L'IMPACT DE LA STIMULATION MAGNÉTIQUE TRANSCRÂNIENNE RÉPÉTÉE À HAUTE FRÉQUENCE SUR LE SUBSTRAT MOLÉCULAIRE ET LE COMPORTEMENT DE SOURIS DÉFICITAIRES EN SÉROTONINE

Mémoire

Kéven Binette

Maîtrise en neurobiologie
Maître ès sciences (M. Sc.)

Québec, Canada
© Kéven Binette, 2018

L'IMPACT DE LA STIMULATION MAGNÉTIQUE TRANSCRÂNIENNE RÉPÉTÉE À HAUTE FRÉQUENCE SUR LE SUBSTRAT MOLÉCULAIRE ET LE COMPORTEMENT DE SOURIS DÉFICITAIRES EN SÉROTONINE

Mémoire

Kéven Binette

Sous la direction de :

Shirley Fecteau, directrice de recherche

Jean-Martin Beaulieu, codirecteur de recherche

RÉSUMÉ

La stimulation magnétique transcrânienne répétée (rTMS) est une technique de stimulation cérébrale non invasive qui est largement répandue dans la recherche clinique. Par exemple, l'utilisation de la rTMS à haute fréquence (HF rTMS) dans le traitement de la dépression majeure résistante aux traitements habituels (TRD) est approuvée par Santé Canada et la *Food and Drug Administration* mais ses mécanismes neurobiologiques demeurent en grande partie inconnus. Les laboratoires Jean-Martin Beaulieu et Shirley Fecteau ont observé dans le passé qu'un traitement HF rTMS de 5 jours sur le cortex frontal de souris induisait des modulations épigénétiques dans les niveaux de certaines protéines spécifiques d'une manière similaire à celle des inhibiteurs sélectifs de la recapture de la sérotonine. En ce sens, un protocole utilisant un modèle animal de la TRD a été mis sur pied. Le tryptophane hydroxylase 2 (Tph2) est une enzyme de synthèse de la sérotonine (5-HT) dans le cerveau adulte. Les souris qui expriment une forme mutante de cette enzyme possèdent ~80 % moins de sérotonine, ce qui induit des comportements d'anxiété, de dépression et de compulsivité. Cette mutation a été trouvée dans un groupe de personnes âgées et d'adolescents, les premiers montrant des symptômes liés à la TRD et les derniers montrant des symptômes liés au trouble obsessionnel compulsif (OCD). L'objectif de ce projet était d'évaluer l'impact épigénétique d'un traitement HF rTMS de 5 jours sur l'expression des gènes et du comportement de souris mutées $Tph2^{-/-}$ en comparaison avec un traitement placebo. Au final, aucune différence significative n'a été observée entre le traitement HF rTMS et le placebo en lien avec les comportements d'anxiété et de compulsivité des différents tests suivant un traitement HF rTMS de 5 jours. Malheureusement, la seconde partie de ce projet, l'évaluation de l'expression des gènes suite au traitement HF rTMS, a été reportée en cours de route pour des raisons hors de notre contrôle et puisque l'analyse des résultats ne s'insérait pas dans l'échéancier du projet de maîtrise. Toutefois, l'analyse future de l'expression des gènes pourrait, comme il a été observé dans le passé, montrer des différences significatives au niveau moléculaire même si aucune modification du comportement n'a été observée.

ABSTRACT

Repetitive transcranial magnetic stimulation (rTMS) is a non-invasive brain stimulation technique that is being extensively used in clinical research. For instance, the use of high-frequency (HF) rTMS to treat treatment-resistant major depression (TRD) is approved by Health Canada and the Food and Drug Administration, but its neurobiological mechanisms remains unclear. The laboratories of Jean-Martin Beaulieu and Shirley Fecteau reported in the past that a 5-day HF rTMS regimen applied over the frontal cortex of mice induced epigenetic modulations of specific protein levels in a manner similar to those of selective serotonin reuptake inhibitors. In that sense, a protocol using a mice model that suits the TRD condition was created. Tryptophan hydroxylase 2 (Tph2) is an enzyme which synthesize serotonin (5-HT) in the adult brain. Mice expressing a mutant form of that enzyme results in ~80 % less 5-HT and leads to anxiety, depressive and compulsive behaviors. This mutation has been found in an elder and teenager group, the former showing TRD and the latter showing obsessive compulsive disorder (OCD) symptoms. The main goal of this project was to assess the epigenetic impact of a 5-day HF rTMS regimen on gene expression and behaviors in Tph2 mutant mice as compared to a sham-rTMS regimen. In the end, no significant differences occurred between the rTMS and sham Tph2 mice in both anxiety and compulsivity behaviors following a 5-day HF rTMS regimen. Unfortunately, the second part of this project, the gene expression assessment, was postponed halfway because of the extensive data analysis not inserting itself within the timescale of this master's project and other reasons out of our control. Nevertheless, the future analysis of gene expression might, as observed in the past, show significant differences on the molecular level even if no significant behavior modifications were observed.

TABLE DES MATIÈRES

RÉSUMÉ III
ABSTRACT IV
TABLE DES MATIÈRES V
LISTE DES FIGURES VII
LISTE DES ABRÉVIATIONS X
REMERCIEMENTS XII
1. INTRODUCTION 1
1.1. La stimulation magnétique transcrânienne répétée chez l'humain 1
1.1.1. L'historique de la (r)TMS 1
1.1.2. Le mécanisme d'action de la TMS 2
1.1.3. L'utilisation de la rTMS dans le traitement des troubles psychiatriques 3
1.1.4. Les risques associés à l'utilisation de la rTMS 3
1.1.5. L'approbation des organismes de santé publique dans le traitement du trouble de la dépression majeure 4
1.2. La dépression majeure comme problème de santé publique 4
1.2.1. La dépression majeure résistante aux traitements et le succès de la rTMS 5
1.3. Les effets neurobiologiques de la rTMS 6
1.3.1. La recherche rTMS sur modèle animal 6
1.3.2. Un effet similaire à certaines drogues psychoactives 9
1.3.3. La modulation de l'acétylation des histones H3 et H4 10
1.3.4. Les effets épigénétiques de la HF rTMS 11
1.3.4.1. La diminution du taux de protéine PSD-95 12
1.3.4.2. L'augmentation du taux de protéine CDK5 12
1.3.4.3. L'augmentation des niveaux de récepteurs dopaminergiques D_2 12
1.4. Le rôle de la sérotonine dans la MDD 13
1.4.1. Le tryptophane hydroxylase 2 : son impact sur la sérotonine du SNC et les troubles psychiatriques 14
1.4.2. Mise au point d'un modèle murin avec mutation et effets comportementaux 15
1.5. Hypothèses 17
1.6. Objectifs 18
1.7. Participation de l'étudiant au projet de recherche 18

2. MATÉRIEL ET MÉTHODES 19
2.1. Animaux 19
2.2. Conditions d'hébergement 19
2.3. Volet moléculaire 19
2.3.1. Protocole 19
2.3.2. Euthanasie et dissection 21
2.3.3. Séquençage ARNm 21
2.4. Volet comportemental 22
2.4.1. Protocole 22
2.4.2. Open Field Test 22
2.4.3. Marble Burying Test 22
2.4.4. Dark-Light Emergence Test 23
2.5. Analyses statistiques 23
3. RÉSULTATS 24
3.1. Volet moléculaire 24
3.2. Volet comportemental 24
3.2.1. Un traitement HF rTMS de 5 jours du cortex frontal n'affecte pas de façon significative le comportement des souris Tph2$^{-/-}$ lors du test *Open Field* 24
3.2.2 Un traitement HF rTMS de 5 jours du cortex frontal n'affecte pas significativement le comportement des souris Tph2$^{-/-}$ lors du test *Marble Burying* 27
3.2.3 Un traitement HF rTMS de 5 jours du cortex frontal n'affecte pas significativement le comportement des souris Tph2$^{-/-}$ lors du test *Dark-Light Emergence* 30
4. DISCUSSION 33
5. CONCLUSION 41
BIBLIOGRAPHIE 42

LISTE DES FIGURES

Figure 1. Représentation du mécanisme d'action de la TMS avec le courant électrique initial dans la bobine, la génération du champ magnétique (pointillé rouge) et sa propagation jusqu'au site d'intérêt local où il est retransformé en courant électrique. Copyright Ridding & Rothwell, 2007. L'image a été modifiée pour convenir au format du mémoire. 2

Figure 2. Représentation du FST avec, à gauche, un comportement de mobilité/fuite et à droite, d'immobilité/abandon. Copyright Abeleira et al., 2013. L'image a été modifiée pour convenir au format du mémoire. 7

Figure 3. Représentation schématique du test du labyrinthe en croix surélevé. Copyright samueljohn.de. L'image a été modifiée pour convenir au format du mémoire. 8

Figure 4. Représentation des phénomènes d'acétylation (chromatine moins compacte autour des histones) et de désacétylation (chromatine plus compacte autour des histones). Ac = groupe acétyle. Copyright University of California, San Francisco. L'image a été modifiée pour convenir au format du mémoire. 11

Figure 5. Représentation des différentes étapes menant à la synthèse de la sérotonine. Copyright proteopedia.org. L'image a été modifiée pour convenir au format du mémoire. 14

Figure 6. Représentation du test Open Field dans lequel l'activité locomotrice d'un rongeur est évaluée. Copyright Carolina Institute for Developmental Disabilities. L'image a été modifiée pour convenir au format du mémoire. 16

Figure 7. Représentation du test Marble Burying dans lequel le comportement de compulsivité est évalué. Copyright spectrumnews.org. L'image a été modifiée pour convenir au format du mémoire. 16

Figure 8. Représentation du dispositif utilisé pour le test Dark-Light Emergence. Copyright Navigator Innovation. L'image a été modifiée pour convenir au format du mémoire. 17

Figure 9. Représentation du positionnement de la bobine lors de la stimulation rTMS du cortex frontal des souris pendant l'étude. Copyright Etiévant et al., 2015. 20

Figure 10. Dissection du cortex frontal et du bulbe olfactif de la souris. (**A**) Vue d'ensemble du cerveau intact de la souris. (**B**) Vue des 2 hémisphères séparés et cortex frontal disséqué. 21

Figure 11. L'effet d'un traitement HF rTMS de 5 jours sur le cortex frontal sur le comportement anxieux de souris WT contrôles (Wt_ctrl), stimulées (Wt_tms), Tph2$^{-/-}$ contrôles (Ho_ctrl) et Tph2$^{-/-}$ stimulées (Ho_tms) au OFT. **(A)** Le nombre d'entrées dans la zone centrale. [ANOVA, $F_{traitement/génotype(3,\ 34)} = 1.4$, $P > 0.05$]. **(B)** Le temps passé dans la zone centrale. [ANOVA, $F_{traitement/génotype(3,\ 34)} = 3.8$, $P = 0.0188$]. Temps du test : 30 minutes. Pour tous les tests, des groupes comprenant entre 4-6 souris de chaque sexe ont été utilisés. Les résultats sont affichés par moyennes ± SEM. * = $P < 0.05$. Les ANOVAs ont été générées avec le test de Bonferroni pour corriger les comparaisons multiples entre paires. 25

Figure 12. L'effet d'un traitement HF rTMS de 5 jours sur le cortex frontal sur le comportement locomoteur en cm de souris WT contrôles (Wt_ctrl), stimulées (Wt_tms), Tph2$^{-/-}$ contrôles (Ho_ctrl) et Tph2$^{-/-}$ stimulées (Ho_tms) au OFT. **(A)** La distance parcourue en périphérie. [ANOVA, $F_{traitement/génotype(3,\ 34)} = 0.6825$, $P > 0.05$]. **(B)** La distance parcourue dans la zone centrale. [ANOVA, $F_{traitement/génotype(3,\ 34)} = 1.2$, $P > 0.05$]. **(C)** La distance parcourue totale. [ANOVA, $F_{traitement/génotype(3,\ 34)} = 0.9504$, $P > 0.05$] Temps du test : 30 minutes. Pour tous les tests, des groupes comprenant entre 4-6 souris de chaque sexe ont été utilisés. Les résultats sont affichés par moyennes ± SEM. * = $P < 0.05$. Les ANOVAs ont été générées avec le test de Bonferroni pour corriger les comparaisons multiples entre paires. 25

Figure 13. Représentation des 4 groupes en fonction du sexe lors des paramètres anxiété du OFT. **(A)** Le nombre d'entrées dans la zone centrale. [ANOVA, $F_{traitement/génotype(3,\ 30)} = 1.509$, $P > 0.05$; ANOVA, $F_{sexe(1,30)} = 6.589$, $P = 0.0155$; ANOVA, $F_{sexeXtraitement/génotype(3,30)} = 1.347$, $P > 0.05$]. **(B)** Le temps passé dans la zone centrale. [ANOVA, $F_{traitement/génotype(3,\ 30)} = 3.582$, $P = 0.0252$; ANOVA, $F_{sexe(1,30)} = 2.892$, $P > 0.05$; ANOVA, $F_{sexeXtraitement/génotype(3,30)} = 0.7356$, $P > 0.05$]. Les résultats sont affichés par moyennes ± SEM. Les ANOVAs à deux facteurs ont été générées avec le test de Tukey pour corriger les comparaisons multiples entre paires. 26

Figure 14. Représentation des 4 groupes en fonction du sexe lors des paramètres locomoteurs du OFT. **(A)** La distance parcourue dans la zone centrale. [ANOVA, $F_{traitement/génotype(3, 30)} = 1.294$, $P > 0.05$; ANOVA, $F_{sexe(1,30)} = 5.634$, $P = 0.0242$; ANOVA, $F_{sexeXtraitement/génotype(3,30)} = 1.744$, $P > 0.05$]. **(B)** La distance parcourue totale. [ANOVA, $F_{traitement/génotype(3, 30)} = 1.160$, $P > 0.05$; ANOVA, $F_{sexe(1,30)} = 3.022$, $P > 0.05$; ANOVA, $F_{sexeXtraitement/génotype(3,30)} = 2.127$, $P > 0.05$]. Les résultats sont affichés par moyennes ± SEM. Les ANOVAs à deux facteurs ont été générées avec le test de Tukey pour corriger les comparaisons multiples entre paires. 27

Figure 15. L'effet d'un traitement HF rTMS de 5 jours sur le cortex frontal sur le comportement compulsif de souris WT contrôles (Wt_ctrl), stimulées (Wt_tms), Tph2$^{-/-}$ contrôles (Ho_ctrl) et Tph2$^{-/-}$ stimulées (Ho_tms) au MBT. **(A)** Le temps écoulé avant le premier comportement de creusage. [ANOVA, $F_{traitement/génotype(3, 50)} = 1.3$, $P > 0.05$]. **(B)** Le nombre total de billes enterrées. [ANOVA, $F_{traitement/génotype(3, 50)} = 5.5$, $P = 0.0024$]. Temps du test : 30 minutes. Pour tous les tests, des groupes comprenant entre 6-8 souris de chaque sexe ont été utilisés. Les résultats sont affichés par moyennes ± SEM. *, $P < 0.05$. Les ANOVAs ont été générées avec le test de Bonferroni pour corriger les comparaisons multiples entre paires. 28

Figure 16. **(A)** Le temps écoulé avant le premier comportement de creusage sur des souris sans manipulations. [Test de t non-pairé avec correction de Welch, $P > 0.05$]. **(B)** Le nombre total de billes enterrées sur des souris sans manipulations. [Test de t non-pairé avec correction de Welch, $P = 0.0058$]. Temps du test : 30 minutes. Pour tous les tests, des groupes comprenant entre 4-6 souris de chaque sexe ont été utilisés. Les résultats sont affichés par moyennes ± SEM. **, $P < 0.01$ 29

Figure 17. Représentation des 4 groupes en fonction du sexe lors du MBT. **(A)** Le temps écoulé avant le premier comportement de creusage. [ANOVA, $F_{traitement/génotype(3, 46)} = 1.420$, $P > 0.05$; ANOVA, $F_{sexe(1,46)} = 0.1121$, $P > 0.05$; ANOVA, $F_{sexeXtraitement/génotype(3,46)} = 3.063$, $P = 0.0373$]. **(B)** Le nombre total de billes enterrées. [ANOVA, $F_{traitement/génotype(3, 46)} = 5.312$, $P = 0.0032$; ANOVA, $F_{sexe(1,46)} = 2.502$, $P > 0.05$; ANOVA, $F_{sexeXtraitement/génotype(3,46)} = 0.063$, $P > 0.05$]. Les résultats sont affichés par moyennes ± SEM. Les ANOVAs à deux facteurs ont été générées avec le test de Tukey pour corriger les comparaisons multiples entre paires. 29

