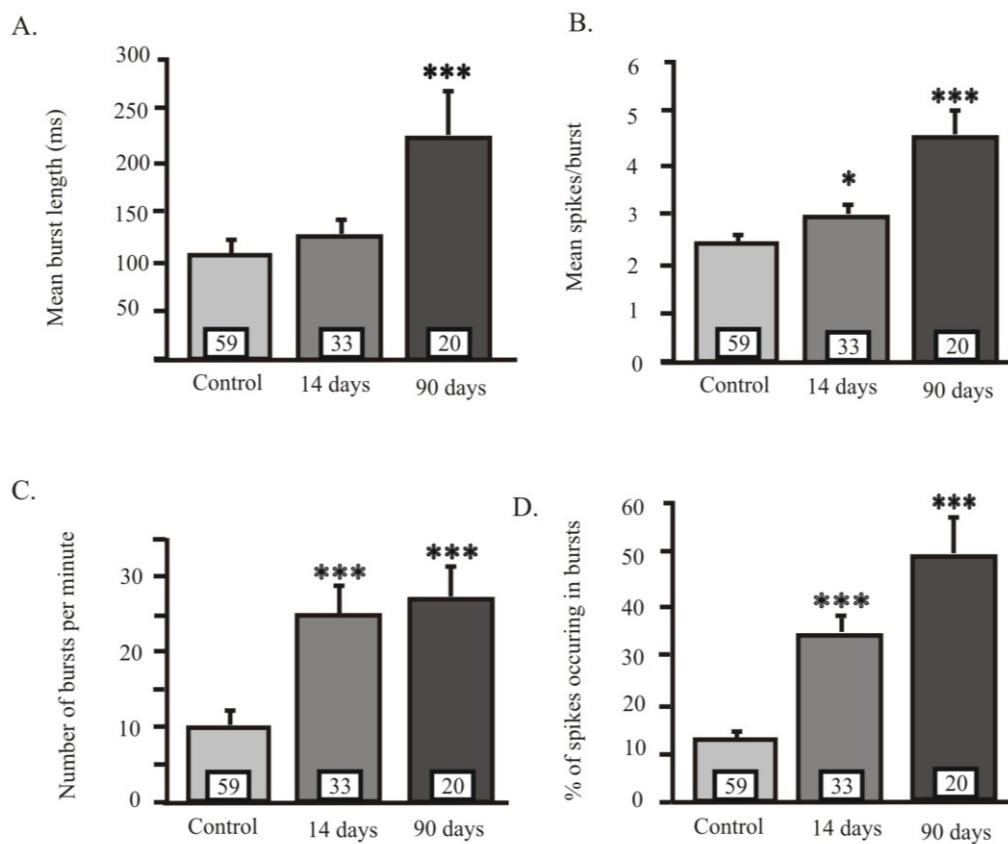


Figure 1. Histograms representing mean \pm S.E.M of LC NE neurons mean burst length (A), mean spikes per burst (B), number of bursts per minute (C) and percentage of spikes in bursts (D), in controls, 2 week and 90 day treated rats. The numbers at the bottoms of the columns represent numbers of neurons tested. Five to nine rats were used per group. * $P < 0.05$; *** $P < 0.001$ using Linear Mixed Model.

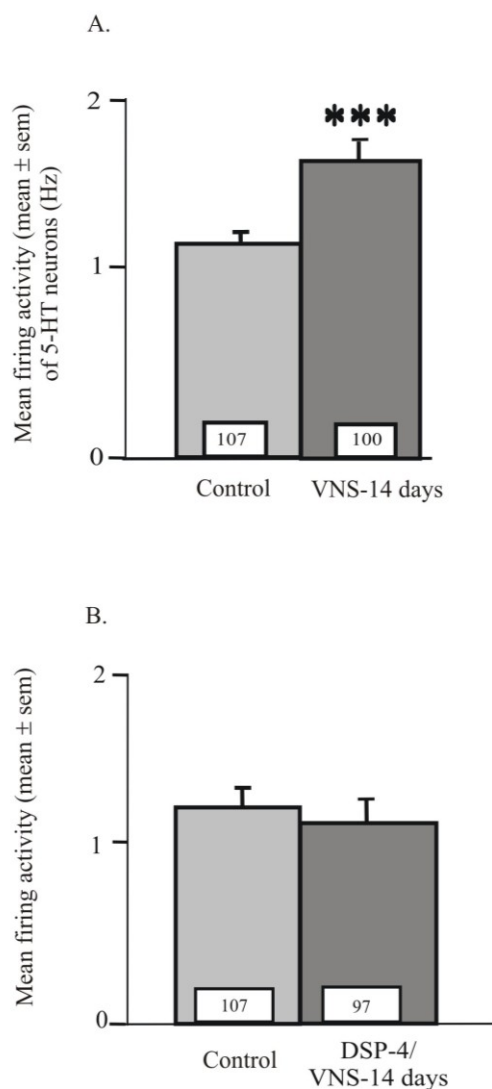


Figure 2. Histograms representing mean \pm S.E.M. spontaneous firing rate of DRN 5-HT neurons. The numbers at the bottoms of the columns represent numbers of neurons tested. Five to six rats were used per group. A. Average firing rates for controls and 2 week VNS treated rats. *** $P < 0.001$ using Linear Mixed Model. B. Average firing rates for controls and 2 week VNS treated rats following a DSP-4 lesion. There was no significant difference between the two groups.

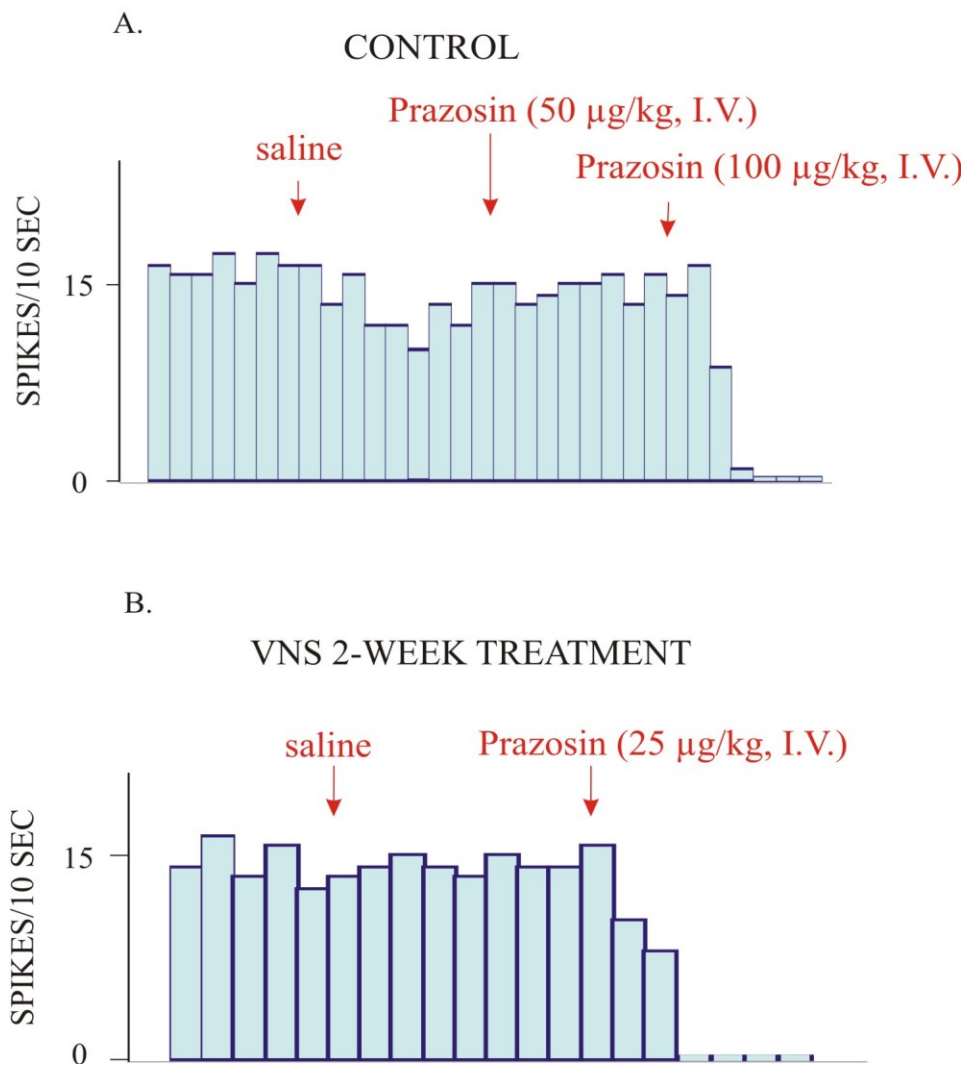


Figure 3. Examples of the response of DRN 5-HT neurons to the α_1 -adrenoceptor antagonist prazosin. Histograms of one DRN 5-HT neuron in control (A) and two-week VNS treated rat (B).

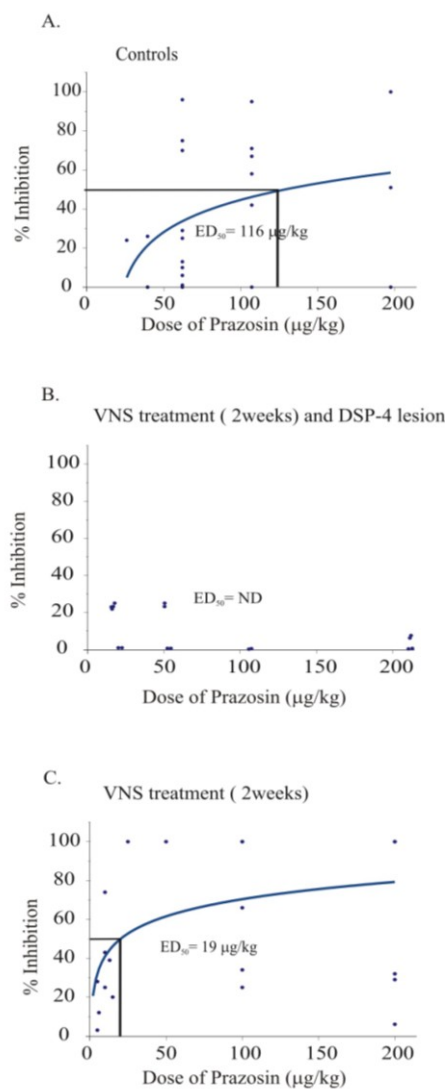


Figure 4. Response of DRN 5-HT neurons to the α_1 -adrenoceptor antagonist prazosin. Dose-response curves for prazosin of control (A, $\text{ED}_{50} = 116 \mu\text{g}/\text{kg}$), two-week VNS treatment post DSP-4 lesion (B) and two-week VNS treatment (C, $\text{ED}_{50} = 19 \mu\text{g}/\text{kg}$). One neuron was analysed per rats. Two to nine rats were used per doses of prazosin.

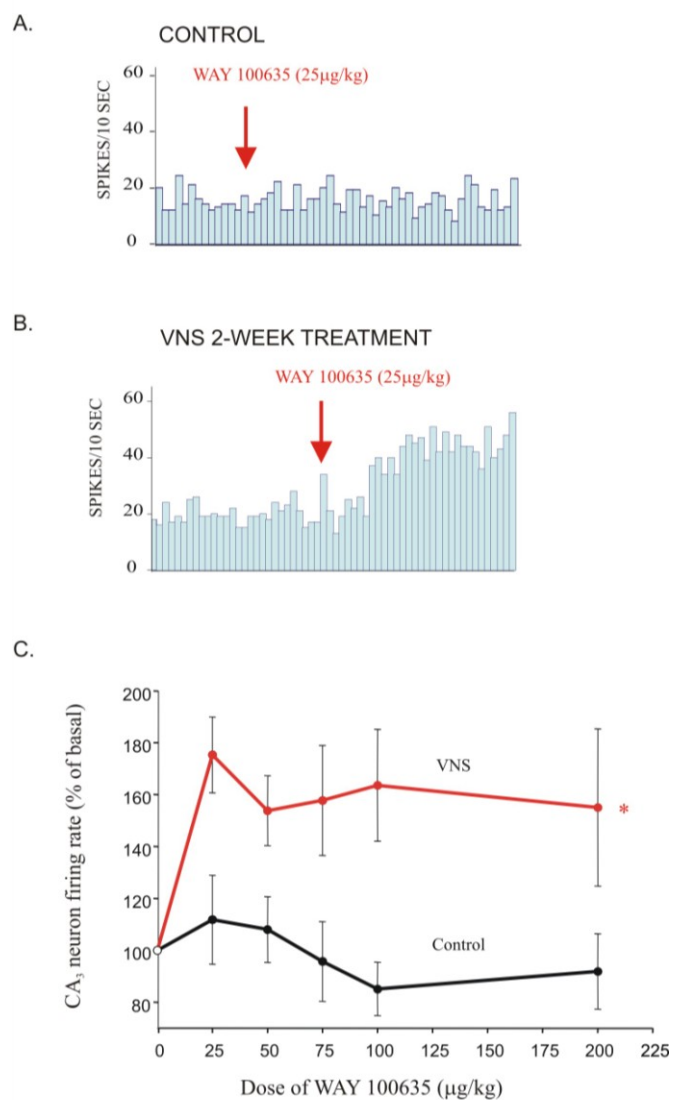


Figure 5. A and B represent integrated firing rate histograms of two dorsal hippocampus CA₃ pyramidal neurons showing their responsiveness to the i.v. administration of WAY 100635 (from 25 to 200 μ g/kg i.v.) in a control rat (A) and in a two-week VNS treated rat (B). These neurons were activated with quisqualate. C represents the dose-response curves of the effects of WAY 100635 in control and two-week VNS treated rats on CA₃ pyramidal neuron firing rate. Six rats were used per group; * $P < 0.05$ using Two-way repeated measures ANOVA.

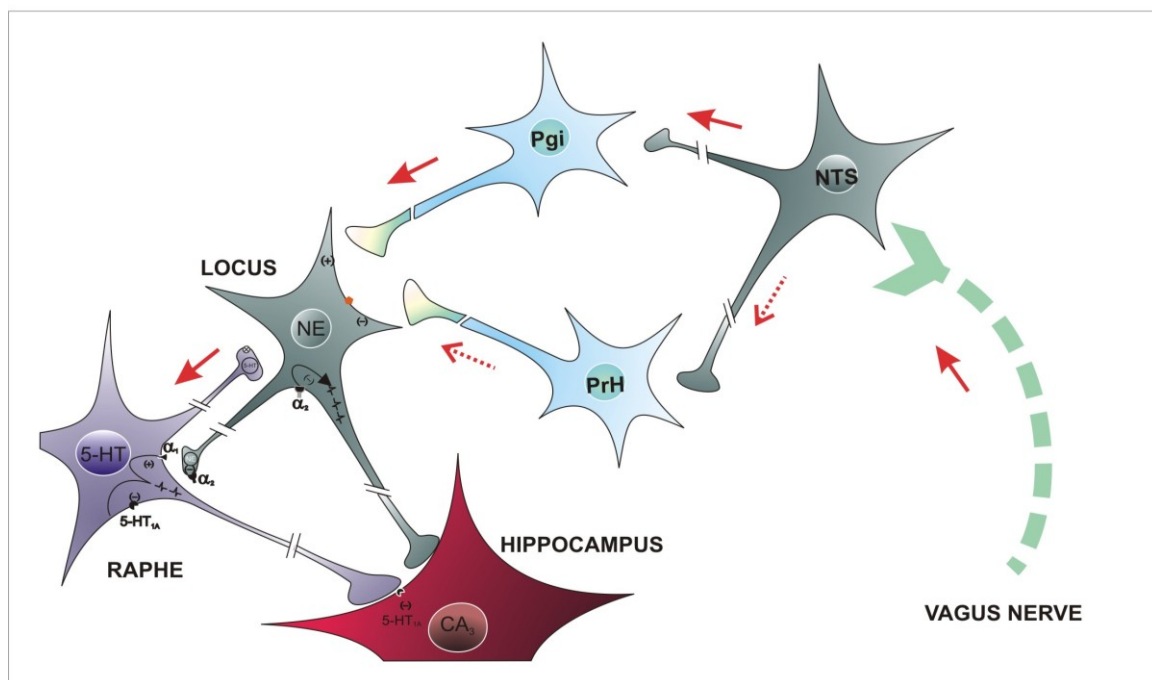


Figure 6. The vagus nerve sends afferents to the nucleus tractus solitarius (NTS), which in turn projects to the locus coeruleus (LC) through disynaptic pathways: one *via* the nucleus paragigantocellularis (Pgi) containing excitatory amino acids and a γ -amino-butyric acid (GABA)-ergic inhibitory system *via* in the nucleus prepositus hypoglossi (PrH), acting primarily at the GABA_A receptor subtypes on LC neurons. VNS would facilitate the excitatory pathway on LC neurons more than the inhibitory one. The LC would then modify the firing rate of 5-HT neurons through its monosynaptic input to the DRN. VNS is therefore believed to act first on the LC, and then indirectly on DRN 5-HT neurons. VNS leads to a marked enhancement of NE and 5-HT transmission.

1.9. References

- Aghajanian GK, Vandermaelen CP** (1982). Intracellular identification of central noradrenergic and serotonergic neurons by a new double labeling procedure. *J Neurosci* **2**, 1786-1792.
- Baraban JM, Aghajanian GK** (1980). Suppression of firing activity of 5-HT neurons in the dorsal raphe by alpha-adrenoceptor antagonists. *Neuropharmacology* **19**, 355-363.
- Besson A, Haddjeri N, Blier P, de Montigny C** (2000). Effects of the co-administration of mirtazapine and paroxetine on serotonergic neurotransmission in the rat brain. *Eur Neuropsychopharmacol* **10**, 177-188.
- Blier P, de Montigny C** (1994). Current advances and trends in the treatment of depression. *Trends Pharmacol Sci* **15**, 220-226.
- Bosker F, Klompmakers A, Westenberg H** (1994). Extracellular 5-hydroxytryptamine in median raphe nucleus of the conscious rat is decreased by nanomolar concentrations of 8-hydroxy-2-(di-n-propylamino) tetralin and is sensitive to tetrodotoxin. *J Neurochem* **63**, 2165-2171.
- Buoni S, Mariottini A, Pieri S, Zalaffi A, Farnetani MA, Strambi M, Palma L, Fois A** (2004). Vagus nerve stimulation for drug-resistant epilepsy in children and young adults. *Brain Dev* **26**, 158-163.
- Chae JH, Nahas Z, Lomarev M, Denslow S, Lorberbaum JP, Bohning DE, George MS** (2003). A review of functional neuroimaging studies of vagus nerve stimulation (VNS). *J Psychiatr Res* **37**, 443-455.
- Crews FT, Smith CB** (1978). Presynaptic alpha-receptor subsensitivity after long-term antidepressant treatment. *Science* **202**, 322-324.
- Cunningham JT, Mifflin SW, Gould GG, Frazer A** (2007). Induction of c-Fos and DeltaFosB Immunoreactivity in Rat Brain by Vagal Nerve Stimulation. *Neuropsychopharmacology*.
- Curet O, de Montigny C** (1989). Electrophysiological characterization of adrenoceptors in the rat dorsal hippocampus. III. Evidence for the physiological role of terminal alpha 2-adrenergic autoreceptors. *Brain Res* **499**, 18-26.
- Daban C, Martinez-Aran A, Cruz N, Vieta E** (2008). Safety and efficacy of Vagus Nerve Stimulation in treatment-resistant depression. A systematic review. *J Affect Disord* **110**, 1-15.
- Dorr AE, Debonnel G** (2006). Effect of vagus nerve stimulation on serotonergic and noradrenergic transmission. *J Pharmacol Exp Ther* **318**, 890-898.

El Mansari M, Ghanbari R, Janssen S, Blier P (2008). Sustained administration of bupropion alters the neuronal activity of serotonin, norepinephrine but not dopamine neurons in the rat brain. *Neuropharmacology*.

Elger G, Hoppe C, Falkai P, Rush AJ, Elger CE (2000). Vagus nerve stimulation is associated with mood improvements in epilepsy patients. *Epilepsy Res* **42**, 203-210.

Ennis M, Aston-Jones G (1988). Activation of locus coeruleus from nucleus paragigantocellularis: a new excitatory amino acid pathway in brain. *J Neurosci* **8**, 3644-3657.

Ennis M, Aston-Jones G (1989). GABA-mediated inhibition of locus coeruleus from the dorsomedial rostral medulla. *J Neurosci* **9**, 2973-2981.

Florin-Lechner SM, Druhan JP, Aston-Jones G, Valentino RJ (1996). Enhanced norepinephrine release in prefrontal cortex with burst stimulation of the locus coeruleus. *Brain Res* **742**, 89-97.

Foley JO, Dubois F (1937). Quantitative studies of the vagus nerve in the cat. I: The ratio of sensory and motor studies. *J Comp Neurol* **67**, 49-67.

Follesa P, Biggio F, Gorini G, Caria S, Talani G, Dazzi L, Puligheddu M, Marrosu F, Biggio G (2007). Vagus nerve stimulation increases norepinephrine concentration and the gene expression of BDNF and bFGF in the rat brain. *Brain Res* **1179**, 28-34.

Ghanbari R, El Mansari M, Blier P (2008). Electrophysiological effects of the co-administration of escitalopram and bupropion on rat serotonin and norepinephrine neurons. *J Psychopharmacol*.

Gobbi G, Cassano T, Radja F, Morgese MG, Cuomo V, Santarelli L, Hen R, Blier P (2007). Neurokinin 1 receptor antagonism requires norepinephrine to increase serotonin function. *Eur Neuropsychopharmacol* **17**, 328-338.

Grace AA, Bunney BS (1984). The control of firing pattern in nigral dopamine neurons: burst firing. *J Neurosci* **4**, 2877-2890.

Grzanna R, Berger U, Fritschy JM, Geffard M (1989). Acute action of DSP-4 on central norepinephrine axons: biochemical and immunohistochemical evidence for differential effects. *J Histochem Cytochem* **37**, 1435-1442.

Haddjeri N, Blier P (2008). Neurokinin-1 receptor antagonists modulate brain noradrenaline and serotonin interactions. *Eur J Pharmacol* **600**, 64-70.

Haddjeri N, Blier P, de Montigny C (1998). Long-term antidepressant treatments result in a tonic activation of forebrain 5-HT_{1A} receptors. *J Neurosci* **18**, 10150-10156.

Hajos M, Gartside SE, Villa AE, Sharp T (1995). Evidence for a repetitive (burst) firing pattern in a sub-population of 5-hydroxytryptamine neurons in the dorsal and median raphe nuclei of the rat. *Neuroscience* **69**, 189-197.

Henry TR (2002). Therapeutic mechanisms of vagus nerve stimulation. *Neurology* **59**, S3-14.

Hery F, Faudon M, Fueri C (1986). Release of serotonin in structures containing serotonergic nerve cell bodies: dorsalis raphe nucleus and nodose ganglia of the cat. *Ann N Y Acad Sci* **473**, 239-255.

Kandel ER, Spencer WA (1961). Electrophysiology of hippocampal neurons. II. Afterpotentials and repetitive firing. *J Neurophysiol* **24**, 243-259.

Kasamo K, Suzuki T, Tada K, Ueda N, Matsuda E, Ishikawa K, Kojima T (2001). Endogenous 5-HT tonically inhibits spontaneous firing activity of dorsal hippocampus CA1 pyramidal neurons through stimulation of 5-HT(1A) receptors in quiet awake rats: in vivo electrophysiological evidence. *Neuropsychopharmacology* **24**, 141-151.

Krahl SE, Senanayake SS, Pekary AE, Sattin A (2004). Vagus nerve stimulation (VNS) is effective in a rat model of antidepressant action. *J Psychiatr Res* **38**, 237-240.

Logue MP, Growdon JH, Coviella IL, Wurtman RJ (1985). Differential effects of DSP-4 administration on regional brain norepinephrine turnover in rats. *Life Sci* **37**, 403-409.

Marangell LB, Rush AJ, George MS, Sackeim HA, Johnson CR, Husain MM, Nahas Z, Lisanby SH (2002). Vagus nerve stimulation (VNS) for major depressive episodes: one year outcomes. *Biol Psychiatry* **51**, 280-287.

McMillen BA, Warnack W, German DC, Shore PA (1980). Effects of chronic desipramine treatment on rat brain noradrenergic responses to alpha-adrenergic drugs. *Eur J Pharmacol* **61**, 239-246.

Millan MJ, Rivet JM, Gobert A, Canton H, Veiga S, Bervoets K (1994). 5-HT1A receptors and the tail-flick response. VI. Intrinsic alpha 1A-adrenoceptor antagonist properties can mask the actions of 5-HT1A receptor agonists in the spontaneous tail-flick paradigm. *J Pharmacol Exp Ther* **269**, 121-131.

Nahas Z, Marangell LB, Husain MM, Rush AJ, Sackeim HA, Lisanby SH, Martinez JM, George MS (2005). Two-year outcome of vagus nerve stimulation (VNS) for treatment of major depressive episodes. *J Clin Psychiatry* **66**, 1097-1104.

Pineyro G, Blier P (1999). Autoregulation of serotonin neurons: role in antidepressant drug action. *Pharmacol Rev* **51**, 533-591.

Ranck JB, Jr. (1973). Studies on single neurons in dorsal hippocampal formation and septum in unrestrained rats. I. Behavioral correlates and firing repertoires. *Exp Neurol* **41**, 461-531.

Roosevelt RW, Smith DC, Clough RW, Jensen RA, Browning RA (2006). Increased extracellular concentrations of norepinephrine in cortex and hippocampus following vagus nerve stimulation in the rat. *Brain Res* **1119**, 124-132.

Sackeim HA, Rush AJ, George MS, Marangell LB, Husain MM, Nahas Z, Johnson CR, Seidman S, Giller C, Haines S, Simpson RK, Jr., Goodman RR (2001). Vagus nerve stimulation (VNS) for treatment-resistant depression: efficacy, side effects, and predictors of outcome. *Neuropsychopharmacology* **25**, 713-728.

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.

Schachter SC (2004). Vagus nerve stimulation: mood and cognitive effects. *Epilepsy Behav* **5 Suppl 1**, S56-59.

Schlaepfer TE, Frick C, Zobel A, Maier W, Heuser I, Bajbouj M, O'Keane V, Corcoran C, Adolfsson R, Trimble M, Rau H, Hoff HJ, Padberg F, Muller-Siecheneder F, Audenaert K, Van den Abbeele D, Stanga Z, Hasdemir M (2008). Vagus nerve stimulation for depression: efficacy and safety in a European study. *Psychol Med* **38**, 651-661.

Schoffemeer AN, Mulder AH (1983). 3H-noradrenaline release from rat neocortical slices in the absence of extracellular Ca²⁺ and its presynaptic alpha 2-adrenergic modulation. A study on the possible role of cyclic AMP. *Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol* **323**, 188-192.

Svensson TH, Bunney BS, Aghajanian GK (1975). Inhibition of both noradrenergic and serotonergic neurons in brain by the alpha-adrenergic agonist clonidine. *Brain Res* **92**, 291-306.

Szabo ST, Blier P (2001). Effects of the selective norepinephrine reuptake inhibitor reboxetine on norepinephrine and serotonin transmission in the rat hippocampus. *Neuropsychopharmacology* **25**, 845-857.

Trulson ME, Jacobs BL (1979). Raphe unit activity in freely moving cats: correlation with level of behavioral arousal. *Brain Res* **163**, 135-150.

Van Bockstaele EJ, Peoples J, Telegan P (1999). Efferent projections of the nucleus of the solitary tract to peri-locus coeruleus dendrites in rat brain: evidence for a monosynaptic pathway. *J Comp Neurol* **412**, 410-428.

Vandermaelen CP, Aghajanian GK (1983). Electrophysiological and pharmacological characterization of serotonergic dorsal raphe neurons recorded extracellularly and intracellularly in rat brain slices. *Brain Res* **289**, 109-119.

2. Étude II

Cette étude a été acceptée pour publication en 2012 dans *The international Journal of Neuropsychopharmacology*.

ELECTROPHYSIOLOGICAL AND NEUROCHEMICAL EFFECTS OF LONG-TERM VAGUS NERVE STIMULATION ON THE RAT MONOAMINERGIC SYSTEMS

Stella Manta, Mostafa El Mansari, Guy Debonnel, and Pierre Blier

Contributions des co-auteurs:

Cette étude a été élaborée par les Drs Guy Debonnel. et Pierre Blier.

Toutes les données ont été collectées par Stella Manta.

Les résultats ont été analysés par Stella Manta et Pierre Blier.

Le manuscrit a été écrit par Stella Manta et revu puis approuvé par Mostafa El Mansari et Pierre Blier.

Title page

**ELECTROPHYSIOLOGICAL AND NEUROCHEMICAL EFFECTS
OF LONG-TERM VAGUS NERVE STIMULATION
ON THE RAT MONOAMINERGIC SYSTEMS**

Stella Manta¹, Mostafa El Mansari¹, Guy Debonnel^{3,+}, and Pierre Blier^{1,2,3}

2.1. Abstract

Vagus Nerve Stimulation (VNS) is an adjunctive treatment for resistant epilepsy and depression. Electrophysiological recordings in the rat brain have already shown that chronic VNS increases norepinephrine (NE) neuronal firing activity and, subsequently, that of serotonin (5-HT) neurons through an activation of their excitatory α_1 -adrenoceptors. Long-term VNS was shown to increase the tonic activation of postsynaptic 5-HT_{1A} receptors in the hippocampus. This study was aimed at examining the effect of VNS on extracellular 5-HT, NE and dopamine (DA) levels in different brain areas using *in vivo* microdialysis, on NE transmission in the hippocampus, and DA neuronal firing activity using electrophysiology. Rats were implanted with a VNS device and stimulated for 14 days with standards parameters used in treatment-resistant depression (0.25mA, 20Hz, 500 μ sec, 30sec ON-5min OFF). The results of the present study revealed that two weeks of VNS significantly increased extracellular NE levels in the prefrontal cortex and the hippocampus and enhanced the tonic activation of postsynaptic α_2 -adrenoceptors on pyramidal neurons. The electrophysiological experiments revealed a significant decrease in ventral tegmental area DA neuronal firing rate after long-term VNS; extracellular DA levels were nevertheless increased in the prefrontal cortex and nucleus accumbens. Chronic VNS significantly increased extracellular 5-HT levels in the dorsal raphe but not in the hippocampus and prefrontal cortex. In conclusion, the effect of VNS in increasing the transmission of monoaminergic systems targeted in the treatment of resistant-depression should be involved, at least in part, in its antidepressant properties observed in patients not responding to many antidepressant strategies.

2.2. Introduction

Vagus nerve stimulation (VNS) is an adjunctive treatment for resistant epilepsy which has proven efficacy in treating resistant-depression. This procedure has been approved by the US Food and Drug Administration in 2005 as an adjunctive therapy for treatment of non-psychotic unipolar and bipolar depressed patients that have failed to respond to at least four antidepressant trials. The latest open label multicenter study showed a 53 % response rate and a 33 % remission rate after a year of VNS in 74 treatment-resistant patients (Schlaepfer *et al.*, 2008), effects that were sustained two years after VNS surgery (Bajbouj *et al.*, 2010). VNS efficacy was also supported by depressive relapses that occurred in patients that had their VNS therapy interrupted (Ashton, 2010; Conway *et al.*, 2008; Martinez & Zboyan, 2006).

Previous experiments conducted in our laboratory were aimed at elucidating possible mechanisms of action for VNS in depression. These experiments were first conducted in the dorsal raphe (DRN) and the locus coeruleus (LC) to assess the neuronal firing activity of these two major neurotransmitter systems involved in the pathophysiology of depression. The main results were that VNS promptly increase the basal firing activity of LC norepinephrine (NE) neurons after only one hour and secondarily that of DRN serotonin (5-HT) neurons after 14 days (Dorr & Debonnel, 2006). An increase in the firing rate of 5-HT neurons is commonly associated with an increased 5-HT neuronal release (Bosker *et al.*, 1994; Hery *et al.*, 1986) that activates the 5-HT_{1A} somatodendritic autoreceptors. These autoreceptors are presumed to be involved in the short negative feedback loop which, in response to 5-HT release from dendrites within the DRN, decreases the firing activity of 5-HT neurons (Blier *et al.*, 1998). Thus, acute administration of antidepressants such as selective serotonin reuptake inhibitors (SSRIs),

which initially enhances 5-HT extracellular levels, decreases the firing rate of 5-HT neurons. However, following long-term administration of SSRIs, 5-HT_{1A} autoreceptors desensitize and DRN 5-HT neurons recover their normal firing rate (see Pineyro & Blier, 1999). Surprisingly, no change in 5-HT_{1A} autoreceptors sensitivity was observed following VNS, thus suggesting an alternative mechanism to increase 5-HT neuronal firing. Further studies then showed that the effect of VNS on 5-HT neuronal firing was indirect and mediated by LC NE neurons through the enhanced activation of excitatory α_1 -adrenoceptors located on DRN cell bodies (Manta *et al.*, 2009a). These data were consistent with microdialysis studies that revealed that VNS increases NE release in projection areas of the LC such as the hippocampus and cortex (Roosevelt *et al.*, 2006). This study, however, provided information only about acute VNS delivery with different stimulation intensities than the one already shown to be optimal in increasing 5-HT neuronal firing (Manta *et al.*, 2009b). The hippocampus plays an important role in the mediation of the therapeutic effect of various classes of antidepressant treatments (Santarelli *et al.*, 2003). As the rat hippocampus receives a dense noradrenergic innervation arising from the LC (Jones & Moore, 1977) and that NE generally decreases CA3 pyramidal neuronal activity through the activation of postsynaptic α_2 -adrenoceptors (Curet & de Montigny, 1988a; Curet & de Montigny, 1988b), a possible change in the degree of activation of these receptors following VNS treatment, as well as that of the α_1 -adrenoceptors, needed to be investigated.

Recently, dopamine (DA) has also been suggested to be implicated in the pathophysiology of depression (Dunlop & Nemeroff, 2007). For instance, lower concentrations of DA and its metabolite homovanillic acid (HVA) had been reported in the cerebrospinal fluid (CSF) of depressed patients (Lambert *et al.*, 2000; Mitani *et al.*, 2006). Interestingly, a comparison between sham versus active VNS in 21 adults with treatment-

resistant major depression revealed a significant VNS-associated increase in CSF HVA (Carpenter *et al.*, 2004). In addition, mood disorders are highly prevalent in diseases affecting directly the dopaminergic system such as Parkinson's disease (Merschdorf *et al.*, 2003) and the D₂/D₃ receptor agonist pramipexole has been shown to be effective in the treatment of depression (Corrigan *et al.*, 2000) mainly by increasing DA and 5-HT neurotransmission (Chernoloz *et al.*, 2011). DA neurons in the ventral tegmental area (VTA) project to the cerebral cortex and limbic system, the latter including the anterior cingulate and prefrontal cortices, the hippocampus, amygdala, and the nucleus accumbens, which is particularly important for motivation, hedonia, and reward. Despite the role of dopamine in the pathophysiology of depression, there is, however, no preclinical data on the effects of VNS on the DA system.

The present study was therefore first aimed at examining the effect of long-term VNS on the extracellular levels of 5-HT, NE and DA neurotransmitters in brain areas of interest, second, at assessing the tonic activation of postsynaptic α_2 and α_1 -adrenoceptors in the hippocampus, and finally, at characterizing VTA DA neuronal firing activity and pattern using standard stimulation parameters used to treat resistant-depression.

2.3. Methods and Material

Animals.

The experiments were carried out on male Sprague-Dawley rats (Charles River, Canada) weighing between 275 and 300 g at the time of the implantation of the VNS device and housed individually under standard laboratory conditions (12:12 h light-dark cycle with access to food and water *ad libitum*). Body temperature was kept at 37°C during surgery, microdialysis and electrophysiological experiments. All experiments were

performed in accordance with the Canadian Council on Animal Care and the local animal care committee.

VNS Surgery.

Using sterile surgical techniques, animals were operated under equithesine, 1 ml i.p./300 g rat (4.26% chloral hydrate and 0.96% sodium pentobarbital). Supplemental doses of equithesine were given i.p., 0.1 ml at a time, to maintain constant anesthesia and to prevent any nociceptive reaction to a tail pinch. A horizontal incision was made in the ventral aspect of the neck. The skin and muscles were meticulously separated and the left vagus nerve, which lies laterally to the carotid artery, was isolated. Bipolar leads were wrapped around the left carotid artery and the vagus nerve, allowing close contact between the electrodes and the vagus nerve. The leads were sutured in place to the underlying muscle. The leads were then tunneled subcutaneously toward an incision made in the back and were then connected to the stimulator. The stimulator was then placed in a dorsal pocket made under the back skin wiped with iodine and antibiotics and fluid replacement were given to ease recovery. Sham animals underwent the same surgical procedure with leads and a dummy 103-pulse stimulator. After a two-day recovery, the stimulator was turned on for two weeks in treated rats and programmed using standard parameters (0.25 mA/ 20 Hz/ 500 μ seconds pulse width/ 30 seconds ON-5 minutes OFF continuously; Sackeim *et al.*, 2001).

Microdialysis.

Rats were anaesthetized with chloral hydrate 400 mg/kg i.p. and mounted in a stereotaxic apparatus (David Kopf Instruments, Tujunga, CA). The microdialysis probe

(CMA/11, Cuprophan membrane, molecular cut-off of 6000 Daltons, Solna, Sweden) was implanted into the DRN, the hippocampus (HPC), the prefrontal cortex (PFC) or the nucleus accumbens (NAcc). According to the rat brain atlas (Paxinos & Watson, 2007) the stereotaxic coordinates relative to the interaural line were AP, +1.1 mm, L, 0 mm, V, -7 mm for the DRN; AP, +4 mm, L, +4.8 mm, V, -6 mm for the HPC; and AP, +12.7 mm, L, +0.6 mm, V, -4.6 mm for the PFC and AP, +11 mm, L, +1.5 mm, V, -8 mm for the NAcc. The active length of the dialysis membrane was 1 mm for the DRN, 3 mm for the HPC and PFC, 2 mm for the NAcc. The probe was continuously perfused, at a flow rate of 1 μ l/min (CMA/400 microdialysis pump), with the following artificial cerebrospinal fluid: 147 mM NaCl, 2.7 mM KCl, 1 mM MgCl₂, 1.2 mM CaCl₂, adjusted to pH 7.4 with 2 mM sodium phosphate buffer. After a stabilization period of 120 minutes, dialysate fractions (30 μ l) were collected every 30 minutes for 3 hours for measuring dialysate neurotransmitter concentrations. Locations of dialysis probes were confirmed histologically on serial coronal brain sections at the end of each experiment. Different sets of rats were used for each structure and each neurotransmitter studied. Six to eight rats were used per group.

Zero net flux method

As described by Guiard *et al.*, 2008, five fractions were collected to determine basal hippocampal and cortical 5-HT levels before local perfusion of increasing concentrations of 5-HT (5, 10, 20 nM). The dialysate 5-HT concentration ([5-HT]_{out}) obtained during perfusion of the various concentrations of 5-HT ([5-HT]_{in}) are used to construct a linear regression curve where [5-HT]_{in} is plotted on the *x*-axis and the difference between [5-HT]_{in} and [5-HT]_{out} appears on the *y*-axis. The extracellular 5-HT concentration corresponds to a point at which there is no net diffusion of neurotransmitter

between the extracellular space and the microdialysis membrane (when $[5\text{-HT}]_{\text{in}} - [5\text{-HT}]_{\text{out}} = 0$).

Biochemical assays.

NE and DA determination. Dialysate samples were applied onto a high-performance liquid chromatography (HPLC) system coupled with electrochemical detection. Samples (25 μl) were injected by a Hitachi model L-7200 autosampler into a 2.6 μm C18 reverse phase analytical column (Kinetex 150 x 3.0 mm, Phenomenex, Torrance CA). The mobile phase (containing 114 mM NaH_2PO_4 , 150 μM EDTA, 3 mM sodium octylsulfonate and 5 % methanol, adjusted to pH 3.5 with phosphoric acid for NE and containing 70 mM NaH_2PO_4 , 100 μM EDTA, 1 mM sodium octylsulfonate and 15 % methanol, adjusted to pH 4.5 with phosphoric acid for DA) was delivered by a Hitachi model L-7100 pump at a flow rate of 0.45 ml/min. Electrochemical detection was carried out by an ESA Coulochem III detector (ESA, Chelmsford, MA) and analysis of neurotransmitter peak area under the curve using the Empower Pro software (Waters Corporation, Milford, MA).

5-HT determination. Samples (25 μl) were injected into a 2.6 μm C18 reverse phase analytical column (Kinetex 50 x 3.0 mm, Phenomenex, Torrance, CA). The mobile phase containing 150 mM NaH_2PO_4 , 4.76 mM citric acid, 50 μM EDTA, 1.5 mM sodium dodecyl sulfate, 10 % methanol and, 15 % acetonitrile, adjusted to pH 5.6 with NaOH was delivered at a flow rate of 0.3 ml/min.

Electrophysiological experiments

Rats were anaesthetized with chloral hydrate (400 mg/kg i.p.) and mounted in a stereotaxic apparatus (David Kopf Instruments, Tujunga, CA). The experiments were

performed with the VNS device in place but inactivated for the duration of the experiments to avoid electrical interference.

Recordings of VTA DA neurons. Single-barreled glass micropipettes were positioned using the following coordinates (in mm from λ): AP, +3.0 to +3.8; L, 0.6–1; V, 6.5–9. The presumed DA neurons were identified according to the well-established electrophysiological properties in vivo: a typical triphasic action potential with a marked negative deflection; a characteristic long duration (>2.5 ms) often with an inflection or ‘notch’ on the rising phase ; a slow spontaneous firing rate (0.5-9 Hz) with an irregular single spiking pattern with slow bursting activity (characterized by spike amplitude decrement; (Grace & Bunney, 1983). Additionally, as previously described, a criterion of duration (>1.1 ms from the start of the action potential to the negative trough was used (Ungless *et al.*, 2004). The firing patterns of DA neurons were analyzed by interspike interval burst analysis following the criteria set by (Grace & Bunney, 1984). The onset of a burst was defined as the occurrence of two spikes with an interspike interval shorter than 0.08 s. The termination of a burst was defined as an interspike interval of 0.16 s or longer. Five to six rats were used per group.

Recordings of CA3 pyramidal neurons of dorsal hippocampus. Extracellular recording of CA3 pyramidal neurons and microiontophoresis were carried out with five-barreled glass micropipettes. The central barrel used for the unitary recording was filled with a 2 M NaCl solution, and the impedance of these electrodes ranged from 2 to 4 M Ω . The four side barrels were filled with the following solutions: 5-HT creatinine sulfate (15 mM in 200 mM NaCl, pH 4), (\pm)-NE bitartrate (10 mM in 200 mM NaCl, pH 4), quisqualic acid (1.5 mM in 200 mM NaCl, pH 8), and the last barrel was filled with a 2 M NaCl solution used for automatic current balancing. Prior to the electrophysiological recordings a catheter was inserted in a lateral tail vein for systemic intravenous (i.v.)

injection of pharmacological agents. The microelectrodes were lowered into the dorsal CA3 region of the hippocampus using the following coordinates; 4 mm anterior to lambda and 4.2 mm lateral. Pyramidal neurons were found at a depth of 4.0 ± 0.5 mm below the surface of the brain. Since the pyramidal neurons do not discharge spontaneously in chloral hydrate anesthetized rats, a small ejection current or a leak of quisqualate was used to activate them within their physiological firing range (10 to 15 Hz; (Ranck, 1973). Pyramidal neurons were identified by their large amplitude (0.5–1.2 mV) and long-duration (0.8–1.2 ms) simple action potentials, alternating with complex spike discharges (Kandel & Spencer, 1961). The duration of microiontophoretic application of 5-HT and NE was 50 seconds. Neuronal responsiveness to the microiontophoretic application of 5-HT and NE was assessed by determining the number of spikes suppressed per nanoampere (nA) per Hz. The degree of tonic activation of postsynaptic α_2 - and α_1 -adrenoceptors was assessed by injecting the selective antagonists idazoxan and prazosin, respectively. Indeed, after lowering and obtaining a steady firing baseline idazoxan (1000 $\mu\text{g}/\text{kg}$) and prazosin (100 $\mu\text{g}/\text{kg}$) were intravenously administered, always in this order, to assess the percentage of changes in the firing activity in sham and VNS treated rats. Five to six rats were used per group.

Drugs and Materials

Components of HPLC mobile phases, artificial cerebrospinal fluid, neurotransmitters standards and drugs were obtained from Sigma-Aldrich (St-Louis, MO). The leads, model 103-pulse stimulators and dummy stimulators were provided by Cyberonics, Inc. (Houston, Texas).

Statistical analysis

Statistical analysis of changes in basal extracellular 5-HT, NE, and DA levels, firing rate and burst activity of DA neurons, responsiveness to 5-HT and NE application in the hippocampus and tonic activation postsynaptic α_2 - and α_1 -adrenoceptors, between sham and VNS treated groups were performed using a two-tailed t-test. Zero net flux data were analyzed by linear regression. All values are expressed by mean \pm SEM and the level of significance set at $p < 0.05$.

2.4. Results

Effects of long-term VNS on extracellular NE levels

A two-week VNS delivery significantly increased extracellular NE levels in the prefrontal cortex by 58 % (2.63 ± 0.10 pg/sample in sham versus 4.15 ± 0.22 pg/sample in VNS-treated rats; $p < 0.001$; Fig. 1a) and in the hippocampus by 14 % (2.55 ± 0.10 pg/sample in sham versus 2.91 ± 0.11 pg/sample in VNS-treated rats; $p = 0.028$; Fig. 1b). No change in extracellular NE levels was observed in the DRN between sham and VNS treated rats (2.36 ± 0.13 pg/sample in sham versus 2.64 ± 0.13 pg/sample in VNS-treated rats; $p = 0.148$; Fig. 1c).

Effects of long-term VNS on the responsiveness of CA3 pyramidal neurons to exogenous NE and 5-HT

The microiontophoretic application of NE and 5-HT suppressed the firing activity of CA3 pyramidal neurons in the hippocampus in a current-dependant manner in sham rats as expressed as number of spikes suppressed per nA per Hz (Fig. 2a). A two-week VNS delivery did not result in a modification of the suppressant effect of local application of NE

and 5-HT on hippocampal firing rate revealing an unaltered sensitivity of postsynaptic α_2 -adrenoceptors and 5-HT_{1A} receptors in the hippocampus (Fig. 2b-c).

Effects of long-term VNS on the tonic activation of postsynaptic α_2 - and α_1 -adrenoceptors in the hippocampus

The intravenous administration of the selective α_2 - and α_1 -adrenoceptors antagonists idazoxan and prazosin, respectively, did not modify the firing activity of dorsal hippocampus CA3 pyramidal neurons in sham rats, as previously reported by Ghanbari *et al.*, 2011. After a two-week VNS delivery, the administration of idazoxan significantly increased the firing activity of CA3 pyramidal neurons (from 20 ± 16 % in sham rats to 107 ± 46 % in VNS treated rats $p=0.03$; Fig. 3), whereas the administration of prazosin had no effect ($p=0.96$), therefore indicating a greater tonic activation of only the postsynaptic α_2 -adrenoceptors.

Effects of long-term VNS on VTA DA firing activity

A two-week VNS delivery significantly decreased VTA DA neuronal firing rate by 23 % (from 3.24 ± 0.24 Hz in sham rats to 2.50 ± 0.35 Hz in VNS treated rats; $p=0.025$; Fig. 4a). No change was observed between sham and VNS treated rats regarding the firing pattern of these neurons such as the number of burst per min, number of spikes per burst, % of spikes occurring in burst, and mean burst length (Fig. 4b).

Effects of long-term VNS on extracellular DA levels

A two-week VNS delivery significantly increased extracellular DA levels in the prefrontal cortex by 26 % (1.15 ± 0.11 pg/sample in sham versus 1.55 ± 0.07 pg/sample in

VNS-treated rats; $p=0.005$; Fig. 5a) and in the nucleus accumbens by 27 % (2.91 ± 0.18 pg/sample in sham versus 3.7 ± 0.13 pg/sample in VNS-treated rats; $p<0.001$; Fig. 5b).

Effects of long-term VNS on extracellular 5-HT levels

A two-week VNS delivery significantly increased extracellular 5-HT in the DRN by 30 % compared to sham rats (1.57 ± 0.14 pg/sample in sham versus 2.04 ± 0.16 pg/sample in VNS-treated rats; $p=0.03$; Fig. 6a).

Conventional microdialysis and zero net flux (ZNF) method were employed to assess extracellular 5-HT concentrations in the hippocampus and prefrontal cortex. Both methods showed no change in basal 5-HT extracellular concentrations between sham and long-term VNS treated rats neither in the hippocampus nor in the prefrontal cortex (respectively, 1.0 ± 0.10 pg/sample in sham versus 1.04 ± 0.10 pg/sample in VNS-treated rats; $p=0.77$ and 1.15 ± 0.13 pg/sample in sham versus 1.35 ± 0.19 pg/sample in VNS-treated rats; $p=0.31$; Fig. 6b-c).

2.5. Discussion

The present results confirmed major impacts of long-term VNS on monoaminergic systems. Chronic VNS markedly enhanced extracellular NE levels in the prefrontal cortex and to a lesser extent in the hippocampus and increased the degree of activation of postsynaptic α_2 -adrenoceptors located on CA3 pyramidal neurons. However, no change in extracellular NE levels was observed in the DRN. The electrophysiological experiments revealed a decrease in VTA DA neuronal firing rate after 2 weeks of VNS without any change in their firing pattern, however, a significant increase of extracellular DA levels was detected in the prefrontal cortex and the nucleus accumbens. Chronic VNS

significantly increased extracellular 5-HT levels in the DRN but not in two postsynaptic structures, namely the hippocampus and prefrontal cortex.

The NE neurotransmitter has been proposed to be implicated in the pathophysiology of depression for many years (El Mansari *et al.*, 2010; Schildkraut, 1974). In the present study, a marked increase of extracellular NE levels was observed in the prefrontal cortex and in the hippocampus following 14 days of VNS. These results are in keeping with those of previous studies showing also an enhancement of NE levels in these brain areas after acute VNS (Raedt *et al.*, 2011; Roosevelt *et al.*, 2006). They are also consistent with the net increased firing rate and burst activity of the LC NE neurons reported in our previous experiments (Manta *et al.*, 2009a). Moreover, following the 14-day delivery of VNS, the degree of activation of α_2 -adrenoceptors was enhanced while that of α_1 -adrenoceptors remained unaltered. A similar increase in the tonic activation of α_2 -adrenoceptors has already been found following a long-term administration with the antidepressant bupropion (Ghanbari *et al.*, 2011). Interestingly, the hippocampal α_2 -adrenoceptors have recently been shown to be implicated in the seizure-suppressing effect of acute VNS treatment (Raedt *et al.*, 2011). Thus, this robust action of VNS on extracellular NE levels in postsynaptic structures as well as the increased NE neurotransmission that results may be involved, at least in part, in the antidepressant effect of VNS. Indeed, this action of VNS on the NE system is different from that of SSRIs, for example, which exert a negative influence on NE neuronal firing activity and NE release (Dremencov *et al.*, 2007; Kawahara *et al.*, 2007; Szabo *et al.*, 2000). Furthermore, this negative impact of SSRI on the NE system could be in part responsible of residual symptoms such as fatigue, concentration difficulties, cognitive impairment in patients receiving such treatment. (Blier & Briley, 2011; Kasper *et al.*, 2011).

Because of the implication of DA in depression and the critical role of DA pathways in the regulation of motivation and reward, it was deemed essential to investigate the effect of long-term VNS in that monoaminergic system. In the present study, a significant increase of extracellular DA levels in both prefrontal cortex and nucleus accumbens following VNS delivery was unexpected in the presence of an attenuated firing rate of the VTA DA neurons. The present results revealed that the firing rate and release are not always correlated. Other mechanisms may thus be involved in an increase of extracellular DA levels such as changes in terminal area. This is supported by a previous study showing that an inhibition of VTA DA neuronal firing induced by the infusion of tetrodotoxin in that area did not prevent the enhanced DA release in the medial PFC induced by systemic administration of the atypical antipsychotic asenapine. (Franberg *et al.*, 2009). In contrast, in the same study, the inhibition of VTA neuronal firing completely blocked the increase of accumbens dopamine induced by the injection of asenapine, suggesting that this increase is dependent on VTA DA neuronal activity. As VTA DA neuronal firing is decreased following chronic VNS, the increase of extracellular DA levels observed after such treatment in the nucleus accumbens should involve other mechanisms. An explanation for the enhanced extracellular DA levels despite a diminished VTA DA neuronal firing rate would be a change in terminal DA D₂ autoreceptors sensitivity. Indeed, a recent *in vitro* electrophysiological study demonstrated the ability of terminal D₂ receptors, which normally inhibit DA release, to show a decrease in their effectiveness (Fawaz *et al.*, 2009). It would thus be interesting to assess terminal D₂ receptor function following chronic VNS. Finally, despite a diminished firing rate of VTA DA neurons, the increase in extracellular DA levels in postsynaptic areas could be at play in the efficacy of VNS in depression. Amongst SSRIs, only fluoxetine was shown to increase extracellular

DA in the prefrontal cortex acutely but failed to do so chronically (Bymaster *et al.*, 2002; Tanda *et al.*, 1996b). Moreover, acutely or chronically administered fluoxetine had no effect on extracellular DA in the nucleus accumbens (Clark *et al.*, 1996; Koch *et al.*, 2002). Other antidepressants such as desipramine, nortriptyline and, mianserin induce an enhancement of extracellular DA levels in the prefrontal cortex but not in the nucleus accumbens suggesting a regionally selective effect (Carlson *et al.*, 1996; Tanda *et al.*, 1996a). Thus, the significant increase of DA observed both in the prefrontal cortex and the nucleus accumbens after chronic VNS could help improving depressive symptoms when VNS therapy is added to the treatment as usual of resistant-depressed patients.

Antidepressant therapies have been consistently shown to affect 5-HT neuronal activity and principally contributing to an increase in 5-HT neurotransmission after chronic antidepressant treatment (Blier & de Montigny, 1994), thus showing an important role of 5-HT in the antidepressant response. The present study showed an increase of extracellular 5-HT levels in the DRN after 14 days of VNS delivery. This is congruent with previous electrophysiological studies in the rat brain showing an increase of the firing rate of DRN 5-HT neurons by about 30 % after 14 days and by 100 % after 90 days of VNS (Dorr & Debonnel, 2006). While such an increase, following antidepressant treatments, is usually attributable to a desensitization of 5-HT_{1A} autoreceptors (see Pineyro & Blier, 1999), a 14-day VNS delivery did not yield such desensitization. Nevertheless, it is now well documented that reciprocal interactions exist between monoaminergic neurons and that an increase in DRN 5-HT neurons firing rate can be obtained through the activation of α_1 -adrenergic receptors (Baraban & Aghajanian, 1980) and/or D₂-like dopamine receptors (Aman *et al.*, 2007; Chernoloz *et al.*, 2009; Haj-Dahmane, 2001), both located on the soma of 5-HT neurons in the DRN. Although, the present study was not able to detect changes in

extracellular NE levels in the DRN, the increase in DRN 5-HT neuronal firing rate after VNS was shown to be mediated by the activation of the α_1 -adrenergic receptors (Manta *et al.*, 2009a). Moreover, α_1 -adrenoceptors were shown to be implicated in the modulation of 5-HT release, when the infusion of the α_1 -adrenoceptor antagonist prazosin decreased the citalopram-induced increase in 5-HT levels in the DRN (Rea *et al.*, 2010). Thus, the increased extracellular 5-HT levels in the DRN may be due to the activation of the somatic α_1 -adrenergic receptors on 5-HT neurons.

In the prefrontal cortex, in contrast to chronic administration of SSRIs, which have been shown many times to increase cortical extracellular 5-HT levels (Bel & Artigas, 1993; Ceglia *et al.*, 2004; Tanda *et al.*, 1996b), long-term VNS had no effect on 5-HT levels in that area. In the hippocampus, as with a variety of antidepressants (Blier & de Montigny, 1994; Haddjeri *et al.*, 1998), our previous results have shown that 14 days of VNS delivery increase the degree of activation of postsynaptic 5-HT_{1A} receptors (Manta *et al.*, 2009a), without an alteration of their sensitivity, that reflects an enhancement of 5-HT transmission. However, the present study showed no change in extracellular 5-HT levels in the hippocampus following VNS delivery even by using the more sensitive zero net flux method. A similar phenomenon was observed when an increase in the α_1 -adrenergic receptors tonic activation already reported (Manta *et al.*, 2009a) was not associated to an increase in extracellular NE levels in the DRN. For instance, with SSRIs, many discrepancies exist between studies regarding a possible 5-HT extracellular increase in the hippocampus after long-term treatment. Several groups reported, for example, that chronic treatments with citalopram, paroxetine or fluoxetine produce an increase in extracellular 5-HT levels in the hippocampus (Gundlah *et al.*, 1997; Hajos-Korcsok *et al.*, 2000; Kreiss & Lucki, 1995), while other groups did not observe any change after repeated paroxetine or citalopram in the same structure (Gardier *et al.*, 2003; Invernizzi *et al.*, 1995). However,

using electrophysiology, it was possible to show an increase in the tonic activation of postsynaptic 5-HT_{1A} receptors after long-term administration with these antidepressants (El Mansari *et al.*, 2005; Haddjeri *et al.*, 1998; Mnie-Filali *et al.*, 2011). It is interesting to note that the electrophysiological approach assesses neurotransmitter activity in the biophase of the receptors, while microdialysis estimates the concentration of neurotransmitters in the extracellular compartment. Thus, despite a lack of change in extracellular 5-HT levels in the hippocampus, VNS was shown to increase the tonic activation of 5-HT_{1A} postsynaptic receptors suggesting an enhancement of 5-HT neurotransmission in the forebrain.

In conclusion, the present results support the enhancing effect of VNS on NE transmission in forebrain structures when using stimulation parameters currently used in the clinic to treat resistant depression. Moreover, despite a diminished firing activity of VTA DA neurons, VNS increased extracellular DA levels in postsynaptic structures, especially in the nucleus accumbens which plays an important role in reward and hedonia. The enhancement of 5-HT transmission observed using electrophysiological approach in the hippocampus was not detected using microdialysis, but the enhanced firing of 5-HT neurons was reflected at their cell bodies in the dorsal raphe by an increased extracellular level of 5-HT. Finally, the effect of VNS in increasing the transmission of key monoaminergic systems targeted in the treatment of depression might explain, at least in part, the efficacy of VNS, when added to treatment as usual, in patients failing to respond to previous antidepressant strategies. Moreover, a better understanding of how VNS affect each monoaminergic systems and their projection areas will be very helpful to eventually

find the best combination of VNS with other antidepressants to further improve response and remission rates of treatment-resistant depressed patients.

There are some limitations of this study. First, all experiments were conducted on healthy animals, however, although it would have been relevant to carry out them in rats with depressive-like symptoms, there is no consensus yet as to the best animal model of depression. Second, it would have been preferable to perform our experiments after 90 days of VNS, which is the average wait to observe clinical responses in patients with resistant-depression receiving VNS. However, regarding the number of stimulators available for all the experiments (7) it would have been technically difficult to collect our results in a reasonable amount of time. Furthermore, it is difficult to predict how much can be inferred from the effects of 14 days compared to 90 days, however it is important to note that the effects of VNS on 5-HT and NE neuronal firing activity are already significant after 14 days of stimulation but in a less pronounced manner (Dorr & Debonnel, 2006). Thus, the 14-day stimulation period can still give reliable clues regarding the long-term impact of VNS on all three monoaminergic systems.

2.6. Acknowledgements

The VNS stimulators and leads were provided by Cyberonics Inc. Houston, Texas. The study was funded through a Canadian Institutes of Health Research grant to P.B and by Cyberonics. P.B. was in receipt of the Canadian Research Chair in Psychopharmacology, the Endowed Chair in Mood Disorders Research from the University of Ottawa Institute of Mental Health Research.

2.7. Conflict of Interest

M. El Mansari and S. Manta report no potential conflicts of interest. Dr Blier received honoraria for participation in advisory boards, for giving lectures, and received investigator-initiated grants from Astra Zeneca, Bristol-Myers Squibb, Eli Lilly, Janssen, Labopharm, Lundbeck/Takeda, Merck, Pfizer, Servier.

2.8. Figures and Legends

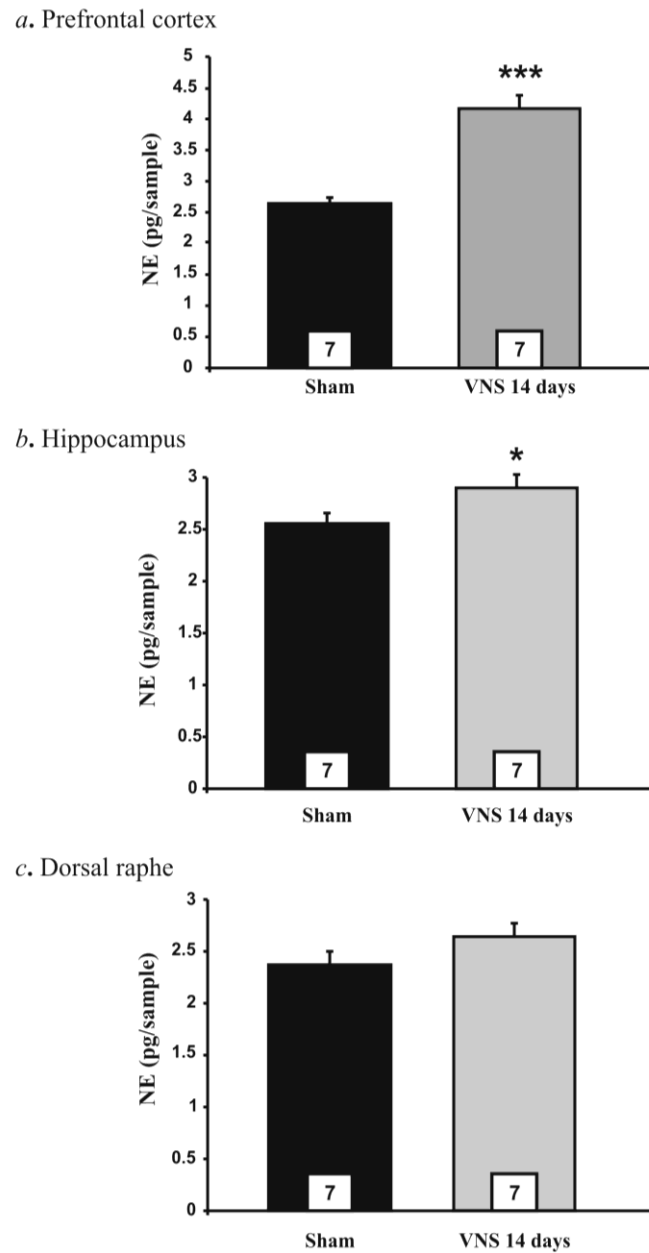


Figure 1. Effects of chronic VNS on basal extracellular norepinephrine (NE) levels in (a) the prefrontal cortex (PFC), (b) the hippocampus (HPC), and, (c) the dorsal raphe (DRN) in anesthetized rats. Graph bars represent mean \pm SEM of pg/sample collected over 3 hours after stabilization. Numbers at the bottom of the column represent the numbers of rats used. * $p < 0.05$, *** $p < 0.001$ between sham and VNS treated rats.

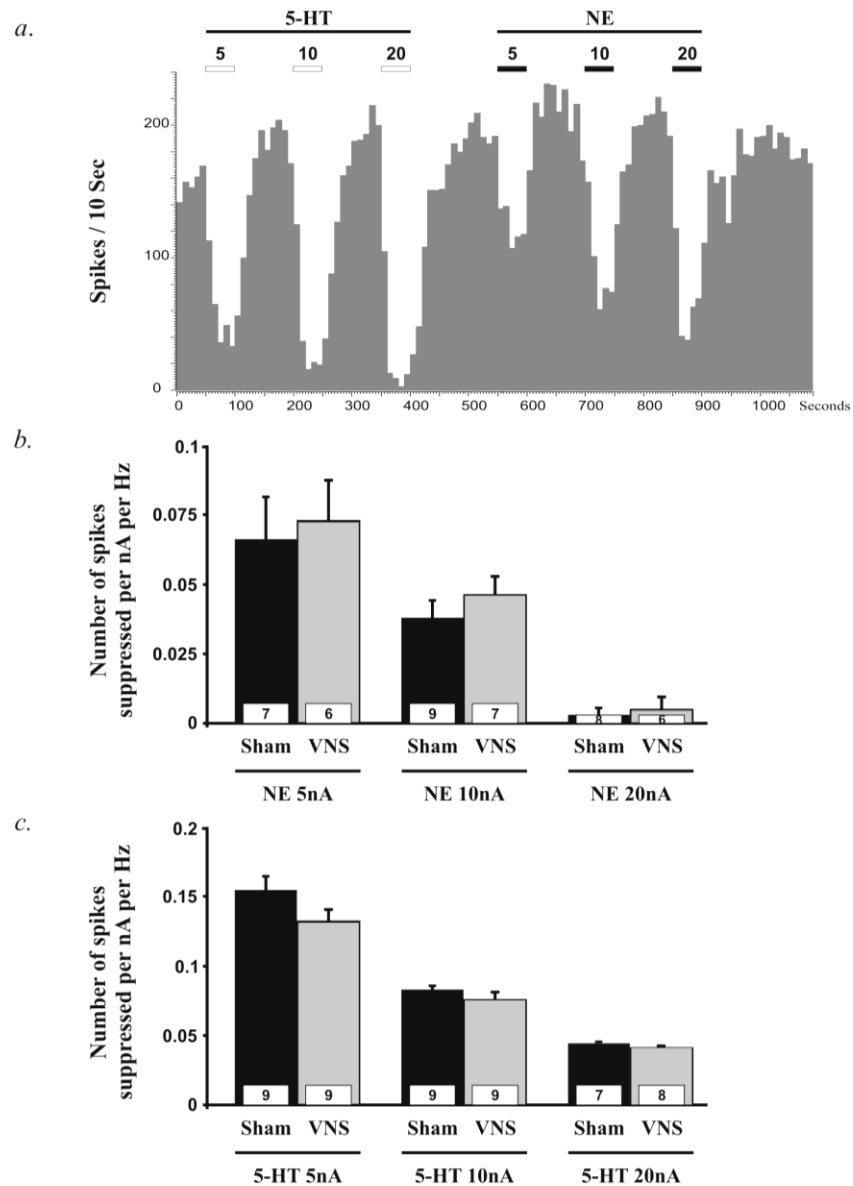


Figure 2. Integrated firing rate histogram of a CA3 pyramidal neuron in the hippocampus of a control rats during the microiontophoretic application of 5-HT and NE (*a*), and responses of CA3 pyramidal neurons to different currents of NE (*b*) or 5-HT (*c*) in sham and VNS-treated rats. Horizontal bars indicate the duration of iontophoretic ejection and current values in nA. Data are expressed as mean \pm SEM of the number of spikes suppressed per nA per Hz. Numbers at the bottom of the columns represent the number of neurons tested.