Figure 18. L'effet d'un traitement HF rTMS de 5 jours sur le cortex frontal sur le comportement anxieux de souris WT contrôles (Wt_ctrl), stimulées (Wt_tms), Tph2$^{-/-}$ contrôles (Ho_ctrl) et Tph2$^{-/-}$ stimulées (Ho_tms) au MBT. **(A)** Temps requis avant le premier passage vers la zone éclairée. [ANOVA, $F_{traitement(3, 44)} = 3.6$, $P = 0.0204$]. **(B)** Distance parcourue dans la zone éclairée. [ANOVA, $F_{traitement(3, 44)} = 3.2$, $P = 0.0326$]. **(C)** Nombre d'entrées dans la zone éclairée. [ANOVA, $F_{traitement(3, 44)} = 0.79$, $P > 0.05$]. **(D)** Temps passé dans la zone éclairée. [ANOVA, $F_{traitement(3, 44)} = 3.5$, $P = 0.0237$]. Temps du test : 5 minutes. Pour tous les tests, des groupes comprenant entre 4-8 souris de chaque sexe ont été utilisés. Les résultats sont affichés par moyennes ± SEM. *, $P < 0.05$. Les ANOVAs ont été générées avec le test de Bonferroni pour corriger les comparaisons multiples entre paires. 30

Figure 19. **(A)** Temps requis avant le premier passage vers la zone éclairée sans manipulations. [Test de t non-pairé avec correction de Welch, $P > 0.05$]. **(B)** Distance parcourue dans la zone éclairée sans manipulations. [Test de t non-pairé avec correction de Welch, $P > 0.05$]. **(C)** Nombre d'entrées dans la zone éclairée sans manipulations. [Test de t non-pairé avec correction de Welch, $P > 0.05$]. **(D)** Temps passé dans la zone éclairée sans manipulations. [Test de t non-pairé avec correction de Welch, $P > 0.05$]. Temps du test : 5 minutes. Pour tous les tests, des groupes comprenant entre 4-6 souris de chaque sexe ont été utilisés. Les résultats sont affichés par moyennes ± SEM. 31

Figure 20. Représentation des 4 groupes en fonction du sexe lors du DLET. **(A)** Temps requis avant le premier passage vers la zone éclairée. [ANOVA, $F_{traitement/génotype(3, 40)} = 3.354$, $P = 0.0282$; ANOVA, $F_{sexe(1,40)} = 0.5785$, $P > 0.05$; ANOVA, $F_{sexeXtraitement/génotype(3,40)} = 0.0685$, $P > 0.05$]. **(B)** Distance parcourue dans la zone éclairée. [ANOVA, $F_{traitement/génotype(3, 40)} = 2.916$, $P = 0.0458$; ANOVA, $F_{sexe(1,40)} = 2.104$, $P > 0.05$; ANOVA, $F_{sexeXtraitement/génotype(3,40)} = 0.2188$, $P > 0.05$]. **(C)** Nombre d'entrées dans la zone éclairée. [ANOVA, $F_{traitement/génotype(3, 40)} = 0.6541$, $P > 0.05$; ANOVA, $F_{sexe(1,40)} = 2.389$, $P > 0.05$; ANOVA, $F_{sexeXtraitement/génotype(3,40)} = 0.2414$, $P > 0.05$]. **(D)** Temps passé dans la zone éclairée. [ANOVA, $F_{traitement/génotype(3, 40)} = 3.241$, $P = 0.0320$; ANOVA, $F_{sexe(1,40)} = 1.612$, $P > 0.05$; ANOVA, $F_{sexeXtraitement/génotype(3,40)} = 0.2722$, $P > 0.05$]. Les

résultats sont affichés par moyennes ± SEM. Les ANOVAs à deux facteurs ont été générées avec le test de Tukey pour corriger les comparaisons multiples entre paires. 32

LISTE DES ABRÉVIATIONS

5-HT :	*Serotonin* / Sérotonine
5-HTT :	*Serotonin transporters* / Transporteurs de la sérotonine
ADN :	Acide désoxyribonucléique
ARNm :	Acide ribonucléique messager
AVC :	Accident vasculaire cérébral
CDK5 :	*Cyclin-dependant kinase 5*
D_2R :	*Dopamine receptors* D_2 / Récepteurs de la dopamine D_2
DLPFC :	*Dorsolateral prefrontal cortex* / Cortex préfrontal dorsolatéral
DLET :	*Dark-light emergence test*
ECT :	*Electroconvulsive therapy* / Électroconvulsivothérapie
EPM :	*Elevated plus maze* / Labyrinthe en croix surélevé
FDA :	*Food and Drug Administration*
FST :	*Forced swim test* / Test de nage forcé
GFAP :	*Glial fibrillary acidic protein* / Protéine acide fibrillaire gliale
HAT :	*Histone acetyltransferase* / Histone acétyltransférase
HDAC :	*Histone deacetylase* / Histone désacétylase
HDACi :	*Histone deacetylase inhibitor* / Inhibiteur de la désacétylation des histones
HF rTMS :	*High frequency repetitive transcranial magnetic stimulation* / Stimulation magnétique transcrânienne répétée à haute fréquence
LTD :	*Long-term depression* / Dépression à long terme
LTP :	*Long-term potentialisation* / Potentialisation à long terme
MBT :	*Marble burying test*
MDD :	*Major depressive disorder* / Dépression majeure
NMDAr :	*N-methyl D-aspartate receptors* / récepteurs acide N-méthyl-D-aspartique
OCD :	*Obsessive-compulsive disorder* / Trouble obsessionnel compulsif
OFT :	*Open field test*
PSD-95 :	*Postsynaptic density protein 95*
PTSD :	*Posttraumatic stress disorder* / Trouble de stress post-traumatique
rTMS :	*repetitive Transcranial magnetic stimulation* / Stimulation magnétique transcrânienne répétée
SNC :	Système nerveux central
SNP :	Système nerveux périphérique

ISRS : *Selective serotonin reuptake inhibitor* / Inhibiteurs sélectifs du recaptage de la sérotonine

TMS : *Transcranial magnetic stimulation* / Stimulation magnétique transcrânienne

Tph1 : *Tryptophan hydroxylase 1*

Tph2 : *Tryptophan hydroxylase 2*

TRD : *Treatment-resistant depression* / Dépression majeure résistante aux traitements habituels

WT : *Wild type* / Type naturel

REMERCIEMENTS

J’aimerais remercier tout d’abord mon co-directeur Martin Beaulieu et ma co-directrice Shirley Fecteau de m’avoir recruté dans leur labo et de ce fait avoir eu l’opportunité d’effectuer ma première expérience de longue durée en recherche!

Je remercie aussi la *familia* pour leur indéfectible appui : Mom, Jean, Alexia, P’pa, Sylvie et Isaac ‘Le Gremlin’.

Merci à Richard Dawkins et Sam Harris, jamais personne n’a eu un aussi grand impact sur la manière dont je fais sens (ou non-sens) du monde qui m’entoure.

Merci aussi *aux boys* de Sherbrooke d’être là, on ne se voit plus autant qu’avant, mais j’apprécie à chaque fois nos retrouvailles!

Merci à Antoine, *my man*, la personne avec qui j’ai les discussions les plus intéressantes!

Merci à Marie ---B’BÉ---, qui mange toujours tous mes chocolats et future enseignante extraordinaire! Love you!

1. INTRODUCTION

1.1. La stimulation magnétique transcrânienne répétée chez l'humain

La stimulation magnétique transcrânienne répétée (rTMS) est une méthode de plus en plus utilisée comme traitement non invasif d'un nombre sans cesse grandissant de conditions différentes (Lefaucheur, 2014). Bien que comparativement à la psychopharmacologie, la psychothérapie et à l'électroconvulsivothérapie (ECT) elle n'en soit qu'à ses balbutiements, la rTMS est devenue un traitement efficace reconnu pour la dépression majeure réfractaire aux traitements. Avec une stimulation relativement focalisée et une calibration des paramètres adéquats, la rTMS a prouvé être un outil capable d'avoir un impact sur les substrats neuronaux et le comportement des patients.

Bien qu'en quelques décennies seulement, les connaissances reliées aux différents effets neurobiologiques et comportementaux de la rTMS aient avancé à grands pas, son impact sur la mécanique cellulaire et moléculaire du cerveau à long terme demeure pour l'instant peu étudié. Des connaissances plus approfondies à ce sujet permettraient d'améliorer et personnaliser son utilisation clinique en plus d'optimiser de potentielles combinaisons avec certaines thérapies pharmacologiques et psychothérapeutiques.

1.1.1. L'historique de la (r)TMS

Bien que la première tentative d'utiliser la TMS comme outil dans le but d'engendrer des changements comportementaux datent de la fin du 19^{e} siècle (D'Arsonval, 1896), c'est en 1980 que l'ère moderne de la TMS prend son essor avec les efforts d'une équipe anglaise qui, muni d'un dispositif de stimulation non invasif, réussi à provoquer des contractions musculaires chez des sujets humains suite à une stimulation du cortex moteur (Merton et Morton, 1980). Après diverses spéculations avançant que la TMS pouvait avoir un impact sur l'humeur de certains patients, Hofflich observa pour la première fois une amélioration légère des symptômes chez un patient souffrant de dépression majeure suite à un traitement de TMS répétée (rTMS) échelonné sur 10 séances (Hofflich *et al*., 1993). Ces résultats furent rapidement reproduits et confirmés par les études de George *et al*., (1995) et Pascual-Leone *et al*., (1996). Ces découvertes permirent d'ouvrir la porte à l'étude non invasive des fonctions corticales, de l'excitabilité des neurones et ses impacts subséquents sur le comportement chez les patients cliniques atteints de troubles neurologiques et psychiatriques.

1.1.2. Le mécanisme d'action de la TMS

Le mécanisme de la TMS repose sur deux principes électromagnétiques, le théorème d'Ampère et la loi de Faraday (Burt *et al*., 2002; Gaynes *et al*., 2014). Le premier consiste en la génération d'un champ magnétique à l'aide d'un courant électrique alternatif et le second transforme ce même champ magnétique en courant électrique. Le courant électrique alternatif initial est transformé en champ magnétique à l'intérieur d'une bobine métallique (figure 1). Cette dernière est posée à l'endroit désiré du cuir chevelu du patient. Ce champ magnétique, d'une puissance de 1,5-3,0 Tesla et de l'ordre des millisecondes (George et Aston-Jones, 2010) traverse ensuite librement le cuir chevelu et le crâne et induit un courant électrique dans la région du système nerveux localisé en périphérie sous la bobine (Burt *et al*., 2002; Gaynes *et al*., 2014).

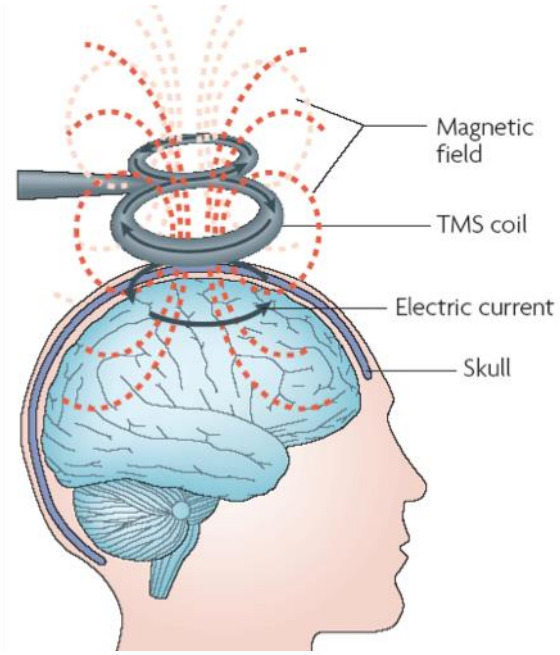


Figure 1. Représentation du mécanisme d'action de la TMS avec le courant électrique initial dans la bobine, la génération du champ magnétique (pointillé rouge) et sa propagation jusqu'au site d'intérêt local où il est retransformé en courant électrique. Copyright Ridding & Rothwell, 2007. L'image a été modifiée pour convenir au format du mémoire.

Ce processus peut être appliqué pour induire une seule pulsation électromagnétique (*single pulse* TMS) comme dans le cas de Merton et Morton en 1980, mais l'utilisation de la TMS comme outil de traitement expérimental et psychiatrique se fait généralement davantage sous forme de stimulation répétée, la rTMS, une technique qui consiste à induire une série de pulsations électromagnétique à intervalle régulier. Les paramètres d'un traitement rTMS comprennent l'intensité de la stimulation, la fréquence de la stimulation, le nombre de séquence, le nombre de pulsations par séquence et

l'intervalle entre chaque séquence. La fréquence de la stimulation varie entre faible (< 1 Hz) et élevée (> 1 Hz), mais est habituellement située entre 5 et 20 Hz. Par le passé, un traitement à faible intensité et à haute intensité était respectivement considéré comme inhibiteur et excitateur, mais de plus en plus, la recherche observe que les caractéristiques neurobiologiques propres à l'individu, la région stimulée et le trouble à traiter ont une influence non négligeable dans les résultats de la stimulation (Gorelick *et al*., 2014).

1.1.3. L'utilisation de la rTMS dans le traitement des troubles psychiatriques

En plus d'être utilisée comme outil de traitement expérimental pour certaines conditions neurologiques telles que la douleur chronique, le rétablissement post-AVC et la maladie de Parkinson (Khedr *et* al., 2005a; Kedhr *et al*., 2005b; Hamada *et al*., 2008), la recherche clinique en psychiatrie utilise la rTMS depuis plus de 20 ans (Rossi *et al*., 2009). Zyss (1992) a été le premier à avancer que la rTMS pouvait être utilisée comme méthode de traitement non invasive en psychiatrie, et depuis ce temps, une multitude de troubles tels l'addiction, le trouble de stress post-traumatique (PTSD) et le trouble obsessionnel compulsif (OCD) ont observé des résultats positifs suivant un traitement rTMS (Cohen *et* al., 2004; Berlim *et al*., 2013; Salling et Martinez, 2016). À ce jour, en lien avec la rTMS, de tous les troubles psychiatriques, c'est la dépression qui a bénéficié du plus de recherches (Dunlop *et al*., 2015). Plusieurs dizaines de recherches à contrôle aléatoire à grande échelle ont confirmé l'impact de la rTMS sur la dépression majeur (MDD) (O'Reardon *et al*., 2007).

1.1.4. Les risques associés à l'utilisation de la rTMS

En général, la rTMS est une technique considérée comme sécuritaire et sans effets secondaires durables dans le temps (George et Aston-Jones, 2010). Comparativement à d'autres traitements comme l'ECT ou la pharmacologie, la rTMS fait bonne figure si l'on prend en compte les effets indésirables et secondaires reliés à son utilisation (O'Reardon *et al*., 2007). Bien que les convulsions soient les effets indésirables les plus sévères associés à la rTMS, jusqu'à maintenant, la prévalence de cette incidence est de 0,1 %, ce qui rend le risque moins important que la prise d'antidépresseurs conventionnels (Rossi *et al*., 2009; George *et al*., 2014). Sinon, une proportion de 10 à 30% des utilisateurs peut présenter des effets secondaires mineurs comme des tics faciaux, des maux de tête ou du tinnitus (Burt *et al*., 2002). Ces effets secondaires sont néanmoins confinés au temps de la stimulation et ne perdurent généralement pas suite au traitement (Gaynes *et al*., 2014). Il est à noter que le risque d'effets secondaires peut être augmenté par certaines combinaisons d'intensité, de fréquence, de durée et d'intervalle (Rossi *et al*., 2009).

1.1.5. L'approbation des organismes de santé publique dans le traitement du trouble de la dépression majeure

Au Canada, le traitement rTMS a été reconnu par Santé Canada en 2002 comme antidépresseur chez les individus souffrant de MDD (Kennedy *et al*., 2009).

En 2007, une étude américaine, australienne et canadienne sur les effets de la rTMS à haute fréquence (HF rTMS) sur le cortex préfrontal dorsolatéral gauche (DLPFC) comme traitement de la MDD permit d'observer des effets antidépresseurs significatifs comparativement au placebo suite à un traitement rTMS de 4 à 6 semaines (O'Reardon, 2007). Un an plus tard, suite à ces résultats positifs et à d'autres études subséquentes (Lisanby *et al*., 2009; George *et al*., 2010), la *Food and Drug Administration* (FDA) donna son approbation au dispositif *Neuronetics NeuroStar TMS Therapy System* comme traitement antidépresseur adéquat aux individus atteint de la MDD. Pour un tel traitement, la recommandation officielle de la FDA s'adresse à une population n'ayant pas répondu à au moins un antidépresseur après un essai d'une durée et d'une dose approprié (Gaynes *et al*., 2014).