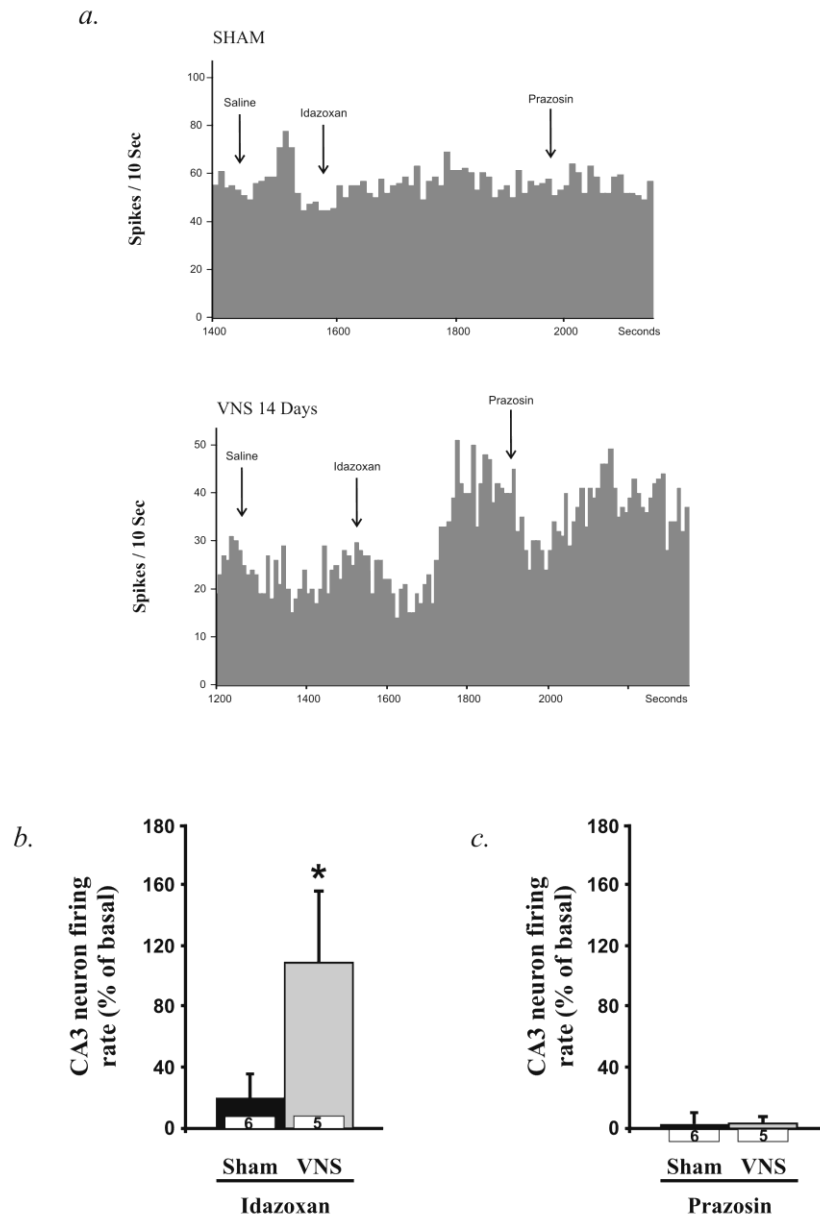


Figure 3. Integrated firing rate histogram of a CA3 pyramidal neuron in the hippocampus of a control rat (upper panel) and a 14-day VNS treated-rat (lower panel) during the i.v. administration of idazoxan and prazosin (*a*) and graph bars representing the overall changes of firing activity of CA3 pyramidal neurons after systemic injections of idazoxan (*b*) and prazosin (*c*) in sham and VNS treated-rats. Numbers at the bottom of the columns represent the number of rats used. * $p < 0.05$ between sham and VNS treated rats..

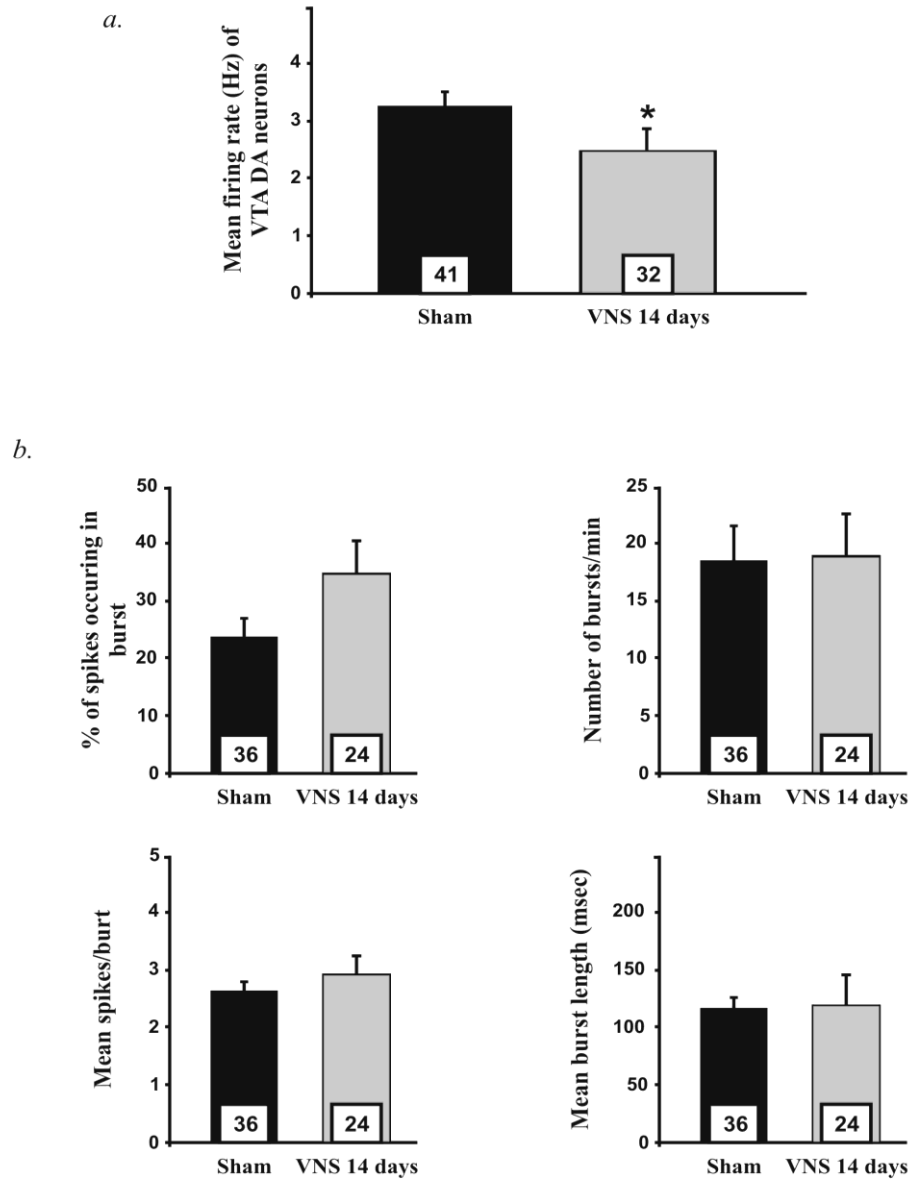


Figure 4. Graph bars representing mean \pm SEM of (a) the spontaneous firing rate and (b) the percentage of spikes occurring in burst, the number of bursts per minute, the mean spikes per burst and the mean burst length in ventral tegmental area (VTA) dopamine (DA) neurons of sham and 14 days VNS-treated rats. Numbers at the bottom of the columns represent the numbers of neurons recorded. Six to seven rats were used per group. * $p < 0.05$ between sham and VNS treated rats.

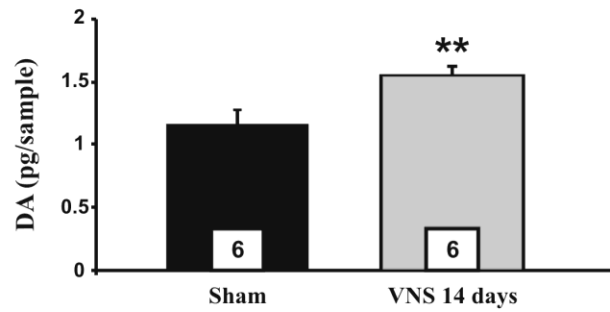
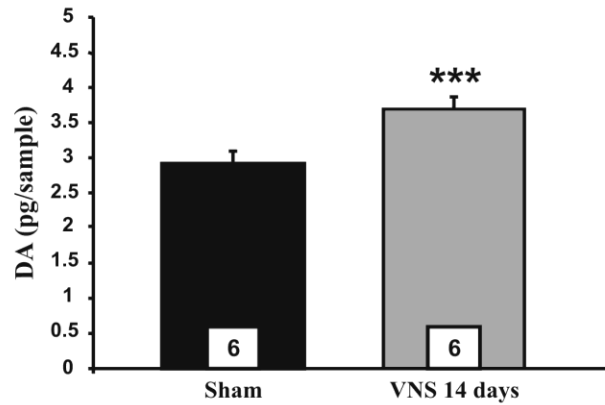
a. Prefrontal cortex*b.* Nucleus accumbens

Figure 5. Effects of chronic VNS on basal extracellular dopamine (DA) levels in (a) the prefrontal cortex (PFC), and (b) the nucleus accumbens in anesthetized rats. Graph bars represent mean \pm SEM of pg/sample collected over 3 hours after stabilization. Numbers at the bottom of the columns represent the numbers of rats used. ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$ between sham and VNS treated rats.

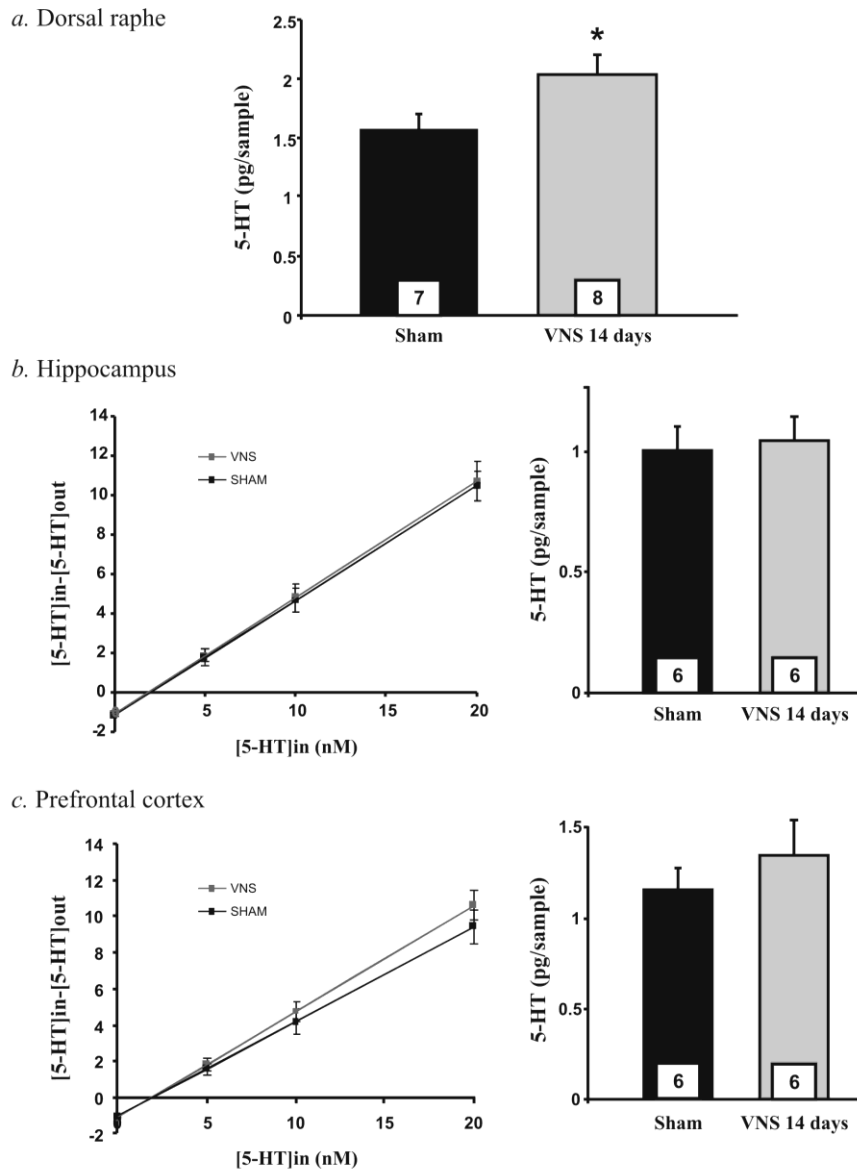


Figure 6. Effects of chronic VNS on basal extracellular serotonin (5-HT) levels in (a) the dorsal raphe, (b) the hippocampus using the zero net flux method (ZNF; left) or conventional microdialysis method (right), and (c) the prefrontal cortex using the ZNF (left) or conventional microdialysis method (right). Graphs represent a linear regression of ZNF data, the x -intercepts corresponds to the extracellular 5-HT levels. Histograms represent mean \pm SEM of pg/sample collected over 3 hours after stabilization. Numbers at the bottom of the column represent the numbers of rats used. * $p < 0.05$ between sham and VNS treated rats.

2.9. References

- Aman TK, Shen RY, Haj-Dahmane S** (2007). D2-like dopamine receptors depolarize dorsal raphe serotonin neurons through the activation of nonselective cationic conductance. *J Pharmacol Exp Ther* **320**, 376-385.
- Ashton AK** (2010). Depressive relapse after vagal nerve stimulator explantation. *Am J Psychiatry* **167**, 719-720.
- Bajbouj M, Merkl A, Schlaepfer TE, Frick C, et al.** (2010). Two-year outcome of vagus nerve stimulation in treatment-resistant depression. *Journal of Clinical Psychopharmacology* **30**, 273-281.
- Baraban JM, Aghajanian GK** (1980). Suppression of firing activity of 5-HT neurons in the dorsal raphe by alpha-adrenoceptor antagonists. *Neuropharmacology* **19**, 355-363.
- Bel N, Artigas F** (1993). Chronic treatment with fluvoxamine increases extracellular serotonin in frontal cortex but not in raphe nuclei. *Synapse* **15**, 243-245.
- Blier P, Briley M** (2011). The noradrenergic symptom cluster: clinical expression and neuropharmacology. *Journal of Neuropsychiatric Disease and Treatment* **7**, 15-20.
- Blier P, de Montigny C** (1994). Current advances and trends in the treatment of depression. *Trends Pharmacol Sci* **15**, 220-226.
- Blier P, Pineyro G, el Mansari M, Bergeron R, et al.** (1998). Role of somatodendritic 5-HT autoreceptors in modulating 5-HT neurotransmission. *Ann N Y Acad Sci* **861**, 204-216.
- Bosker F, Klomp makers A, Westenberg H** (1994). Extracellular 5-hydroxytryptamine in median raphe nucleus of the conscious rat is decreased by nanomolar concentrations of 8-hydroxy-2-(di-n-propylamino) tetralin and is sensitive to tetrodotoxin. *J Neurochem* **63**, 2165-2171.
- Bymaster FP, Zhang W, Carter PA, Shaw J, et al.** (2002). Fluoxetine, but not other selective serotonin uptake inhibitors, increases norepinephrine and dopamine extracellular levels in prefrontal cortex. *Psychopharmacology (Berl)* **160**, 353-361.
- Carlson JN, Visker KE, Nielsen DM, Keller RW, Jr., et al.** (1996). Chronic antidepressant drug treatment reduces turning behavior and increases dopamine levels in the medial prefrontal cortex. *Brain Res* **707**, 122-126.
- Carpenter LL, Moreno FA, Kling MA, Anderson GM, et al.** (2004). Effect of vagus nerve stimulation on cerebrospinal fluid monoamine metabolites, norepinephrine, and gamma-aminobutyric acid concentrations in depressed patients. *Biol Psychiatry* **56**, 418-426.

Ceglia I, Acconcia S, Fracasso C, Colovic M, et al. (2004). Effects of chronic treatment with escitalopram or citalopram on extracellular 5-HT in the prefrontal cortex of rats: role of 5-HT_{1A} receptors. *Br J Pharmacol* **142**, 469-478.

Chernoloz O, El Mansari M, Blier P (2009). Electrophysiological studies in the rat brain on the basis for aripiprazole augmentation of antidepressants in major depressive disorder. *Psychopharmacology (Berl)* **206**, 335-344.

Chernoloz O, El Mansari M, Blier P (2011). Long-term administration of the dopamine D_{3/2} receptor agonist pramipexole increases dopamine and serotonin neurotransmission in the male rat forebrain. *Journal of Psychiatry and Neuroscience* **37**, 113-121.

Clark RN, Ashby CR, Jr., Dewey SL, Ramachandran PV, et al. (1996). Effect of acute and chronic fluoxetine on extracellular dopamine levels in the caudate-putamen and nucleus accumbens of rat. *Synapse* **23**, 125-131.

Conway CR, Chibnall JT, Tait RC (2008). Vagus nerve stimulation for depression: a case of a broken lead, depression relapse, revision surgery, and restoration of patient response. *Brain Stimul* **1**, 227-228.

Corrigan MH, Denahan AQ, Wright CE, Ragual RJ, et al. (2000). Comparison of pramipexole, fluoxetine, and placebo in patients with major depression. *Depress Anxiety* **11**, 58-65.

Curet O, de Montigny C (1988a). Electrophysiological characterization of adrenoceptors in the rat dorsal hippocampus. I. Receptors mediating the effect of microiontophoretically applied norepinephrine. *Brain Res* **475**, 35-46.

Curet O, de Montigny C (1988b). Electrophysiological characterization of adrenoceptors in the rat dorsal hippocampus. II. Receptors mediating the effect of synaptically released norepinephrine. *Brain Res* **475**, 47-57.

Dorr AE, Debonnel G (2006). Effect of vagus nerve stimulation on serotonergic and noradrenergic transmission. *J Pharmacol Exp Ther* **318**, 890-898.

Dremencov E, El Mansari M, Blier P (2007). Noradrenergic augmentation of escitalopram response by risperidone: electrophysiologic studies in the rat brain. *Biological Psychiatry* **61**, 671-678.

Dunlop BW, Nemeroff CB (2007). The role of dopamine in the pathophysiology of depression. *Arch Gen Psychiatry* **64**, 327-337.

El Mansari M, Guiard BP, Chernoloz O, Ghanbari R, et al. (2010). Relevance of norepinephrine-dopamine interactions in the treatment of major depressive disorder. *CNS Neurosci Ther* **16**, e1-17.

El Mansari M, Sanchez C, Chouvet G, Renaud B, et al. (2005). Effects of acute and long-term administration of escitalopram and citalopram on serotonin neurotransmission:

an in vivo electrophysiological study in rat brain. *Neuropsychopharmacology* **30**, 1269-1277.

Fawaz CS, Martel P, Leo D, Trudeau LE (2009). Presynaptic action of neurotensin on dopamine release through inhibition of D(2) receptor function. *BMC Neurosci* **10**, 96.

Franberg O, Marcus MM, Ivanov V, Schilstrom B, et al. (2009). Asenapine elevates cortical dopamine, noradrenaline and serotonin release. Evidence for activation of cortical and subcortical dopamine systems by different mechanisms. *Psychopharmacology (Berl)* **204**, 251-264.

Gardier AM, David DJ, Jégo G, Przybylski C, et al. (2003). Effects of chronic paroxetine treatment on dialysate serotonin in 5-HT_{1B} receptor knockout mice. *J Neurochem* **86**, 13-24.

Ghanbari R, El Mansari M, Blier P (2011). Enhancement of serotonergic and noradrenergic neurotransmission in the rat hippocampus by sustained administration of bupropion. *Psychopharmacology (Berl)* **217**, 61-73.

Grace AA, Bunney BS (1984). The control of firing pattern in nigral dopamine neurons: burst firing. *J Neurosci* **4**, 2877-2890.

Grace AA, Bunney BS (1983). Intracellular and extracellular electrophysiology of nigral dopaminergic neurons--3. Evidence for electrotonic coupling. *Neuroscience* **10**, 333-348.

Guiard BP, David DJ, Deltheil T, Chenu F, et al. (2008). Brain-derived neurotrophic factor-deficient mice exhibit a hippocampal hyperserotonergic phenotype. *Int J Neuropsychopharmacol* **11**, 79-92.

Gundlach C, Hjorth S, Auerbach SB (1997). Autoreceptor antagonists enhance the effect of the reuptake inhibitor citalopram on extracellular 5-HT: this effect persists after repeated citalopram treatment. *Neuropharmacology* **36**, 475-482.

Haddjeri N, Blier P, de Montigny C (1998). Long-term antidepressant treatments result in a tonic activation of forebrain 5-HT_{1A} receptors. *J Neurosci* **18**, 10150-10156.

Haj-Dahmane S (2001). D₂-like dopamine receptor activation excites rat dorsal raphe 5-HT neurons in vitro. *Eur J Neurosci* **14**, 125-134.

Hajos-Korcsok E, McTavish SF, Sharp T (2000). Effect of a selective 5-hydroxytryptamine reuptake inhibitor on brain extracellular noradrenaline: microdialysis studies using paroxetine. *Eur J Pharmacol* **407**, 101-107.

Hery F, Faudon M, Fueri C (1986). Release of serotonin in structures containing serotonergic nerve cell bodies: dorsalis raphe nucleus and nodose ganglia of the cat. *Annals of the New York Academy of Sciences* **473**, 239-255.

Invernizzi R, Bramante M, Samanin R (1995). Extracellular concentrations of serotonin in the dorsal hippocampus after acute and chronic treatment with citalopram. *Brain Res* **696**, 62-66.

Jones BE, Moore RY (1977). Ascending projections of the locus coeruleus in the rat. II. Autoradiographic study. *Brain Res* **127**, 25-53.

Kandel ER, Spencer WA (1961). Electrophysiology of hippocampal neurons. II. Afterpotentials and repetitive firing. *J Neurophysiol* **24**, 243-259.

Kasper S, Meshkat D, Kutzelnigg A (2011). Improvement of the noradrenergic symptom cluster following treatment with milnacipran. *Journal of Neuropsychiatric Disease and Treatment* **7**, 21-27.

Kawahara Y, Kawahara H, Kaneko F, Tanaka M (2007). Long-term administration of citalopram reduces basal and stress-induced extracellular noradrenaline levels in rat brain. *Psychopharmacology (Berl)* **194**, 73-81.

Koch S, Perry KW, Nelson DL, Conway RG, et al. (2002). R-fluoxetine increases extracellular DA, NE, as well as 5-HT in rat prefrontal cortex and hypothalamus: an in vivo microdialysis and receptor binding study. *Neuropsychopharmacology* **27**, 949-959.

Kreiss DS, Lucki I (1995). Effects of acute and repeated administration of antidepressant drugs on extracellular levels of 5-hydroxytryptamine measured in vivo. *J Pharmacol Exp Ther* **274**, 866-876.

Lambert G, Johansson M, Agren H, Friberg P (2000). Reduced brain norepinephrine and dopamine release in treatment-refractory depressive illness: evidence in support of the catecholamine hypothesis of mood disorders. *Arch Gen Psychiatry* **57**, 787-793.

Manta S, Dong J, Debonnel G, Blier P (2009a). Enhancement of the function of rat serotonin and norepinephrine neurons by sustained vagus nerve stimulation. *J Psychiatry Neurosci* **34**, 272-280.

Manta S, Dong J, Debonnel G, Blier P (2009b). Optimization of vagus nerve stimulation parameters using the firing activity of serotonin neurons in the rat dorsal raphe. *Eur Neuropsychopharmacol* **19**, 250-255.

Martinez JM, Zboyan HA (2006). Vagus nerve stimulation therapy in a patient with treatment-resistant depression: a case report of long-term follow-up and battery end-of-service. *CNS Spectr* **11**, 143-147.

Merschdorf U, Berg D, Csoti I, Fornadi F, et al. (2003). Psychopathological symptoms of depression in Parkinson's disease compared to major depression. *Psychopathology* **36**, 221-225.

Mitani H, Shirayama Y, Yamada T, Kawahara R (2006). Plasma levels of homovanillic acid, 5-hydroxyindoleacetic acid and cortisol, and serotonin turnover in depressed patients. *Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry* **30**, 531-534.

Mnie-Filali O, Faure C, Lambas-Senas L, El Mansari M, et al. (2011). Pharmacological blockade of 5-HT(7) receptors as a putative fast acting antidepressant strategy. *Neuropsychopharmacology* **36**, 1275-1288.

Paxinos G, Watson C (2007). *Paxinos & Watson the rat brain in stereotaxic coordinates*. 6th edn. Elsevier: Amsterdam.

Pineyro G, Blier P (1999). Autoregulation of serotonin neurons: role in antidepressant drug action. *Pharmacol Rev* **51**, 533-591.

Raedt R, Clinckers R, Mollet L, Vonck K, et al. (2011). Increased hippocampal noradrenaline is a biomarker for efficacy of vagus nerve stimulation in a limbic seizure model. *J Neurochem* **117**, 461-469.

Ranck JB, Jr. (1973). Studies on single neurons in dorsal hippocampal formation and septum in unrestrained rats. I. Behavioral correlates and firing repertoires. *Exp Neurol* **41**, 461-531.

Rea K, Folgering J, Westerink BH, Cremers TI (2010). Alpha1-adrenoceptors modulate citalopram-induced serotonin release. *Neuropharmacology* **58**, 962-971.

Roosevelt RW, Smith DC, Clough RW, Jensen RA, et al. (2006). Increased extracellular concentrations of norepinephrine in cortex and hippocampus following vagus nerve stimulation in the rat. *Brain Res* **1119**, 124-132.

Sackeim HA, Rush AJ, George MS, Marangell LB, et al. (2001). Vagus nerve stimulation (VNS) for treatment-resistant depression: efficacy, side effects, and predictors of outcome. *Neuropsychopharmacology* **25**, 713-728.

Santarelli L, Saxe M, Gross C, Surget A, et al. (2003). Requirement of hippocampal neurogenesis for the behavioral effects of antidepressants. *Science* **301**, 805-809.

Schildkraut JJ (1974). Biogenic amines and affective disorders. *Annu Rev Med* **25**, 333-348.

Schlaepfer TE, Frick C, Zobel A, Maier W, et al. (2008). Vagus nerve stimulation for depression: efficacy and safety in a European study. *Psychol Med* **38**, 651-661.

Szabo ST, de Montigny C, Blier P (2000). Progressive attenuation of the firing activity of locus coeruleus noradrenergic neurons by sustained administration of selective serotonin reuptake inhibitors. *The International Journal of Neuropsychopharmacology* **3**, 1-11.

Tanda G, Bassareo V, Di Chiara G (1996a). Mianserin markedly and selectively increases extracellular dopamine in the prefrontal cortex as compared to the nucleus accumbens of the rat. *Psychopharmacology (Berl)* **123**, 127-130.

Tanda G, Frau R, Di Chiara G (1996b). Chronic desipramine and fluoxetine differentially affect extracellular dopamine in the rat prefrontal cortex. *Psychopharmacology (Berl)* **127**, 83-87.

Ungless MA, Magill PJ, Bolam JP (2004). Uniform inhibition of dopamine neurons in the ventral tegmental area by aversive stimuli. *Science* **303**, 2040-2042.

3. Étude III

Cette étude a été publiée en 2009 dans *European Journal of Neuropsychopharmacology*. 19(4):250-255.

**OPTIMIZATION OF VAGUS NERVE STIMULATION PARAMETERS
USING THE FIRING ACTIVITY OF SEROTONIN NEURONS
IN THE RAT DORSAL RAPHE**

Stella Manta, Jianming Dong, Guy Debonnel et Pierre Blier

Contributions des co-auteurs:

Cette étude a été élaborée par les Docteur Guy Debonnel et Pierre Blier.

Toutes les données ont été collectées par Stella Manta et Jianming Dong.

Les résultats ont été analysés par Stella Manta et Pierre Blier.

Le manuscrit a été écrit par Stella Manta et revu puis approuvé par Pierre Blier.

Title page

**OPTIMIZATION OF VAGUS NERVE STIMULATION
PARAMETERS
USING THE FIRING ACTIVITY OF SEROTONIN NEURONS
IN THE RAT DORSAL RAPHE**

Stella Manta,¹ Jianming Dong,² Guy Debonnel,^{2,+} Pierre Blier^{1,2}

3.1. Abstract

Vagus nerve stimulation (VNS) is a recently approved adjunctive intervention for treatment-resistant depression. This therapy enhances the firing rate of rat norepinephrine neurons after 1 hour and that of serotonin (5-HT) neurons only after 14 days. Various stimulation parameters were thus tested on their capacity to enhance 5-HT neuronal firing because of the delayed action of VNS on the 5-HT system and its important role in the antidepressant response. Rats were implanted with a stimulator and treated for 14 days, each group of rats having only one stimulation parameter modified from the standard ones (0.25 mA, 20 Hz, 500 μ sec, 30 sec ON/5 min OFF). Electrophysiological recordings showed that the usual parameters utilized in depressed patients, with the exception of current intensity, produced an optimal activation of 5-HT neurons. Excessive enhancement of the charge delivered to the nerve can lead to a loss of VNS effect on 5-HT neuronal firing.

Keywords : Vagus Nerve Stimulation (VNS), stimulation parameters, serotonin, electrophysiology, depression

3.2. Introduction

Vagus nerve stimulation (VNS) is a treatment which has been used for many years for refractory epilepsy (Buoni *et al.*, 2004). Mood improvement using VNS in patients with epilepsy, despite the improvement in their seizure disorder, had strongly suggested that VNS might have antidepressant effects (Elger *et al.*, 2000). Early open-label studies on the effects of VNS in addition to antidepressant medications for severe treatment-resistant depression demonstrated a 35 % clinical improvement of the depressive symptoms and of the cognitive abilities (Rush *et al.*, 2000; Sackeim *et al.*, 2001). VNS therapy was approved for use in drug-resistant depression in both Canada and Europe in 2001 and by the Food and Drug Administration in 2005. More recently, VNS has again shown antidepressant efficacy in patients with treatment-resistant depression with a 37% response rate and a 17% remission rate after a 3 month open multicentre study (Schlaepfer *et al.*, 2008). The level of clinical response increased to 53% and the remission rates reached 33% after one year of treatment (Schlaepfer *et al.*, 2008). Another clinical study has shown that the response rate can also be improved two years after the initiation of VNS (Nahas *et al.*, 2005).

VNS refers to stimulation of the left cervical vagus nerve using a commercial device, a neurocybernetic prosthesis. The device is multi-programmable and stimulation parameters include output current, frequency, pulse width and stimulation periods which can be modified to maximize the effectiveness of VNS on disease state. In 1992, an animal study was conducted in dogs using EEG and EMG to determine the most effective parameters for epilepsy (Zabara, 1992). These parameters were then employed in the initial clinical trials for epilepsy (Ben-Menachem *et al.*, 1994; Handforth *et al.*, 1998) and also adopted for clinical trials in patients with depression (George *et al.*, 2000a; George *et al.*,

2000b; Rush *et al.*, 2000; Sackeim *et al.*, 2001). More recent reports from European studies suggested that modifying stimulation parameters could increase the efficacy of VNS in refractory patients and/or modify its effects on brain functions (Lomarev *et al.*, 2002; Mu *et al.*, 2004). Thus, it is possible to find the most effective stimulation parameters for treatment-resistant depression by investigating the effect of different VNS parameters on brain regional activity known to be implicated on the pathophysiology of depression. The mechanism of action of VNS, however, is not fully understood.

The vagus nerve sends projections to the nucleus tractus solitarius (NTS), which in turn projects to the locus coeruleus (LC) through two disynaptic pathways (Ennis & Aston-Jones, 1988; Ennis & Aston-Jones, 1989). The LC would then enhance the firing rate of 5-HT neurons through its monosynaptic excitatory input to the dorsal raphe nucleus (DRN). It is well established that the serotonin (5-HT) and norepinephrine (NE) systems are known to be important in the pathophysiology of depression and in the mechanisms of action of antidepressants. Recent electrophysiological studies have reported that VNS enhances the firing rate of NE neurons within hours of its initiation, whereas it was found that an increase in 5-HT neuronal firing rate became statistically significant only after two weeks and increased up to 90 days of stimulation (Dorr & Debonnel, 2006). Furthermore, it appears that the effects of VNS on the 5-HT system are mediated through its robust effect in enhancing the firing rate and pattern of NE neurons (Manta *et al.*, 2007). Thus, the 5-HT system appears to be a better indicator of the therapeutic action from a time perspective and also because an enhancement in 5-HT neurotransmission is a more common underlying target for the therapeutic effect of a wide variety of antidepressant treatments (Blier & de Montigny, 1994; Owens, 1996). The previously mentioned experiments were conducted using the standard stimulation parameters for humans (0.25 mA, 20 Hz, 500 μ sec, 30 sec ON, 5 min OFF).

The present *in vivo* electrophysiological study aimed to investigate in rats, the effectiveness of various stimulation parameters after two weeks of VNS administration in enhancing the firing activity of DRN 5-HT neurons to attempt putting into evidence improvements of stimulation parameters that could help optimize VNS in treatment-resistant depression.

3.3 Methods and Material

Animals.

The experiments were carried out on male Sprague-Dawley rats (Charles River Canada) weighing a minimum of 275 g at the time of the implantation of the VNS device and housing under standard laboratory conditions (12:12 light-dark cycle with access to food and water *ad libitum*). Body temperature was kept at 37°C during the surgery and electrophysiological experiments. Experiments were approved by the McGill University Animal Care Committee.

Surgery.

Using sterile surgical techniques, animals were operated on under equithesine, 1 ml i.p./300 g rat (4.26% chloral hydrate and 0.96% sodium pentobarbital). Supplemental doses of equithesine were given i.p., 0.1 ml at a time, to maintain constant anesthesia and to prevent any nociceptive reaction to a tail pinch. A horizontal incision was made in the ventral aspect of the neck. The skin and muscles were meticulously separated and the left vagus nerve, which lies lateral to the carotid artery, was isolated. Bipolar leads were wrapped around the left carotid artery and the vagus nerve, allowing close contact between the vagus nerve and the electrodes. The leads were sutured in place to the underlying

muscle. The leads were tunneled subcutaneously toward an incision made in the back and were then connected to the stimulator. The stimulator was then placed in a dorsal pocket made under the back skin wiped with iodine and antibiotics and fluid replacement was given to ease recovery. Sham control animals underwent the same surgical procedure with leads and a dummy 102-pulse stimulator was inserted. The lead impedance was checked to ensure a tight connection between the nerve and the coil, using the device diagnostic setting on the NeuroCybernetic Prosthesis (NCP) handheld-computer and programming wand from Cyberonics Inc. After a two-day recovery, the stimulator was turned on for two weeks in treated rats and programmed with a variety of outputs: current range, 0.25 to 1 mA; frequency range, 1 to 144 Hz; pulse width from 130 to 750 μ sec and a duty cycle of 30 seconds ON every 0.8 to 5 minutes; continuous cycle. A system diagnostic (lead test) is performed again before the electrophysiological experiment to check the electrical connections of the whole system, as well as the integrity of the lead.

Electrophysiological experiments.

These were performed with the VNS device in place but inactivated for the duration of experiment to avoid electrical interference after completion of the two weeks of stimulation (or sham stimulation). Rats were anaesthetized with chloral hydrate 400 mg/kg i.p. and were mounted on a stereotaxic apparatus.

Recordings of Dorsal Raphe 5-HT neurons

In vivo electrophysiological extracellular unitary recordings were carried out using single glass micropipettes. The electrodes were filled with a 2 M NaCl solution, with an impedance range of 2 to 4 M Ω . A burr hole was drilled on the midline 1 mm anterior to

lambda and dorsal raphe 5-HT neurons were encountered over a distance of 1 mm starting immediately below the ventral border of the Sylvius aqueduct.

5-HT DRN neurons were identified using the criteria of (Aghajanian & Vandermaelen, 1982): a slow flow (0.5-2.5 Hz) and regular firing rate and long duration (0.8-1.2 ms) positive action potentials. In order to determine the average firing rate for each group, at least five electrode descents were made per rat at 100 μ m distances from the first descent. Each neuron was recorded for at least 1 minute after stabilization. Neuronal firing rates were calculated by adding each discharge per 10-s period (as obtained by the Spike2 program during recording) and divided by length of time recorded in seconds. All neuronal firing rates for single groups were added together and divided by the number of neurons recorded per group.

Drugs and materials

The leads, model 103-pulse stimulators, and dummy stimulators were provided by Cyberonics (Houston, Texas)

Statistics

Electrophysiological data were expressed as means \pm S.E.M. of firing rates. Nonparametric tests were used as firing rates were not normally distributed. Average firing rates for control and treated groups were compared using the Kruskal-Wallis one-way analysis of variance on rank test. Post hoc tests were performed using Dunn's multiple comparisons test to assess the difference between control and treated groups.

3.4. Results

Alteration of stimulation intensity on the firing of 5-HT neurons

The intensity of the stimulation was modified from 0.25 to 1.0 mA, while keeping all other parameters constant. A significant increase of the firing of dorsal raphe 5-HT neurons (by 49 %) was observed with the 0.25 mA current. Increasing current intensity lead to the loss of the increased firing frequency of 5-HT neurons above the control value (fig. 1).

Alteration of stimulation frequency on the firing of 5-HT neurons

The frequency of the stimulation was modified from 1 to 144 Hz, while keeping all others parameters constant. Stimulation frequencies of 1 to 30 Hz lead to significant increases of 5-HT neuronal firing in the dorsal raphe. The apparent optimal increase was obtained at the 20 Hz frequency (fig. 2). In contrast, the highest stimulation frequency (144 Hz) significantly decreased the firing rate of 5-HT neurons by 30%.

Alteration of stimulation duration on the firing of 5-HT neurons

The duration of the stimulation was modified from 130 to 750 μ seconds, while keeping all others parameters constant. Only the 130 and 500 μ seconds pulses enhanced the firing of dorsal raphe 5-HT neurons (by 34 % and 49 % respectively; Fig. 3) with the apparent optimal effect observed at the 500 μ second duration of the pulses.

Alteration of the stimulation intervals between the ON periods on the firing of 5-HT neurons

The duty cycle of the stimulation was modified using intervals of 0.8 to 5 min, while keeping all others parameters constant. The 0.8 and 5 minutes ON period increased significantly the firing of dorsal raphe 5-HT neurons by 25% and 45 % respectively (fig. 4).

3.5. Discussion

The results of the present study indicated that the optimal VNS parameters to activate 5-HT neurons firing activity were principally the ones commonly used in the clinic to treat resistant depression, with the exception of the current intensity.

When using VNS for the treatment of epilepsy or depression, changes of stimulation parameters can increase or decrease therapeutic efficacy. Usually, the output current is set at 0.25 mA at the start of VNS therapy, and increased in 0.25 to 0.5 mA steps when failing to achieve a positive response from the patients. However, potential side effects of VNS therapy tend to increase with output current (voice alteration, hoarseness, cough, a feeling of throat tightening, and dyspnea; (Labiner & Ahern, 2007), but these side effects can decrease with time (Morris & Mueller, 1999). The present study showed that the most effective output current in enhancing the firing activity of DRN 5-HT neurons was the 0.25 mA intensity as the firing frequency of 5-HT neurons decreased with increased amperage (fig. 1). In clinical studies for treatment-resistant depression, however, the median output current after 12 months in a controlled naturalistic study was 1 mA (Rush *et al.*, 2005). The difference observed in the effective stimulus intensity between patients and rats could probably be explained by the different threshold currents necessary

to activate fibers of the vagus nerve in rats and in humans. The vagus nerve, at the cervical level, is composed of afferent myelinated A and B fibers and unmyelinated C fibers. It was previously shown that activation of vagal C-fibers was not necessary for VNS to induce seizure suppression in rats (Krahl *et al.*, 2001) and revealed the role of myelinated afferent vagal fibers. With regards to the A fibers, their threshold activation currents were established in patients and ranged between 0.5 and 1.5 mA (Binks *et al.*, 2001), whereas an *in vivo* intracellular study in rats has shown that a stimulus strength of 0.1 mA was sufficient to activate these fibers (Zagon & Kemeny, 2000). These fibers are thus likely activated in the rat with a smaller current to obtain the same effect as in humans. Nevertheless, the present results obtained by varying the current also showed that, in rats, higher stimulation intensities are not better in optimizing the efficacy of VNS on the 5-HT system.

Previous preclinical experiments for the use of VNS in epilepsy have already found an optimum frequency of stimulation between 20 and 30 Hz to reduce seizure frequency (Heck *et al.*, 2002; Zabara, 1992). Clinical study results suggest a frequency of 20 Hz for patients with depression (Rush *et al.*, 2005; Sackeim *et al.*, 2001). The present experiments also showed a significant increase activity of 5-HT neurons from 1 to 30 Hz with an optimal efficacy at 20 Hz. In contrast, enhancing the frequency to 144 Hz, significantly decreased the firing rate of 5-HT DRN neurons (fig. 2). This attenuation below the control value is likely due to the fact that axons cannot conduct impulses at such high frequencies. Therefore, 5-HT neurons likely received attenuated NE impulses, which normally drive their firing rate up through the excitatory α_1 -adrenergic heteroreceptors located on their cell body (Baraban & Aghajanian, 1980). Thus, these basic results on frequency modulation are in agreement with the optimal frequency obtained with patients under VNS therapy for depression.

When examining the effects of varying pulse widths, it is also important to consider the charge delivered (multiplying the pulse width in microseconds by the current intensity in milliamps gives the charge delivered per pulse expressed in microCoulombs) since modulating the overall charge is a crucial variable in producing brain effects (Mu *et al.*, 2004). The median pulse duration in depression or epilepsy is 500 μ sec (Handforth *et al.*, 1998; Rush *et al.*, 2005), but this parameter value can be decreased to 250 μ sec in patients who experience side effects of VNS therapy (pain in the throat or jaw, teeth and neck; (Liporace *et al.*, 2001). The more effective pulse width, in the present electrophysiological experiments to increase 5-HT neuronal firing activity was also found to be 500 μ sec (fig. 3). Increasing this parameter lead to a loss of the effect of VNS on these neurons, suggesting that enhancing the charge too much may not improve the effectiveness of this therapy. These results were actually expected because the actual depolarizing phase of most action potentials is of the order of half a millisecond and significant deviations from this duration would not be compatible with the physiology of nerve fibers.

The duty cycle parameter allows regulation of the ON and OFF period of stimulation. In 1990, Agnews and his group have shown in an animal study that a duty cycle greater than 50% (stimulation with ON period longer than OFF period) resulted in neural degeneration (Agnew & McCreery, 1990). VNS clinical trials for epilepsy then showed that the duty cycle of 30 seconds ON every 5 minutes was safe and effective (Handforth *et al.*, 1998); this programmed ON and OFF time was then used in depression clinical studies (Rush *et al.*, 2005; Sackeim *et al.*, 2001). In the present experiments, it appears that the optimal duty cycle was the standard 5 minute interval between the stimulation periods because the firing frequency of 5-HT neurons was only increased with this 5 minute period which again matches with clinical data (fig. 4).

Taken together, these results showed that the VNS parameters used routinely with some success to treat resistant depression are the same as those which lead to the greater increase in 5-HT neuronal firing. Enhancing too much the charge delivered (current x time) also appeared not to be effective to improve VNS efficacy as it was observed herein that it can even lead to a loss of VNS effect on 5-HT neuronal firing. These results obtained in laboratory rats can also be taken as a validation of the use of the firing activity of 5-HT neurons as a reliable target to determine the optimal parameters of VNS in patients. Although this report tends to confirm the existing clinical parameters for VNS (with the exception of current intensity > 0.25 mA) additional studies will attempt further optimization based on augmentation of 5-HT neuronal activity.

3.6. Acknowledgements

Pierre Blier received a Research Chair in Psychopharmacology from the Canadian Government, and an endowed chair from the University of Ottawa Institute of Mental Health Research.

3.7. Conflict of Interest

Pierre Blier and Guy Debonnel were paid consultants for Cyberonics.

3.8. Figures and Legends

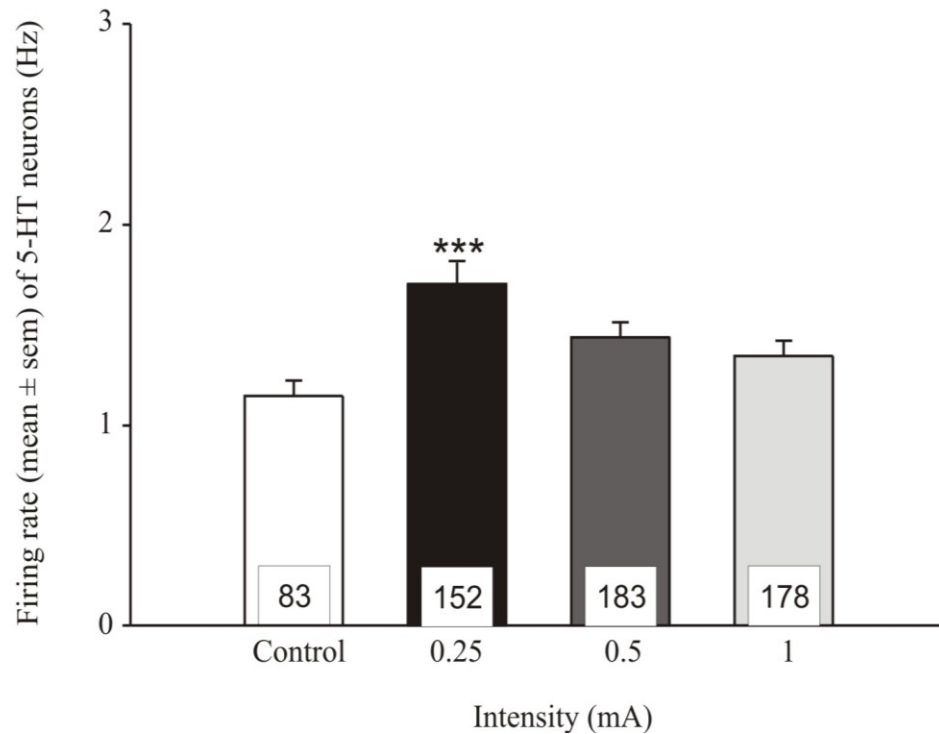


Figure 1. Histograms representing means \pm S.E.M. spontaneous firing activity of DRN 5-HT neurons. The average 5-HT neuronal firing rate was measured in control and two-week VNS treated rats for the three stimulation intensities, 0.25, 0.5, and 1.0 milliamperes (mA). The numbers at the bottoms of the columns represent the number of neurons tested. Five or six rats were used per group. *** $p < 0.001$ treated rats versus control.

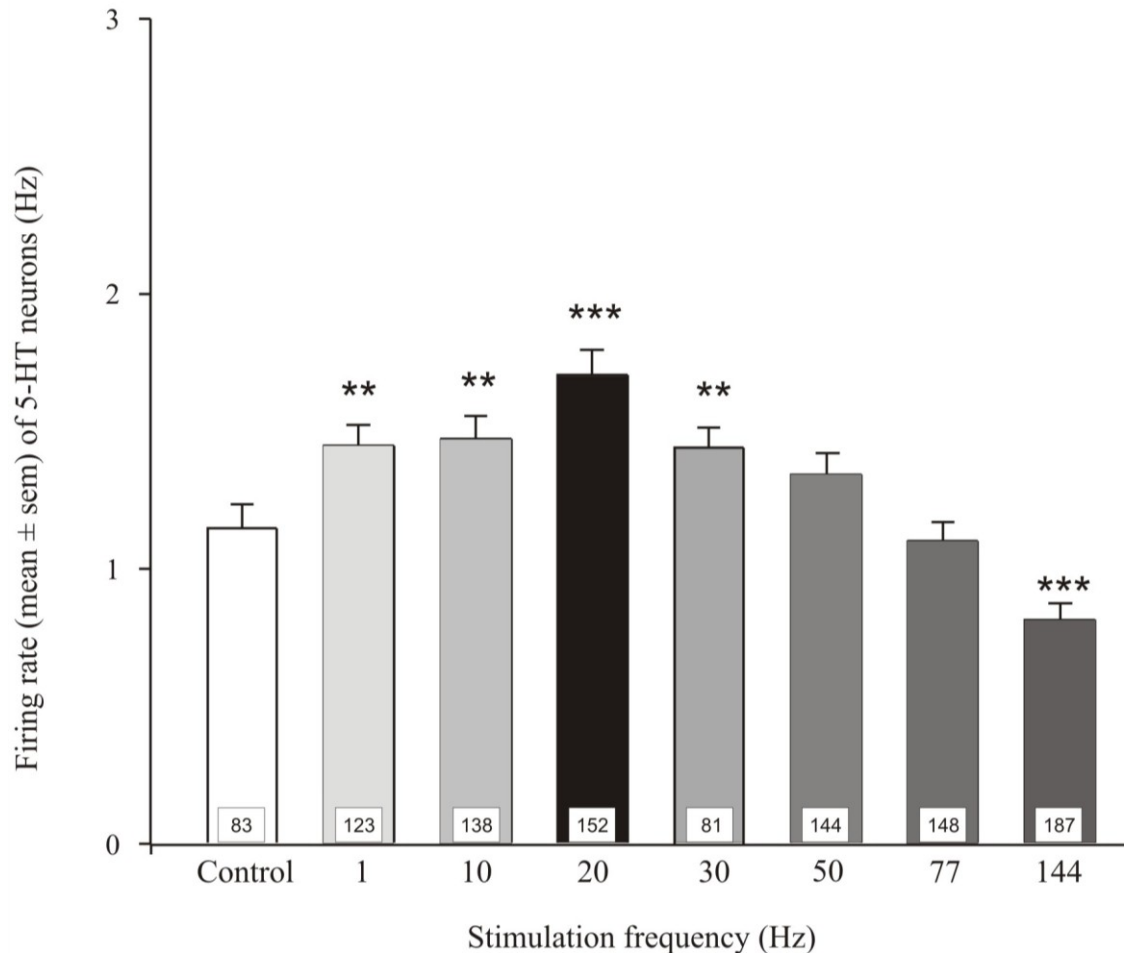


Figure 2. Histograms representing means \pm S.E.M. spontaneous firing activity of DRN 5-HT neurons. The average 5-HT neuronal firing rate was measured in control and two-week VNS treated rats for the seven stimulation frequencies from 1 to 144 Hertz (Hz). The numbers at the bottoms of the columns represent the number of neurons tested. Five or six rats were used per group. ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$ treated rats versus control.

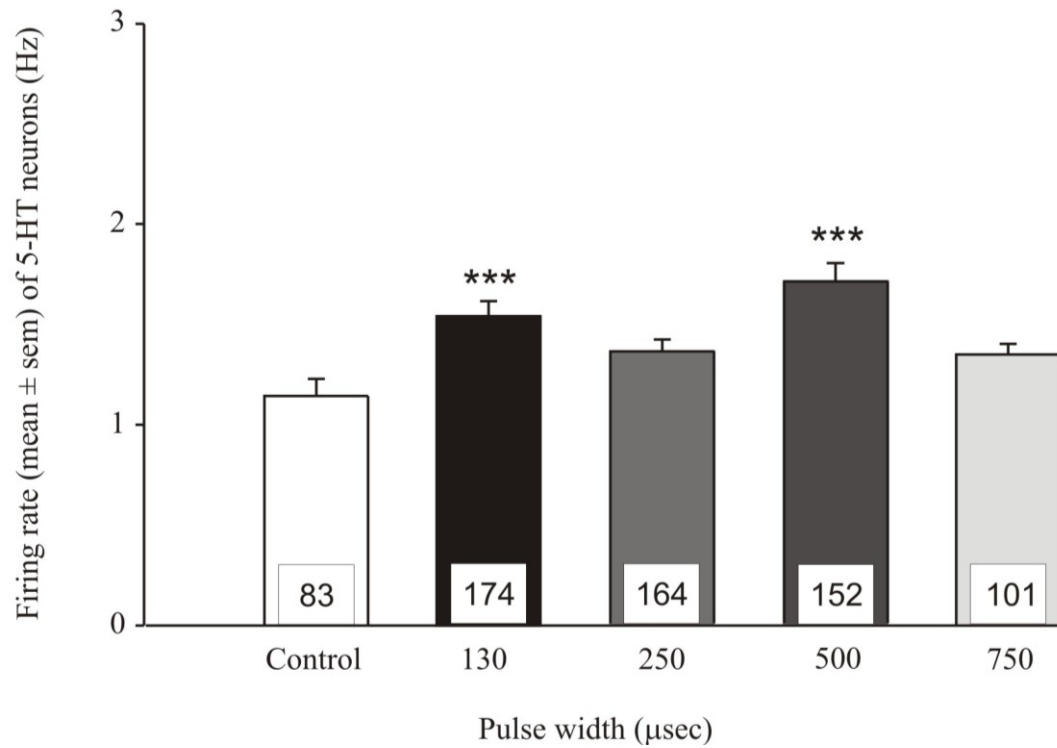


Figure 3. Histograms representing means \pm S.E.M. spontaneous firing activity of DRN 5-HT neurons. The average 5-HT neuronal firing rate was measured in control and two-week VNS treated rats for the four pulse widths (PW) from 130 to 750 μ seconds. The numbers at the bottoms of the columns represent the number of neurons tested. Five or six rats were used per group. *** $p < 0.001$ treated rats versus control.

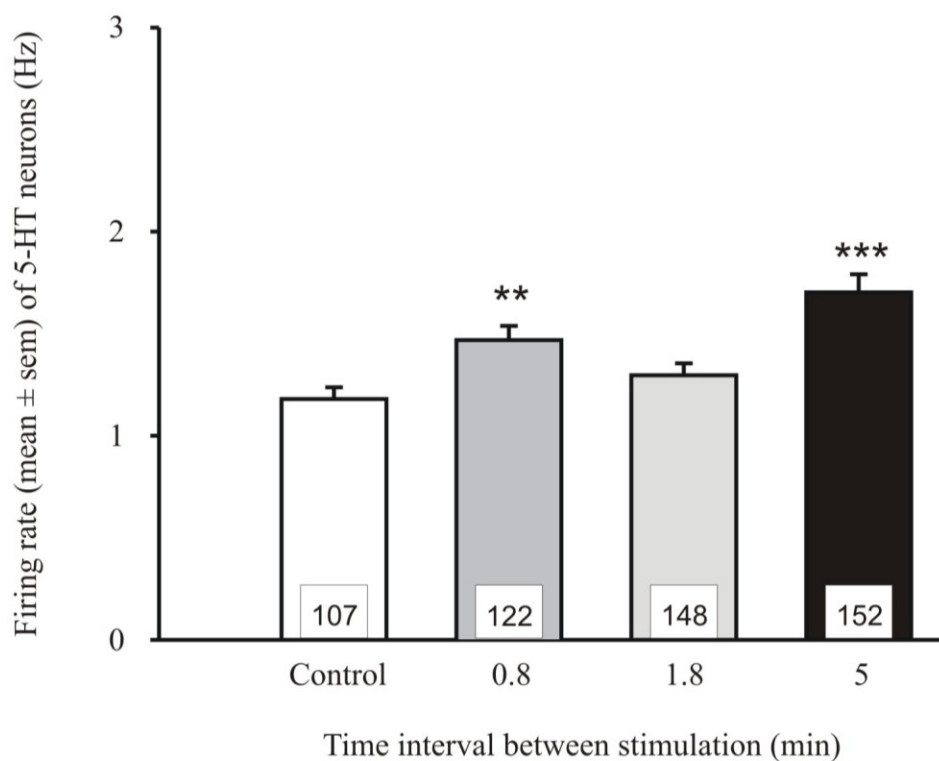


Figure 4. Histograms representing means \pm S.E.M. spontaneous firing activity of DRN 5-HT neurons. The average 5-HT neuronal firing rate was measured in control and two-week VNS treated rats for the three OFF periods (between 30 second stimulation epochs) of 0.8, 1.8, and 5.0 minutes. The numbers at the bottoms of the columns represent the number of neurons tested. Five or six rats were used per group. ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$ treated rats versus control.

3.9. References

- Aghajanian GK, Vandermaelen CP** (1982). Intracellular identification of central noradrenergic and serotonergic neurons by a new double labeling procedure. *J Neurosci* **2**, 1786-1792.
- Agnew WF, McCreery DB** (1990). Considerations for safety with chronically implanted nerve electrodes. *Epilepsia* **31 Suppl 2**, S27-32.
- Baraban JM, Aghajanian GK** (1980). Suppression of firing activity of 5-HT neurons in the dorsal raphe by alpha-adrenoceptor antagonists. *Neuropharmacology* **19**, 355-363.
- Ben-Menachem E, Manon-Espaillet R, Ristanovic R, Wilder BJ, Stefan H, Mirza W, Tarver WB, Wernicke JF** (1994). Vagus nerve stimulation for treatment of partial seizures: 1. A controlled study of effect on seizures. First International Vagus Nerve Stimulation Study Group. *Epilepsia* **35**, 616-626.
- Binks AP, Paydarfar D, Schachter SC, Guz A, Banzett RB** (2001). High strength stimulation of the vagus nerve in awake humans: a lack of cardiorespiratory effects. *Respir Physiol* **127**, 125-133.
- Blier P, de Montigny C** (1994). Current advances and trends in the treatment of depression. *Trends Pharmacol Sci* **15**, 220-226.
- Buoni S, Mariottini A, Pieri S, Zalaffi A, Farnetani MA, Strambi M, Palma L, Fois A** (2004). Vagus nerve stimulation for drug-resistant epilepsy in children and young adults. *Brain Dev* **26**, 158-163.
- Dorr AE, Debonnel G** (2006). Effect of vagus nerve stimulation on serotonergic and noradrenergic transmission. *J Pharmacol Exp Ther* **318**, 890-898.
- Elger G, Hoppe C, Falkai P, Rush AJ, Elger CE** (2000). Vagus nerve stimulation is associated with mood improvements in epilepsy patients. *Epilepsy Res* **42**, 203-210.
- Ennis M, Aston-Jones G** (1988). Activation of locus coeruleus from nucleus paragigantocellularis: a new excitatory amino acid pathway in brain. *J Neurosci* **8**, 3644-3657.
- Ennis M, Aston-Jones G** (1989). GABA-mediated inhibition of locus coeruleus from the dorsomedial rostral medulla. *J Neurosci* **9**, 2973-2981.
- George MS, Sackeim HA, Marangell LB, Husain MM, Nahas Z, Lisanby SH, Ballenger JC, Rush AJ** (2000a). Vagus nerve stimulation. A potential therapy for resistant depression? *Psychiatr Clin North Am* **23**, 757-783.
- George MS, Sackeim HA, Rush AJ, Marangell LB, Nahas Z, Husain MM, Lisanby S, Burt T, Goldman J, Ballenger JC** (2000b). Vagus nerve stimulation: a new tool for brain research and therapy. *Biol Psychiatry* **47**, 287-295.

Handforth A, DeGiorgio CM, Schachter SC, Uthman BM, Naritoku DK, Tecoma ES, Henry TR, Collins SD, Vaughn BV, Gilmartin RC, Labar DR, Morris GL, 3rd, Salinsky MC, Osorio I, Ristanovic RK, Labiner DM, Jones JC, Murphy JV, Ney GC, Wheless JW (1998). Vagus nerve stimulation therapy for partial-onset seizures: a randomized active-control trial. *Neurology* **51**, 48-55.

Heck C, Helmers SL, DeGiorgio CM (2002). Vagus nerve stimulation therapy, epilepsy, and device parameters: scientific basis and recommendations for use. *Neurology* **59**, S31-37.

Krahl SE, Senanayake SS, Handforth A (2001). Destruction of peripheral C-fibers does not alter subsequent vagus nerve stimulation-induced seizure suppression in rats. *Epilepsia* **42**, 586-589.

Labiner DM, Ahern GL (2007). Vagus nerve stimulation therapy in depression and epilepsy: therapeutic parameter settings. *Acta Neurol Scand* **115**, 23-33.

Liporace J, Hucko D, Morrow R, Barolat G, Nei M, Schnur J, Sperling M (2001). Vagal nerve stimulation: adjustments to reduce painful side effects. *Neurology* **57**, 885-886.

Lomarev M, Denslow S, Nahas Z, Chae JH, George MS, Bohning DE (2002). Vagus nerve stimulation (VNS) synchronized BOLD fMRI suggests that VNS in depressed adults has frequency/dose dependent effects. *J Psychiatr Res* **36**, 219-227.

Manta S, Dong J, Debonnel G, Blier P (2007). Vagus nerve stimulation: effects on noradrenergic neuronal firing and serotonin transmission in the rat brain. *European NeuroPsychopharmacology* **17**, S368-S369.

Morris GL, 3rd, Mueller WM (1999). Long-term treatment with vagus nerve stimulation in patients with refractory epilepsy. The Vagus Nerve Stimulation Study Group E01-E05. *Neurology* **53**, 1731-1735.

Mu Q, Bohning DE, Nahas Z, Walker J, Anderson B, Johnson KA, Denslow S, Lomarev M, Moghadam P, Chae JH, George MS (2004). Acute vagus nerve stimulation using different pulse widths produces varying brain effects. *Biol Psychiatry* **55**, 816-825.

Nahas Z, Marangell LB, Husain MM, Rush AJ, Sackeim HA, Lisanby SH, Martinez JM, George MS (2005). Two-year outcome of vagus nerve stimulation (VNS) for treatment of major depressive episodes. *J Clin Psychiatry* **66**, 1097-1104.

Owens MJ (1996). Molecular and cellular mechanisms of antidepressant drugs. *Depress Anxiety* **4**, 153-159.

Rush AJ, George MS, Sackeim HA, Marangell LB, Husain MM, Giller C, Nahas Z, Haines S, Simpson RK, Jr., Goodman R (2000). Vagus nerve stimulation (VNS) for treatment-resistant depressions: a multicenter study. *Biol Psychiatry* **47**, 276-286.

Rush AJ, Sackeim HA, Marangell LB, George MS, Brannan SK, Davis SM, Lavori P, Howland R, Kling MA, Rittberg B, Carpenter L, Ninan P, Moreno F, Schwartz T, Conway C, Burke M, Barry JJ (2005). Effects of 12 months of vagus nerve stimulation in treatment-resistant depression: a naturalistic study. *Biol Psychiatry* **58**, 355-363.

Sackeim HA, Rush AJ, George MS, Marangell LB, Husain MM, Nahas Z, Johnson CR, Seidman S, Giller C, Haines S, Simpson RK, Jr., Goodman RR (2001). Vagus nerve stimulation (VNS) for treatment-resistant depression: efficacy, side effects, and predictors of outcome. *Neuropsychopharmacology* **25**, 713-728.

Schlaepfer TE, Frick C, Zobel A, Maier W, Heuser I, Bajbouj M, O'Keane V, Corcoran C, Adolfsson R, Trimble M, Rau H, Hoff HJ, Padberg F, Muller-Siecheneder F, Audenaert K, Van den Abbeele D, Stanga Z, Hasdemir M (2008). Vagus nerve stimulation for depression: efficacy and safety in a European study. *Psychol Med* **38**, 651-661.

Zabara J (1992). Inhibition of experimental seizures in canines by repetitive vagal stimulation. *Epilepsia* **33**, 1005-1012.

Zagon A, Kemeny AA (2000). Slow hyperpolarization in cortical neurons: a possible mechanism behind vagus nerve stimulation therapy for refractory epilepsy? *Epilepsia* **41**, 1382-1389.

4. Étude IV

Cette étude, acceptée pour publication en 2011, est sous presse dans le journal *Brain Stimulation*.

NOVEL ATTEMPTS TO OPTIMIZE VAGUS NERVE STIMULATION PARAMETERS ON SEROTONIN NEURONAL FIRING ACTIVITY IN THE RAT BRAIN

Stella Manta, Mostafa El Mansari and Pierre Blier

Contributions des co-auteurs:

Cette étude a été élaborée par Pierre Blier.

Toutes les données ont été collectées par Stella Manta.

Les résultats ont été analysés par Stella Manta et Pierre Blier.

Le manuscrit a été écrit par Stella Manta et revu puis approuvé par Mostafa El Mansari et Pierre Blier.

Title page

**NOVEL ATTEMPTS TO OPTIMIZE VAGUS NERVE STIMULATION
PARAMETERS ON SEROTONIN NEURONAL FIRING ACTIVITY
IN THE RAT BRAIN**

Stella Manta¹, Mostafa El Mansari¹, Pierre Blier^{1,2}

4.1. Abstract

Background: Vagus nerve stimulation (VNS) is indicated for treatment-resistant epilepsy and depression. Electrophysiological recordings in the rat brain have shown that VNS promptly increases the firing rate of NE neurons and subsequently that of 5-HT neurons. Thus far, it appears that the standard stimulation parameters currently utilized in depressed patients produce an optimal activation of 5-HT neurons.

Objective/Hypothesis: This study was therefore aimed at investigating additional alterations of stimulation parameters to optimize VNS efficacy in order to further increase 5-HT neuronal activity.

Methods: Rats were implanted with a VNS device and stimulated for 14 days using standard (0.25 mA/20 Hz/500 μ seconds/30 seconds ON-5 minutes OFF, continuously) or various stimulation parameters: extension of the OFF period (30 seconds ON every 10 to 30 minutes), the OFF and ON periods, discontinuous stimulation (12 hours per day using standard parameters), and burst stimulation modes. Rat dorsal raphe 5-HT neurons were recorded under chloral hydrate anaesthesia.

Results: Both 12-hour stimulation periods for 14 days, and the 30-second stimulation every 10 or 15 minutes significantly increased the firing activity of 5-HT neurons to the same extent as standard parameters while the 30-minute intervals were ineffective. Stimulations in a burst mode and the pseudo-one-pulse stimulations also significantly increased 5-HT neuronal activity.