1.2. La dépression majeure comme problème de santé publique

La dépression est la condition psychiatrique la plus répandue au monde, elle affecte entre 5 et 15 % de la population mondiale (Kessler *et* al., 2003; Lefaucheur *et al*., 2014). De cette proportion, un pourcentage important ne répond pas aux différentes thérapies conventionnelles offertes (Fava *et al*., 2003; Mayberg *et al*, 2005). En ce sens, depuis 20 ans, le fardeau social et économique relié à la dépression a dramatiquement augmenté, mettant l'emphase sur l'importance de développer de nouveaux traitements efficaces et d'améliorer les connaissances visant à mieux comprendre les mécanismes fondamentaux et les impacts comportementaux que les différents traitements peuvent avoir sur cette condition (Ferrari *et al*., 2013). En effet, les symptômes d'une maladie ne reflètent pas seulement les conséquences de la blessure ou la dysfonction d'un organe, ils reflètent aussi le résultat d'un système nerveux qui tente de s'adapter. Pour l'organisme, ces réponses incluent des changements compensatoires qui peuvent être débilitants et mal adaptés. Conséquemment, avec l'avancement de la recherche, certaines régions du cerveau ont été reconnues comme étant systématiquement associées dans le la dépression et la régulation de l'humeur. Depuis plus d'une vingtaine d'années, la théorie générale sur les causes de la dépression avance que la condition provient d'une dysrégulation des régions ayant un impact dans l'humeur comme le cortex préfrontal et limbique (George *et al*., 1994; Drevets, 2000). Avec les années, la recherche rTMS a appuyée à des maintes reprises cette théorie puisque c'est sur des structures telles le DLPFC et le gyrus

cingulaire que les résultats positifs des traitements rTMS de la dépression ont eu le plus de succès (Fox *et al*., 2012; Lefaucheur *et al*., 2014).

1.2.1. La dépression majeure résistante aux traitements et le succès de la rTMS

La dépression majeure résistante aux traitements habituels (TRD) est une catégorie de la MDD (Dunlop *et al*., 2016). La définition du TRD consiste en une absence de réponse d'un individu atteint de MDD à un ou plusieurs traitements antidépresseurs reconnus comme adéquats (Nemeroff, 2007). En effet, les études sur l'efficacité des antidépresseurs pour traiter la dépression ont observé que le tiers des patients entre en rémission suite au premier traitement antidépresseur et le second tiers après une à trois médications additionnelles (Rush *et al*., 2006). Le dernier tiers qui n'expérimente aucune amélioration est alors classifié comme TRD avec de faibles chances de rémission (10-15 %) lors des traitements suivants (Rush *et al*, 2006). Avec une prévalence de 2 % de la population mondiale et 50 % de rechute après 2 ans suivant des combinaisons de divers traitements comme les antidépresseurs et l'ECT, de nouvelles méthodes de traitements sont activement recherchées (Nemeroff, 2007; Dierckx *et al*., 2012; Rocha *et al*., 2012; Jelovac *et al*., 2013).

L'isolement social, une perception du danger élevée et des comportements de réassurance exagérée font partie des symptômes interpersonnels de la MDD (Challis et Berton, 2015). Un individu vivant avec cette condition attribuera plus facilement à autrui des intentions et des motifs négatifs, anticipera les jugements ou le rejet avec une réaction défensive exagérée ce qui résultera souvent en un retrait de la vie sociale (Challis et Berton; 2015). Les déficits interpersonnels amenés par la MDD peuvent être expliqués en partie par le déséquilibre provenant de certaines anomalies neurobiologiques (George *et al*., 1994). En 1995, une première étude rTMS à stimulation du cortex frontal ayant comme but un effet antidépresseur avait comme hypothèse qu'une stimulation chronique et fréquente initierait une cascade d'évènements qui viendrait rebalancer et normaliser la circuiterie préfrontale et limbique, deux structures jouant un rôle important dans la prévalence de la dépression (George *et al*., 1995). Ces résultats, s'appuyant sur l'imagerie, s'avérèrent concluants. C'est ainsi que la rTMS moderne fut spécifiquement mise au point comme outil thérapeutique basé sur un circuit précis dans le traitement contre la dépression et plus particulièrement la MDD/TRD. En effet, de 1995 à 2012, un total de 29 études à essai randomisé contrôlé à double aveugle avec groupe placebo ont été répertoriées rassemblant 1371 individus souffrant de la MDD/TRD (Berlim *et al*., 2014). La rTMS du DLPFC est la technique ayant eu le plus de succès avec un taux de guérison significativement supérieur au groupe contrôle (Berlim *et al*., 2014).

Le mécanisme proposé pour la rTMS comme traitement de la dépression majeure est centré autour de l'altération de l'excitabilité des différentes structures neuronales jouant un rôle dans la physiopathologie de la dépression (Burt *et al*., 2002). Le mécanisme de la rTMS et son effet antidépresseur n'est pas complètement clair, mais plusieurs observations ont suggéré un mécanisme d'action semblable aux traitements antidépresseurs conventionnels en altérant le niveau d'excitabilité corticale (Bocchio-Chiavetto *et al*., 2008; Funke et Benali, 2011). En ce sens, à titre comparatif, la rTMS est un outil de traitement intéressant à ces alternatives puisqu'elle a le pouvoir d'apporter des bénéfices similaires avec moins d'effets secondaires et/ou est en général mieux tolérée par l'individu que les médicaments antidépresseurs et l'ECT (Pascual-Leone *et al*., 1996; O'Reardon *et al*., 2007).

1.3. Les effets neurobiologiques de la rTMS

La rTMS peut produire différents effets sur le cerveau selon la région stimulée et des différents paramètres du dispositif (p.ex. : fréquence, intensité, nombre de pulsations, durée des intervalles entre les trains de pulsations) (Lefaucheur *et al*., 2014). La rTMS semble posséder un potentiel d'action anatomique relativement localisé. Pour les bobines standards utilisées chez l'humain, l'impulsion magnétique de la TMS parcourt une distance située entre 1 et 2 cm^3 (Speer *et al*., 2000), quoique certains nouveaux modèles en forme de 'H' peuvent atteindre une profondeur de 6 cm^3 (Roth *et al*., 2002). Aussi, une étude sur modèle murin qui a stimulé à haute fréquence à l'aide d'une bobine adaptée le cortex frontal de souris pendant 5 séances, a observé des différences dans le niveau de certaines protéines dans le cortex frontal sans apercevoir de changements significatifs dans le striatum, l'hippocampe et cervelet (Etiévant *et al*., 2015). Malgré cette zone d'action en profondeur réduite, grâce à la connectivité entre les différentes régions du cerveau, une stimulation du cortex frontal a le potentiel de communiquer avec des régions plus sous-corticales (Cohen *et* al., 2004; Müller-Dahlhaus et Vlachos, 2013). De plus, la recherche rTMS a observé que la stimulation activait les potentiels d'actions et altérait le niveau d'excitabilité neuronal pendant et après la stimulation (Maeda *et al*., 2000; Ma *et al*., 2013).

1.3.1. La recherche rTMS sur modèle animal

Les recherches sur modèle animal permirent d'observer que la rTMS chronique avait un impact sur le niveau des facteurs neurotrophes, des protéines jouant un rôle dans les troubles de l'humeur et responsables de l'excitabilité, de la croissance, de la survie neuronales (Müller *et al*., 2000; Ma *et al*., 2013) et de plusieurs neurotransmetteurs (glutamate et GABA (Yue *et al*., 2009), dopamine (Erhardt *et al*., 2004) et sérotonine (Lisanby et Belmaker, 2000).

Dans le cas de l'utilisation de la rTMS dans le traitement de la MDD, l'hypothèse initiale suppose qu'une stimulation répétée du DLPFC peut induire une modulation des réseaux neuronaux qui sont impliqués dans cette pathologie puisque le DLPFC est relié de manière synaptique au système limbique impliqué dans la régulation de l'humeur (George *et al*., 1994; Drevets, 2000). Quelques études ont été faites en ce sens afin d'évaluer l'effet de la rTMS sur le comportement de modèle animal de la dépression. Le test de nage forcé (FST) est un test mis au point afin d'évaluer le temps requis avant l'immobilisation de l'animal dans une situation de noyade (Porsolt *et al*., 1978). L'animal utilisé dans ce test montrera, après un temps variable, une posture d'immobilité typique suite à son immersion dans l'eau (figure 2). Ce test est un outil intéressant dans l'évaluation de certains antidépresseurs sur le temps d'immobilisation, puisque ces derniers peuvent diminuer le temps d'immobilisation de l'animal (Porsolt *et al*., 1978). Au moins trois études ont utilisé ce test pour évaluer l'effet antidépresseur de la rTMS sur modèle animal de la dépression et elles ont toutes observé des temps d'immobilisation réduits comparativement au contrôle sans stimulation, c'est-à-dire un effort et un temps de locomotion significativement plus élevé avant que l'animal n'arrête de se débattre, suite à un traitement quotidien à haute fréquence de 7 ou 10 jours (Fleischmann *et al*., 1995; Zyss *et al*., 1997; Zyss *et al*., 1999). De plus, ces effets étaient observés de plus en plus rapidement à mesure que la fréquence de la stimulation augmentait (Zyss *et al*., 1999).

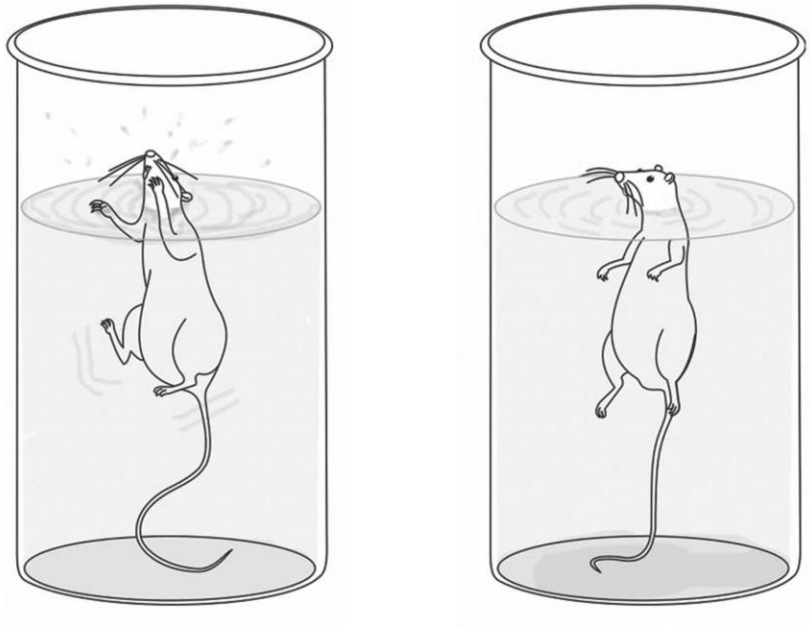


Figure 2. Représentation du FST avec, à gauche, un comportement de mobilité/fuite et à droite, d'immobilité/abandon. Copyright Abeleira *et al*., 2013. L'image a été modifiée pour convenir au format du mémoire.

Dans le cas de l'anxiété, une condition souvent comorbide de la MDD, les effets comportementaux de la rTMS au test du labyrinthe en croix surélevé (EPM) ont été évalués. Ce test consiste à intégrer un animal à un dispositif en forme de croix surélevé dont deux bras sont fermés et les deux autres sont ouverts (figure 4). Le labyrinthe est un évaluateur de l'anxiété de l'animal (Pellow *et al*., 1985) et peut être utilisé lorsque l'impact d'un anxiolytique sur le comportement souhaite être évalué (Pellow et File, 1986). Un animal moins anxieux passera davantage de temps dans les aires ouvertes que le groupe contrôle et plusieurs traitements anxiolytiques ont observé ces mêmes résultats (Cruz *et al*., 1994; Teixeira *et al*., 1996). Une étude a voulu évaluer un possible effet anxiolytique de la rTMS sur modèle animal (Kanno *et al*., 2003). Ces derniers ont observé qu'un traitement quotidien HF rTMS de 3 jours apportait des changements significatifs dans le nombre d'entrées dans les bras ouverts du labyrinthe comparativement au contrôle. De plus, les études moléculaires ont permis d'observer que ce traitement HF rTMS engendrait une suppression de l'augmentation extracellulaire des niveaux de sérotonine (5-HT) dans le cortex préfrontal normalement apporté par le test via une réduction de la sensibilité des autorecepteurs 5-HT_{1A} et 5-HT_{1B} et l'augmentation des niveaux de 5-HT dans la fente synaptique, suggérant fortement un effet anxiolytique de la rTMS relié au système sérotoninergique (Yoshioka *et* al., 1995; Gur *et al*., 2000; Kanno *et al*., 2003). Dans la même veine, une autre étude observa une diminution dans la présence de récepteurs 5-HT_2 dans le cortex frontal suite à un traitement HF rTMS de 10 jours (Ben-Shachar *et al*., 1999).

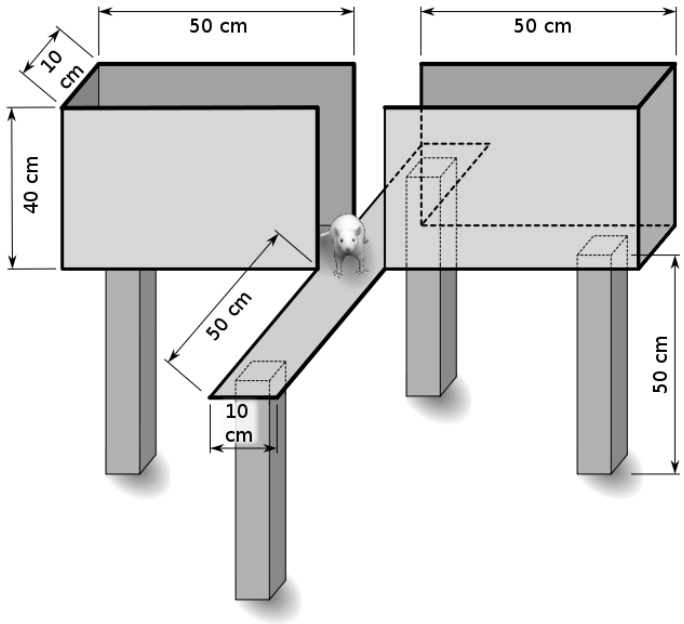


Figure 3. Représentation schématique du test du labyrinthe en croix surélevé. Copyright samueljohn.de. L'image a été modifiée pour convenir au format du mémoire.

Également, les mécanismes d'action sous-jacents de la HF rTMS ne semblent pas activer les processus de neuroinflammation ni de perte neuronale puisqu'un traitement de 5 séances HF rTMS du cortex frontal sur modèle murin n'a pas altéré les niveaux de protéine acide-fibrillaire-gliale (GFAP), une protéine impliquée dans ces deux processus, puisqu'aucune différence dans le niveau de ces protéines n'a été observée comparativement au contrôle (Etiévant *et al*., 2015).

Les modèles animaux ont été d'une importance capitale dans l'observation des effets moléculaires et comportementaux de la rTMS sur le cerveau. Néanmoins, le désavantage majeur de la recherche rTMS sur modèle animal est la sélection spatiale restreinte des structures du cerveau comparativement à l'humain (Kim *et al*., 2006). Pendant longtemps, il était prédit que même la plus petite bobine aurait un champ d'action trop large pour effectuer des recherches sur une structure précise du cerveau, l'efficacité de la rTMS étant drastiquement diminuée dans les cerveaux plus petits (Weissman *et al*., 1992). Encore aujourd'hui, certains avancent que la démonstration d'effets de la rTMS sur modèle animal ne pourra être limitée qu'aux processus globaux régissant les réseaux neuronaux qui apparaissent de manière uniforme dans le cerveau, peu importe l'endroit stimulé (Funke et Benali, 2011). Même si, récemment, des observations du contraire ont été démontrées dans le sens où la stimulation d'une structure spécifique engendrait des effets propres à cette structure sans affecter les autres (Etiévant *et al*., 2015), l'extrapolation de l'effet d'un traitement rTMS sur le cerveau d'un modèle animal et son parallèle appliqué à l'humain doit se faire avec prudence.

1.3.2. Un effet similaire à certaines drogues psychoactives

Une réduction de la sensibilité des autorécepteurs sérotoninergique 5-HT_{1A} et 5-HT_{1B}, qui contrôlent les niveaux de 5-HT du cortex frontal, a été proposé comme étant l'un des effets neurobiologiques des antidépresseurs, spécifiquement les inhibiteurs sélectifs du recaptage de la sérotonine (ISRS) (Blier et de Montigny, 1998). Subséquemment, cette réduction de sensibilité mènerait à une augmentation de la neurotransmission sérotoninergique (Blier et de Montigny, 1998). Gur et collègues (2000) ont observé ce même phénomène de sensibilité réduite des autorécepteurs de la 5-HT dans le cortex frontal de rats suivant un traitement HF rTMS quotidien de 10 jours.

De plus, des traitements comme les ISRS ou certains psychostimulants comme la cocaïne sont connus pour induire des changements épigénétiques dans l'organisation de la chromatine, menant au final à des changements dans l'expression des gènes (Schroeder *et al*., 2008; Melas *et al*., 2012). Il a d'ailleurs été observé que combiné à un traitement ISRS, la rTMS était efficace pour contrer la dépression (Conca *et al*., 1997). Plusieurs études ont suggéré un mécanisme d'action de la rTMS similaire à certains antidépresseurs (Kim *et al*., 2006; Etiévant *et al*., 2015).

L'un de ces mécanismes consiste en la plasticité synaptique. Cette dernière est l'habileté à une synapse de se moduler en fonction de son usage dans le temps et est à la base des processus d'apprentissage et de mémorisation (Pell *et al*., 2011). La plasticité synaptique est présente sous de nombreuses formes, comme la potentialisation et la dépression à long terme (LTD et LTP), les deux processus les plus communément acceptés comme étant les mécanismes d'actions de la rTMS sur le cerveau (Lenz *et al*., 2016). La LTD est la réduction de l'efficacité dans la force d'une synapse dans le temps et au contraire, la LTP est l'augmentation de l'efficacité de la synapse (Hallett, 2007).

1.3.3. La modulation de l'acétylation des histones H3 et H4

Il a été observé qu'un traitement HF rTMS quotidien de 5 jours pouvait moduler l'acétylation des histones H3 et H4 de façon significative comparativement au groupe contrôle (Etiévant *et al*., 2015). Les histones sont des protéines autour desquels l'ADN s'enroule pour former le nucléosome, un constituant majeur de la chromatine (Strahl et Allis, 2000). Ces structures sont grandement conservées dans l'ADN eucaryote puisqu'elles permettent la compaction de l'ADN et jouent un rôle dans le niveau de transcription des gènes (Kornberg et Lorch, 1999). Deux familles d'enzyme coexistent à l'équilibre permettant d'observer les processus d'acétylation : les histones acétyltransférases (HAT) et les histones désacétylase (HDAC) (Luger et Richmond, 1998). La première famille permet le déroulement de la chromatine rendant le brin ADN plus accessible aux facteurs de transcription et ultimement à l'expression de ce gène et la seconde famille, au contraire, compacte davantage la chromatine autour de l'histone, rendant le gène moins accessible aux facteurs de transcription, ce qui diminue l'expression du gène (figure 3) (Etiévant *et al*., 2015).

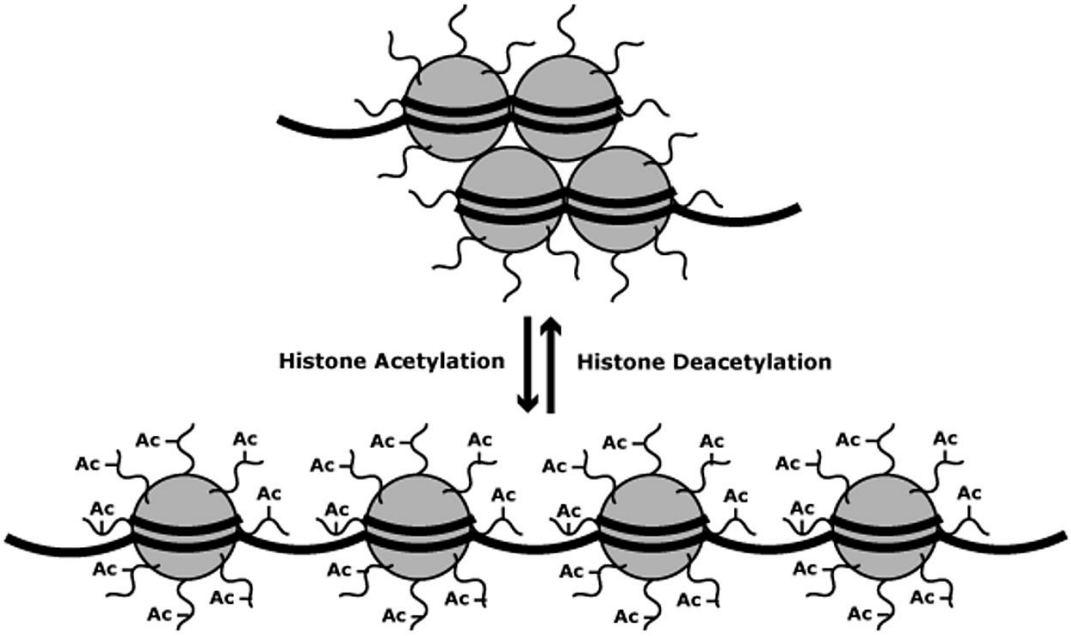


Figure 4. Représentation des phénomènes d'acétylation (chromatine moins compacte autour des histones) et de désacétylation (chromatine plus compacte autour des histones). Ac = groupe acétyle. Copyright University of California, San Francisco. L'image a été modifiée pour convenir au format du mémoire.

1.3.4. Les effets épigénétiques de la HF rTMS

Les origines des troubles psychiatriques sont nombreuses et comprennent souvent une prédisposition génétique et une contribution des facteurs environnementaux (Kendler, 2001; Tsankova *et al*., 2007). Une origine importante dans le trouble de la dépression provient de la répétition de comportements à risques échelonnés sur une longue période, ces derniers pouvant graduellement altérer les processus neurobiologiques tels que le signalement cellulaire et l'expression des gènes. Ce phénomène, mieux connu sous le nom d'épigénétique, joue un rôle central dans l'étiologie des troubles psychiatriques comme la dépression (Tsankova *et al*., 2007). Le mécanisme d'action des antidépresseurs agit sur ces processus, d'où son administration chronique s'échelonnant sur plusieurs mois avant que ses effets soient optimaux et puissent se perpétuer suite à son retrait (Tsankova *et al*., 2007).

Ainsi, dans une optique thérapeutique et de réhabilitation, un intérêt majeur de la rTMS réside dans le potentiel de ses effets à perdurer dans le temps bien après les dernières stimulations. Une étude récente sur modèle murin a observé une modulation du niveau de plusieurs types de protéine suite à un traitement HF rTMS localisé sur le cortex frontal allant jusqu'à 20 jours après la dernière stimulation avec un retour à la normale 60 jours après la dernière stimulation (Etiévant *et al*., 2015).

Ce remodelage continu des fonctions neuronales en réponse aux stimuli externes sur lequel repose l'épigénétique à travers des modifications des connexions interneurales représente l'une des forces adaptatives majeures du système nerveux central. Quelques études ont permis d'observer qu'un traitement HF rTMS de longue durée agissait sur cette plasticité synaptique en modulant des changements transitoires dans la neurotransmission, l'expression des protéines et l'activité des gènes (Baeken *et al*., 2011; Etiévant *et al*., 2015).

1.3.4.1. La diminution du taux de protéine PSD-95

La *Postsynaptic density protein* 95 (PSD-95) est une protéine connue pour être recrutée par les récepteurs N-methyl-D-aspartate (NMDAr), ces derniers jouant un rôle primordial dans la plasticité synaptique et les processus de mémorisation (Tsien *et al*., 2000). PSD-95 est associée à une stimulation répétée de la neurotransmission dopaminergique (Yao *et al*., 2004). Une diminution du niveau de PSD-95 dans le cortex frontal est généralement observée après un traitement pharmacologique de stimulation de la neurotransmission dopaminergique, mais a aussi été observée suite à un traitement HF rTMS de 10 jours (Etiévant *et al*., 2015). La régulation à la baisse de cette protéine chez les modèles animaux montre une excitabilité neuronale augmentée (Yao *et al*., 2004).

1.3.4.2. L'augmentation du taux de protéine CDK5

Le gène CDK5 code pour une kinase sérine/thréonine qui est régulée à la hausse en réponse à divers traitements tels l'ECT et l'administration chronique de stimulants (Chen *et al*., 2000; Bibb *et al*., 2001). Spécifiquement, la *Cyclin-dependent kinase* 5 (CDK5) est une protéine sous forme d'enzyme qui joue un rôle dans la migration neuronale et la plasticité synaptique (Xei *et* al., 2003; Lai et Ip, 2009). Une augmentation du niveau de CDK5 dans le cortex frontal est généralement observée après un traitement pharmacologique de stimulation de la neurotransmission dopaminergique, mais a aussi été observée suite à un traitement HF rTMS de 10 jours (Etiévant *et al*., 2015).

1.3.4.3. L'augmentation des niveaux de récepteurs dopaminergiques D_2

PSD-95 et CDK5 peuvent être régulées lors de la stimulation de la neurotransmission dopaminergique (Bibb *et al*., 2001; Yao *et al*., 2004). Pour vérifier si c'était réellement le cas pour la rTMS, la même étude à évaluer si un traitement rTMS avait un impact sur le niveau de récepteur de la dopamine D_2 (D_2R) (Etiévant *et al*., 2015). Ils ont en effet noté une augmentation de ces récepteurs

suite au traitement rTMS. Afin de s'assurer que la régulation de ces protéines était entièrement dépendante de la dopamine, ils ont effectué les mêmes manipulations sur des souris mutantes déficitaires en D_2R. Plus aucune différence dans les niveaux de PSD-95 et CDK5 n'était perceptible chez ces souris, indiquant que les changements provoqués par la rTMS chez ces deux protéines étaient dépendants de D_2R.

Une augmentation dans la stimulation de D_2R peut être associée à des changements épigénétiques de la réorganisation de la chromatine à travers le processus de l'acétylation des histones (Li *et al*., 2004). Pour vérifier si le mécanisme d'action de la HF rTMS était dépendant de ce processus, des souris ont été injectées à un inhibiteur de la désacétylase des histones (HDACi) pendant un traitement HF rTMS quotidien de 10 jours. Ces dernières ne montrèrent plus aucun changement dans les niveaux de protéines autrement affectées (PSD-95 et CDK5), confirmant l'importance de la désacétylation dans les modifications épigénétiques apportées par la HF rTMS (Etiévant *et al*., 2015).

Ultimement, les connaissances acquises par les études sur modèle animal pourraient être traduites en pratique clinique afin d'optimiser le traitement rTMS dans le but visé, que ce soit pour détecter, induire ou moduler certaines formes de plasticité neuronale ou bien en combinant la rTMS avec d'autres outils thérapeutiques pour en maximiser le potentiel. Ainsi, l'utilité de la rTMS dans le traitement de la MDD pourrait être optimisée si l'on identifiait les prédicateurs moléculaires efficaces.

1.4. Le rôle de la sérotonine dans la MDD

Dans le système nerveux central, la 5-HT occupe principalement un rôle de neurotransmetteur inhibiteur (Owens et Nemeroff, 1994). L'acide aminé précurseur de la 5-HT, le tryptophane, est transporté du sang jusqu'au cerveau, est sélectionné par les terminaux nerveux sérotoninergiques et convertis en 5-hydroxytryptophane (5-HTP) par la tryptophane hydroxylase. Le 5-HTP est ensuite rapidement converti en 5-HT par une décarboxylase (figure 5) (Owens et Nemeroff, 1994).

Chez les mammifères, la neurotransmission sérotoninergique régule une vaste gamme de procédés comportementaux y compris la cognition (Mann, 1999; Bonasera et Tecott, 2000). Une théorie généralement reconnue de la MDD indique qu'un dérèglement du système sérotoninergique est une composante importante dans la prévalence de la pathologie (Mann, 1999). En effet, une diminution de la production de 5-HT ou de ses récepteurs a été associée à la dépression ainsi qu'à plusieurs autres conditions comorbides comme les désordres anxieux et le trouble obsessionnel compulsif (Mann, 1999). Plus précisément dans le cas de la MDD, l'impact principal qu'a la 5-HT sur le

comportement social des individus est probablement dû à son effet sur le cortex frontal, une zone où les axones sérotoninergiques et les récepteurs 5-HT sont nombreux (Challis et Berton, 2015).

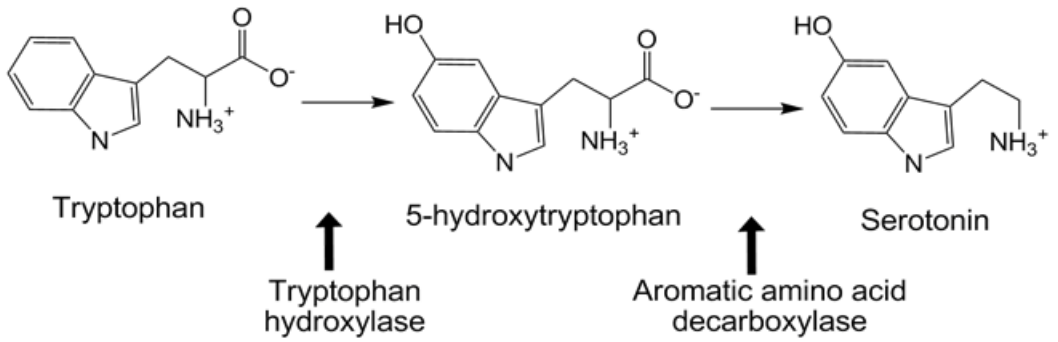


Figure 5. Représentation des différentes étapes menant à la synthèse de la sérotonine. Copyright proteopedia.org. L'image a été modifiée pour convenir au format du mémoire.

1.4.1. Le tryptophane hydroxylase 2 : son impact sur la sérotonine du SNC et les troubles psychiatriques

La 5-HT et la présence de ces récepteurs ont un effet sur la neuroplasticité en ayant la capacité de bloquer ou stimuler la LTP et LTD (Kemp et Manahan-Vaughan, 2005; Normann et Clark, 2005). En ce sens, l'hypothèse sérotoninergique de la MDD représente un substrat de recherche intéressant pour l'approche thérapeutique qui utilise des amplificateurs de la 5-HT pour améliorer les fonctions cognitives et le comportement des patients atteints de ce trouble (Cirillo *et al*., 2016).

Les variantes des gènes contrôlant pour la disponibilité synaptique de la 5-HT, comme l'enzyme de synthèse tryptophane hydroxylase 2 (Tph2) et les transporteurs de la sérotonine (5-HTT) ont été associés à des altérations du comportement (Brown *et al.*, 2005; Verhagen *et al*., 2009). Au contraire du tryptophane hydroxylase 1 (Tph1) qui participe à la synthèse sérotoninergique du système nerveux périphérique (SNP), le Tph2 est davantage spécifique à la synthèse sérotoninergique du SNC (Savelieva *et al*., 2008). Plus particulièrement, une mutation réduisant considérablement la présence de cette enzyme de synthèse a été retrouvée dans une cohorte de personnes âgées souffrant de TRD (Zill *et al*., 2004; Zhang *et al*., 2005) et d'adolescents souffrant d'OCD (Mössner *et al*., 2006).

1.4.2. Mise au point d'un modèle murin avec mutation et effets comportementaux

La modélisation de troubles psychiatriques sur modèle animal pose de nombreux défis, mais permet d'isoler certaines dimensions spécifiques d'une maladie afin d'examiner ses fondements neurobiologiques (Berton et Nestler, 2006).

Avant la découverte du Tph2, malgré un *knockout* du gène codant pour Tph1, à l'époque considérée comme la seule enzyme de synthèse de la 5-HT, il était curieux de constater que les souris avaient un niveau de 5-HT du SNP presque vide, mais ne montraient aucune altération dans le comportement ni dans les niveaux de 5-HT du SNC (Walther *et al*., 2003). Suite à la découverte du Tph2, des souris exprimant une forme mutante de l'enzyme ($Tph2^{-/-}$) furent générées pour évaluer l'impact de l'absence de Tph2 sur le niveau de 5-HT du SNC et sur le comportement. Cette mutation est équivalente à une variante humaine rare identifiée chez certains individus souffrant de TRD (Beaulieu *et al*., 2008). Au niveau moléculaire, les souris $Tph2^{-/-}$ montrent un niveau de 5-HT du SNC 80% inférieur aux souris *wild type* (WT) (Beaulieu *et al*., 2008).

Comme mentionné précédemment, le FST est un test évaluant la dépression par l'observation de comportement de tentative de fuite et d'abandon/immobilité. Une étude observa une différence significative entre les souris $Tph2^{-/-}$ et WT dans le temps de latence menant à l'immobilisation (Mosienko *et al*., 2012). Les souris $Tph2^{-/-}$ cessaient de se débattre plus vite, ce qui peut être interprété comme un phénotype typique de la dépression et supporte la théorie sérotoninergique de la dépression.