Conclusion: These results indicate that less stimulation is sufficient to achieve the same VNS efficacy on 5-HT neuronal firing. These data may be relevant for patients using VNS because these new parameters could minimize or prevent side effects and increase battery life of the stimulator.

4.2. Introduction

Vagus nerve stimulation (VNS) has been approved several years ago as an adjunctive treatment for resistant depression. More recent lines of evidence support the efficacy of VNS. The most recent open label multicenter study on 74 patients with treatment-resistant depression showed a 53% response rate and a 33% remission rate after one year of treatment (Schlaepfer *et al.*, 2008). Moreover, there are reports showing a progressive improvement of response and remission rates after the initiation of VNS (Bajbouj *et al.*, 2010; Nahas *et al.*, 2005). Inversely, depressive relapses have occurred following interruption of VNS (Ashton, 2010; Conway *et al.*, 2008; Martinez & Zboyan, 2006).

VNS therapy consists of a surgical procedure that connects an electrical stimulator which looks like a pacemaker to the left vagus nerve. This stimulator can then be programmed to deliver electrical pulses to the nerve according to a wide variety of stimulation parameters such as current intensity, pulse width, pulse frequency and duration of the ON and OFF periods of stimulation.

The mechanisms of action of this treatment are still not completely understood but a variety of approaches have shed light on altered brain functions. In particular, acute VNS produces an increase of the biomarker of short-term neuronal activation c-fos in several rat brain regions including the locus coeruleus (LC) but not the dorsal raphe nucleus (DRN). In contrast, an activation of the DRN is revealed by an enhancement of another gene product specific to delayed and persistent neuronal activation, delta fosB, only after prolonged VNS treatment (Cunningham *et al.*, 2008). These data were consistent with electrophysiological studies showing that VNS increases after one hour the basal firing activity of LC norepinephrine (NE) neurons (Groves *et al.*, 2005) and secondarily that of

DRN serotonin (5-HT) neurons only after 14 days (Dorr & Debonnel, 2006), two key neurotransmitter systems in the pathophysiology of depression and in the mechanisms of action of antidepressants. The effects of VNS on the 5-HT system appears to be indirect and mediated through its robust effect in enhancing the firing rate and pattern of NE neurons since a lesion of LC NE neurons completely prevents the increase of 5-HT neuronal firing rate after chronic VNS (Manta *et al.*, 2009a). The additional increase in firing rates of 5-HT neurons after three months of VNS (Dorr & Debonnel, 2006) is consistent with the effect seen in clinical depression studies in which mean Hamilton Rating Scales for Depression scores tend to decrease progressively over time, suggesting a time-dependent improvement (Marangell *et al.*, 2002). Added to the fact that 5-HT transmission is an established target for the therapeutic effect of various antidepressant treatments (Blier & de Montigny, 1994), these previous studies suggested that 5-HT neuronal firing might be a predictor of the efficacy of VNS. This is also based on the premise that this increase in 5-HT neuronal firing leads to an enhanced 5-HT transmission in the rat hippocampus after 14 days of VNS (Manta *et al.*, 2009a).

It was already mentioned that VNS has proven to be efficient in about a third of treatment-resistant depressed patients so further studies are still necessary to further improve the success rate of this therapy. Clinical studies have already reported that the modification of stimulation parameters could increase the efficacy of VNS in refractory patients and on brain functions (Lomarev *et al.*, 2002; Mu *et al.*, 2004). Previous experiments have thus been conducted in our laboratory whereby variations of the standard parameters currently used in the clinic were studied in the rat brain. These experiments indicated that the optimal VNS parameters that activate 5-HT neurons are the ones routinely used in the clinic to treat resistant depression (Manta *et al.*, 2009b). These results

were additionally perceived as an indicator of the use of the firing activity of 5-HT neurons as a target to possibly optimize parameters of VNS in patients.

The present *in vivo* electrophysiological study thus investigated, in rats, the effects of more drastic alterations of the stimulation parameters on DRN 5-HT neuronal firing rate in order to potentially further optimize VNS effectiveness in treatment-resistant depression.

4.3. Methods and Materials

Animals.

The experiments were carried out on male Sprague-Dawley rats (Charles River Canada) weighing a minimum of 275 g at the time of the implantation of the VNS device and housed individually under standard laboratory conditions (12:12 h light-dark cycle with access to food and water *ad libitum*). Body temperature was kept at 37°C during surgery and electrophysiological experiments. All experiments were performed in accordance with the Canadian Council on Animal Care, and the local animal care committee.

Surgery.

Using sterile surgical techniques, animals were operated under equithesine, 1 ml i.p./300 g rat (4.26% chloral hydrate and 0.96% sodium pentobarbital). Supplemental doses of equithesine were given i.p., 0.1 ml at a time, to maintain constant anesthesia and to prevent any nociceptive reaction to a tail pinch. A horizontal incision was made in the ventral aspect of the neck. The skin and muscles were meticulously separated and the left vagus nerve, which lies laterally to the carotid artery, was isolated. Bipolar leads were

wrapped around the left carotid artery and the vagus nerve, allowing close contact between of the electrodes with the vagus nerve. The leads were sutured in place to the underlying muscle. The leads were then tunneled subcutaneously toward an incision made in the back and were then connected to the stimulator. The stimulator was then placed in a dorsal pocket made under the back skin wiped with iodine and antibiotics and fluid replacement were given to ease recovery. Sham animals underwent the same surgical procedure with leads and a dummy 103-pulse stimulator was inserted as a control group. The lead impedance was checked to ensure a tight connection between the nerve and the coil, using the device diagnostic setting on the NeuroCybernetic Prosthesis (NCP) handheld-computer and programming wand from Cyberonics Inc. After a two-day recovery, the stimulator was turned on for two weeks in treated rats and programmed using either the standard parameters (0.25 mA/ 20 Hz/ 500 μ seconds/ 30 seconds ON-5 minutes OFF continuously) or different experimental settings described below:

- Extension of the OFF period (30 seconds ON from 10 to 30 minutes)
- Discontinuous stimulation (12 hours per day using standard parameters; from 7 am to 7 pm or *vice versa*)
- Extension of the ON and OFF periods (180 seconds ON-180 minutes OFF)
- Double or quadruple pulses spaced by 5 milliseconds delivered every 2 seconds for 36 seconds every 4.5 minutes (equivalent, in number of pulses, to a frequency of 1 and 2 Hz, respectively, with standard parameters)
- Pseudo-one-pulses stimulation (POP): four pulses at 100 Hz delivered once every 4.5 minutes in a continuous manner for 14 days.
- Half hour stimulation once a day for 4 days (1 mA/ 20 Hz/ 500 μ seconds).

A system diagnostic (lead test) was performed again before the electrophysiological experiment to check the electrical connections of the whole system, as well as the integrity of the leads.

Electrophysiological experiments.

Experiments were performed with the VNS device in place but inactivated for the duration of the experiment to avoid electrical interference with the recordings. Rats were anaesthetized with chloral hydrate 400 mg/kg i.p. and mounted in a stereotaxic apparatus (David Kopf Instruments, Tujunga, CA).

Recordings of Dorsal Raphe 5-HT neurons

In vivo electrophysiological extracellular unitary recordings were carried out using single glass micropipettes. The electrodes were filled with a 2 M NaCl solution, with an impedance range of 2 to 4 MOhm. A burr hole was drilled on the midline 1 mm anterior to lambda and dorsal raphe 5-HT neurons were encountered over a distance of 1 mm starting immediately below the ventral border of the Sylvius aqueduct.

Putative 5-HT DRN neurons were identified using the criteria of Aghajanian and Vandermaelen (Aghajanian & Vandermaelen, 1982): a slow flow (0.5-2.5 Hz), a regular firing rate, and long-duration (0.8-1.2 ms) asymmetric action potentials (Fig. 1). These parameters are crucial in identifying 5-HT neurons because it is estimated that only a third of the neurons in the dorsal raphe area are serotonergic in nature (Descarries *et al.*, 1982). In order to determine the average firing rate for each group, at least five electrode descents were made per rat at 100 μ m distances from the first descent. Each neuron was recorded for at least 2 minutes after stabilization. Neuronal firing rates were calculated by adding each action potential per 10-second periods (as obtained by the Spike2 program during

recording) and divided by length of time recorded in seconds. All neuronal firing rates for single groups were added together and divided by the number of neurons recorded per group.

Drugs and materials

The leads, model 103-pulse stimulators, and dummy stimulators were provided by Cyberonics (Houston, Texas).

Statistics

Electrophysiological data were expressed as mean \pm standard error of the mean (SEM) of firing rates. Nonparametric tests were used as firing rates were not normally distributed. Average firing rates for control and treated groups were compared using the Mann-Whitney Rank Sum Test.

4.4. Results

Effect of an extension of the OFF period of the stimulation on the firing of 5-HT neurons

The duty cycle of the stimulation was modified by increasing the OFF period of stimulation from the standard 5 minutes to 30 minutes. The 30-second stimulation periods every 10 or 15 minutes significantly increased the firing activity of DRN 5-HT neurons ($p=0.015$ and $p<0.001$, respectively; Fig 2, 3) to the same extent as the standard parameters. The 30-second stimulation period every 30 minutes was not sufficient to enhance 5-HT neuronal firing ($p= 0.416$; Fig. 3).

Effect of discontinuous stimulation on the firing of 5-HT neurons

The 12-hour stimulation per day was applied during the light or dark phase of the rat diurnal cycle using the standard stimulation parameters. Both 12-hour stimulation periods significantly increased 5-HT neurons firing rate ($p < 0.001$ during the light period and $p = 0.01$ during the dark period) as effectively as the continuous stimulation (24 h; Fig. 4).

Effect of stimulations in a burst mode on the firing of 5-HT neurons

The mode of stimulation was modified by using twin or quadruple pulses at 200 Hz delivered every 2 seconds for 36 seconds every 4.5 minutes which correspond to the number of pulses using frequencies of 1 or 2 Hz, respectively, with standard stimulation parameters. Both stimulation settings significantly increased the firing activity of DRN 5-HT neurons to the same extent as standard parameters ($p < 0.001$ with doublet and $p < 0.01$ with quadruple pulses; Fig. 5).

Effect of the use of POP stimulations on the firing of 5-HT neurons

The stimulation parameters were modified in order to deliver 4 pulses at 100 Hz once every 4.5 minutes, 24 hours per day for 14 days. This mode of stimulation significantly increased DRN 5-HT neuron firing rate as high as the standard parameters ($p < 0.001$; Fig. 2, 6).

Effect of the extension of the ON period with prolongation of the OFF period on the firing of 5-HT neurons

The duty cycle was modified by extending the period of stimulation from 30 to 180 seconds and the OFF period from 5 minutes to 3 hours while keeping other standard

parameters constant. Such stimulations significantly decreased 5-HT neuronal firing rate compared to sham rats ($p=0.024$; Fig. 2, 7).

Effect of the extension of the ON period with daily delivery on the firing of 5-HT neurons

Rats were stimulated once daily for 30 minutes for 4 days in order to reproduce the stimulation parameters used by Krahl and colleagues in 2004 (Krahl *et al.*, 2004) prior to performing the forced swim test experiments. This mode of stimulation did not affect the firing activity of DRN 5-HT neurons ($p=0.67$; Fig. 8).

4.5. Discussion

The results of the present study support the notion that 5-HT neuronal activation is not proportional to the intensity of stimulation of the vagus nerve. Indeed, several modalities delivering less stimulations than the standard one are sufficient to achieve the same effectiveness in increasing 5-HT neuronal firing activity, whereas some modalities delivering more stimulations attenuate their discharge rate.

The duty cycle parameter determining the ON and OFF period of the stimulations was already shown to be safe and effective with a 30 second stimulation every 5 minutes for epilepsy and depression as well (Handforth *et al.*, 1998; Rush *et al.*, 2005; Sackeim *et al.*, 2001). The efficacy of such a duty cycle was also confirmed in a preclinical study conducted in our laboratory whereby decreasing the OFF period of stimulation induced the loss of VNS effect on increasing 5-HT neuronal firing activity (Manta *et al.*, 2009b). Furthermore, an ON period superior to the OFF period was even shown to induce degenerative nerve damage (Agnew & McCreery, 1990). Thus, in the present experiments,

longer intervals were tested between the stimulation periods (while keeping others standard parameters constant, i.e., intensity of 0.25 mA/ frequency of 20 Hz/ pulse width of 500 μ seconds) for 14 days. It was found that 30 second stimulations every 10 or 15 minutes, instead of the usual 5 minutes, were also effective to increase 5-HT neurons firing rate to the same extent, but the enhancing action was lost if the stimulation occurred every 30 minutes (Fig. 3). Even though the firing of 5-HT neurons was not further increased, these results demonstrate that less stimulations are sufficient to achieve the same VNS efficacy on 5-HT neurons. The latter findings could be relevant for patients using VNS because adverse events can be encountered due to the delivery of stimulations. Indeed, the main side effects seen in long-term treatment with VNS are infections, voice alteration, throat pain, hoarseness, dyspnea, cough, and paresthesia (Ben-Menachem, 2001). Even if these symptoms are generally of mild to moderate intensity, and tend to decrease over time, they may still be cumbersome for the patients. As these adverse events are mostly stimulus-related, it would be helpful for the patients treated with VNS to minimize the intensity and/or duration of the stimulation periods after a response is achieved. For instance, if the 30-second stimulation period delivered every 15 minutes maintained the effectiveness of standard VNS parameters in depression, this means that the period of experiencing the side effects would occur three times less often. The second issue is in regards to the battery life of the stimulator which lasts approximately 6 to 8 years using the standard parameters (Rado & Janicak, 2007) after which an additional surgery is required for the battery to be replaced. Decreasing the time of stimulation would then increase the battery life and minimize the risks related to the surgery and anesthesia, as well as the cost of the treatment.

The 12-hour daily stimulation periods using standard parameters for 14 days, applied either during the light or dark phase of the rat diurnal cycle, significantly increased the firing activity of 5-HT neurons (Fig. 4). In addition to enhancing the battery life of the stimulator, and potentially decreasing the side effect burden, the stimulation of the vagus nerve for only 12 hours during the sleep-wake cycle may also alter favorably the sleep architecture of depressed patients. Indeed, sleep disturbances are part of the diagnostic criteria in the DSM-IV for major depressive disorder with more than 80 % of depressed inpatients and 40 to 60 % of outpatients reporting troubles in initiating and maintaining sleep, as well as feeling fatigued upon awakening (Armitage, 2000). In addition to impaired sleep efficiency, alterations of sleep architecture in depression are characterized by increased rapid eye movement (REM) sleep and decreased slow-wave sleep (SWS) stage 3 and 4 (Reynolds & Kupfer, 1987). These last stages, considered as deep sleep, reflect the sleep intensity and quality required by the human body to recover. A recent report studying the effect of VNS on sleep EEG in depression showed an improvement in sleep architecture with sleep EEG rhythms restored to near normal after VNS treatment (Armitage *et al.*, 2003). However, even if stage 2 sleep tends to increase following VNS treatment, no effect was observed on stages 3 and 4. It may then be speculated that the side effects of VNS during the night could be subconsciously detected, thereby limiting the extension of the deep sleep phases. It would then be interesting to explore if the 12-hour stimulation period only during the day would improve further the sleep architecture of depressed patients. Even if such sleep studies turned out negative, then the 12-hour stimulation period only during the night would prevent the discomforts occurring during the time of stimulation thereby improving the quality of life of the patients during the day and prolonging battery life of the stimulator.

More drastic alterations of stimulation parameters were then studied to potentially increase the firing activity of 5-HT neurons. About 30 to 40 % of NE neurons in the LC discharge in a burst fashion with an average of 2 single spikes occurring closely together. In rats that received long-term VNS, over 80 % of NE neurons displayed this mode of firing and the number of action potentials per burst increased to 4 single spikes (Manta *et al.*, 2009a). Thus, in another series of experiments, double or quadruple pulses at 200 Hz were delivered every 2 seconds for 30 seconds every 5 minutes in order to mimic the burst firing activity of NE neurons and eventually more robustly influence 5-HT neuronal firing (Fig. 5). Such stimulations, that are the equivalent of a global stimulation of 1 or 2 Hz in terms of total number of pulses, were as effective as the standard frequency of 20 Hz, thus showing that the pattern of stimulation could also influence the impact of VNS on 5-HT neuronal firing. These results corroborate the possibility that less stimulations could be sufficient to obtain VNS efficacy. This was also confirmed when using the 3-minute stimulation periods every 3 hours that significantly decreased the firing rate of 5-HT neurons (Fig. 7). Indeed in this condition, even if the OFF period of the duty cycle was relatively long, the prolonged duration of the ON period delivering 6 times the number of pulses compared to the standard one actually dampened the firing rate of 5-HT neurons. The only other condition which significantly decreased the firing rate of 5-HT neurons was the 144 Hz stimulations, which delivered about 7 times the usual number of stimulations (Manta *et al.*, 2009b).

In the next experimental series, POP stimulations were delivered once every 4.5 minutes in a continuous manner for 14 days and tested in their capacity to increase 5-HT neuronal firing. The rationale for such stimulation was that numerous studies have shown that 4 pulses delivered at 100 Hz can produce neurotransmitter release that can only be achieved with much longer stimulation periods with pulses delivered at much lower

frequencies (Feuerstein & Hertting, 1986; Mongeau *et al.*, 1994; Zier *et al.*, 1988). This is attributable to the duration of stimulation in this situation to be too short for the development of autoinhibition of the neurons through the activation of their autoreceptors (Story *et al.*, 1981). Once again, this mode of stimulation of the vagus nerve significantly increased 5-HT neuronal firing to the extent, but not further, of standard parameters (Fig. 6). It would thus be interesting to assess how such stimulations are perceived by patients receiving VNS. Indeed, given the fact that POP stimulations occur within a very brief period (30 ms) and only once about every 5 minutes, they have the potential to abolish the discomforts related to the stimulus periods.

Finally, Krahl and colleagues in 2004 showed that 30 minutes of stimulation of the vagus nerve at 1 mA once a day for 4 consecutive days reduced the immobility time in rat the forced-swim test (FST;(Krahl *et al.*, 2004), which is an indicator of an antidepressant-like effect. This mode of stimulation had, however, no effect on 5-HT neuronal firing rate (Fig. 8). This could be explained by the fact that the FST is divided into two specific behavioral measures: the swimming behavior which is predominantly increased by antidepressants increasing serotonergic transmission, and the climbing behavior which is related to an enhancement of catecholaminergic transmission (Cryan *et al.*, 2005). Thus, the antidepressant-like effect observed by Krahl and colleagues may have been a pure noradrenergic action, consistently with such a brief stimulation period affecting only the firing rate of NE neurons (Dorr & Debonnel, 2006; Groves *et al.*, 2005).

Taken together, the present results showed that alternative stimulation parameters can be as effective as the standard ones in increasing the firing activity of DRN 5-HT neurons. Even if the current experiments did not reveal a further augmentation of the firing rate of 5-HT neurons, it would still be interesting to test some of these new parameters in

patients with depression and also epilepsy in order to potentially minimize and/or even prevent side effects in VNS-responsive patients.

4.6. Acknowledgements

The VNS stimulators and leads were provided by Cyberonics. The study was funded through a Canadian Institutes of Health Research grant to P.B. P.B. was in receipt of the Canadian Research Chair in Psychopharmacology, the endowed Chair in Mood Disorders Research from the University of Ottawa Institute of Mental Health Research.

4.7. Conflict of Interest

P.B., M.E.M., and S.M. report no financial interests or potential conflicts of interest.

4.8. Figures and Legends

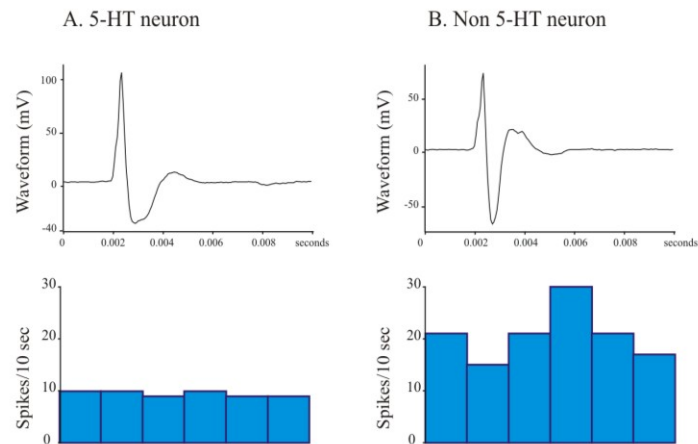


Figure 1. Electrophysiological characteristics of a 5-HT neuron (A) and a non 5-HT neuron in the rat dorsal raphe. The upper panels illustrate a single action potential and the lower panels represent integrated firing rate histograms of the same neurons. Each individual histogram represents the number of action potential per 10-second period.

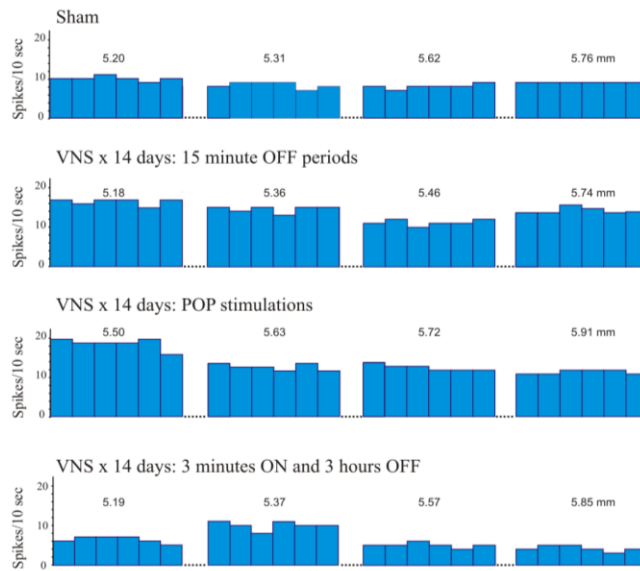


Figure 2. Integrated firing rate histograms of dorsal raphe 5-HT neurons, recorded in a single electrode descent through the dorsal raphe in sham or VNS treated rats with different stimulation parameters. Each individual histogram represents the number of action potential per 10-second period. The numbers above each neuron represent its position relative to the surface of the brain.

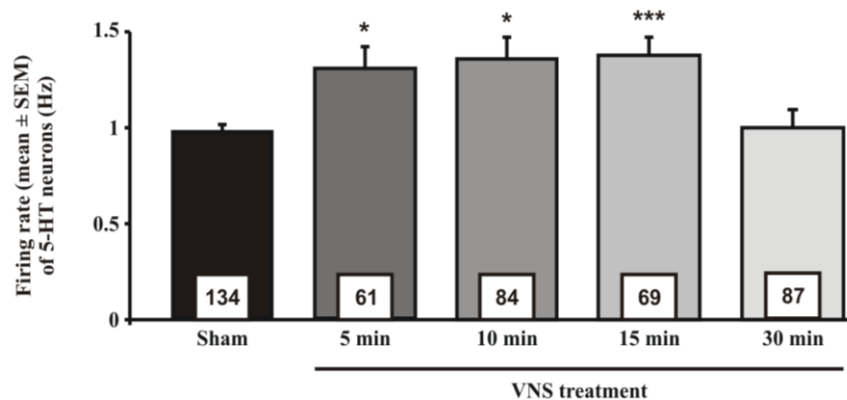


Figure 3. Histograms representing means \pm SEM of the spontaneous firing activity of DRN 5-HT neurons. The average 5-HT neuronal firing rate was calculated in control and two-week VNS treated rats after increasing the duration of the OFF period of stimulation from 5 to 30 minutes. The numbers at the bottom of the columns represent the number of neurons recorded. Five or six rats were used per group. * $p < 0.05$, *** $p < 0.001$ treated rats versus controls.

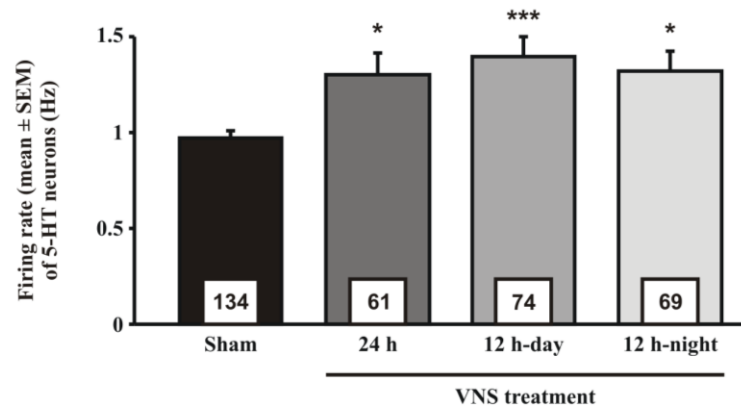


Figure 4. Histograms representing means \pm SEM of the spontaneous firing activity of DRN 5-HT neurons. The average 5-HT neuronal firing rate was calculated in control and two-week VNS treated rats that received continuous stimulation (24 h) or 12 h stimulation during the day or night using standard parameters. The numbers at the bottom of the columns represent the number of neurons recorded. Five or six rats were used per group. * $p < 0.05$, *** $p < 0.001$ treated rats versus controls.

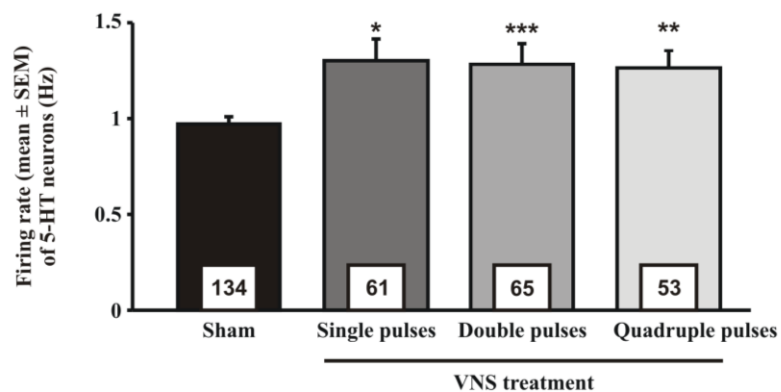


Figure 5. Histograms representing means \pm SEM of the spontaneous firing activity of DRN 5-HT neurons. The average 5-HT neuronal firing rate was calculated in control and two-week VNS treated rats that received standard parameters with single pulses or stimulations in burst mode with double or quadruple pulses at 200 Hz. The numbers at the bottom of the columns represent the number of neurons recorded. Five or six rats were used per group. * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$ treated rats versus controls.

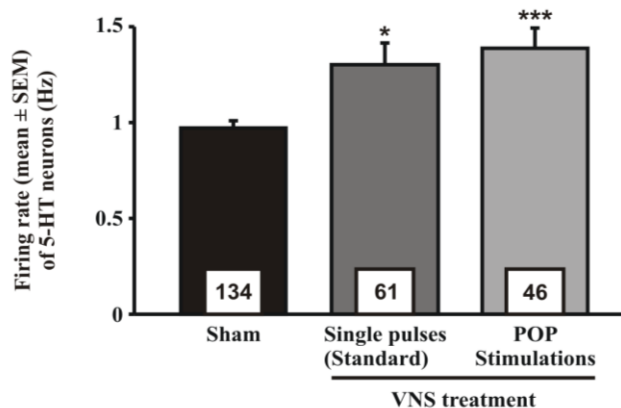


Figure 6. Histograms representing means \pm SEM of the spontaneous firing activity of DRN 5-HT neurons. The average 5-HT neuronal firing rate was calculated in control and two-week VNS treated rats that received standard parameters or the pseudo-one-pulse (POP) stimulation mode (4 pulses at 100 Hz once every 4.5 minutes). The numbers at the bottom of the columns represent the number of neurons recorded. Four to six rats were used per group. * $p < 0.05$, *** $p < 0.001$ treated rats versus controls.

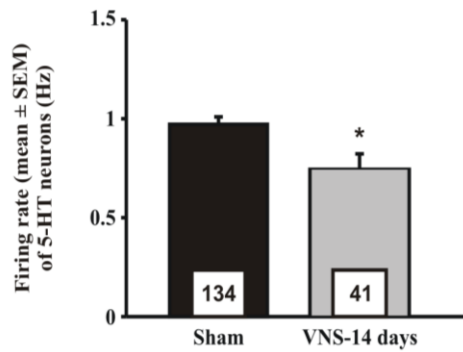


Figure 7. Histograms representing means \pm SEM of the spontaneous firing activity of DRN 5-HT neurons. The average 5-HT neuronal firing rate was calculated in control and two-week VNS treated rats with extension of the ON and OFF period of stimulation (180 seconds ON-180 minutes OFF). The numbers at the bottom of the columns represent the number of neurons recorded. Four or five rats were used per group. * $p < 0.05$, treated rats versus controls.

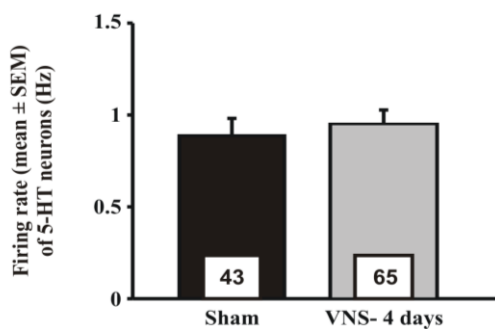


Figure 8. Histograms representing means \pm SEM of the spontaneous firing activity of DRN 5-HT neurons. The average 5-HT neuronal firing rate was calculated in control and VNS treated rats that received 30-minute stimulations once a day for 4 days at 1 mA/20 Hz/ 500 μ seconds. The numbers at the bottom of the columns represent the number of neurons recorded. Four or five rats were used per group.

4.9. References

- Aghajanian GK, Vandermaelen CP** (1982). Intracellular identification of central noradrenergic and serotonergic neurons by a new double labeling procedure. *J Neurosci* **2**, 1786-1792.
- Agnew WF, McCreery DB** (1990). Considerations for safety with chronically implanted nerve electrodes. *Epilepsia* **31 Suppl 2**, S27-32.
- Armitage R** (2000). The effects of antidepressants on sleep in patients with depression. *Can J Psychiatry* **45**, 803-809.
- Armitage R, Husain M, Hoffmann R, Rush AJ** (2003). The effects of vagus nerve stimulation on sleep EEG in depression: a preliminary report. *J Psychosom Res* **54**, 475-482.
- Ashton AK** (2010). Depressive relapse after vagal nerve stimulator explantation. *Am J Psychiatry* **167**, 719-720.
- Bajbouj M, Merkl A, Schlaepfer TE, Frick C, Zobel A, Maier W, O'Keane V, Corcoran C, Adolfsson R, Trimble M, Rau H, Hoff HJ, Padberg F, Muller-Siecheneder F, Audenaert K, van den Abbeele D, Matthews K, Christmas D, Eljamel S, Heuser I** (2010). Two-year outcome of vagus nerve stimulation in treatment-resistant depression. *J Clin Psychopharmacol* **30**, 273-281.
- Ben-Menachem E** (2001). Vagus nerve stimulation, side effects, and long-term safety. *J Clin Neurophysiol* **18**, 415-418.
- Blier P, de Montigny C** (1994). Current advances and trends in the treatment of depression. *Trends Pharmacol Sci* **15**, 220-226.
- Conway CR, Chibnall JT, Tait RC** (2008). Vagus nerve stimulation for depression: a case of a broken lead, depression relapse, revision surgery, and restoration of patient response. *Brain Stimul* **1**, 227-228.
- Cryan JF, Valentino RJ, Lucki I** (2005). Assessing substrates underlying the behavioral effects of antidepressants using the modified rat forced swimming test. *Neurosci Biobehav Rev* **29**, 547-569.
- Cunningham JT, Mifflin SW, Gould GG, Frazer A** (2008). Induction of c-Fos and DeltaFosB immunoreactivity in rat brain by Vagal nerve stimulation. *Neuropsychopharmacology* **33**, 1884-1895.
- Descarries L, Watkins KC, Garcia S, Beaudet A** (1982). The serotonin neurons in nucleus raphe dorsalis of adult rat: a light and electron microscope radioautographic study. *J Comp Neurol* **207**, 239-254.

Dorr AE, Debonnel G (2006). Effect of vagus nerve stimulation on serotonergic and noradrenergic transmission. *J Pharmacol Exp Ther* **318**, 890-898.

Feuerstein TJ, Hertting G (1986). Serotonin (5-HT) enhances hippocampal noradrenaline (NA) release: evidence for facilitatory 5-HT receptors within the CNS. *Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol* **333**, 191-197.

Groves DA, Bowman EM, Brown VJ (2005). Recordings from the rat locus coeruleus during acute vagal nerve stimulation in the anaesthetised rat. *Neurosci Lett* **379**, 174-179.

Handforth A, DeGiorgio CM, Schachter SC, Uthman BM, Naritoku DK, Tecoma ES, Henry TR, Collins SD, Vaughn BV, Gilmartin RC, Labar DR, Morris GL, 3rd, Salinsky MC, Osorio I, Ristanovic RK, Labiner DM, Jones JC, Murphy JV, Ney GC, Wheless JW (1998). Vagus nerve stimulation therapy for partial-onset seizures: a randomized active-control trial. *Neurology* **51**, 48-55.