Le test *Open Field* (OFT) évalue le niveau d'anxiété de l'animal et a prouvé avec les années être un bon indicateur de la qualité anxiolytique d'un traitement ainsi que de l'activité motrice (Bonasera et Tecott, 2000). Le test consiste à insérer un rongeur dans une pièce carrée ouverte et à enregistrer ses mouvements (figure 6). Le rongeur à une tendance innée à éviter les endroits ouverts et à privilégier la périphérie, ce comportement étant toutefois en conflit avec la nature exploratrice de l'animal (Cryan et Holmes, 2005). L'évaluation du test se base sur le niveau d'activité de l'animal en périphérie et au centre, un modèle passant un temps significativement plus grand en périphérie et/ou ayant un déplacement total moindre étant considéré comme plus anxieux. Trois études ont évalué l'activité motrice totale des souris $Tph2^{-/-}$ comparativement au WT, mais aucune différence significative n'a été observée (Beaulieu *et al*., 2008; Savelieva *et al*., 2008; Mosienko *et al*., 2012).

Le test *Marble Burying* (MBT) permet d'observer les symptômes d'OCD liés à des agents anxiogènes menant à un comportement compulsif réduisant l'anxiété (Cryan et Holmes, 2005). Des billes (l'agent anxiogène) sont ajoutées à la cage du rongeur et la quantité qu'il enterrera (le comportement compulsif) permettra de localiser le rongeur sur l'échelle de l'OCD (figure 7). Ce test est réputé pour avoir la capacité de détecter les effets anxiolytiques/antidépresseurs des traitements, en particulier les ISRS (Nicolas *et al*., 2006). Deux études permirent d'évaluer des souris Tph2$^{-/-}$ au MBT avec comme résultats une propension significativement plus grande à enterrer un plus grand nombre de billes que les WT (Savelieva *et al*., 2008; Jacobsen *et al*., 2012). La mutation Tph2$^{-/-}$ possède donc le potentiel d'être un modèle pertinent d'évaluation de l'anxiété et de l'OCD.



Figure 6. Représentation du test *Open Field* dans lequel l'activité locomotrice d'un rongeur est évaluée. Copyright *Carolina Institute for Developmental Disabilities*. L'image a été modifiée pour convenir au format du mémoire.



Figure 7. Représentation du test *Marble Burying* dans lequel le comportement de compulsivité est évalué. Copyright *spectrumnews.org*. L'image a été modifiée pour convenir au format du mémoire.

Le test *Dark-Light Emergence* (DLET) est similaire à celui d'OFT dans l'évaluation de l'anxiété et de l'activité exploratoire chez les rongeurs. Le modèle est inséré dans une pièce sombre comprenant une entrée vers une zone ouverte et éclairée (figure 8). Comme les rongeurs favorisent naturellement les endroits sombres et fermés, le temps passé dans chacune des deux chambres et le nombre d'entrées dans la zone lumineuse a souvent été utilisé pour l'évaluation de l'efficacité de traitements anxiolytiques (Crawley et Goodwin, 1980 ; Crawley, 1981). Une étude a vérifié l'effet de la mutation $Tph2^{-/-}$ sur le comportement lors du DLET (Beaulieu *et al*., 2008). Comparativement aux souris WT, les $Tph2^{-/-}$ prenaient un temps significativement plus long à traverser pour la première fois vers la zone lumineuse et y passaient au total moins de temps.

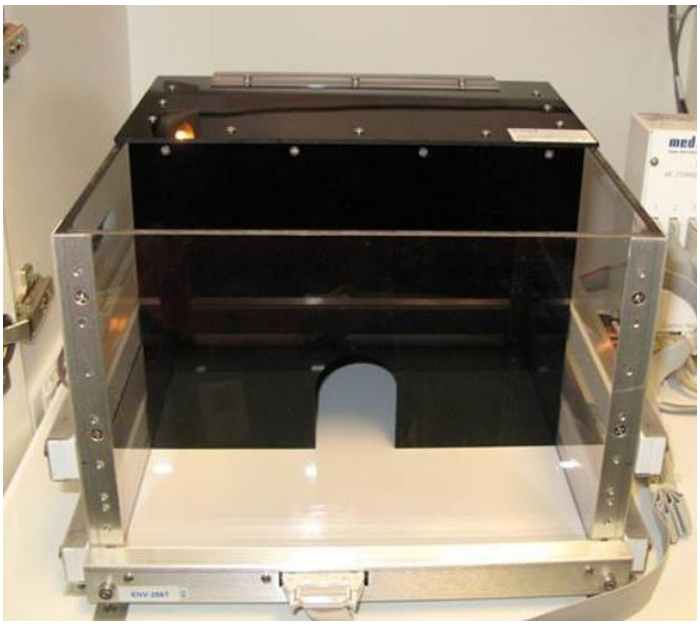


Figure 8. Représentation du dispositif utilisé pour le test *Dark-Light Emergence*. Copyright Navigator Innovation. L'image a été modifiée pour convenir au format du mémoire.

1.5. Hypothèses

En sachant que :

1. Le HF rTMS du DLPFC est un traitement reconnu dans le MDD et semble posséder des effets et un mécanisme d'action lié à la plasticité synaptique similaire à certains antidépresseurs.
2. Le modèle de déficience en 5-HT $Tph2^{-/-}$ possède une signature comportementale de dépression, d'anxiété et d'OCD comparables à certains individus souffrant de TRD.

3. Un traitement quotidien d'HF rTMS d'une durée de 5 jours sur des souris WT induit des changements épigénétiques dans la modulation de certaines protéines retrouvées dans le cortex frontal jusqu'à 20 jours après la dernière stimulation.

L'hypothèse de cette étude est qu'un traitement HF rTMS quotidien de 5 jours aura un impact antidépresseur et agira sur le niveau de certaines protéines retrouvées dans le cortex frontal du modèle murin de la TRD et potentiellement sur son comportement.

1.6. Objectifs

Cette étude est divisée en 2 parties :

1. La cohorte moléculaire. Nous voulons évaluer les effets d'un traitement quotidien HF rTMS de 5 jours sur le profil d'expression d'ARNm de souris déficitaire en 5-HT. Nous prédisons un changement plus important dans le niveau de certaines protéines chez les souris stimulées Tph2$^{-/-}$ que les souris à stimulation placebo. Des groupes de souris WT stimulés et placebos seront également évalués à titre de comparaison avec le génotype Tph2$^{-/-}$.
2. La cohorte comportementale. Nous voulons évaluer les effets d'un traitement quotidien HF rTMS de 5 jours sur le comportement de souris déficitaires 5-HT. Nous prédisons un changement plus important dans les comportements d'anxiété et de compulsivité chez les souris stimulées Tph2$^{-/-}$ que les souris à stimulation placebo. Des groupes de souris WT stimulés et placebos seront également évalués à titre de comparaison avec le phénotype Tph2$^{-/-}$.

1.7. Participation de l'étudiant au projet de recherche

Cette étude s'inscrit dans le cadre de mon projet de maîtrise en neurobiologie 2016-2018. Comme le projet est en quelque sorte la continuité du projet d'Etiévant *et al*. (2015), j'ai utilisé le même protocole expérimental de la cohorte moléculaire et les mêmes paramètres rTMS. J'ai participé à toutes les étapes du projet sauf le séquençage de l'ARNm des cortex frontaux qui sera envoyé à un laboratoire externe spécialisé. J'ai mis sur pied le protocole comportemental, effectué les stimulations rTMS, les tests comportementaux, la dissection des cortex frontaux, le génotypage des souris et l'analyse des résultats.

2. MATÉRIEL ET MÉTHODES

2.1. Animaux

Deux types de souris ont été utilisés pour cette étude. Les souris WT des deux sexes étaient de la lignée C57BL/6J et celles Tph2$^{-/-}$ mâles et femelles possédaient une mutation de l'allèle R439H similaire à un équivalent humain rare (R441H) identifié dans la TRD. Le génotype WT et Tph2$^{-/-}$ était identifié par analyse PCR à partir d'un poinçon d'oreille prélevé sur les juvéniles et une fois de plus à partir d'un bout de queue à titre de double vérification après la mise à mort de l'animal. Pendant l'étude, les souris utilisées étaient âgées entre 2 et 5 mois. Le projet a été approuvé par le comité éthique de l'Université Laval et par le conseil canadien de protection des animaux.

2.2. Conditions d'hébergement

Pendant tout le temps de l'expérimentation, de la première manipulation à l'euthanasie, toutes les souris ont été hébergées dans la même pièce suivant un cycle jour/nuit de 12 heures avec de la nourriture à volonté. Les souris ont été séparées par sexe, les mâles étant isolés et les femelles restant en groupe de 2 à 4 individus. Avant leur transfert dans la chambre d'hébergement, les souris étaient hébergées dans les deux animaleries de l'Institut universitaire en santé mentale de Québec au rez-de-chaussée et au 2^{e} étage.

2.3. Volet moléculaire

Le volet moléculaire vise à évaluer l'effet d'un traitement HF rTMS de 5 jours du cortex frontal sur l'expression des gènes de souris déficitaires en sérotonine.

2.3.1. Protocole

Avant les stimulations, les souris ont été manipulées par l'expérimentateur à cinq reprises pendant 40 secondes sur 3 ou 4 jours. La manipulation recréait les conditions de la stimulation alors que la bobine était accolée sur la tête de la souris, mais sans en activer le courant. Ces manipulations avaient pour but d'acclimater l'animal au contact de l'expérimentateur et de la bobine. Pour la majorité des souris, l'acclimatation était manifeste puisque parvenu à la 5^{e} manipulation, les souris étaient visiblement moins agitées, se débattant moins et tentant moins de mordre l'expérimentateur. Suite à la 5^{e} manipulation, les souris étaient pesées pour quantifier la dose de HDACi ou saline requise pour

l'injection quotidienne des souris. Il est à noter que cette étape du projet fut abandonnée quelques semaines après le début des expérimentations, l'équipe préférant se concentrer seulement sur les effets de la HF rTMS sur l'expression des gènes et du comportement. Par souci d'uniformité, toutes les souris ont été injectées quotidiennement à la saline environ une heure avant la manipulation, du premier jour de stimulation jusqu'au dernier jour de manipulation à la saline 0,9 % contenant 3,5 % de DMSO pour 20 mg/kg.

La stimulation HF rTMS et le placebo étaient administrées tous les jours entre 9h30 et 15h30 pendant 5 jours consécutifs. Une bobine adaptée pour souris à diamètre interne de 2,5 cm et diamètre externe de 5 cm a été utilisée (Magstim Company Limited, UK, figure 8).

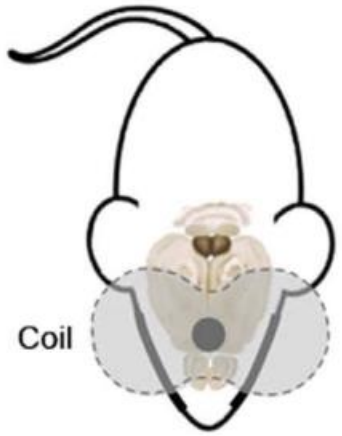


Figure 9. Représentation du positionnement de la bobine lors de la stimulation rTMS du cortex frontal des souris pendant l'étude. Copyright Etiévant *et al*., 2015.

Les paramètres de stimulations sont identiques à ceux utilisés par l'étude d'Etiévant *et al.* (2015), ce projet ayant observé une différence significative dans l'expression de certains gènes chez les groupes de souris stimulés à la HF rTMS versus les groupes placebo. Les paramètres de stimulations consistaient à 3 trains de 10 secondes à 150 pulsations chacun (450 totaux) de 15 Hz avec un intervalle entre les trains de 0,5 seconde et une intensité calibrée à 53 %. Le groupe contrôle consistait en des souris présentent pendant la stimulation du groupe actif, manipulé de la même manière et étant sujet au son de la rTMS, mais avec un objet plat mimant la bobine accolée sur leur crâne.

2.3.2. Euthanasie et dissection

Conformément à l'étude d'Etiévant *et al*. (2015), sachant que les effets d'un traitement de 5 jours de HF rTMS du cortex frontal sont davantage marqués dans l'expression de certains gènes 5 jours après la dernière stimulation, les cortex frontaux des groupes actifs et contrôles ont été prélevés 5 jours après la dernière stimulation. La méthode d'euthanasie sélectionnée a été la dislocation cervicale, une méthode mécanique permettant de préserver l'intégrité du contenu du cortex frontal. Cette méthode a été privilégiée puisqu'une euthanasie chimique aurait eu le potentiel d'apporter des modifications dans le contenu moléculaire du cortex frontal. Les cortex frontaux gauche et droit ont été prélevés rapidement, immergés dans l'azote liquide et entreposés dans un réfrigérateur à -80 °C en attendant leur purification ARN (figure 10).

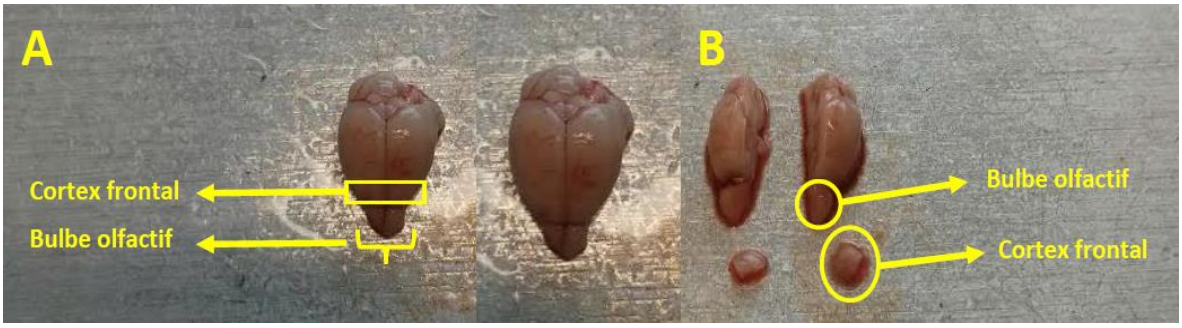


Figure 10. Dissection du cortex frontal et du bulbe olfactif de la souris. (**A**) Vue d'ensemble du cerveau intact de la souris. (**B**) Vue des 2 hémisphères séparés et cortex frontal disséqué.

La purification ARN a été faite avec un kit *Zymo Research* (*Direct-zol™ RNA Kit*). Par la suite, la quantification ARN a été faite à l'aide d'un spectrophotomètre. Les échantillons contenaient entre 46 et 150 ng/µl d'ARN avec 45 µl disponibles pour leur séquençage ARNm subséquent. Chaque groupe (WT contrôle, WT stimulé, Tph2$^{-/-}$ contrôle et Tph2$^{-/-}$ stimulé) contenait 5 individus chacun.

2.3.3. Séquençage ARNm

Pour des raisons de logistique hors de notre contrôle, le séquençage ARNm et l'analyse des données subséquentes ne s'insérèrent finalement pas dans la fenêtre de temps de ce projet de maîtrise, les données reliées au volet moléculaire ne seront donc pas traitées dans ce mémoire. L'analyse de ces données est prévue pour la 2^{e} moitié de 2018, pour de plus amples informations, il est possible de contacter le laboratoire de Martin Beaulieu à Toronto à l'adresse suivante : martin.beaulieu@utoronto.ca.

2.4. Volet comportemental

Le volet comportemental vise à évaluer l'effet d'un traitement HF rTMS de 5 jours du cortex frontal sur les comportements locomoteurs, anxieux et compulsifs de souris déficitaire en sérotonine.

2.4.1. Protocole

Les protocoles et paramètres de manipulation pré-stimulation, stimulation et d'injection de saline sont les mêmes que ceux du volet moléculaire. Suite aux 5 jours de stimulation, les souris effectuèrent trois tests comportementaux, *Open Field Test, Marble Burying Test* et *Dark-Light Emergence Test* entre 9h30 et 17h. L'OFT avait lieu au jour 7, le MBT au jour 9 et le DLET au jour 11. Les souris avaient donc une journée de repos entre les différents tests. Tous comme les journées de stimulation, les souris étaient injectées à la saline environ une heure avant la tenue des tests. Les groupes *baseline* WT et Tph2$^{-/-}$ sans manipulations ayant pris part au MBT et DLET eurent également une journée de repos entre les deux tests.

2.4.2. Open Field Test

Au jour 7, l'activité locomotrice et le comportement anxieux des souris ont été évalués à l'aide du OFT. L'activité des souris a été enregistrée automatiquement par informatique pendant 30 minutes. Les souris étaient insérées dans le coin inférieur gauche de la chambre carrée. La chambre était nettoyée après chaque test. Les paramètres enregistrés consistaient au nombre d'entrées dans la zone centrale, le temps passé dans la zone centrale, la distance parcourue en périphérie, la distance parcourue dans la zone centrale et la zone parcourue totale.

2.4.3. Marble Burying Test

Au jour 9, le comportement compulsif des souris a été évalué à l'aide du MBT. L'activité des souris a été enregistrée manuellement par l'expérimentateur et par caméra pendant 30 minutes. Les 20 billes et les souris étaient insérées dans une cage à rat d'une dimension de 48x26x20 cm avec une litière d'environ 5 cm de profondeur. Au commencement du test, les souris étaient insérées dans le coin inférieur gauche de la zone sans billes. La cage était recouverte d'une plaque de plexiglas pour permettre à la caméra de filmer l'activité des souris et les empêcher de sortir pendant le test. La litière était remplacée et les billes nettoyées après chaque test. Les paramètres enregistrés consistaient au temps passé dans la zone sans billes, le temps requis avant la première activité de fouissage et le

nombre total de billes enterrées. Une bille devait être enterrée au 2/3 dans la litière pour être considérée comme enterrée.

2.4.4. Dark-Light Emergence Test

Au jour 11, le comportement anxieux des souris a été évalué à l'aide du DLET. L'activité des souris a été enregistrée automatiquement par informatique pendant 5 minutes. Les souris étaient insérées dans la zone sombre pour le commencement du test. Les paramètres enregistrés consistaient au temps de latence avant le premier passage vers la zone éclairée, le nombre d'entrées dans la zone éclairée, le temps passé dans la zone éclairée et la distance parcourue dans la zone éclairée.

2.5. Analyses statistiques

Les résultats de chaque groupe (WT contrôle, WT stimulé, $Tph2^{-/-}$ contrôle et $Tph2^{-/-}$ stimulé) ont été analysés par un *outlier generator*. Pour chaque paramètre, les individus et leurs résultats se trouvant à plus de deux écarts-types de la moyenne étaient écartés du test en entier. Les ANOVAs à un ou deux facteurs et les tests de t non-pairé ont été générés avec Graphpad Prism 6. Une différence significative est considérée lorsque $p < 0,05$.

.

3. RÉSULTATS

3.1. Volet moléculaire

Aucunes données disponibles. Pour plus de détails, voir la section 2.3.3.

3.2. Volet comportemental

Les effets comportementaux d'un traitement HF rTMS sur le cortex frontal de 5 jours ont été évalués sur des souris mutantes Tph2$^{-/-}$ et WT. Cette étude mène à la conclusion qu'un tel traitement n'amène aucun changement significatif comportemental dans les tests d'anxiété, de locomotion et d'impulsivité du OFT, MBT et DLET entre les souris Tph2$^{-/-}$ stimulées et contrôles de 2 à 6 jours après la dernière stimulation. Dans plusieurs des paramètres évalués par ces tests, il y a présence d'une différence significative soit entre les deux sexes, entre certains traitements et génotypes ou dans l'interaction entre ces facteurs.

3.2.1. Un traitement HF rTMS de 5 jours du cortex frontal n'affecte pas de façon significative le comportement des souris Tph2$^{-/-}$ lors du test *Open Field*

Deux jours après la dernière stimulation, l'anxiété et la locomotion des souris des 4 groupes furent évaluées à l'aide du OFT. La première paire consiste en des souris WT n'ayant pas été stimulées et avec stimulation. La seconde comprend les souris Tph2$^{-/-}$ n'ayant pas été stimulées et avec stimulation. En termes de comportements anxieux, le OFT permet d'évaluer le nombre d'entrées dans la zone centrale et le temps passé dans la zone centrale des souris. Un traitement HF rTMS du cortex frontal de 5 jours n'a apporté aucun changement significatif dans ces deux paramètres chez les paires WT contrôle/WT stimulé, Tph2$^{-/-}$ contrôle/Tph2$^{-/-}$ stimulé et WT contrôle/Tph2$^{-/-}$ contrôle (figure 11).

En termes de comportement locomoteur, le OFT permet d'évaluer la distance parcourue en périphérie, dans la zone centrale et en totalité. Un traitement HF rTMS du cortex frontal de 5 jours n'a apporté aucun changement significatif dans ces trois paramètres chez les paires WT contrôle/WT stimulé, Tph2$^{-/-}$ contrôle/Tph2$^{-/-}$ stimulé et WT contrôle/Tph2$^{-/-}$ contrôle (figure 12).

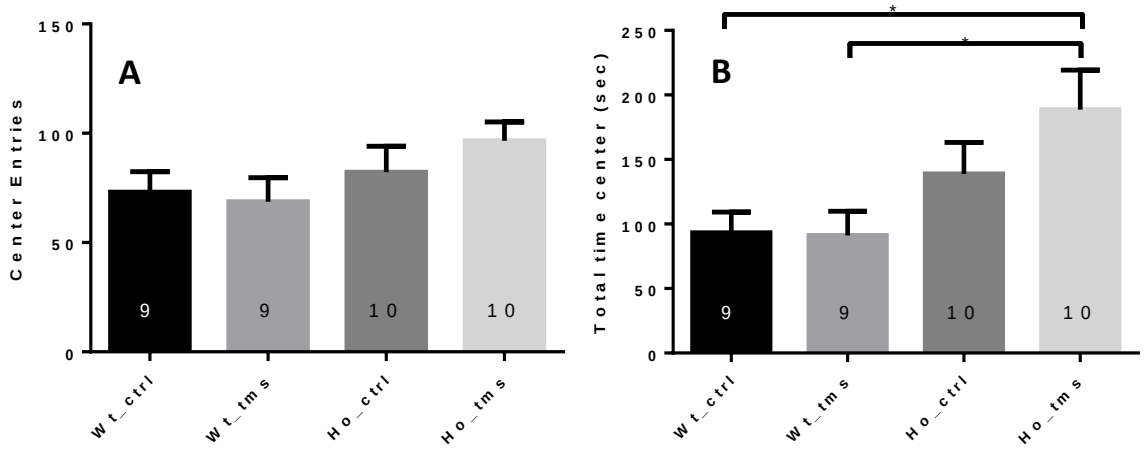


Figure 11. L'effet d'un traitement HF rTMS de 5 jours sur le cortex frontal sur le comportement anxieux de souris WT contrôles (Wt_ctrl), stimulées (Wt_tms), Tph2$^{-/-}$ contrôles (Ho_ctrl) et Tph2$^{-/-}$ stimulées (Ho_tms) au OFT. **(A)** Le nombre d'entrées dans la zone centrale. [ANOVA, $F_{traitement/génotype(3, 34)} = 1.4$, $P > 0.05$]. **(B)** Le temps passé dans la zone centrale. [ANOVA, $F_{traitement/génotype(3, 34)} = 3.8$, $P = 0.0188$]. Temps du test : 30 minutes. Pour tous les tests, des groupes comprenant entre 4-6 souris de chaque sexe ont été utilisés. Les résultats sont affichés par moyennes ± SEM. * = $P < 0.05$. Les ANOVAs ont été générées avec le test de Bonferroni pour corriger les comparaisons multiples entre paires.

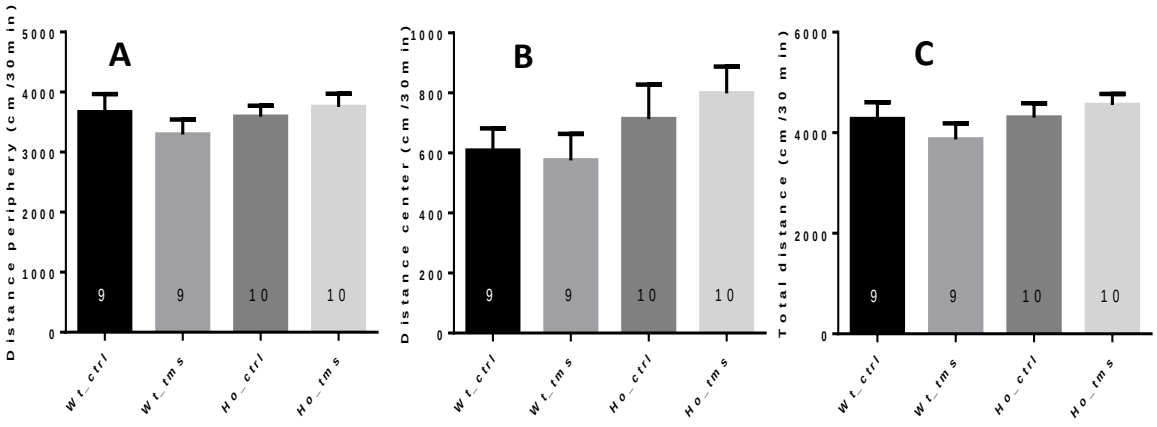


Figure 12. L'effet d'un traitement HF rTMS de 5 jours sur le cortex frontal sur le comportement locomoteur en cm de souris WT contrôles (Wt_ctrl), stimulées (Wt_tms), Tph2$^{-/-}$ contrôles (Ho_ctrl) et Tph2$^{-/-}$ stimulées (Ho_tms) au OFT. **(A)** La distance parcourue en périphérie. [ANOVA, $F_{traitement/génotype(3, 34)} = 0.6825$, $P > 0.05$]. **(B)** La distance parcourue dans la zone centrale. [ANOVA, $F_{traitement/génotype(3, 34)} = 1.2$, $P > 0.05$]. **(C)** La distance parcourue totale. [ANOVA, $F_{traitement/génotype(3, 34)} = 0.9504$, $P > 0.05$] Temps du test : 30 minutes. Pour tous les tests, des groupes comprenant entre 4-6 souris de chaque sexe ont été utilisés. Les résultats sont affichés par moyennes ± SEM. * = $P < 0.05$. Les ANOVAs ont été générées avec le test de Bonferroni pour corriger les comparaisons multiples entre paires.

Afin de s'assurer qu'il n'y avait pas de différence entre les deux sexes ou d'interaction entre sexes et traitements et génotypes dans les comportements observés, des ANOVAs à deux facteurs ont été générées. Aucune différence significative n'est présente entre les différents groupes, mais le sexe engendre une différence significative dans le paramètre du nombre d'entrées dans la zone centrale, les femelles faisant en moyenne plus d'entrées dans la zone centrale. Le traitement et génotype est un facteur significatif dans le temps passé dans la zone centrale. On observe également une tendance aux mâles Tph2$^{-/-}$ stimulés à fréquenter davantage la zone centrale comparativement aux mâles Tph2$^{-/-}$ contrôles (figure 13).

Le même test d'ANOVA à deux facteurs a été généré sur les comportements locomoteurs du OFT : la distance parcourue au centre et la distance parcourue totale. Il y a une différence significative en fonction du sexe dans la distance parcourue au centre, les femelles se déplaçant davantage dans la zone centrale que les mâles. La même tendance que dans les comportements anxieux est observée chez les mâles Tph2$^{-/-}$ stimulés qui parcourent plus de distance que les mâles Tph2$^{-/-}$ contrôles (figure 14).

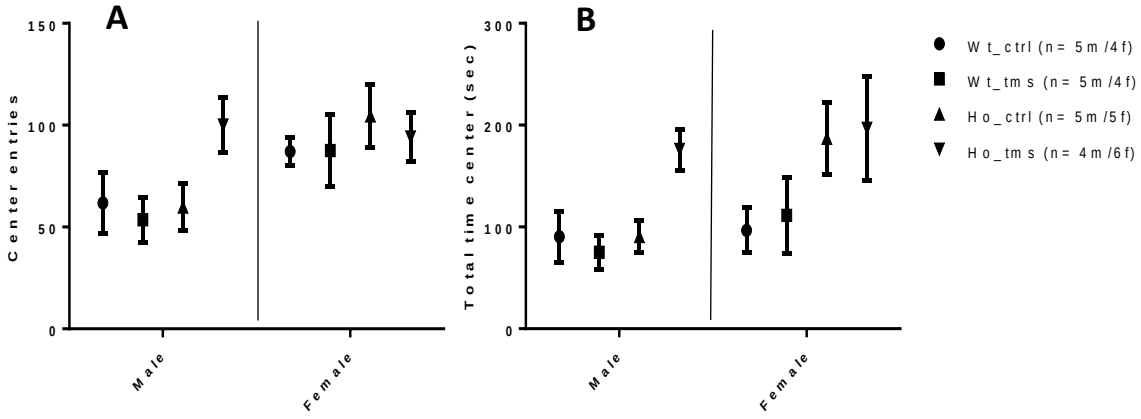


Figure 13. Représentation des 4 groupes en fonction du sexe lors des paramètres anxiété du OFT. **(A)** Le nombre d'entrées dans la zone centrale. [ANOVA, $F_{traitement/génotype(3, 30)} = 1.509$, $P > 0.05$; ANOVA, $F_{sexe(1,30)} = 6.589$, $P = 0.0155$; ANOVA, $F_{sexeXtraitement/génotype(3,30)} = 1.347$, $P > 0.05$]. **(B)** Le temps passé dans la zone centrale. [ANOVA, $F_{traitement/génotype(3, 30)} = 3.582$, $P = 0.0252$; ANOVA, $F_{sexe(1,30)} = 2.892$, $P > 0.05$; ANOVA, $F_{sexeXtraitement/génotype(3,30)} = 0.7356$, $P > 0.05$]. Les résultats sont affichés par moyennes ± SEM. Les ANOVAs à deux facteurs ont été générées avec le test de Tukey pour corriger les comparaisons multiples entre paires.

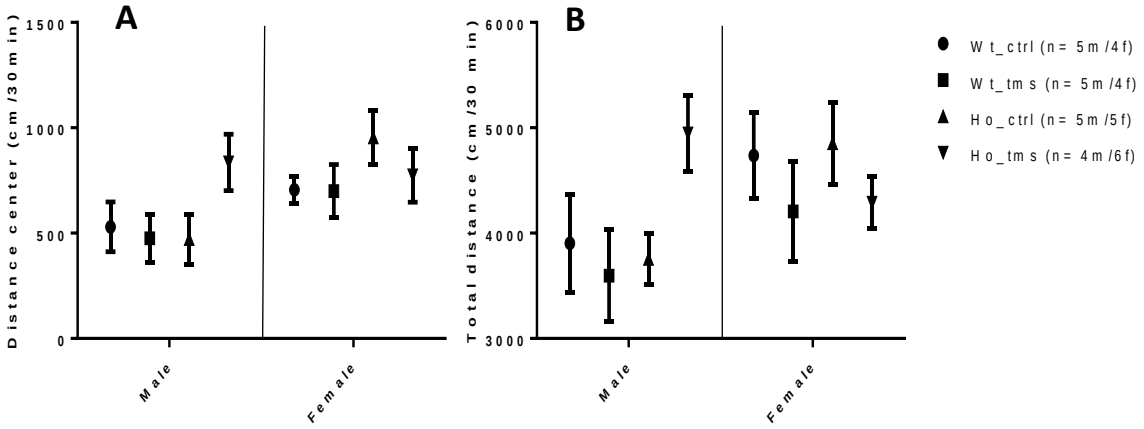


Figure 14. Représentation des 4 groupes en fonction du sexe lors des paramètres locomoteurs du OFT. **(A)** La distance parcourue dans la zone centrale. [ANOVA, $F_{traitement/génotype(3,\ 30)} = 1.294$, $P > 0.05$; ANOVA, $F_{sexe(1,30)} = 5.634$, $P = 0.0242$; ANOVA, $F_{sexeXtraitement/génotype(3,30)} = 1.744$, $P > 0.05$]. **(B)** La distance parcourue totale. [ANOVA, $F_{traitement/génotype(3,\ 30)} = 1.160$, $P > 0.05$; ANOVA, $F_{sexe(1,30)} = 3.022$, $P > 0.05$; ANOVA, $F_{sexeXtraitement/génotype(3,30)} = 2.127$, $P > 0.05$]. Les résultats sont affichés par moyennes ± SEM. Les ANOVAs à deux facteurs ont été générées avec le test de Tukey pour corriger les comparaisons multiples entre paires.

3.2.2 Un traitement HF rTMS de 5 jours du cortex frontal n'affecte pas significativement le comportement des souris Tph2$^{-/-}$ lors du test *Marble Burying*

Quatre jours après la dernière stimulation, le comportement compulsif des souris des 4 groupes fut évalué à l'aide du MBT. En termes de comportements compulsifs, le MBT permet d'évaluer le temps écoulé avant le premier comportement de creusage et le nombre total de billes enterrées après 30 minutes. Un traitement HF rTMS du cortex frontal de 5 jours n'a apporté aucun changement significatif dans ces deux paramètres chez les paires WT contrôle/WT stimulé et Tph2$^{-/-}$ contrôle/Tph2$^{-/-}$ stimulé (figure 15). Une différence significative est observée dans le nombre total de billes enterrées entre WT contrôle et Tph2$^{-/-}$ contrôle, les souris Tph2$^{-/-}$ montrant un comportement plus compulsif que le WT, enterrant en moyenne 11 billes contre 6 billes.