Krahl SE, Senanayake SS, Pekary AE, Sattin A (2004). Vagus nerve stimulation (VNS) is effective in a rat model of antidepressant action. *J Psychiatr Res* **38**, 237-240.

Lomarev M, Denslow S, Nahas Z, Chae JH, George MS, Bohning DE (2002). Vagus nerve stimulation (VNS) synchronized BOLD fMRI suggests that VNS in depressed adults has frequency/dose dependent effects. *J Psychiatr Res* **36**, 219-227.

Manta S, Dong J, Debonnel G, Blier P (2009a). Enhancement of the function of rat serotonin and norepinephrine neurons by sustained vagus nerve stimulation. *J Psychiatry Neurosci* **34**, 272-280.

Manta S, Dong J, Debonnel G, Blier P (2009b). Optimization of vagus nerve stimulation parameters using the firing activity of serotonin neurons in the rat dorsal raphe. *Eur Neuropsychopharmacol* **19**, 250-255.

Marangell LB, Rush AJ, George MS, Sackeim HA, Johnson CR, Husain MM, Nahas Z, Lisanby SH (2002). Vagus nerve stimulation (VNS) for major depressive episodes: one year outcomes. *Biol Psychiatry* **51**, 280-287.

Martinez JM, Zboyan HA (2006). Vagus nerve stimulation therapy in a patient with treatment-resistant depression: a case report of long-term follow-up and battery end-of-service. *CNS Spectr* **11**, 143-147.

Mongeau R, De Montigny C, Blier P (1994). Activation of 5-HT₃ receptors enhances the electrically evoked release of [³H]noradrenaline in rat brain limbic structures. *Eur J Pharmacol* **256**, 269-279.

Mu Q, Bohning DE, Nahas Z, Walker J, Anderson B, Johnson KA, Denslow S, Lomarev M, Moghadam P, Chae JH, George MS (2004). Acute vagus nerve stimulation using different pulse widths produces varying brain effects. *Biol Psychiatry* **55**, 816-825.

Nahas Z, Marangell LB, Husain MM, Rush AJ, Sackeim HA, Lisanby SH, Martinez JM, George MS (2005). Two-year outcome of vagus nerve stimulation (VNS) for treatment of major depressive episodes. *J Clin Psychiatry* **66**, 1097-1104.

Rado J, Janicak PG (2007). Vagus nerve stimulation for severe depression. *J Psychosoc Nurs Ment Health Serv* **45**, 43-51.

Reynolds CF, 3rd, Kupfer DJ (1987). Sleep research in affective illness: state of the art circa 1987. *Sleep* **10**, 199-215.

Rush AJ, Sackeim HA, Marangell LB, George MS, Brannan SK, Davis SM, Lavori P, Howland R, Kling MA, Rittberg B, Carpenter L, Ninan P, Moreno F, Schwartz T, Conway C, Burke M, Barry JJ (2005). Effects of 12 months of vagus nerve stimulation in treatment-resistant depression: a naturalistic study. *Biol Psychiatry* **58**, 355-363.

Sackeim HA, Rush AJ, George MS, Marangell LB, Husain MM, Nahas Z, Johnson CR, Seidman S, Giller C, Haines S, Simpson RK, Jr., Goodman RR (2001). Vagus nerve stimulation (VNS) for treatment-resistant depression: efficacy, side effects, and predictors of outcome. *Neuropsychopharmacology* **25**, 713-728.

Schlaepfer TE, Frick C, Zobel A, Maier W, Heuser I, Bajbouj M, O'Keane V, Corcoran C, Adolfsson R, Trimble M, Rau H, Hoff HJ, Padberg F, Muller-Siecheneder F, Audenaert K, Van den Abbeele D, Stanga Z, Hasdemir M (2008). Vagus nerve stimulation for depression: efficacy and safety in a European study. *Psychol Med* **38**, 651-661.

Story DF, McCulloch MW, Rand MJ, Standford-Starr CA (1981). Conditions required for the inhibitory feedback loop in noradrenergic transmission. *Nature* **293**, 62-65.

Zier G, Drobny H, Valenta B, Singer EA (1988). Evidence against a functional link between noradrenaline uptake mechanisms and presynaptic alpha-2 adrenoceptors. *Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol* **337**, 118-121.

IV. DISCUSSION GÉNÉRALE

Lorsque la SNV a été approuvée en clinique comme traitement additif pour la dépression résistante, peu de recherches précliniques avaient été effectuées dans le but de mieux comprendre les mécanismes d'action qui sous-tendent cette approche thérapeutique. Compte tenu de l'implication reconnue des systèmes monoaminergiques dans la pathophysiologie de la dépression et dans le mode d'action des antidépresseurs, il était alors logique de tenter de caractériser l'impact de la SNV sur ces trois systèmes, NA, DA et 5-HT pour expliquer son efficacité thérapeutique dans cette maladie.

Adrienne Dorr et Guy Debonnel avaient initialement décrit l'effet de la SNV sur l'activité électrique des neurones NA du LC et 5-HT du NRD chez le rat anesthésié soumis à différentes durées de SNV en utilisant les paramètres de stimulations auxquels sont couramment soumis les patients souffrant de dépression résistante (Sackeim *et al.*, 2001; Dorr & Debonnel, 2006). Ces auteurs ont constaté qu'une heure de stimulation était suffisante pour augmenter significativement le taux de décharge des neurones NA du LC (Groves *et al.*, 2005; Dorr & Debonnel, 2006) et que cette augmentation était d'autant plus forte que la durée de stimulation était prolongée (Dorr & Debonnel, 2006). L'effet de la SNV sur les neurones 5-HT du NRD était quant à lui différé, puisqu'il fallait 14 jours de stimulation pour observer une élévation significative de l'activité électrique des ces neurones. Cette augmentation était également accrue après 90 jours de SNV (Dorr & Debonnel, 2006).

1. SNV et système NA

Notre ré-analyse de ces résultats électrophysiologiques obtenus après 14 et 90 jours de SNV a révélé un autre effet de ce traitement sur l'activité électrique des neurones NA

du LC sous forme d'une augmentation de leur mode de décharge en bouffées (étude I). Or, il était déjà connu que ce mode de décharge influence la libération terminale des neurotransmetteurs. En effet, sur une durée comparable et pour un même nombre d'impulsions électriques des neurones du LC, le regroupement de ces impulsions en salves est associé à une augmentation de la libération de NA dans le cortex préfrontal (Florin-Lechner *et al.*, 1996; Devoto *et al.*, 2005b). Aussi, tel qu'attendu, une augmentation de concentration de la NA extracellulaire a-t-elle été détectée autant après l'administration aiguë (Roosevelt *et al.*, 2006; Follesa *et al.*, 2007; Raedt *et al.*, 2011) que l'administration prolongée de SNV (étude II) dans les aires de projections terminales du LC, à savoir le cortex frontal et l'hippocampe. Notre travail a également mis en évidence une augmentation de l'activation tonique des récepteurs postsynaptiques α_2 -adrénergiques présents sur les neurones pyramidaux dans la région CA3 de l'hippocampe, pouvant refléter une augmentation de la neurotransmission NA. Cette action de la SNV sur le système NA se distingue clairement de celle des ISRS, dont l'administration aiguë ou chronique, à l'inverse, exerce une action inhibitrice sur l'activité électrique des neurones NA du LC ainsi que sur la libération de NA (Szabo *et al.*, 2000; Seager *et al.*, 2004; Dremencov *et al.*, 2007; Kawahara *et al.*, 2007). Il se pourrait que l'influence négative des ISRS sur le système NA soit responsable de la persistance de symptômes résiduels, tels que fatigue, diminution de la concentration, dysfonctionnements cognitifs et anxiété, chez les patients recevant ce type de traitement (Nutt *et al.*, 2007; Blier & Briley, 2011; Kasper *et al.*, 2011). Ces observations ont donc conduit à l'utilisation conjointe de molécules pouvant contrecarrer l'effet inhibiteur des ISRS sur la neurotransmission NA, comme les antipsychotiques atypiques. En effet, en raison de leur propriété antagoniste des récepteurs 5-HT_{2A}, dont l'activation par la 5-HT est responsable de la diminution de l'activité des neurones NA, l'ajout d'antipsychotiques atypiques aux ISRS permet de rétablir la

fréquence de décharge de ces neurones ainsi que la neurotransmission NA (Szabo & Blier, 2001b; Dremencov *et al.*, 2007; Chernoloz *et al.*, 2009a). Ainsi, l'effet robuste de la SNV sur la fréquence et le mode de décharge des neurones NA du LC ainsi que sur la neurotransmission NA pourrait être un des principaux facteurs expliquant l'efficacité de la SNV chez les patients souffrant de dépression et ne répondant pas à maintes stratégies thérapeutiques. Associée aux autres traitements antidépresseurs, la SNV viendrait contrebalancer un déficit noradrénergique, améliorant ainsi la réponse thérapeutique des patients. L'implication de la NA dans le mode d'action de la SNV avait déjà été montrée dans le contexte de son utilisation dans l'épilepsie, puisqu'une lésion du LC prévenait l'effet anticonvulsif de la SNV chez le rat (Krahl *et al.*, 1998). De même, alors que la SNV augmente la fréquence de décharge des neurones 5-HT après 14 jours d'administration chez le rat, une lésion des neurones NA induite par la neurotoxine DSP-4 abolit complètement ce phénomène (étude I). Ceci démontre également que l'action de la SNV sur les neurones 5-HT du NRD est indirecte et médiée par le système NA.

2. SNV et système 5-HT

En dépit de l'augmentation significative de l'activité électrique des neurones 5-HT provoquée par la SNV, Adrienne Dorr et Guy Debonnel n'avaient pas observé de désensibilisation de l'autorécepteur somatodendritique 5-HT_{1A} comme il était attendu dans de telles circonstances. Cela suggérait que des mécanismes d'action alternatifs soient impliqués dans ce phénomène (Dorr & Debonnel, 2006). L'étude I répond à cette question. En effet, l'inhibition accrue de l'activité des neurones 5-HT observée en réponse à l'injection de prazosin, un antagoniste spécifique des récepteurs α_1 -adrénergiques, après 14 jours de SNV, suggère que l'élévation d'activité électrique observée dans ces conditions

soit le résultat d'une activation des récepteur excitateurs α_1 -adrénergiques présents sur le soma des neurones 5-HT du NRD. Il est important de souligner qu'une augmentation de la fréquence de décharge des neurones 5-HT, ou un retour à leur taux de décharge initial, en l'absence de désensibilisation des autorécepteurs somatodendritiques 5-HT_{1A} lors d'un traitement antidépresseur, est un phénomène rare (Pineyro & Blier, 1999). En effet, outre la SNV, le nouvel antidépresseur agomélatine est le seul connu à ce jour dont l'administration chronique s'accompagne d'une augmentation du taux de décharge des neurones 5-HT du NRD sans désensibilisation de l'autorécepteur 5-HT_{1A} (Hanoun *et al.*, 2004; Blier *et al.*, 2010). Le mécanisme d'action de l'agomélatine est cependant distinct de celui de la SNV, puisque l'augmentation de l'activité électrique des neurones 5-HT induite par cet antidépresseur dépend d'une activation des récepteurs excitateurs de type D2 présents sur le soma des neurones 5-HT (Blier *et al.*, 2010), alors que les mécanismes propres à la SNV font intervenir les récepteurs α_1 -adrénergiques. L'activation de ces récepteurs α_1 -adrénergiques pourrait aussi rendre compte de l'élévation de la 5-HT extracellulaire observée en microdialyse dans le NRD suite à l'administration prolongée de SNV (étude II). En effet, il est déjà connu que l'activation de ces récepteurs est capable de moduler la libération de 5-HT au sein du NRD (Pudovkina *et al.*, 2003; Rea *et al.*, 2010).

Par ailleurs, au niveau du cortex préfrontal et de l'hippocampe, les expériences de microdialyse n'ont révélé aucune modification de la concentration de la 5-HT extracellulaire après l'administration prolongée de SNV (étude II). Cependant, nous avons constaté une augmentation de l'activation tonique des récepteurs postsynaptiques 5-HT_{1A} des neurones pyramidaux de l'hippocampe à la suite de ce traitement, laquelle s'ajoutant à l'élévation de l'activité électrique des neurones 5-HT suggère une augmentation globale de la neurotransmission 5-HT. (étude I). À cet égard, la SNV rejoint les autres formes de traitement antidépresseur classiques, ou plus récemment utilisées qui induisent aussi une

augmentation du degré d'activation de ces hétérorécepteurs, dont la contribution à la réponse thérapeutique aux antidépresseurs est maintenant reconnue (Blier & de Montigny, 1994; Haddjeri *et al.*, 1998b; El Mansari *et al.*, 2005; Chernoloz *et al.*, 2011; Ghanbari *et al.*, 2011).

Ainsi, il apparaît de plus en plus probable qu'une augmentation globale et de la neurotransmission NA et de la neurotransmission 5-HT explique, du moins en partie, l'action antidépressive de la SNV. L'augmentation de l'activation tonique des deux hétérorécepteurs 5-HT_{1A} et α_2 -adrénergiques - inhibiteurs dans l'hippocampe - pourrait notamment être responsable de la diminution de l'activité métabolique de cette région observée en imagerie cérébrale suite à la SNV (Henry *et al.*, 1998; Zobel *et al.*, 2005). Cette notion est d'autant plus intéressante que la dépression est généralement associée à une hyperactivité des structures limbiques, accompagnée d'hypoactivité frontale, et que la réponse clinique aux antidépresseurs est associée à une normalisation de ces activités métaboliques (Mayberg *et al.*, 2000; Kennedy *et al.*, 2001; Drevets *et al.*, 2002).

3. SNV et système DA

Compte-tenu des interactions réciproques s'exerçant entre les trois systèmes monoaminergiques et de l'implication démontrée de la DA dans la pathologie de la dépression, il était important d'étudier aussi l'impact de la SNV sur le système DA.

Étant données les influences inhibitrices exercées par la 5-HT et la NA sur l'activité électrique des neurones DA (cf. paragraphes 2.4.2. et 2.4.3.), et l'induction d'une augmentation significative de ces deux neurotransmissions par la SNV, il ne fut pas surprenant d'observer une diminution de la fréquence de décharge des neurones DA de

l'ATV après 14 jours de SNV (étude II). Toutefois, c'est une augmentation de DA extracellulaire que nous avons observé dans ces conditions, tant dans le cortex préfrontal que le noyau accumbens (étude II). Les mécanismes induisant une telle augmentation de la DA extracellulaire dans deux territoires d'innervation de l'ATV ne sont pas encore élucidés, mais laissent supposer que l'activité électrique des neurones DA et la libération de ce neurotransmetteur ne soient pas systématiquement corrélés, tel que démontré suite à l'administration d'asénapine dans une autre étude (Franberg *et al.*, 2009). Cependant, d'autres hypothèses explicatives peuvent également s'appliquer. En effet, il a été rapporté que le transporteur membranaire DAT serait peu abondant sur les terminaisons neuronales DA du cortex préfrontal, et que le signal DA y serait terminé par recapture de la DA via le transporteur membranaire NET des terminaisons NA (Carboni *et al.*, 1990; Bymaster *et al.*, 2002a). De plus, la stimulation électrique du LC semble induire une libération conjointe de NA et de DA dans le cortex préfrontal (Devoto *et al.*, 2005a; Devoto *et al.*, 2005b). Il se pourrait donc que l'augmentation de la concentration extracellulaire de DA dans le cortex préfrontal résultant de la SNV dépende de l'augmentation d'activité des neurones du LC induite par ce traitement. Ce même phénomène pourrait également être en cause dans l'augmentation de la concentration extracellulaire de DA observée dans le noyau accumbens. En effet, le blocage des NET par la réboxétine (un inhibiteur sélectif de la recapture de NA) augmente davantage la libération de DA induite par le blocage des DAT dans la partie ventrale du noyau accumbens (Carboni *et al.*, 2006).

Cela dit, une élévation de la neurotransmission DA dans des aires cérébrales clés pourrait contribuer à l'efficacité de la SNV comme traitement de la dépression. En effet, il a déjà été montré que l'administration d'ISRS, à court ou long-terme, inhibe l'activité spontanée des neurones DA de l'ATV (Dremencov *et al.*, 2009). Parmi les différents ISRS cependant, seule la fluoxétine semble capable d'induire une augmentation de DA dans le

cortex préfrontal, et ceci en administration aiguë seulement (Tanda *et al.*, 1996b; Bymaster *et al.*, 2002b). De plus, la fluoxétine, administrée ponctuellement ou de façon répétée, n'altère pas les niveaux de DA extracellulaire dans le noyau accumbens, ni d'autres traitements appartenant à différentes classes d'antidépresseurs, tels que la désipramine, la nortriptyline ou la miansérine (Carlson *et al.*, 1996; Clark *et al.*, 1996; Tanda *et al.*, 1996a; Tanda *et al.*, 1996b; Koch *et al.*, 2002).

L'influence de la SNV sur la neurotransmission DA, particulièrement dans le noyau accumbens, qui joue un rôle essentiel dans les comportements de récompense et de plaisir, se démarque ainsi de celle de plusieurs antidépresseurs classiques. L'anhédonie qui représente l'un des symptômes cardinaux de la dépression, peut persister chez certains patients dépressifs sous traitement. On ne peut donc exclure que l'efficacité thérapeutique de la SNV chez des patients résistants à d'autres stratégies thérapeutiques dépende en partie de son action sur le système DA.

4. Autres impacts de la SNV

Au terme des deux études précédentes, il apparaît clairement que la SNV affecte d'une façon ou d'une autre les trois systèmes monoaminergiques impliqués dans la pathophysiologie de la dépression et le mode d'action des antidépresseurs. L'impact de la SNV sur ces trois systèmes se différencie parfois de celui des antidépresseurs classiques, ce qui pourrait rendre compte de l'efficacité de la SNV chez les patients souffrant de dépression et ne répondant pas aux pharmacothérapies habituelles. Cependant, l'impact de la SNV pourrait être beaucoup plus étendu, et d'autres facteurs pourraient également contribuer à son action antidépressive, rejoignant ainsi les deux autres hypothèses

pathogéniques de la dépression, à savoir l'hypothèse neurotrophique et l'hypothèse endocrinienne.

En effet, même si les recherches à ce sujet sont encore au stade embryonnaire, certaines études précliniques ont observé que, tout comme diverses classes d'antidépresseurs, l'administration aiguë ou prolongée de SNV augmente l'expression du facteur neurotrophique BDNF dans l'hippocampe et le cortex chez le rat (Nibuya *et al.*, 1995; Nibuya *et al.*, 1996; Follesa *et al.*, 2007; Biggio *et al.*, 2009). Ceci pourrait représenter un élément nouveau en terme d'efficacité thérapeutique de la SNV dans la dépression, puisque la neurogénèse dans l'hippocampe semble intervenir dans la réponse aux antidépresseurs (Santarelli *et al.*, 2003; Warner-Schmidt & Duman, 2006; Perera *et al.*, 2007). D'autre part, alors que d'autres données mettent en cause un dysfonctionnement de l'axe hypothalamo-hypophysaire dans la dépression (cf. paragraphe 1.2.1.), une étude clinique effectuée chez des patients souffrant de dépression a montré que la SNV induit une normalisation de la réponse du cortisol face au stress (O'Keane *et al.*, 2005).

Ces dernières observations apportent des indices supplémentaires sur les mécanismes d'action de la SNV dans le traitement de la dépression résistante et méritent d'être approfondies davantage.

5. Amélioration des paramètres de la SNV

Une meilleure compréhension des mécanismes d'action de la SNV nous a également servi à concrétiser le deuxième objectif de ce travail de thèse, soit l'amélioration des paramètres de stimulation de la SNV. Des études cliniques d'imageries cérébrales avaient déjà rapporté qu'une altération des paramètres de stimulation pouvait affecter le potentiel de la SNV à activer certaines régions cérébrales (Lomarev *et al.*, 2002; Mu *et al.*,

2004). Pour notre part, nous avons voulu déterminer les paramètres de SNV qui augmentaient de façon optimale la fréquence de décharge des neurones 5-HT du NRD.

Notre première série d'expériences électrophysiologiques a permis de tester l'effet des modifications de chacun des paramètres standards (0.25 mA, 20 Hz, 500 μ secondes, 30 secondes ON-5 minutes OFF) généralement utilisés en clinique chez les patients souffrants de dépression, sur le taux de décharge des neurones 5-HT du NRD chez le rat soumis à 14 jours de SNV (étude III). Cette série de modifications a somme toute montré que les paramètres de stimulation optimaux pour activer les neurones 5-HT étaient globalement ceux qui étaient déjà utilisés pour le traitement de la dépression résistante. L'étude a aussi permis de constater que des stimulations trop excessives induisaient au contraire une perte d'efficacité de la SNV à augmenter la fréquence de décharge des neurones 5-HT (étude III). Cette série d'expériences validait du même coup l'utilisation de l'activité électrique des neurones 5-HT comme indicateur potentiel de l'efficacité de la SNV. C'est pourquoi, le même paradigme a ensuite été utilisé pour tester de nouvelles modifications plus drastiques des paramètres de stimulation (étude IV).

Au final, aucun des paramètres testés ne s'est avéré capable d'accroître davantage l'augmentation du taux de décharge des neurones 5-HT obtenue avec les paramètres standards de SNV. Cependant, ce travail a permis d'observer que diverses modalités de réglage, réduisant la stimulation, s'avéraient aussi efficaces à augmenter l'activité des neurones 5-HT. En effet, alors que le cycle standard de stimulation, pour le traitement de la dépression ou celui de l'épilepsie, est généralement de 30 secondes toutes les 5 minutes (Handforth *et al.*, 1998; Sackeim *et al.*, 2001; Rush *et al.*, 2005b; Schlaepfer *et al.*, 2008), notre étude a montré que le même cycle durant 12 heures par jour au lieu des 24 habituelles, de même qu'une stimulation de 30 secondes toutes les 10 ou 15 minutes au lieu de 5 minutes, étaient tout aussi efficaces que les paramètres standards pour augmenter

le taux de décharge des neurones 5-HT. De même, un mode de stimulation en bouffées, visant à imiter le mode de décharge des neurones NA du LC et à influencer de façon plus robuste l'activité des neurones 5-HT, ainsi que l'utilisation de stimulations POP (pour *Pseudo-One-Pulse*), qui consiste à délivrer quatre impulsions électriques de 100 Hz toutes les 5 minutes et qui produiraient une libération plus importante de neurotransmetteurs (Feuerstein & Hertting, 1986; Zier *et al.*, 1988; Mongeau *et al.*, 1994), augmentent le taux de décharge des neurones 5-HT au même niveau que les paramètres standards.

Un des bénéfices majeurs pouvant être apporté par ces modes de stimulation différents pourrait être une réduction des effets secondaires rapportés par les patients recevant la SNV. Ces effets indésirables, soit surtout une altération de la voix, des maux de gorge, de la toux, ou des essoufflements au cours d'exercice (Ben-Menachem, 2001), sont en effet directement reliés aux périodes de stimulation. Et même si ces effets indésirables sont relativement mineurs ou modérés et tendent à diminuer au cours du temps, ils représentent une gêne quotidienne chez la plupart des patients. Ainsi, des stimulations plus brèves, voire même quasiment imperceptibles (avec la POP), plus espacées, ou ne survenant que durant le jour ou la nuit, pourraient améliorer la qualité de vie des patients traités par SNV.

Un autre avantage des paramètres de stimulation que nous avons testés est que la durée de vie de la batterie du dispositif de stimulation pourrait être prolongée de façon significative avec des durées de stimulation réduites. Il en résulterait une réduction des coûts et des risques relatifs au remplacement de la pile, qui nécessite une chirurgie. Puisque des modalités de stimulation différentes et moins intenses pourraient s'avérer bénéfiques chez des patients ayant déjà répondu à la SNV, et améliorer leur qualité de vie au quotidien, il serait intéressant de tester ces nouveaux modes de stimulations en clinique.

V. CONCLUSION

La caractérisation de l'impact de la SNV sur les trois systèmes monoaminergiques impliqués dans la pathophysiologie de la dépression apporte des indices précieux pour la compréhension du mode d'action de cette approche thérapeutique, qui s'avère en partie distinct de celui des médicaments antidépresseurs les plus communément utilisés tels les ISRS. L'induction par la SNV d'une augmentation globale des neurotransmissions 5-HT et NA, de même qu'une élévation significative de la DA dans plusieurs structures clés, dont le noyau accumbens, semble contribuer à l'action antidépressive de cette thérapie. Cette meilleure connaissance globale des mécanismes grâce auxquels la SNV exercerait son effet thérapeutique pourrait conduire à l'élaboration de nouveaux concepts pouvant mimer les effets de la SNV sur les différents systèmes et structures monoaminergiques et augmenter ainsi l'efficacité des traitements de la dépression résistante.

Par ailleurs, la détermination de nouveaux paramètres de stimulation qui s'avèrent aussi efficaces que les paramètres standards pour augmenter l'activité électrique des neurones 5-HT chez le rat, pourrait avoir des répercussions cliniques très positives. En effet, les modalités de stimulation ainsi définies étant moins intenses que les stimulations standards actuellement utilisées chez les patients souffrant de dépression, elles pourraient contribuer à une minimisation, voire même, à une absence d'effets secondaires liés à la stimulation, et améliorer ainsi la qualité de vie des patients. Des recherches additionnelles sont cependant nécessaires pour tester ces nouveaux paramètres de stimulation en clinique.

VI. BIBLIOGRAPHIE

Adell A, Artigas F (2004). The somatodendritic release of dopamine in the ventral tegmental area and its regulation by afferent transmitter systems. *Neurosci Biobehav Rev* **28**, 415-431.

Adell A, Celada P, Artigas F (2001). The role of 5-HT_{1B} receptors in the regulation of serotonin cell firing and release in the rat brain. *J Neurochem* **79**, 172-182.

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

Alonso R, Griebel G, Pavone G, Stemmelin J, Le Fur G, Soubrie P (2004). Blockade of CRF(1) or V(1b) receptors reverses stress-induced suppression of neurogenesis in a mouse model of depression. *Mol Psychiatry* **9**, 278-286, 224.

Aman TK, Shen RY, Haj-Dahmane S (2007). D₂-like dopamine receptors depolarize dorsal raphe serotonin neurons through the activation of nonselective cationic conductance. *J Pharmacol Exp Ther* **320**, 376-385.

Angelucci F, Brene S, Mathe AA (2005). BDNF in schizophrenia, depression and corresponding animal models. *Mol Psychiatry* **10**, 345-352.

Arango V, Underwood MD, Boldrini M, Tamir H, Kassir SA, Hsiung S, Chen JJ, Mann JJ (2001). Serotonin 1A receptors, serotonin transporter binding and serotonin transporter mRNA expression in the brainstem of depressed suicide victims. *Neuropsychopharmacology* **25**, 892-903.

Arango V, Underwood MD, Gubbi AV, Mann JJ (1995). Localized alterations in pre- and postsynaptic serotonin binding sites in the ventrolateral prefrontal cortex of suicide victims. *Brain Res* **688**, 121-133.

Arborelius L, Owens MJ, Plotsky PM, Nemeroff CB (1999). The role of corticotropin-releasing factor in depression and anxiety disorders. *J Endocrinol* **160**, 1-12.

Asberg M, Traskman L, Thoren P (1976). 5-HIAA in the cerebrospinal fluid. A biochemical suicide predictor? *Arch Gen Psychiatry* **33**, 1193-1197.

Bailey P, Bremer F (1938). A Sensory Cortical Representation of the Vagus Nerve. *Journal of Neurophysiology* **1**, 405-412.

Bajbouj M, Merkl A, Schlaepfer TE, Frick C, Zobel A, Maier W, O'Keane V, Corcoran C, Adolfsson R, Trimble M, Rau H, Hoff HJ, Padberg F, Muller-Siecheneder F, Audenaert K, van den Abbeele D, Matthews K, Christmas D, Eljamel

S, Heuser I (2010). Two-year outcome of vagus nerve stimulation in treatment-resistant depression. *J Clin Psychopharmacol* **30**, 273-281.

Baker KG, Halliday GM, Tork I (1990). Cytoarchitecture of the human dorsal raphe nucleus. *J Comp Neurol* **301**, 147-161.

Baraban JM, Aghajanian GK (1981). Noradrenergic innervation of serotonergic neurons in the dorsal raphe: demonstration by electron microscopic autoradiography. *Brain Res* **204**, 1-11.

Baraban JM, Aghajanian GK (1980). Suppression of firing activity of 5-HT neurons in the dorsal raphe by alpha-adrenoceptor antagonists. *Neuropharmacology* **19**, 355-363.

Barnes NM, Sharp T (1999). A review of central 5-HT receptors and their function. *Neuropharmacology* **38**, 1083-1152.

Bauer M, Forsthoff A, Baethge C, Adli M, Berghofer A, Dopfmer S, Bschor T (2003). Lithium augmentation therapy in refractory depression-update 2002. *Eur Arch Psychiatry Clin Neurosci* **253**, 132-139.

Bel N, Artigas F (1993). Chronic treatment with fluvoxamine increases extracellular serotonin in frontal cortex but not in raphe nuclei. *Synapse* **15**, 243-245.

Belmaker RH, Agam G (2008). Major depressive disorder. *N Engl J Med* **358**, 55-68.

Ben-Menachem E (2001). Vagus nerve stimulation, side effects, and long-term safety. *J Clin Neurophysiol* **18**, 415-418.

Ben-Menachem E, Hamberger A, Hedner T, Hammond EJ, Uthman BM, Slater J, Treig T, Stefan H, Ramsay RE, Wernicke JF, et al. (1995). Effects of vagus nerve stimulation on amino acids and other metabolites in the CSF of patients with partial seizures. *Epilepsy Res* **20**, 221-227.

Ben-Menachem E, Manon-Espaillet R, Ristanovic R, Wilder BJ, Stefan H, Mirza W, Tarver WB, Wernicke JF (1994). Vagus nerve stimulation for treatment of partial seizures: 1. A controlled study of effect on seizures. First International Vagus Nerve Stimulation Study Group. *Epilepsia* **35**, 616-626.

Biggio F, Gorini G, Utzeri C, Olla P, Marrosu F, Mocchetti I, Follesa P (2009). Chronic vagus nerve stimulation induces neuronal plasticity in the rat hippocampus. *Int J Neuropsychopharmacol* **12**, 1209-1221.

Birkmayer W, Riederer P (1975). Biochemical post-mortem findings in depressed patients. *J Neural Transm* **37**, 95-109.

Blier P (1991). Terminal serotonin autoreceptor function in the rat hippocampus is not modified by pertussis and cholera toxins. *Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol* **344**, 160-166.

Blier P, Briley M (2011). The noradrenergic symptom cluster: clinical expression and neuropharmacology. *Neuropsychiatr Dis Treat* **7**, 15-20.

Blier P, Chaput Y, de Montigny C (1988). Long-term 5-HT reuptake blockade, but not monoamine oxidase inhibition, decreases the function of terminal 5-HT autoreceptors: an electrophysiological study in the rat brain. *Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol* **337**, 246-254.

Blier P, de Montigny C (1994). Current advances and trends in the treatment of depression. *Trends Pharmacol Sci* **15**, 220-226.

Blier P, De Montigny C (1983). Electrophysiological investigations on the effect of repeated zimelidine administration on serotonergic neurotransmission in the rat. *J Neurosci* **3**, 1270-1278.

Blier P, de Montigny C (1985). Serotonergic but not noradrenergic neurons in rat central nervous system adapt to long-term treatment with monoamine oxidase inhibitors. *Neuroscience* **16**, 949-955.

Blier P, ElMansari M, Chenu F (2010). Electrophysiological effects of the repeated administration of agomelatine on the serotonin, norepinephrine, and dopamine systems in the rat brain
International Journal of Neuro-Psychopharmacology **13**.

Blier P, Gobbi G, Turcotte JE, de Montigny C, Boucher N, Hebert C, Debonnel G (2009). Mirtazapine and paroxetine in major depression: a comparison of monotherapy versus their combination from treatment initiation. *Eur Neuropsychopharmacol* **19**, 457-465.

Blier P, Pineyro G, el Mansari M, Bergeron R, de Montigny C (1998). Role of somatodendritic 5-HT autoreceptors in modulating 5-HT neurotransmission. *Ann N Y Acad Sci* **861**, 204-216.

Blier P, Ramdine R, Galzin AM, Langer SZ (1989). Frequency-dependence of serotonin autoreceptor but not alpha 2-adrenoceptor inhibition of [3H]-serotonin release in rat hypothalamic slices. *Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol* **339**, 60-64.

Blier P, Szabo ST (2005). Potential mechanisms of action of atypical antipsychotic medications in treatment-resistant depression and anxiety. *J Clin Psychiatry* **66 Suppl 8**, 30-40.

Bohning DE, Lomarev MP, Denslow S, Nahas Z, Shastri A, George MS (2001). Feasibility of vagus nerve stimulation-synchronized blood oxygenation level-dependent functional MRI. *Invest Radiol* **36**, 470-479.

Bohotin C, Scholsem M, Bohotin V, Franzen R, Schoenen J (2003a). Vagus nerve stimulation attenuates heat- and formalin-induced pain in rats. *Neurosci Lett* **351**, 79-82.

Bohotin C, Scholsem M, Multon S, Martin D, Bohotin V, Schoenen J (2003b). Vagus nerve stimulation in awake rats reduces formalin-induced nociceptive behaviour and fos-immunoreactivity in trigeminal nucleus caudalis. *Pain* **101**, 3-12.

Boldrini M, Underwood MD, Mann JJ, Arango V (2008). Serotonin-1A autoreceptor binding in the dorsal raphe nucleus of depressed suicides. *J Psychiatr Res* **42**, 433-442.

Booij L, Van der Does W, Benkelfat C, Bremner JD, Cowen PJ, Fava M, Gillin C, Leyton M, Moore P, Smith KA, Van der Kloot WA (2002). Predictors of mood response to acute tryptophan depletion. A reanalysis. *Neuropsychopharmacology* **27**, 852-861.

Bouchard TJ, Jr. (1994). Genes, environment, and personality. *Science* **264**, 1700-1701.

Bremner JD, Narayan M, Anderson ER, Staib LH, Miller HL, Charney DS (2000). Hippocampal volume reduction in major depression. *Am J Psychiatry* **157**, 115-118.

Brunello N, Blier P, Judd LL, Mendlewicz J, Nelson CJ, Souery D, Zohar J, Racagni G (2003). Noradrenaline in mood and anxiety disorders: basic and clinical studies. *Int Clin Psychopharmacol* **18**, 191-202.

Burke HM, Davis MC, Otte C, Mohr DC (2005). Depression and cortisol responses to psychological stress: a meta-analysis. *Psychoneuroendocrinology* **30**, 846-856.

Bylund DB (1992). Subtypes of alpha 1- and alpha 2-adrenergic receptors. *FASEB J* **6**, 832-839.

Bymaster FP, Katner JS, Nelson DL, Hemrick-Luecke SK, Threlkeld PG, Heiligenstein JH, Morin SM, Gehlert DR, Perry KW (2002a). Atomoxetine increases extracellular levels of norepinephrine and dopamine in prefrontal cortex of rat: a potential mechanism for efficacy in attention deficit/hyperactivity disorder. *Neuropsychopharmacology* **27**, 699-711.

Bymaster FP, Zhang W, Carter PA, Shaw J, Chernet E, Phebus L, Wong DT, Perry KW (2002b). Fluoxetine, but not other selective serotonin uptake inhibitors, increases norepinephrine and dopamine extracellular levels in prefrontal cortex. *Psychopharmacology (Berl)* **160**, 353-361.

Calabrese JR, Bowden CL, Sachs GS, Ascher JA, Monaghan E, Rudd GD (1999). A double-blind placebo-controlled study of lamotrigine monotherapy in outpatients with bipolar I depression. Lamictal 602 Study Group. *J Clin Psychiatry* **60**, 79-88.

Callado LF, Meana JJ, Grijalba B, Pazos A, Sastre M, Garcia-Sevilla JA (1998). Selective increase of alpha2A-adrenoceptor agonist binding sites in brains of depressed suicide victims. *J Neurochem* **70**, 1114-1123.

Cannon DM, Ichise M, Rollis D, Klaver JM, Gandhi SK, Charney DS, Manji HK, Drevets WC (2007). Elevated serotonin transporter binding in major depressive disorder

assessed using positron emission tomography and [¹¹C]DASB; comparison with bipolar disorder. *Biol Psychiatry* **62**, 870-877.

Carboni E, Silvagni A, Vacca C, Di Chiara G (2006). Cumulative effect of norepinephrine and dopamine carrier blockade on extracellular dopamine increase in the nucleus accumbens shell, bed nucleus of stria terminalis and prefrontal cortex. *J Neurochem* **96**, 473-481.

Carboni E, Tanda GL, Frau R, Di Chiara G (1990). Blockade of the noradrenaline carrier increases extracellular dopamine concentrations in the prefrontal cortex: evidence that dopamine is taken up in vivo by noradrenergic terminals. *J Neurochem* **55**, 1067-1070.

Carlson JN, Visser KE, Nielsen DM, Keller RW, Jr., Glick SD (1996). Chronic antidepressant drug treatment reduces turning behavior and increases dopamine levels in the medial prefrontal cortex. *Brain Res* **707**, 122-126.

Carpenter LL, Moreno FA, Kling MA, Anderson GM, Regenold WT, Labiner DM, Price LH (2004). Effect of vagus nerve stimulation on cerebrospinal fluid monoamine metabolites, norepinephrine, and gamma-aminobutyric acid concentrations in depressed patients. *Biol Psychiatry* **56**, 418-426.

Carpenter LL, Yasmin S, Price LH (2002). A double-blind, placebo-controlled study of antidepressant augmentation with mirtazapine. *Biol Psychiatry* **51**, 183-188.

Carroll BJ, Cassidy F, Naftolowitz D, Tatham NE, Wilson WH, Iranmanesh A, Liu PY, Veldhuis JD (2007). Pathophysiology of hypercortisolism in depression. *Acta Psychiatr Scand Suppl*, 90-103.

Casanovas JM, Hervas I, Artigas F (1999). Postsynaptic 5-HT_{1A} receptors control 5-HT release in the rat medial prefrontal cortex. *Neuroreport* **10**, 1441-1445.

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

Cedarbaum JM, Aghajanian GK (1978). Afferent projections to the rat locus coeruleus as determined by a retrograde tracing technique. *J Comp Neurol* **178**, 1-16.

Cedarbaum JM, Aghajanian GK (1977). Catecholamine receptors on locus coeruleus neurons: pharmacological characterization. *Eur J Pharmacol* **44**, 375-385.

Chaput Y, Blier P, de Montigny C (1986a). In vivo electrophysiological evidence for the regulatory role of autoreceptors on serotonergic terminals. *J Neurosci* **6**, 2796-2801.

Chaput Y, de Montigny C, Blier P (1986b). Effects of a selective 5-HT reuptake blocker, citalopram, on the sensitivity of 5-HT autoreceptors: electrophysiological studies in the rat brain. *Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol* **333**, 342-348.

Chase MH, Serman MB, Clemente CD (1966). Cortical and subcortical patterns of response to afferent vagal stimulation. *Exp Neurol* **16**, 36-49.

Chenu F, Dailly E, Bourin M (2005). 5-HT1B Receptors : A target for Antidepressant Drugs? *Drug Development Research* **65**, 141-146.

Chernoloz O, El Mansari M, Blier P (2009a). Electrophysiological studies in the rat brain on the basis for aripiprazole augmentation of antidepressants in major depressive disorder. *Psychopharmacology (Berl)* **206**, 335-344.

Chernoloz O, El Mansari M, Blier P (2011). Long-term administration of the dopamine D3/2 receptor agonist pramipexole increases dopamine and serotonin neurotransmission in the male rat forebrain. *J Psychiatry Neurosci* **36**, 110038.

Chernoloz O, El Mansari M, Blier P (2009b). Sustained administration of pramipexole modifies the spontaneous firing of dopamine, norepinephrine, and serotonin neurons in the rat brain. *Neuropsychopharmacology* **34**, 651-661.

Clark RN, Ashby CR, Jr., Dewey SL, Ramachandran PV, Strecker RE (1996). Effect of acute and chronic fluoxetine on extracellular dopamine levels in the caudate-putamen and nucleus accumbens of rat. *Synapse* **23**, 125-131.

Collier DA, Stober G, Li T, Heils A, Catalano M, Di Bella D, Arranz MJ, Murray RM, Vallada HP, Bengel D, Muller CR, Roberts GW, Smeraldi E, Kirov G, Sham P, Lesch KP (1996). A novel functional polymorphism within the promoter of the serotonin transporter gene: possible role in susceptibility to affective disorders. *Mol Psychiatry* **1**, 453-460.

Conway CR, Sheline YI, Chibnall JT, George MS, Fletcher JW, Mintun MA (2006). Cerebral blood flow changes during vagus nerve stimulation for depression. *Psychiatry Res* **146**, 179-184.

Coppen A (1967). The biochemistry of affective disorders. *Br J Psychiatry* **113**, 1237-1264.

Corrigan MH, Denahan AQ, Wright CE, Ragual RJ, Evans DL (2000). Comparison of pramipexole, fluoxetine, and placebo in patients with major depression. *Depress Anxiety* **11**, 58-65.

Cremniter D, Jamain S, Kollenbach K, Alvarez JC, Lecrubier Y, Gilton A, Jullien P, Lesieur P, Bonnet F, Spreux-Varoquaux O (1999). CSF 5-HIAA levels are lower in impulsive as compared to nonimpulsive violent suicide attempters and control subjects. *Biol Psychiatry* **45**, 1572-1579.

Cunningham JT, Mifflin SW, Gould GG, Frazer A (2008). Induction of c-Fos and DeltaFosB immunoreactivity in rat brain by Vagal nerve stimulation. *Neuropsychopharmacology* **33**, 1884-1895.

D'Haenen HA, Bossuyt A (1994). Dopamine D2 receptors in depression measured with single photon emission computed tomography. *Biol Psychiatry* **35**, 128-132.

Dahlström A, Fuxe K (1964). Localization of monoamines in the lower brain stem. *Experientia* **20**, 398-399.

Dailly E, Chenu F, Renard CE, Bourin M (2004). Dopamine, depression and antidepressants. *Fundam Clin Pharmacol* **18**, 601-607.

de Montigny C (1984). Electroconvulsive shock treatments enhance responsiveness of forebrain neurons to serotonin. *J Pharmacol Exp Ther* **228**, 230-234.

de Montigny C, Blier P (1991). Desensitization of terminal 5-HT autoreceptors by 5-HT reuptake blockers. *Arch Gen Psychiatry* **48**, 483-484.

de Montigny C, Cournoyer G, Morissette R, Langlois R, Caille G (1983). Lithium carbonate addition in tricyclic antidepressant-resistant unipolar depression. Correlations with the neurobiologic actions of tricyclic antidepressant drugs and lithium ion on the serotonin system. *Arch Gen Psychiatry* **40**, 1327-1334.

De Montigny C, Grunberg F, Mayer A, Deschenes JP (1981). Lithium induces rapid relief of depression in tricyclic antidepressant drug non-responders. *Br J Psychiatry* **138**, 252-256.

De Paermentier F, Mauger JM, Lowther S, Crompton MR, Katona CL, Horton RW (1997). Brain alpha-adrenoceptors in depressed suicides. *Brain Res* **757**, 60-68.

Delgado PL, Charney DS, Price LH, Aghajanian GK, Landis H, Heninger GR (1990). Serotonin function and the mechanism of antidepressant action. Reversal of antidepressant-induced remission by rapid depletion of plasma tryptophan. *Arch Gen Psychiatry* **47**, 411-418.

Delgado PL, Miller HL, Salomon RM, Licinio J, Heninger GR, Gelenberg AJ, Charney DS (1993). Monoamines and the mechanism of antidepressant action: effects of catecholamine depletion on mood of patients treated with antidepressants. *Psychopharmacol Bull* **29**, 389-396.

Delgado PL, Miller HL, Salomon RM, Licinio J, Krystal JH, Moreno FA, Heninger GR, Charney DS (1999). Tryptophan-depletion challenge in depressed patients treated with desipramine or fluoxetine: implications for the role of serotonin in the mechanism of antidepressant action. *Biol Psychiatry* **46**, 212-220.

Descarries L, Watkins KC, Garcia S, Beaudet A (1982). The serotonin neurons in nucleus raphe dorsalis of adult rat: a light and electron microscope radioautographic study. *J Comp Neurol* **207**, 239-254.

Devoto P, Flore G, Pira L, Longu G, Gessa GL (2004). Mirtazapine-induced corelease of dopamine and noradrenaline from noradrenergic neurons in the medial prefrontal and occipital cortex. *Eur J Pharmacol* **487**, 105-111.

Devoto P, Flore G, Saba P, Fa M, Gessa GL (2005a). Co-release of noradrenaline and dopamine in the cerebral cortex elicited by single train and repeated train stimulation of the locus coeruleus. *BMC Neurosci* **6**, 31.

Devoto P, Flore G, Saba P, Fa M, Gessa GL (2005b). Stimulation of the locus coeruleus elicits noradrenaline and dopamine release in the medial prefrontal and parietal cortex. *J Neurochem* **92**, 368-374.

Di Giovanni G, Di Matteo V, Di Mascio M, Esposito E (2000). Preferential modulation of mesolimbic vs. nigrostriatal dopaminergic function by serotonin(2C/2B) receptor agonists: a combined in vivo electrophysiological and microdialysis study. *Synapse* **35**, 53-61.

Di Giovanni G, Di Matteo V, Pierucci M, Esposito E (2008). Serotonin-dopamine interaction: electrophysiological evidence. *Prog Brain Res* **172**, 45-71.

Di Matteo V, Di Giovanni G, Di Mascio M, Esposito E (2000). Biochemical and electrophysiological evidence that RO 60-0175 inhibits mesolimbic dopaminergic function through serotonin(2C) receptors. *Brain Res* **865**, 85-90.

Dong J, Blier P (2001). Modification of norepinephrine and serotonin, but not dopamine, neuron firing by sustained bupropion treatment. *Psychopharmacology (Berl)* **155**, 52-57.

Dorr AE, Debonnel G (2006). Effect of vagus nerve stimulation on serotonergic and noradrenergic transmission. *J Pharmacol Exp Ther* **318**, 890-898.

Dremencov E, El Mansari M, Blier P (2009). Effects of sustained serotonin reuptake inhibition on the firing of dopamine neurons in the rat ventral tegmental area. *J Psychiatry Neurosci* **34**, 223-229.

Dremencov E, El Mansari M, Blier P (2007). Noradrenergic augmentation of escitalopram response by risperidone: electrophysiologic studies in the rat brain. *Biol Psychiatry* **61**, 671-678.

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

Drevets WC, Frank E, Price JC, Kupfer DJ, Holt D, Greer PJ, Huang Y, Gautier C, Mathis C (1999). PET imaging of serotonin 1A receptor binding in depression. *Biol Psychiatry* **46**, 1375-1387.

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

Dunlop BW, Nemeroff CB (2007). The role of dopamine in the pathophysiology of depression. *Arch Gen Psychiatry* **64**, 327-337.

Dunner DL, Rush AJ, Russell JM, Burke M, Woodard S, Wingard P, Allen J (2006). Prospective, long-term, multicenter study of the naturalistic outcomes of patients with treatment-resistant depression. *J Clin Psychiatry* **67**, 688-695.

Ebert D, Feistel H, Loew T, Pirner A (1996). Dopamine and depression--striatal dopamine D2 receptor SPECT before and after antidepressant therapy. *Psychopharmacology (Berl)* **126**, 91-94.

El Mansari M, Guiard BP, Chernoloz O, Ghanbari R, Katz N, Blier P (2010). Relevance of norepinephrine-dopamine interactions in the treatment of major depressive disorder. *CNS Neurosci Ther* **16**, e1-17.

El Mansari M, Sanchez C, Chouvet G, Renaud B, Haddjeri N (2005). Effects of acute and long-term administration of escitalopram and citalopram on serotonin neurotransmission: an in vivo electrophysiological study in rat brain. *Neuropsychopharmacology* **30**, 1269-1277.

Elam M, Clark D, Svensson TH (1986). Electrophysiological effects of the enantiomers of 3-PPP on neurons in the locus coeruleus of the rat. *Neuropharmacology* **25**, 1003-1008.

Ferre S, Artigas F (1993). Dopamine D2 receptor-mediated regulation of serotonin extracellular concentration in the dorsal raphe nucleus of freely moving rats. *J Neurochem* **61**, 772-775.

Feuerstein TJ, Hertting G (1986). Serotonin (5-HT) enhances hippocampal noradrenaline (NA) release: evidence for facilitatory 5-HT receptors within the CNS. *Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol* **333**, 191-197.

Florin-Lechner SM, Druhan JP, Aston-Jones G, Valentino RJ (1996). Enhanced norepinephrine release in prefrontal cortex with burst stimulation of the locus coeruleus. *Brain Res* **742**, 89-97.

Foley JO, Dubois F (1937). Quantitative studies of the vagus nerve in the cat. I: The ratio of sensory and motor studies. *J Comp Neurol* **67**, 49-67.

Follesa P, Biggio F, Gorini G, Caria S, Talani G, Dazzi L, Puligheddu M, Marrosu F, Biggio G (2007). Vagus nerve stimulation increases norepinephrine concentration and the gene expression of BDNF and bFGF in the rat brain. *Brain Res* **1179**, 28-34.

Franberg O, Marcus MM, Ivanov V, Schilstrom B, Shahid M, Svensson TH (2009). Asenapine elevates cortical dopamine, noradrenaline and serotonin release. Evidence for activation of cortical and subcortical dopamine systems by different mechanisms. *Psychopharmacology (Berl)* **204**, 251-264.

Gagne GG, Jr., Furman MJ, Carpenter LL, Price LH (2000). Efficacy of continuation ECT and antidepressant drugs compared to long-term antidepressants alone in depressed patients. *Am J Psychiatry* **157**, 1960-1965.

Garcia-Cabezas MA, Martinez-Sanchez P, Sanchez-Gonzalez MA, Garzon M, Cavada C (2009). Dopamine innervation in the thalamus: monkey versus rat. *Cereb Cortex* **19**, 424-434.

Garcia-Sevilla JA, Guimon J, Garcia-Vallejo P, Fuster MJ (1986). Biochemical and functional evidence of supersensitive platelet alpha 2-adrenoceptors in major affective disorder. Effect of long-term lithium carbonate treatment. *Arch Gen Psychiatry* **43**, 51-57.

Gartside SE, Hajos-Korcsok E, Bagdy E, Harsing LG, Jr., Sharp T, Hajos M (2000). Neurochemical and electrophysiological studies on the functional significance of burst firing in serotonergic neurons. *Neuroscience* **98**, 295-300.

George MS, Rush AJ, Marangell LB, Sackeim HA, Brannan SK, Davis SM, Howland R, Kling MA, Moreno F, Rittberg B, Dunner D, Schwartz T, Carpenter L, Burke M, Ninan P, Goodnick P (2005). A one-year comparison of vagus nerve stimulation with treatment as usual for treatment-resistant depression. *Biol Psychiatry* **58**, 364-373.

George MS, Rush AJ, Sackeim HA, Marangell LB (2003). Vagus nerve stimulation (VNS): utility in neuropsychiatric disorders. *Int J Neuropsychopharmacol* **6**, 73-83.

George MS, Sackeim HA, Marangell LB, Husain MM, Nahas Z, Lisanby SH, Ballenger JC, Rush AJ (2000a). Vagus nerve stimulation. A potential therapy for resistant depression? *Psychiatr Clin North Am* **23**, 757-783.

George MS, Sackeim HA, Rush AJ, Marangell LB, Nahas Z, Husain MM, Lisanby S, Burt T, Goldman J, Ballenger JC (2000b). Vagus nerve stimulation: a new tool for brain research and therapy. *Biol Psychiatry* **47**, 287-295.

George MS, Ward HE, Jr., Ninan PT, Pollack M, Nahas Z, Anderson B, Kose S, Howland RH, Goodman WK, Ballenger JC (2008). A pilot study of vagus nerve stimulation (VNS) for treatment-resistant anxiety disorders. *Brain Stimul* **1**, 112-121.

Gershon AA, Vishne T, Grunhaus L (2007). Dopamine D2-like receptors and the antidepressant response. *Biol Psychiatry* **61**, 145-153.

Ghanbari R, El Mansari M, Blier P (2011). Enhancement of serotonergic and noradrenergic neurotransmission in the rat hippocampus by sustained administration of bupropion. *Psychopharmacology (Berl)*.

Gibbons RD, Davis JM (1986). Consistent evidence for a biological subtype of depression characterized by low CSF monoamine levels. *Acta Psychiatr Scand* **74**, 8-12.

Gobbi G, Cassano T, Radja F, Morgese MG, Cuomo V, Santarelli L, Hen R, Blier P (2007). Neurokinin 1 receptor antagonism requires norepinephrine to increase serotonin function. *Eur Neuropsychopharmacol* **17**, 328-338.

Gobert A, Rivet JM, Lejeune F, Newman-Tancredi A, Adhumeau-Auclair A, Nicolas JP, Cistarelli L, Melon C, Millan MJ (2000). Serotonin(2C) receptors tonically suppress

the activity of mesocortical dopaminergic and adrenergic, but not serotonergic, pathways: a combined dialysis and electrophysiological analysis in the rat. *Synapse* **36**, 205-221.

Gonon FG (1988). Nonlinear relationship between impulse flow and dopamine released by rat midbrain dopaminergic neurons as studied by in vivo electrochemistry. *Neuroscience* **24**, 19-28.

Gordon I, Weizman R, Rehavi M (1996). Modulatory effect of agents active in the presynaptic dopaminergic system on the striatal dopamine transporter. *Eur J Pharmacol* **298**, 27-30.

Grace AA, Bunney BS (1984). The control of firing pattern in nigral dopamine neurons: burst firing. *J Neurosci* **4**, 2877-2890.

Grace AA, Bunney BS (1983). Intracellular and extracellular electrophysiology of nigral dopaminergic neurons--3. Evidence for electrotonic coupling. *Neuroscience* **10**, 333-348.

Grenhoff J, Nisell M, Ferre S, Aston-Jones G, Svensson TH (1993). Noradrenergic modulation of midbrain dopamine cell firing elicited by stimulation of the locus coeruleus in the rat. *J Neural Transm Gen Sect* **93**, 11-25.

Grenhoff J, Svensson TH (1993). Prazosin modulates the firing pattern of dopamine neurons in rat ventral tegmental area. *Eur J Pharmacol* **233**, 79-84.

Groves DA, Bowman EM, Brown VJ (2005). Recordings from the rat locus coeruleus during acute vagal nerve stimulation in the anaesthetised rat. *Neurosci Lett* **379**, 174-179.

Grzanna R, Berger U, Fritschy JM, Geffard M (1989). Acute action of DSP-4 on central norepinephrine axons: biochemical and immunohistochemical evidence for differential effects. *J Histochem Cytochem* **37**, 1435-1442.

Guiard BP, David DJ, Deltheil T, Chenu F, Le Maitre E, Renoir T, Leroux-Nicollet I, Sokoloff P, Lanfumey L, Hamon M, Andrews AM, Hen R, Gardier AM (2008a). Brain-derived neurotrophic factor-deficient mice exhibit a hippocampal hyperserotonergic phenotype. *Int J Neuropsychopharmacol* **11**, 79-92.

Guiard BP, El Mansari M, Blier P (2008b). Cross-talk between dopaminergic and noradrenergic systems in the rat ventral tegmental area, locus ceruleus, and dorsal hippocampus. *Mol Pharmacol* **74**, 1463-1475.

Guiard BP, El Mansari M, Merali Z, Blier P (2008c). Functional interactions between dopamine, serotonin and norepinephrine neurons: an in-vivo electrophysiological study in rats with monoaminergic lesions. *Int J Neuropsychopharmacol* **11**, 625-639.

Haddjeri N, Blier P (2008). Neurokinin-1 receptor antagonists modulate brain noradrenaline and serotonin interactions. *Eur J Pharmacol* **600**, 64-70.

Haddjeri N, Blier P, de Montigny C (1998a). Acute and long-term actions of the antidepressant drug mirtazapine on central 5-HT neurotransmission. *J Affect Disord* **51**, 255-266.

Haddjeri N, Blier P, de Montigny C (1996). Effect of the alpha-2 adrenoceptor antagonist mirtazapine on the 5-hydroxytryptamine system in the rat brain. *J Pharmacol Exp Ther* **277**, 861-871.

Haddjeri N, Blier P, de Montigny C (1998b). Long-term antidepressant treatments result in a tonic activation of forebrain 5-HT_{1A} receptors. *J Neurosci* **18**, 10150-10156.

Haddjeri N, Blier P, de Montigny C (1995). Noradrenergic modulation of central serotonergic neurotransmission: acute and long-term actions of mirtazapine. *Int Clin Psychopharmacol* **10 Suppl 4**, 11-17.

Haddjeri N, de Montigny C, Blier P (1997). Modulation of the firing activity of noradrenergic neurones in the rat locus coeruleus by the 5-hydroxytryptamine system. *Br J Pharmacol* **120**, 865-875.

Haddjeri N, Szabo ST, de Montigny C, Blier P (2000). Increased tonic activation of rat forebrain 5-HT_{1A} receptors by lithium addition to antidepressant treatments. *Neuropsychopharmacology* **22**, 346-356.

Haj-Dahmane S (2001). D₂-like dopamine receptor activation excites rat dorsal raphe 5-HT neurons in vitro. *Eur J Neurosci* **14**, 125-134.

Hajos M, Gartside SE, Villa AE, Sharp T (1995). Evidence for a repetitive (burst) firing pattern in a sub-population of 5-hydroxytryptamine neurons in the dorsal and median raphe nuclei of the rat. *Neuroscience* **69**, 189-197.

Hajos M, Hajos-Korcsok E, Sharp T (1999). Role of the medial prefrontal cortex in 5-HT_{1A} receptor-induced inhibition of 5-HT neuronal activity in the rat. *Br J Pharmacol* **126**, 1741-1750.

Handforth A, DeGiorgio CM, Schachter SC, Uthman BM, Naritoku DK, Tecoma ES, Henry TR, Collins SD, Vaughn BV, Gilmartin RC, Labar DR, Morris GL, 3rd, Salinsky MC, Osorio I, Ristanovic RK, Labiner DM, Jones JC, Murphy JV, Ney GC, Wheless JW (1998). Vagus nerve stimulation therapy for partial-onset seizures: a randomized active-control trial. *Neurology* **51**, 48-55.

Hanoun N, Mocaer E, Boyer PA, Hamon M, Lanfumey L (2004). Differential effects of the novel antidepressant agomelatine (S 20098) versus fluoxetine on 5-HT_{1A} receptors in the rat brain. *Neuropharmacology* **47**, 515-526.

Harden CL (2002). The co-morbidity of depression and epilepsy: epidemiology, etiology, and treatment. *Neurology* **59**, S48-55.

Harden CL, Pulver MC, Ravdin LD, Nikolov B, Halper JP, Labar DR (2000). A Pilot Study of Mood in Epilepsy Patients Treated with Vagus Nerve Stimulation. *Epilepsy Behav* **1**, 93-99.

Hatanaka K, Yatsugi S, Yamaguchi T (2000). Effect of acute treatment with YM992 on extracellular norepinephrine levels in the rat frontal cortex. *Eur J Pharmacol* **395**, 31-36.

Heils A, Teufel A, Petri S, Stober G, Riederer P, Bengel D, Lesch KP (1996). Allelic variation of human serotonin transporter gene expression. *J Neurochem* **66**, 2621-2624.

Heninger GR, Charney DS, Sternberg DE (1983). Lithium carbonate augmentation of antidepressant treatment. An effective prescription for treatment-refractory depression. *Arch Gen Psychiatry* **40**, 1335-1342.

Henry TR (2002). Therapeutic mechanisms of vagus nerve stimulation. *Neurology* **59**, S3-14.

Henry TR, Bakay RA, Votaw JR, Pennell PB, Epstein CM, Faber TL, Grafton ST, Hoffman JM (1998). Brain blood flow alterations induced by therapeutic vagus nerve stimulation in partial epilepsy: I. Acute effects at high and low levels of stimulation. *Epilepsia* **39**, 983-990.

Hery F, Faudon M, Ternaux JP (1982). In vivo release of serotonin in two raphe nuclei (raphe dorsalis and magnus) of the cat. *Brain Res Bull* **8**, 123-129.

Hirschfeld RM, Montgomery SA, Aguglia E, Amore M, Delgado PL, Gastpar M, Hawley C, Kasper S, Linden M, Massana J, Mendlewicz J, Moller HJ, Nemeroff CB, Saiz J, Such P, Torta R, Versiani M (2002). Partial response and nonresponse to antidepressant therapy: current approaches and treatment options. *J Clin Psychiatry* **63**, 826-837.

Holsboer F (2000). The corticosteroid receptor hypothesis of depression. *Neuropsychopharmacology* **23**, 477-501.

Holsboer F, Ising M (2008). Central CRH system in depression and anxiety--evidence from clinical studies with CRH1 receptor antagonists. *Eur J Pharmacol* **583**, 350-357.

Hord ED, Evans MS, Mueed S, Adamolekun B, Naritoku DK (2003). The effect of vagus nerve stimulation on migraines. *J Pain* **4**, 530-534.

Hoyer D, Hannon JP, Martin GR (2002). Molecular, pharmacological and functional diversity of 5-HT receptors. *Pharmacol Biochem Behav* **71**, 533-554.

Husain SS, Kevan IM, Linnell R, Scott AI (2004). Electroconvulsive therapy in depressive illness that has not responded to drug treatment. *J Affect Disord* **83**, 121-126.

Invernizzi R, Bramante M, Samanin R (1996). Role of 5-HT_{1A} receptors in the effects of acute chronic fluoxetine on extracellular serotonin in the frontal cortex. *Pharmacol Biochem Behav* **54**, 143-147.

Invernizzi RW, Parini S, Sacchetti G, Fracasso C, Caccia S, Annoni K, Samanin R (2001). Chronic treatment with reboxetine by osmotic pumps facilitates its effect on extracellular noradrenaline and may desensitize alpha(2)-adrenoceptors in the prefrontal cortex. *Br J Pharmacol* **132**, 183-188.

Johnson DA, Grant EJ, Ingram CD, Gartside SE (2007). Glucocorticoid receptor antagonists hasten and augment neurochemical responses to a selective serotonin reuptake inhibitor antidepressant. *Biol Psychiatry* **62**, 1228-1235.

Jones BE, Moore RY (1977). Ascending projections of the locus coeruleus in the rat. II. Autoradiographic study. *Brain Res* **127**, 25-53.

Kandel ER, Spencer WA (1961). Electrophysiology of hippocampal neurons. II. Afterpotentials and repetitive firing. *J Neurophysiol* **24**, 243-259.

Kanner AM, Balabanov A (2002). Depression and epilepsy: how closely related are they? *Neurology* **58**, S27-39.

Karg K, Burmeister M, Shedden K, Sen S (2011). The serotonin transporter promoter variant (5-HTTLPR), stress, and depression meta-analysis revisited: evidence of genetic moderation. *Arch Gen Psychiatry* **68**, 444-454.

Kasper S, Meshkat D, Kutzelnigg A (2011). Improvement of the noradrenergic symptom cluster following treatment with milnacipran. *Neuropsychiatr Dis Treat* **7**, 21-27.

Katz NS, Guiard BP, El Mansari M, Blier P (2010). Effects of acute and sustained administration of the catecholamine reuptake inhibitor nomifensine on the firing activity of monoaminergic neurons. *J Psychopharmacol* **24**, 1223-1235.

Kawahara Y, Kawahara H, Kaneko F, Tanaka M (2007). Long-term administration of citalopram reduces basal and stress-induced extracellular noradrenaline levels in rat brain. *Psychopharmacology (Berl)* **194**, 73-81.

Kennedy SH, Evans KR, Kruger S, Mayberg HS, Meyer JH, McCann S, Arifuzzman AI, Houle S, Vaccarino FJ (2001). Changes in regional brain glucose metabolism measured with positron emission tomography after paroxetine treatment of major depression. *Am J Psychiatry* **158**, 899-905.

Kilbourn MR, Sherman PS, Pisani T (1992). Repeated reserpine administration reduces in vivo [¹⁸F]GBR 13119 binding to the dopamine uptake site. *Eur J Pharmacol* **216**, 109-112.

Kiyohara C, Yoshimasu K (2010). Association between major depressive disorder and a functional polymorphism of the 5-hydroxytryptamine (serotonin) transporter gene: a meta-analysis. *Psychiatr Genet* **20**, 49-58.

Klimek V, Schenck JE, Han H, Stockmeier CA, Ordway GA (2002). Dopaminergic abnormalities in amygdaloid nuclei in major depression: a postmortem study. *Biol Psychiatry* **52**, 740-748.

Klimek V, Stockmeier C, Overholser J, Meltzer HY, Kalka S, Dilley G, Ordway GA (1997). Reduced levels of norepinephrine transporters in the locus coeruleus in major depression. *J Neurosci* **17**, 8451-8458.

Klinkenberg S, Majoie HJ, van der Heijden MM, Rijkers K, Leenen L, Aldenkamp AP (2011). Vagus nerve stimulation has a positive effect on mood in patients with refractory epilepsy. *Clin Neurol Neurosurg*.

Koch S, Perry KW, Nelson DL, Conway RG, Threlkeld PG, Bymaster FP (2002). R-fluoxetine increases extracellular DA, NE, as well as 5-HT in rat prefrontal cortex and hypothalamus: an in vivo microdialysis and receptor binding study. *Neuropsychopharmacology* **27**, 949-959.

Kosel M, Brockmann H, Frick C, Zobel A, Schlaepfer TE (2011). Chronic vagus nerve stimulation for treatment-resistant depression increases regional cerebral blood flow in the dorsolateral prefrontal cortex. *Psychiatry Res* **191**, 153-159.

Krahl SE, Clark KB, Smith DC, Browning RA (1998). Locus coeruleus lesions suppress the seizure-attenuating effects of vagus nerve stimulation. *Epilepsia* **39**, 709-714.

Krahl SE, Senanayake SS, Handforth A (2001). Destruction of peripheral C-fibers does not alter subsequent vagus nerve stimulation-induced seizure suppression in rats. *Epilepsia* **42**, 586-589.

Krahl SE, Senanayake SS, Pekary AE, Sattin A (2004). Vagus nerve stimulation (VNS) is effective in a rat model of antidepressant action. *J Psychiatr Res* **38**, 237-240.