Pour vérifier si les manipulations avaient un impact sur les souris, le même test a été effectué sur des souris WT et Tph2$^{-/-}$ sans manipulation et sans traitement. La même tendance fut observée, c'est-à-dire aucune différence dans le premier temps de creusage et une différence significative entre WT et Tph2$^{-/-}$ dans le nombre total de billes enterrées (figure 16).

Afin de s'assurer qu'il n'y avait pas de différences dues au sexe, aux traitements et génotypes ou d'interaction entre ces différentes modalités dans les comportements observés, des ANOVAs à deux facteurs ont été générées. Une différence significative dans l'interaction entre les sexes et le traitement et génotype est observable dans le premier temps de creusage (figure 17). Il y a une tendance aux mâles WT stimulés à creuser plus tard que les mâles WT contrôles et pareillement pour les femelles Tph2$^{-/-}$ stimulées comparativement aux femelles Tph2$^{-/-}$ contrôles. Dans le nombre total de billes enterrées, le traitement et génotype joue un rôle significatif, le génotype Tph2$^{-/-}$ semblant enterrer plus de billes peu importe la présence de traitement ou non.

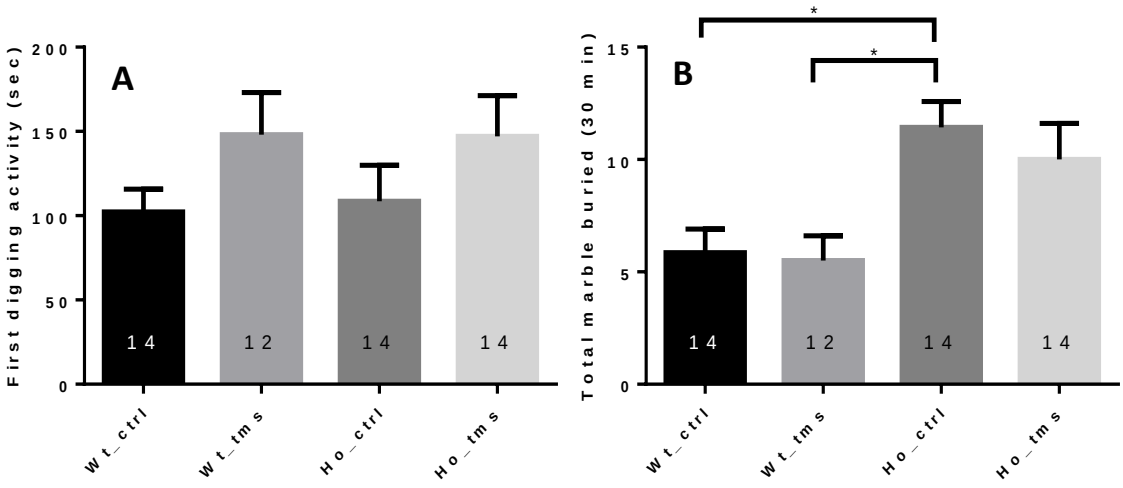


Figure 15. L'effet d'un traitement HF rTMS de 5 jours sur le cortex frontal sur le comportement compulsif de souris WT contrôles (Wt_ctrl), stimulées (Wt_tms), Tph2$^{-/-}$ contrôles (Ho_ctrl) et Tph2$^{-/-}$ stimulées (Ho_tms) au MBT. **(A)** Le temps écoulé avant le premier comportement de creusage. [ANOVA, $F_{traitement/génotype(3, 50)} = 1.3$, $P > 0.05$]. **(B)** Le nombre total de billes enterrées. [ANOVA, $F_{traitement/génotype(3, 50)} = 5.5$, $P = 0.0024$]. Temps du test : 30 minutes. Pour tous les tests, des groupes comprenant entre 6-8 souris de chaque sexe ont été utilisés. Les résultats sont affichés par moyennes ± SEM. *, $P < 0.05$. Les ANOVAs ont été générées avec le test de Bonferroni pour corriger les comparaisons multiples entre paires.

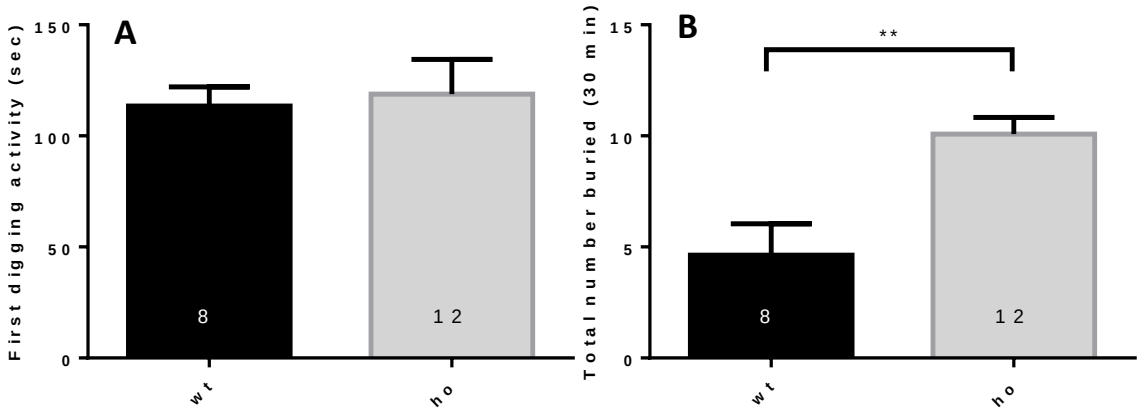


Figure 16. **(A)** Le temps écoulé avant le premier comportement de creusage sur des souris sans manipulations. [Test de t non-pairé avec correction de Welch, P > 0.05]. **(B)** Le nombre total de billes enterrées sur des souris sans manipulations. [Test de t non-pairé avec correction de Welch, P = 0.0058]. Temps du test : 30 minutes. Pour tous les tests, des groupes comprenant entre 4-6 souris de chaque sexe ont été utilisés. Les résultats sont affichés par moyennes ± SEM. **, P < 0.01.

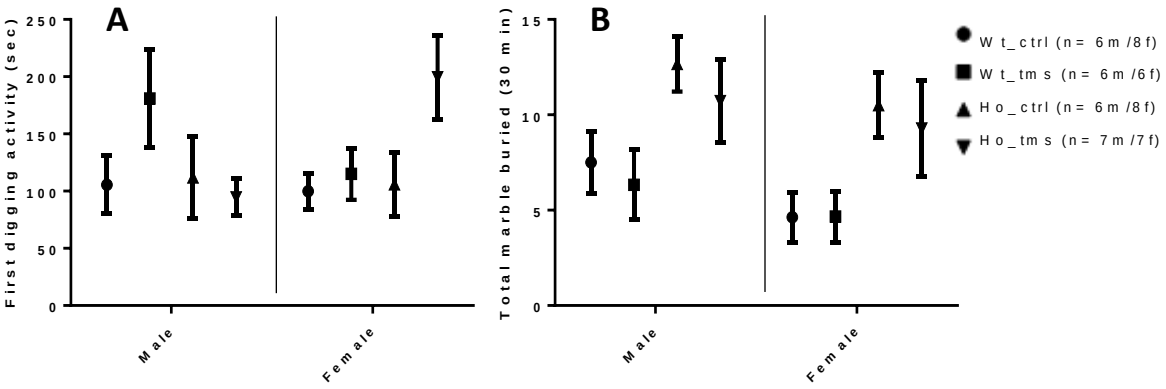


Figure 17. Représentation des 4 groupes en fonction du sexe lors du MBT. **(A)** Le temps écoulé avant le premier comportement de creusage. [ANOVA, $F_{traitement/génotype(3, 46)} = 1.420$, P > 0.05; ANOVA, $F_{sexe(1,46)} = 0.1121$, P > 0.05; ANOVA, $F_{sexeXtraitement/génotype(3,46)} = 3.063$, P = 0.0373]. **(B)** Le nombre total de billes enterrées. [ANOVA, $F_{traitement/génotype(3, 46)} = 5.312$, P = 0.0032; ANOVA, $F_{sexe(1,46)} = 2.502$, P > 0.05; ANOVA, $F_{sexeXtraitement/génotype(3,46)} = 0.063$, P > 0.05]. Les résultats sont affichés par moyennes ± SEM. Les ANOVAs à deux facteurs ont été générées avec le test de Tukey pour corriger les comparaisons multiples entre paires.

3.2.3 Un traitement HF rTMS de 5 jours du cortex frontal n'affecte pas significativement le comportement des souris Tph2$^{-/-}$ lors du test *Dark-Light Emergence*

Six jours après la dernière stimulation, le comportement anxieux des souris des 4 groupes fut évalué à l'aide du DLET. En termes de comportements anxieux, le DLET permet d'évaluer le temps qu'une souris prend pour traverser de la zone sombre à la zone éclairée pour la première fois, la distance parcourue dans la zone éclairée, le nombre d'entrées dans la zone éclairée et le temps passé dans la zone éclairée. Un traitement HF rTMS du cortex frontal de 5 jours n'a apporté aucun changement significatif dans ces quatre paramètres chez les paires Tph2$^{-/-}$ contrôle/Tph2$^{-/-}$ stimulé et WT contrôle/ Tph2$^{-/-}$ contrôle (figure 18).

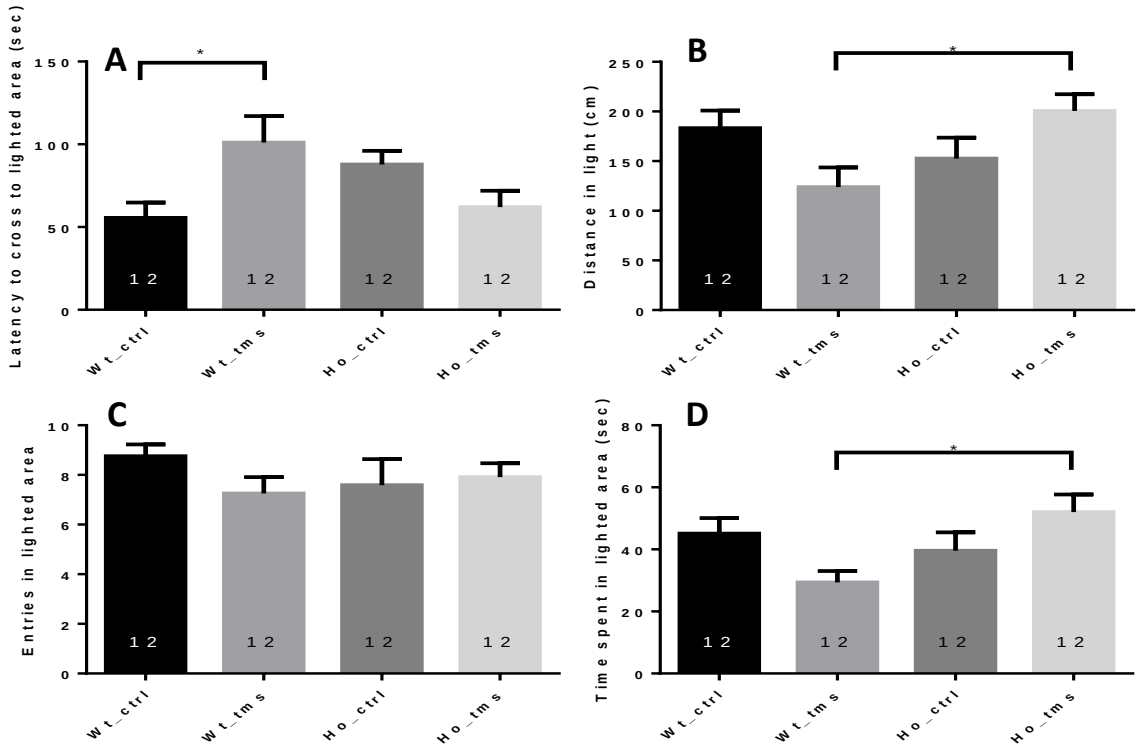


Figure 18. L'effet d'un traitement HF rTMS de 5 jours sur le cortex frontal sur le comportement anxieux de souris WT contrôles (Wt_ctrl), stimulées (Wt_tms), Tph2$^{-/-}$ contrôles (Ho_ctrl) et Tph2$^{-/-}$ stimulées (Ho_tms) au MBT. **(A)** Temps requis avant le premier passage vers la zone éclairée. [ANOVA, $F_{traitement(3, 44)} = 3.6$, $P = 0.0204$]. **(B)** Distance parcourue dans la zone éclairée. [ANOVA, $F_{traitement(3, 44)} = 3.2$, $P = 0.0326$]. **(C)** Nombre d'entrées dans la zone éclairée. [ANOVA, $F_{traitement(3, 44)} = 0.79$, $P > 0.05$]. **(D)** Temps passé dans la zone éclairée. [ANOVA, $F_{traitement(3, 44)} = 3.5$, $P = 0.0237$]. Temps du test : 5 minutes. Pour tous les tests, des groupes comprenant entre 4-8 souris de chaque sexe ont été utilisés. Les résultats sont affichés par moyennes ± SEM. *, $P < 0.05$. Les ANOVAs ont été générées avec le test de Bonferroni pour corriger les comparaisons multiples entre paires.

Une différence significative est observée entre WT contrôle et WT stimulé dans le temps requis pour traverser pour la première fois vers la zone éclairée, les souris stimulées montrant un temps plus élevé. Pour vérifier si les manipulations avaient un impact sur les souris, le même test a été effectué sur des souris WT et Tph2$^{-/-}$ sans manipulation et sans traitement. Aucune différence entre les deux génotypes ne fut observée (figure 19).

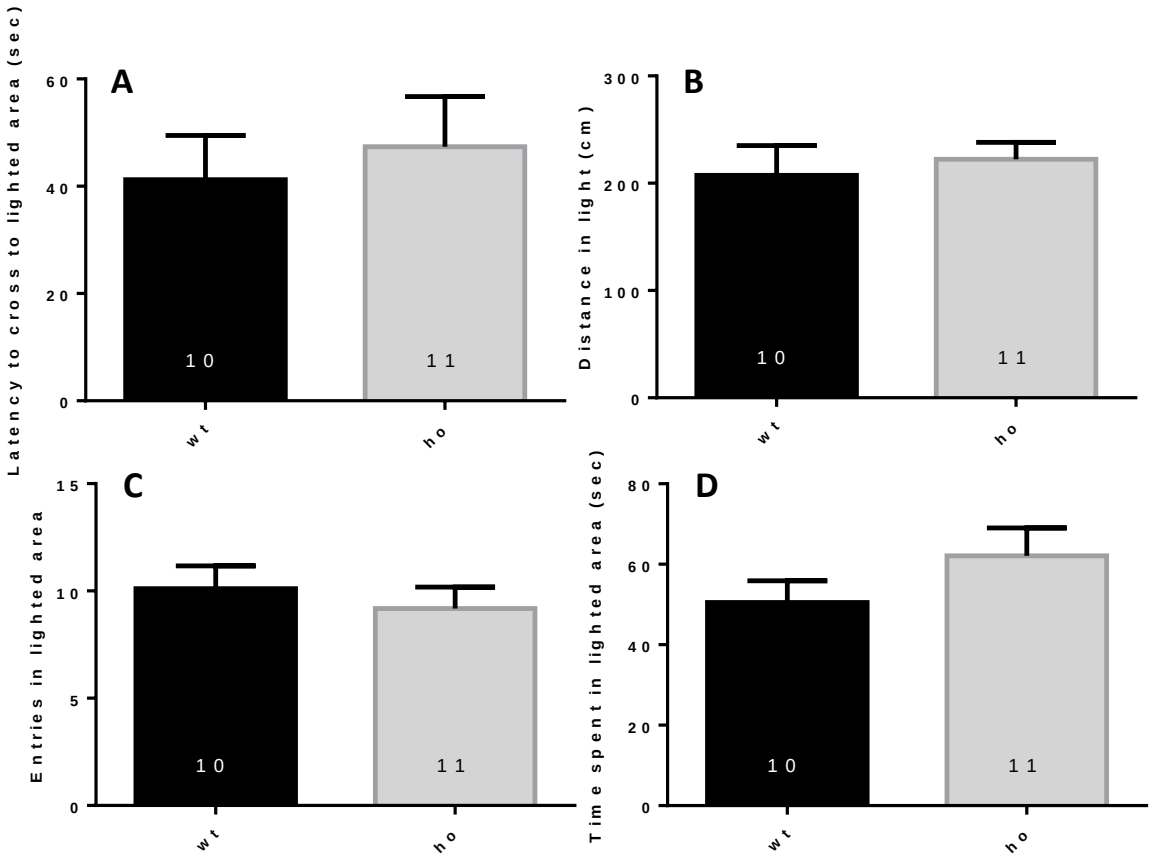


Figure 19. **(A)** Temps requis avant le premier passage vers la zone éclairée sans manipulations. [Test de t non-pairé avec correction de Welch, P > 0.05]. **(B)** Distance parcourue dans la zone éclairée sans manipulations. [Test de t non-pairé avec correction de Welch, P > 0.05]. **(C)** Nombre d'entrées dans la zone éclairée sans manipulations. [Test de t non-pairé avec correction de Welch, P > 0.05]. **(D)** Temps passé dans la zone éclairée sans manipulations. [Test de t non-pairé avec correction de Welch, P > 0.05]. Temps du test : 5 minutes. Pour tous les tests, des groupes comprenant entre 4-6 souris de chaque sexe ont été utilisés. Les résultats sont affichés par moyennes ± SEM.