Kreiss DS, Lucki I (1995). Effects of acute and repeated administration of antidepressant drugs on extracellular levels of 5-hydroxytryptamine measured in vivo. *J Pharmacol Exp Ther* **274**, 866-876.

Kulhara P, Avasthi A (2003). Influence of depressive symptoms and premorbid adjustment on factor structure of phenomenology of schizophrenia: a study from India. *Eur Psychiatry* **18**, 226-232.

L'Heureux R, Dennis T, Curet O, Scatton B (1986). Measurement of endogenous noradrenaline release in the rat cerebral cortex in vivo by transcortical dialysis: effects of drugs affecting noradrenergic transmission. *J Neurochem* **46**, 1794-1801.

Labiner DM, Ahern GL (2007). Vagus nerve stimulation therapy in depression and epilepsy: therapeutic parameter settings. *Acta Neurol Scand* **115**, 23-33.

Lambert G, Johansson M, Agren H, Friberg P (2000). Reduced brain norepinephrine and dopamine release in treatment-refractory depressive illness: evidence in support of the catecholamine hypothesis of mood disorders. *Arch Gen Psychiatry* **57**, 787-793.

Lanska DJ (2002). J.L. Corning and vagal nerve stimulation for seizures in the 1880s. *Neurology* **58**, 452-459.

Lapin IP, Oxenkrug GF (1969). Intensification of the central serotonergic processes as a possible determinant of the thymoleptic effect. *Lancet* **1**, 132-136.

Le Poul E, Laaris N, Doucet E, Laporte AM, Hamon M, Lanfumey L (1995). Early desensitization of somato-dendritic 5-HT_{1A} autoreceptors in rats treated with fluoxetine or paroxetine. *Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol* **352**, 141-148.

Lee CM, Javitch JA, Snyder SH (1983). Recognition sites for norepinephrine uptake: regulation by neurotransmitter. *Science* **220**, 626-629.

Léger L, Descarries L (1978). Serotonin nerve terminals in the locus coeruleus of adult rat: a radioautographic study. *Brain Res* **145**, 1-13.

Lejeune F, Millan MJ (1998). Induction of burst firing in ventral tegmental area dopaminergic neurons by activation of serotonin (5-HT)_{1A} receptors: WAY 100,635-reversible actions of the highly selective ligands, flesinoxan and S 15535. *Synapse* **30**, 172-180.

Lemonde S, Turecki G, Bakish D, Du L, Hrdina PD, Bown CD, Sequeira A, Kushwaha N, Morris SJ, Basak A, Ou XM, Albert PR (2003). Impaired repression at a 5-hydroxytryptamine 1A receptor gene polymorphism associated with major depression and suicide. *J Neurosci* **23**, 8788-8799.

Lesch KP, Bengel D, Heils A, Sabol SZ, Greenberg BD, Petri S, Benjamin J, Muller CR, Hamer DH, Murphy DL (1996). Association of anxiety-related traits with a polymorphism in the serotonin transporter gene regulatory region. *Science* **274**, 1527-1531.

Leuner B, Gould E (2010). Structural plasticity and hippocampal function. *Annu Rev Psychol* **61**, 111-140, C111-113.

Levitt P, Rakic P, Goldman-Rakic P (1984). Region-specific distribution of catecholamine afferents in primate cerebral cortex: a fluorescence histochemical analysis. *J Comp Neurol* **227**, 23-36.

Logue MP, Growdon JH, Coviella IL, Wurtman RJ (1985). Differential effects of DSP-4 administration on regional brain norepinephrine turnover in rats. *Life Sci* **37**, 403-409.

Lomarev M, Denslow S, Nahas Z, Chae JH, George MS, Bohning DE (2002). Vagus nerve stimulation (VNS) synchronized BOLD fMRI suggests that VNS in depressed adults has frequency/dose dependent effects. *J Psychiatr Res* **36**, 219-227.

Louis C, Cohen C, Depoortere R, Griebel G (2006). Antidepressant-like effects of the corticotropin-releasing factor 1 receptor antagonist, SSR125543, and the vasopressin 1b receptor antagonist, SSR149415, in a DRL-72 s schedule in the rat. *Neuropsychopharmacology* **31**, 2180-2187.

Lucas G, Rymar VV, Du J, Mnie-Filali O, Bisgaard C, Manta S, Lambas-Senas L, Wiborg O, Haddjeri N, Pineyro G, Sadikot AF, Debonnel G (2007). Serotonin(4) (5-HT(4)) receptor agonists are putative antidepressants with a rapid onset of action. *Neuron* **55**, 712-725.

Lucki I (1997). The forced swimming test as a model for core and component behavioral effects of antidepressant drugs. *Behav Pharmacol* **8**, 523-532.

Mansour A, Meador-Woodruff JH, Bunzow JR, Civelli O, Akil H, Watson SJ (1990). Localization of dopamine D2 receptor mRNA and D1 and D2 receptor binding in the rat brain and pituitary: an in situ hybridization-receptor autoradiographic analysis. *J Neurosci* **10**, 2587-2600.

Marangell LB, Rush AJ, George MS, Sackeim HA, Johnson CR, Husain MM, Nahas Z, Lisanby SH (2002). Vagus nerve stimulation (VNS) for major depressive episodes: one year outcomes. *Biol Psychiatry* **51**, 280-287.

Martin-Ruiz R, Ugedo L, Honrubia MA, Mengod G, Artigas F (2001). Control of serotonergic neurons in rat brain by dopaminergic receptors outside the dorsal raphe nucleus. *J Neurochem* **77**, 762-775.

Mateo Y, Fernandez-Pastor B, Meana JJ (2001). Acute and chronic effects of desipramine and clorgyline on alpha(2)-adrenoceptors regulating noradrenergic transmission in the rat brain: a dual-probe microdialysis study. *Br J Pharmacol* **133**, 1362-1370.

Mateo Y, Pineda J, Meana JJ (1998). Somatodendritic alpha2-adrenoceptors in the locus coeruleus are involved in the in vivo modulation of cortical noradrenaline release by the antidepressant desipramine. *J Neurochem* **71**, 790-798.

Mauskop A (2005). Vagus nerve stimulation relieves chronic refractory migraine and cluster headaches. *Cephalalgia* **25**, 82-86.

Mayberg HS, Brannan SK, Tekell JL, Silva JA, Mahurin RK, McGinnis S, Jerabek PA (2000). Regional metabolic effects of fluoxetine in major depression: serial changes and relationship to clinical response. *Biol Psychiatry* **48**, 830-843.

Meana JJ, Barturen F, Garcia-Sevilla JA (1992). Alpha 2-adrenoceptors in the brain of suicide victims: increased receptor density associated with major depression. *Biol Psychiatry* **31**, 471-490.

Meana JJ, Garcia-Sevilla JA (1987). Increased alpha 2-adrenoceptor density in the frontal cortex of depressed suicide victims. *J Neural Transm* **70**, 377-381.

Merrill CA, Jonsson MA, Minthon L, Ejnell H, H CsS, Blennow K, Karlsson M, Nordlund A, Rolstad S, Warkentin S, Ben-Menachem E, Sjogren MJ (2006). Vagus nerve stimulation in patients with Alzheimer's disease: Additional follow-up results of a pilot study through 1 year. *J Clin Psychiatry* **67**, 1171-1178.

Merschdorf U, Berg D, Csoti I, Fornadi F, Merz B, Naumann M, Becker G, Supprian T (2003). Psychopathological symptoms of depression in Parkinson's disease compared to major depression. *Psychopathology* **36**, 221-225.

Meyer JH (2007). Imaging the serotonin transporter during major depressive disorder and antidepressant treatment. *J Psychiatry Neurosci* **32**, 86-102.

Meyer JH, Goulding VS, Wilson AA, Hussey D, Christensen BK, Houle S (2002). Bupropion occupancy of the dopamine transporter is low during clinical treatment. *Psychopharmacology (Berl)* **163**, 102-105.

Meyer JH, Houle S, Sagrati S, Carella A, Hussey DF, Ginovart N, Goulding V, Kennedy J, Wilson AA (2004). Brain serotonin transporter binding potential measured with carbon 11-labeled DASB positron emission tomography: effects of major depressive episodes and severity of dysfunctional attitudes. *Arch Gen Psychiatry* **61**, 1271-1279.

Meyer JH, Kruger S, Wilson AA, Christensen BK, Goulding VS, Schaffer A, Minifie C, Houle S, Hussey D, Kennedy SH (2001). Lower dopamine transporter binding potential in striatum during depression. *Neuroreport* **12**, 4121-4125.

Millan MJ (2004). The role of monoamines in the actions of established and "novel" antidepressant agents: a critical review. *Eur J Pharmacol* **500**, 371-384.

Miller HL, Delgado PL, Salomon RM, Berman R, Krystal JH, Heninger GR, Charney DS (1996). Clinical and biochemical effects of catecholamine depletion on antidepressant-induced remission of depression. *Arch Gen Psychiatry* **53**, 117-128.

Missale C, Nash SR, Robinson SW, Jaber M, Caron MG (1998). Dopamine receptors: from structure to function. *Physiol Rev* **78**, 189-225.

Mitani H, Shirayama Y, Yamada T, Kawahara R (2006). Plasma levels of homovanillic acid, 5-hydroxyindoleacetic acid and cortisol, and serotonin turnover in depressed patients. *Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry* **30**, 531-534.

Mnie-Filali O, Faure C, Lambas-Senas L, El Mansari M, Belblidia H, Gondard E, Etievant A, Scarna H, Didier A, Berod A, Blier P, Haddjeri N (2011). Pharmacological blockade of 5-HT(7) receptors as a putative fast acting antidepressant strategy. *Neuropsychopharmacology* **36**, 1275-1288.

Mongeau R, Blier P, de Montigny C (1993). In vivo electrophysiological evidence for tonic activation by endogenous noradrenaline of alpha 2-adrenoceptors on 5-hydroxytryptamine terminals in the rat hippocampus. *Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol* **347**, 266-272.

Mongeau R, De Montigny C, Blier P (1994). Activation of 5-HT3 receptors enhances the electrically evoked release of [3H]noradrenaline in rat brain limbic structures. *Eur J Pharmacol* **256**, 269-279.

Moore RY, Bloom FE (1979). Central catecholamine neuron systems: anatomy and physiology of the norepinephrine and epinephrine systems. *Annu Rev Neurosci* **2**, 113-168.

Morris GL, 3rd, Mueller WM (1999). Long-term treatment with vagus nerve stimulation in patients with refractory epilepsy. The Vagus Nerve Stimulation Study Group E01-E05. *Neurology* **53**, 1731-1735.

Mu Q, Bohning DE, Nahas Z, Walker J, Anderson B, Johnson KA, Denslow S, Lomarev M, Moghadam P, Chae JH, George MS (2004). Acute vagus nerve stimulation using different pulse widths produces varying brain effects. *Biol Psychiatry* **55**, 816-825.

Murray CJ, Lopez AD (1996). Evidence-based health policy--lessons from the Global Burden of Disease Study. *Science* **274**, 740-743.

Nahas Z, Marangell LB, Husain MM, Rush AJ, Sackeim HA, Lisanby SH, Martinez JM, George MS (2005). Two-year outcome of vagus nerve stimulation (VNS) for treatment of major depressive episodes. *J Clin Psychiatry* **66**, 1097-1104.

Nelson JC, Papakostas GI (2009). Atypical antipsychotic augmentation in major depressive disorder: a meta-analysis of placebo-controlled randomized trials. *Am J Psychiatry* **166**, 980-991.

Nemeroff CB (2007). Prevalence and management of treatment-resistant depression. *J Clin Psychiatry* **68 Suppl 8**, 17-25.

Nemeroff CB, Compton MT, Berger J (2001). The depressed suicidal patient. Assessment and treatment. *Ann N Y Acad Sci* **932**, 1-23.

Nemeroff CB, Widerlov E, Bissette G, Walleus H, Karlsson I, Eklund K, Kilts CD, Loosen PT, Vale W (1984). Elevated concentrations of CSF corticotropin-releasing factor-like immunoreactivity in depressed patients. *Science* **226**, 1342-1344.

Nibuya M, Morinobu S, Duman RS (1995). Regulation of BDNF and trkB mRNA in rat brain by chronic electroconvulsive seizure and antidepressant drug treatments. *J Neurosci* **15**, 7539-7547.

Nibuya M, Nestler EJ, Duman RS (1996). Chronic antidepressant administration increases the expression of cAMP response element binding protein (CREB) in rat hippocampus. *J Neurosci* **16**, 2365-2372.

Nishizawa S, Benkelfat C, Young SN, Leyton M, Mzengeza S, de Montigny C, Blier P, Diksic M (1997). Differences between males and females in rates of serotonin synthesis in human brain. *Proc Natl Acad Sci U S A* **94**, 5308-5313.

Nutt D, Demyttenaere K, Janka Z, Aarre T, Bourin M, Canonico PL, Carrasco JL, Stahl S (2007). The other face of depression, reduced positive affect: the role of catecholamines in causation and cure. *J Psychopharmacol* **21**, 461-471.

O'Keane V, Dinan TG, Scott L, Corcoran C (2005). Changes in hypothalamic-pituitary-adrenal axis measures after vagus nerve stimulation therapy in chronic depression. *Biol Psychiatry* **58**, 963-968.

Ordway GA, Schenk J, Stockmeier CA, May W, Klimek V (2003). Elevated agonist binding to alpha2-adrenoceptors in the locus coeruleus in major depression. *Biol Psychiatry* **53**, 315-323.

Ordway GA, Widdowson PS, Smith KS, Halaris A (1994). Agonist binding to alpha 2-adrenoceptors is elevated in the locus coeruleus from victims of suicide. *J Neurochem* **63**, 617-624.

Ornstein K, Milon H, McRae-Degueurce A, Alvarez C, Berger B, Wurzner HP (1987). Biochemical and radioautographic evidence for dopaminergic afferents of the locus coeruleus originating in the ventral tegmental area. *J Neural Transm* **70**, 183-191.

Ostroff RB, Nelson JC (1999). Risperidone augmentation of selective serotonin reuptake inhibitors in major depression. *J Clin Psychiatry* **60**, 256-259.

Owens MJ (1996). Molecular and cellular mechanisms of antidepressant drugs. *Depress Anxiety* **4**, 153-159.

Pardo JV, Sheikh SA, Kuskowski MA, Surerus-Johnson C, Hagen MC, Lee JT, Rittberg BR, Adson DE (2007). Weight loss during chronic, cervical vagus nerve stimulation in depressed patients with obesity: an observation. *Int J Obes (Lond)* **31**, 1756-1759.

Parini S, Renoldi G, Battaglia A, Invernizzi RW (2005). Chronic reboxetine desensitizes terminal but not somatodendritic alpha2-adrenoceptors controlling noradrenaline release in the rat dorsal hippocampus. *Neuropsychopharmacology* **30**, 1048-1055.

Parsey RV, Ogden RT, Miller JM, Tin A, Hesselgrave N, Goldstein E, Mikhno A, Milak M, Zanderigo F, Sullivan GM, Oquendo MA, Mann JJ (2010). Higher serotonin 1A binding in a second major depression cohort: modeling and reference region considerations. *Biol Psychiatry* **68**, 170-178.

Penry JK, Dean JC (1990). Prevention of intractable partial seizures by intermittent vagal stimulation in humans: preliminary results. *Epilepsia* **31 Suppl 2**, S40-43.

Perera TD, Coplan JD, Lisanby SH, Lipira CM, Arif M, Carpio C, Spitzer G, Santarelli L, Scharf B, Hen R, Rosoklija G, Sackeim HA, Dwork AJ (2007). Antidepressant-induced neurogenesis in the hippocampus of adult nonhuman primates. *J Neurosci* **27**, 4894-4901.

Perona MT, Waters S, Hall FS, Sora I, Lesch KP, Murphy DL, Caron M, Uhl GR (2008). Animal models of depression in dopamine, serotonin, and norepinephrine transporter knockout mice: prominent effects of dopamine transporter deletions. *Behav Pharmacol* **19**, 566-574.

Piercey MF, Smith MW, Lum-Ragan JT (1994). Excitation of noradrenergic cell firing by 5-hydroxytryptamine_{1A} agonists correlates with dopamine antagonist properties. *J Pharmacol Exp Ther* **268**, 1297-1303.

Pineyro G, Blier P (1999). Autoregulation of serotonin neurons: role in antidepressant drug action. *Pharmacol Rev* **51**, 533-591.

Plotsky PM, Owens MJ, Nemeroff CB (1998). Psychoneuroendocrinology of depression. Hypothalamic-pituitary-adrenal axis. *Psychiatr Clin North Am* **21**, 293-307.

Post RM, Ketter TA, Denicoff K, Pazzaglia PJ, Leverich GS, Marangell LB, Callahan AM, George MS, Frye MA (1996). The place of anticonvulsant therapy in bipolar illness. *Psychopharmacology (Berl)* **128**, 115-129.

Prisco S, Pagannone S, Esposito E (1994). Serotonin-dopamine interaction in the rat ventral tegmental area: an electrophysiological study in vivo. *J Pharmacol Exp Ther* **271**, 83-90.

Pudovkina OL, Cremers TI, Westerink BH (2003). Regulation of the release of serotonin in the dorsal raphe nucleus by alpha₁ and alpha₂ adrenoceptors. *Synapse* **50**, 77-82.

Raedt R, Clinckers R, Mollet L, Vonck K, El Tahry R, Wyckhuys T, De Herdt V, Carrette E, Wadman W, Michotte Y, Smolders I, Boon P, Meurs A (2011). Increased hippocampal noradrenaline is a biomarker for efficacy of vagus nerve stimulation in a limbic seizure model. *J Neurochem* **117**, 461-469.

Ranck JB, Jr. (1973). Studies on single neurons in dorsal hippocampal formation and septum in unrestrained rats. I. Behavioral correlates and firing repertoires. *Exp Neurol* **41**, 461-531.

Rea K, Folgering J, Westerink BH, Cremers TI (2010). Alpha₁-adrenoceptors modulate citalopram-induced serotonin release. *Neuropharmacology* **58**, 962-971.

Riad M, Rbah L, Verdurand M, Aznavour N, Zimmer L, Descarries L (2008). Unchanged density of 5-HT_{1A} autoreceptors on the plasma membrane of nucleus raphe dorsalis neurons in rats chronically treated with fluoxetine. *Neuroscience* **151**, 692-700.

Riad M, Watkins KC, Doucet E, Hamon M, Descarries L (2001). Agonist-induced internalization of serotonin-1a receptors in the dorsal raphe nucleus (autoreceptors) but not hippocampus (heteroreceptors). *J Neurosci* **21**, 8378-8386.

Riad M, Zimmer L, Rbah L, Watkins KC, Hamon M, Descarries L (2004). Acute treatment with the antidepressant fluoxetine internalizes 5-HT_{1A} autoreceptors and reduces the in vivo binding of the PET radioligand [¹⁸F]MPPF in the nucleus raphe dorsalis of rat. *J Neurosci* **24**, 5420-5426.

Roosevelt RW, Smith DC, Clough RW, Jensen RA, Browning RA (2006). Increased extracellular concentrations of norepinephrine in cortex and hippocampus following vagus nerve stimulation in the rat. *Brain Res* **1119**, 124-132.

Ruf BM, Bhagwagar Z (2009). The 5-HT_{1B} receptor: a novel target for the pathophysiology of depression. *Curr Drug Targets* **10**, 1118-1138.

Rush AJ, George MS, Sackeim HA, Marangell LB, Husain MM, Giller C, Nahas Z, Haines S, Simpson RK, Jr., Goodman R (2000). Vagus nerve stimulation (VNS) for treatment-resistant depressions: a multicenter study. *Biol Psychiatry* **47**, 276-286.

Rush AJ, Marangell LB, Sackeim HA, George MS, Brannan SK, Davis SM, Howland R, Kling MA, Rittberg BR, Burke WJ, Rapaport MH, Zajecka J, Nierenberg AA, Husain MM, Ginsberg D, Cooke RG (2005a). Vagus nerve stimulation for treatment-resistant depression: a randomized, controlled acute phase trial. *Biol Psychiatry* **58**, 347-354.

Rush AJ, Sackeim HA, Marangell LB, George MS, Brannan SK, Davis SM, Lavori P, Howland R, Kling MA, Rittberg B, Carpenter L, Ninan P, Moreno F, Schwartz T, Conway C, Burke M, Barry JJ (2005b). Effects of 12 months of vagus nerve stimulation in treatment-resistant depression: a naturalistic study. *Biol Psychiatry* **58**, 355-363.

Rush AJ, Trivedi MH, Wisniewski SR, Nierenberg AA, Stewart JW, Warden D, Niederehe G, Thase ME, Lavori PW, Lebowitz BD, McGrath PJ, Rosenbaum JF, Sackeim HA, Kupfer DJ, Luther J, Fava M (2006). Acute and longer-term outcomes in depressed outpatients requiring one or several treatment steps: a STAR*D report. *Am J Psychiatry* **163**, 1905-1917.

Rutecki P (1990). Anatomical, physiological, and theoretical basis for the antiepileptic effect of vagus nerve stimulation. *Epilepsia* **31 Suppl 2**, S1-6.

Rutter JJ, Gundlach C, Auerbach SB (1994). Increase in extracellular serotonin produced by uptake inhibitors is enhanced after chronic treatment with fluoxetine. *Neurosci Lett* **171**, 183-186.

Sackeim HA, Brannan SK, Rush AJ, George MS, Marangell LB, Allen J (2007). Durability of antidepressant response to vagus nerve stimulation (VNS). *Int J Neuropsychopharmacol* **10**, 817-826.

Sackeim HA, Prudic J, Devanand DP, Decina P, Kerr B, Malitz S (1990). The impact of medication resistance and continuation pharmacotherapy on relapse following response to electroconvulsive therapy in major depression. *J Clin Psychopharmacol* **10**, 96-104.

Sackeim HA, Rush AJ, George MS, Marangell LB, Husain MM, Nahas Z, Johnson CR, Seidman S, Giller C, Haines S, Simpson RK, Jr., Goodman RR (2001). Vagus nerve stimulation (VNS) for treatment-resistant depression: efficacy, side effects, and predictors of outcome. *Neuropsychopharmacology* **25**, 713-728.

Sanchez-Gonzalez MA, Garcia-Cabezas MA, Rico B, Cavada C (2005). The primate thalamus is a key target for brain dopamine. *J Neurosci* **25**, 6076-6083.

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.

Sargent PA, Kjaer KH, Bench CJ, Rabiner EA, Messa C, Meyer J, Gunn RN, Grasby PM, Cowen PJ (2000). Brain serotonin_{1A} receptor binding measured by positron emission tomography with [¹¹C]WAY-100635: effects of depression and antidepressant treatment. *Arch Gen Psychiatry* **57**, 174-180.

Scates AC, Doraiswamy PM (2000). Reboxetine: a selective norepinephrine reuptake inhibitor for the treatment of depression. *Ann Pharmacother* **34**, 1302-1312.

Schildkraut JJ (1974). Biogenic amines and affective disorders. *Annu Rev Med* **25**, 333-348.

Schildkraut JJ (1965). The catecholamine hypothesis of affective disorders: a review of supporting evidence. *Am J Psychiatry* **122**, 509-522.

Schlaepfer TE, Frick C, Zobel A, Maier W, Heuser I, Bajbouj M, O'Keane V, Corcoran C, Adolfsson R, Trimble M, Rau H, Hoff HJ, Padberg F, Muller-Siecheneder F, Audenaert K, Van den Abbeele D, Stanga Z, Hasdemir M (2008). Vagus nerve stimulation for depression: efficacy and safety in a European study. *Psychol Med* **38**, 651-661.

Schoffelmeer AN, Mulder AH (1983). 3H-noradrenaline release from rat neocortical slices in the absence of extracellular Ca²⁺ and its presynaptic alpha 2-adrenergic modulation. A study on the possible role of cyclic AMP. *Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol* **323**, 188-192.

Seager MA, Huff KD, Barth VN, Phebus LA, Rasmussen K (2004). Fluoxetine administration potentiates the effect of olanzapine on locus coeruleus neuronal activity. *Biol Psychiatry* **55**, 1103-1109.

Sesack SR, Hawrylak VA, Matus C, Guido MA, Levey AI (1998). Dopamine axon varicosities in the prelimbic division of the rat prefrontal cortex exhibit sparse immunoreactivity for the dopamine transporter. *J Neurosci* **18**, 2697-2708.

Shah PJ, Ogilvie AD, Goodwin GM, Ebmeier KP (1997). Clinical and psychometric correlates of dopamine D₂ binding in depression. *Psychol Med* **27**, 1247-1256.

Sheline YI, Gado MH, Kraemer HC (2003). Untreated depression and hippocampal volume loss. *Am J Psychiatry* **160**, 1516-1518.

Shelton RC, Tollefson GD, Tohen M, Stahl S, Gannon KS, Jacobs TG, Buras WR, Bymaster FP, Zhang W, Spencer KA, Feldman PD, Meltzer HY (2001). A novel

augmentation strategy for treating resistant major depression. *Am J Psychiatry* **158**, 131-134.

Sjogren MJ, Hellstrom PT, Jonsson MA, Runnerstam M, Silander HC, Ben-Menachem E (2002). Cognition-enhancing effect of vagus nerve stimulation in patients with Alzheimer's disease: a pilot study. *J Clin Psychiatry* **63**, 972-980.

Smith CB, Garcia-Sevilla JA, Hollingsworth PJ (1981). alpha 2-Adrenoreceptors in rat brain are decreased after long-term tricyclic antidepressant drug treatment. *Brain Res* **210**, 413-418.

Stahl SM (2010). The serotonin-7 receptor as a novel therapeutic target. *J Clin Psychiatry* **71**, 1414-1415.

Stein G, Bernadt M (1993). Lithium augmentation therapy in tricyclic-resistant depression. A controlled trial using lithium in low and normal doses. *Br J Psychiatry* **162**, 634-640.

Steinbusch HW (1981). Distribution of serotonin-immunoreactivity in the central nervous system of the rat-cell bodies and terminals. *Neuroscience* **6**, 557-618.

Stockmeier CA, Shapiro LA, Dilley GE, Kolli TN, Friedman L, Rajkowska G (1998). Increase in serotonin-1A autoreceptors in the midbrain of suicide victims with major depression-postmortem evidence for decreased serotonin activity. *J Neurosci* **18**, 7394-7401.

Sullivan PF, Neale MC, Kendler KS (2000). Genetic epidemiology of major depression: review and meta-analysis. *Am J Psychiatry* **157**, 1552-1562.

Suzuki M, Hurd YL, Sokoloff P, Schwartz JC, Sedvall G (1998). D3 dopamine receptor mRNA is widely expressed in the human brain. *Brain Res* **779**, 58-74.

Svensson TH, Bunney BS, Aghajanian GK (1975). Inhibition of both noradrenergic and serotonergic neurons in brain by the alpha-adrenergic agonist clonidine. *Brain Res* **92**, 291-306.

Swanson LW (1982). The projections of the ventral tegmental area and adjacent regions: a combined fluorescent retrograde tracer and immunofluorescence study in the rat. *Brain Res Bull* **9**, 321-353.

Szabo ST, Blier P (2001a). Effect of the selective noradrenergic reuptake inhibitor reboxetine on the firing activity of noradrenaline and serotonin neurons. *Eur J Neurosci* **13**, 2077-2087.

Szabo ST, Blier P (2002). Effects of serotonin (5-hydroxytryptamine, 5-HT) reuptake inhibition plus 5-HT(2A) receptor antagonism on the firing activity of norepinephrine neurons. *J Pharmacol Exp Ther* **302**, 983-991.

Szabo ST, Blier P (2001b). Functional and pharmacological characterization of the modulatory role of serotonin on the firing activity of locus coeruleus norepinephrine neurons. *Brain Res* **922**, 9-20.

Szabo ST, de Montigny C, Blier P (2000). Progressive attenuation of the firing activity of locus coeruleus noradrenergic neurons by sustained administration of selective serotonin reuptake inhibitors. *Int J Neuropsychopharmacol* **3**, 1-11.

Tanda G, Bassareo V, Di Chiara G (1996a). Mianserin markedly and selectively increases extracellular dopamine in the prefrontal cortex as compared to the nucleus accumbens of the rat. *Psychopharmacology (Berl)* **123**, 127-130.

Tanda G, Frau R, Di Chiara G (1996b). Chronic desipramine and fluoxetine differentially affect extracellular dopamine in the rat prefrontal cortex. *Psychopharmacology (Berl)* **127**, 83-87.

Tandberg E, Larsen JP, Aarsland D, Cummings JL (1996). The occurrence of depression in Parkinson's disease. A community-based study. *Arch Neurol* **53**, 175-179.

Thase ME, Rush AJ (1997). When at first you don't succeed: sequential strategies for antidepressant nonresponders. *J Clin Psychiatry* **58 Suppl 13**, 23-29.

Trivedi MH, Fava M, Wisniewski SR, Thase ME, Quitkin F, Warden D, Ritz L, Nierenberg AA, Lebowitz BD, Biggs MM, Luther JF, Shores-Wilson K, Rush AJ (2006). Medication augmentation after the failure of SSRIs for depression. *N Engl J Med* **354**, 1243-1252.

Trivedi MH, Hollander E, Nutt D, Blier P (2008). Clinical evidence and potential neurobiological underpinnings of unresolved symptoms of depression. *J Clin Psychiatry* **69**, 246-258.

Ungless MA, Magill PJ, Bolam JP (2004). Uniform inhibition of dopamine neurons in the ventral tegmental area by aversive stimuli. *Science* **303**, 2040-2042.

Uthman BM, Wilder BJ, Penry JK, Dean C, Ramsay RE, Reid SA, Hammond EJ, Tarver WB, Wernicke JF (1993). Treatment of epilepsy by stimulation of the vagus nerve. *Neurology* **43**, 1338-1345.

Van Bockstaele EJ, Peoples J, Telegan P (1999). Efferent projections of the nucleus of the solitary tract to peri-locus coeruleus dendrites in rat brain: evidence for a monosynaptic pathway. *J Comp Neurol* **412**, 410-428.

Van der Does AJ (2001). The effects of tryptophan depletion on mood and psychiatric symptoms. *J Affect Disord* **64**, 107-119.

van Praag HM (1982). Serotonin precursors in the treatment of depression. *Adv Biochem Psychopharmacol* **34**, 259-286.

Videbech P, Ravnkilde B (2004). Hippocampal volume and depression: a meta-analysis of MRI studies. *Am J Psychiatry* **161**, 1957-1966.

Wang RY, Aghajanian GK (1978). Collateral inhibition of serotonergic neurones in the rat dorsal raphe nucleus: pharmacological evidence. *Neuropharmacology* **17**, 819-825.

Warner-Schmidt JL, Duman RS (2006). Hippocampal neurogenesis: opposing effects of stress and antidepressant treatment. *Hippocampus* **16**, 239-249.

White FJ, Wang RY (1984). Pharmacological characterization of dopamine autoreceptors in the rat ventral tegmental area: microiontophoretic studies. *J Pharmacol Exp Ther* **231**, 275-280.

Wiegartz P, Seidenberg M, Woodard A, Gidal B, Hermann B (1999). Co-morbid psychiatric disorder in chronic epilepsy: recognition and etiology of depression. *Neurology* **53**, S3-8.

Woodbury DM, Woodbury JW (1990). Effects of vagal stimulation on experimentally induced seizures in rats. *Epilepsia* **31 Suppl 2**, S7-19.

World Health Organization (2008). The global burden of diseases. 2004 Update. *WHO press part 4*, 40-51.

Wu S, Comings DE (1999). A common C-1018G polymorphism in the human 5-HT1A receptor gene. *Psychiatr Genet* **9**, 105-106.

Young SN, Smith SE, Pihl RO, Ervin FR (1985). Tryptophan depletion causes a rapid lowering of mood in normal males. *Psychopharmacology (Berl)* **87**, 173-177.

Zabara J (1992). Inhibition of experimental seizures in canines by repetitive vagal stimulation. *Epilepsia* **33**, 1005-1012.

Zabara J (1985a). Peripheral control of hypersynchronous discharge in epilepsy. *Electroencephalogr Clin Neurophysiol* **61S**, S162.

Zabara J (1985b). Time course of seizure control to brief, repetitive stimuli. *Epilepsia* **26**, 518.

Zanchetti A, Wang SC, Moruzzi G (1952). The effect of vagal afferent stimulation on the EEG pattern of the cat. *Electroencephalogr Clin Neurophysiol* **4**, 357-361.

Zier G, Drobny H, Valenta B, Singer EA (1988). Evidence against a functional link between noradrenaline uptake mechanisms and presynaptic alpha-2 adrenoceptors. *Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol* **337**, 118-121.

Zisook S, Rush AJ, Haight BR, Clines DC, Rockett CB (2006). Use of bupropion in combination with serotonin reuptake inhibitors. *Biol Psychiatry* **59**, 203-210.

Zobel A, Joe A, Freymann N, Clusmann H, Schramm J, Reinhardt M, Biersack HJ, Maier W, Broich K (2005). Changes in regional cerebral blood flow by therapeutic vagus nerve stimulation in depression: an exploratory approach. *Psychiatry Res* **139**, 165-179.

Zobel AW, Nickel T, Kunzel HE, Ackl N, Sonntag A, Ising M, Holsboer F (2000). Effects of the high-affinity corticotropin-releasing hormone receptor 1 antagonist R121919 in major depression: the first 20 patients treated. *J Psychiatr Res* **34**, 171-181.