Afin de s'assurer qu'il n'y avait pas de différence entre les deux sexes ou d'interaction entre sexes et traitements et génotype dans les comportements observés, des ANOVAs à deux facteurs ont été générées. Une différence significative dans le traitement et génotype est observée dans les paramètres du temps de latence avant le premier passage vers la zone éclairée, la distance parcourue dans la zone éclairée et le temps passé dans la zone éclairée (figure 20). Il semble y avoir

une tendance dans un comportement plus anxieux chez les deux sexes WT suite à un traitement HF rTMS comparativement au WT contrôle. Au contraire, il semble y avoir une tendance à ce que les souris Tph2$^{-/-}$ stimulées soient plus actives dans la zone lumineuse que les souris Tph2$^{-/-}$ contrôles.

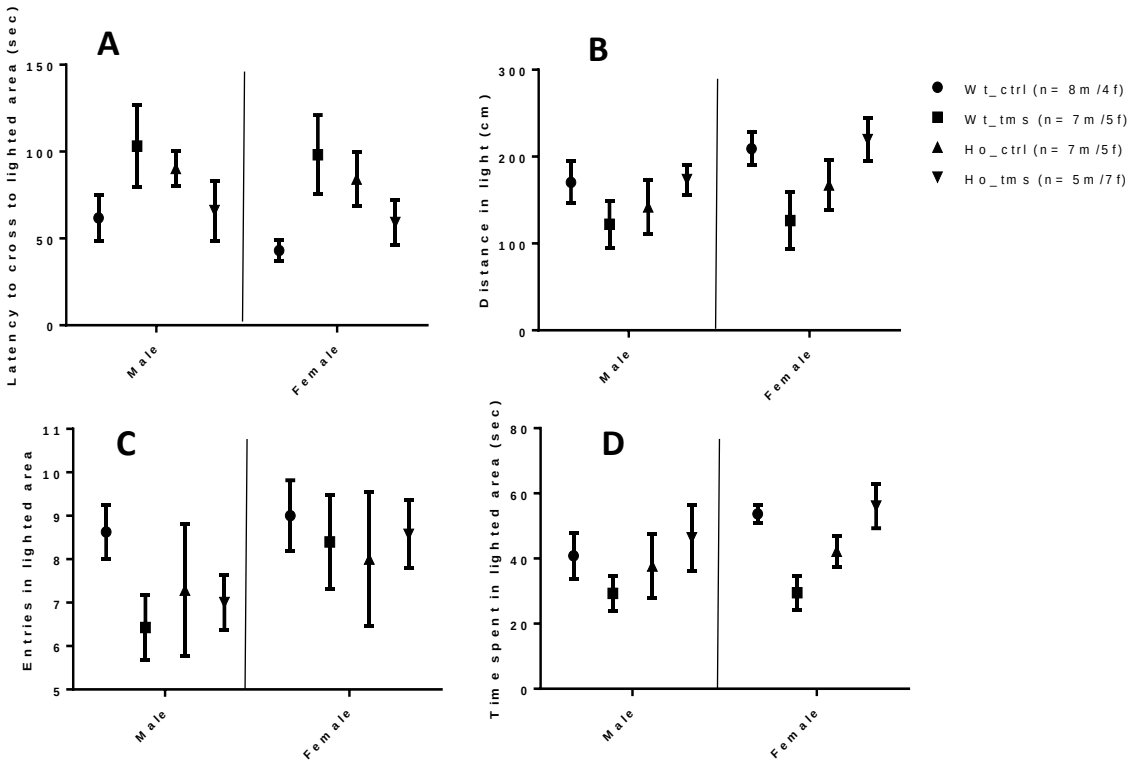


Figure 20. Représentation des 4 groupes en fonction du sexe lors du DLET. **(A)** Temps requis avant le premier passage vers la zone éclairée. [ANOVA, $F_{traitement/génotype(3,\ 40)} = 3.354$, $P = 0.0282$; ANOVA, $F_{sexe(1,40)} = 0.5785$, $P > 0.05$; ANOVA, $F_{sexeXtraitement/génotype(3,40)} = 0.0685$, $P > 0.05$]. **(B)** Distance parcourue dans la zone éclairée. [ANOVA, $F_{traitement/génotype(3,\ 40)} = 2.916$, $P = 0.0458$; ANOVA, $F_{sexe(1,40)} = 2.104$, $P > 0.05$; ANOVA, $F_{sexeXtraitement/génotype(3,40)} = 0.2188$, $P > 0.05$]. **(C)** Nombre d'entrées dans la zone éclairée. [ANOVA, $F_{traitement/génotype(3,\ 40)} = 0.6541$, $P > 0.05$; ANOVA, $F_{sexe(1,40)} = 2.389$, $P > 0.05$; ANOVA, $F_{sexeXtraitement/génotype(3,40)} = 0.2414$, $P > 0.05$]. **(D)** Temps passé dans la zone éclairée. [ANOVA, $F_{traitement/génotype(3,\ 40)} = 3.241$, $P = 0.0320$; ANOVA, $F_{sexe(1,40)} = 1.612$, $P > 0.05$; ANOVA, $F_{sexeXtraitement/génotype(3,40)} = 0.2722$, $P > 0.05$]. Les résultats sont affichés par moyennes ± SEM. Les ANOVAs à deux facteurs ont été générées avec le test de Tukey pour corriger les comparaisons multiples entre paires.

4. DISCUSSION

4.1. Les effets d'un traitement HF rTMS de 5 jours sur le contenu moléculaire de cortex frontaux de souris déficitaire en sérotonine

Bien qu'aucune donnée ne soit disponible concernant ce volet du projet, si les données concordent avec la littérature existante, il est probable que lors de l'analyse future des cortex frontaux, tout comme dans l'article d'Etiévant *et al*. (2015), la production de certaines protéines ait été régulée à la hausse ou à la baisse suite à une stimulation HF rTMS quotidienne de 5 jours et que leurs niveaux soient significativement différents comparativement aux groupes WT stimulés et contrôles (comme CDK5 et PSD-95). Néanmoins, cette même hypothèse ne peut être avancée avec certitude dans le cas des souris Tph2$^{-/-}$ compte tenu de leurs caractéristiques uniques et en l'absence de différences comportementales significatives entre les groupes stimulés et contrôles. Il n'est cependant pas exagéré d'avancer un probable effet de la HF rTMS sur les souris Tph2$^{-/-}$ au niveau moléculaire puisque bien qu'aucune différence n'ait été observée dans le comportement des souris WT, un traitement HF rTMS quotidien de 5 jours peut engendrer des modifications dans la régulation de certaines protéines.

4.2. Les effets d'un traitement HF rTMS de 5 jours sur le comportement de souris déficitaire en sérotonine

Chez les modèles animaux, les tests comportementaux permettent d'évaluer l'efficacité de divers types de traitement. Dans le cadre de cette étude, les comportements locomoteurs, anxieux et compulsifs ont été évalués à l'aide du OFT, MBT et du DLET 2, 4 et 6 jours suivant un traitement HF rTMS de 5 jours. Bien que des différences entre les génotypes soient observables à la base (WT vs. Tph2$^{-/-}$) dans certains paramètres des tests effectués, aucun résultat significatif n'a été observé entre les groupes d'intérêts Tph2$^{-/-}$ contrôle et Tph2$^{-/-}$ stimulé.

Dans le cas du OFT, la conclusion concorde avec la littérature déjà existante : le comportement locomoteur de souris mutantes Tph2$^{-/-}$ est similaire à celui des souris WT. Les résultats quantitatifs reliés à ce test sont toutefois différents des 3 études ayant évalué la locomotion de ces souris. Premièrement, l'étude de Beaulieu *et al*. (2008) a utilisé les mêmes souris, mais a obtenu des résultats moyens de ~1200-1600 cm de distance parcourue totale en 30 minutes pour les souris WT et Tph2$^{-/-}$ comparativement à ~4000 cm en 30 minutes dans le cadre de cette étude. Les deux études ont été effectuées avec des cohortes sexuellement balancées avec un échantillon de taille de similaire (8 vs. 9). Il est spécifié dans Beaulieu *et al*. (2008), que le paramètre utilisé pour

comptabiliser la distance parcourue est la *total distance traveled (horizontal activity)* alors que dans la présente étude il s'agit de l'addition du *center total distance* (centro_TOTDIST_C) et du *periphery total distance* (per_TOTDIST_C).

Dans une seconde étude, Savelieva *et al*. (2008), utilisant des souris mutantes Tph2 KO, mais n'ayant pas une mutation identique à celle présente dans cette étude, a observé des résultats de distance parcourue totale de ~1900-2200 cm en 20 minutes, soit 10 minutes de moins que le test standard. L'éclairage était de 800 lux alors qu'il est inconnu, quoique constant, pour cette étude et celle de Beaulieu *et al*. (2008). La taille des échantillons variait entre 17-19 pour les groupes WT et Tph2 KO, le premier étant balancé sexuellement et le deuxième possédant 11 femelles et 6 mâles. Le paramètre utilisé pour comptabiliser la distance parcourue totale était l'*horizontal locomotor activity (total distance)*.

La dernière étude, celle de Mosienko *et al*. (2012), ne rapporte pas la distance totale en cm, mais en pourcentage de différence avec les WT (Tph2 KO obtient une locomotion de ~105 % comparativement au 100% du WT). Les souris ne possèdent pas la même mutation que cette étude, mais obtiennent un génotype $Tph2^{-/-}$ et les deux groupes ne contiennent que des mâles (10 et 12). Le test se faisait à faible luminosité (30 lux) et durait 10 minutes, soit 20 minutes de moins que le test standard.

Également, l'équipe ayant participé à l'étude d'Etiévant *et al*. (2015) a évalué la distance totale parcourue de souris WT contrôle (n=5, sexe inconnu) et WT stimulé (n=5, sexe inconnu) 4 jours suivant la dernière stimulation en suivant les mêmes paramètres HF rTMS que cette étude. Les résultats sont similaires à ceux de cette étude avec une distance parcourue totale avoisinant les 4000 cm en 30 minutes pour les 2 groupes (communication écrite, non publiée).

Toutes ces études ont en commun une absence de différence significative entre les groupes WT et $Tph2^{-/-}$ dans la locomotion totale du OFT, mais la différence dans les résultats quantitatifs varie. Plusieurs paramètres diffèrent dans ces études et peuvent expliquer en partie les différences observées, le temps du test, la luminosité de la salle, les dimensions de l'arène (42x42 cm vs. 50x50 cm), l'absence ou la présence de manipulation pré-test, le génotype des souris utilisées, etc. De plus, cette étude observe une différence significative entre les sexes dans la distance parcourue dans la zone centrale, les femelles semblant se déplacer davantage dans le centre que les mâles. Cette différence n'est toutefois pas suffisante pour affecter la distance parcourue totale, mais vient probablement ajouter une interférence dans le cumul des différences observées dans les paramètres des différentes études.

Dans le cadre de cette étude, il n'y a pas de différence dans la locomotion entre les souris à stimulation placebo WT et Tph2$^{-/-}$. Un traitement HF rTMS de 5 jours ne vient également pas changer significativement le comportement locomoteur comparativement aux deux groupes contrôles.

Pour ce qui est des paramètres évaluateurs d'anxiété du OFT, le nombre d'entrées au centre et le temps passé au centre, aucune étude avec des souris mutantes Tph2$^{-/-}$ n'a été recensée. Aucune différence n'a été observée entre les groupes dans le nombre d'entrées au centre. Néanmoins, les souris Tph2$^{-/-}$ stimulées passent davantage de temps au centre comparativement aux 2 groupes WT. Il est délicat d'avancer un effet anxiolytique de la HF rTMS sur le groupe Tph2$^{-/-}$ puisque, même s'il montre un comportement moins anxieux que les 2 groupes WT dans le temps passé au centre, il n'y a aucune différence significative avec Tph2$^{-/-}$ contrôle et ce dernier ne montre aucune différence significative avec les deux groupes WT. La comparaison des paires WT contrôle/Tph2$^{-/-}$ stimulée et WT stimulé/Tph2$^{-/-}$ stimulée est peu pertinente comparativement aux paires d'intérêts WT contrôle/WT stimulé, Tph2$^{-/-}$ contrôle/Tph2$^{-/-}$ stimulé ou WT contrôle/Tph2$^{-/-}$ contrôle où les deux premières évaluent l'effet d'un traitement sur un génotype en particulier et la troisième évalue la différence entre deux génotypes différents. Il serait intéressant à l'avenir d'augmenter l'échantillonnage puisque le traitement et génotype joue un rôle significatif dans le temps passé au centre. Peut-être qu'un échantillonnage plus élevé permettrait à Tph2$^{-/-}$ contrôle d'atteindre le même niveau que Tph2$^{-/-}$ stimulé et avoir lui aussi une différence significative avec les deux groupes WT, en particulier WT contrôle, un groupe comparatif pertinent puisque cela permettrait de vérifier une performance de base moins anxieuse des souris Tph2$^{-/-}$ que les souris WT dans l'OFT.

Dans le cadre de cette étude, on observe que les souris Tph2$^{-/-}$ stimulées passent un temps plus élevé dans la zone centrale comparativement aux deux groupes WT. On note néanmoins que, sans être significatif, le groupe Tph2$^{-/-}$ contrôle à une tendance à passer plus de temps dans la zone centrale que les deux groupes WT. Le génotype Tph2$^{-/-}$ semble démontrer un comportement anxieux moindre que les groupes WT dans l'OFT. Un traitement HF rTMS de 5 jours ne semble pas avoir d'impact sur les comportements anxieux des souris WT et Tph2$^{-/-}$.

Dans le cas du MBT, la conclusion concorde avec la littérature déjà existante : le comportement compulsif de souris mutante Tph2$^{-/-}$ est davantage marqué que celui des souris WT et un traitement HF rTMS de 5 jours ne semble avoir aucun effet sur les comportements observés. Pour s'assurer que les manipulations n'apportaient aucuns biais significatifs, une cohorte de souris balancées sexuellement WT (n=8) et Tph2$^{-/-}$ (n=12) a été utilisée pour faire le MBT. Les résultats sans manipulations se sont avérés semblables aux résultats avec manipulations.

Deux études ont été répertoriées dans l'évaluation de comportement compulsif chez des souris Tph2$^{-/-}$. Savelieva *et al*. (2008) observe une différence significative dans le nombre de billes enterrées après 30 minutes, les souris Tph2$^{-/-}$ enterrant en moyenne plus de billes que les WT. Tout comme l'OFT, plusieurs paramètres diffèrent entre Savelieva *et al*. (2008), et cette étude, les conclusions doivent donc être faites avec prudence. Par exemple, la mutation Tph2$^{-/-}$ n'est pas identique à celle de cette étude. Aussi, pour le nombre de billes enterrées par WT et Tph2$^{-/-}$ respectivement, on retrouve dans l'étude de Savelieva *et al*. (2008), une moyenne de ~5 et ~7 billes enterrées comparativement à ~6 et ~11 pour cette étude. Le temps des tests était le même (30 minutes), mais pas le nombre de billes utilisées (25 vs. 20). Les cohortes des deux études étaient balancées sexuellement, mais Savelieva *et al*. (2008), possède un plus grand échantillon avec 34 et 31 souris contre 14 et 14. Les dimensions des cages différaient aussi, 24x18x13 cm pour Savelieva *et al*. (2008), contre 48x26x20 cm pour cette étude. Une bille était considérée comme enterrée si elle était au 2/3 ensevelie pour les 2 études avec un expérimentateur aveugle au génotype et traitement.

La deuxième étude, celle de Jacobsen *et al*. (2012), avec cette fois, des souris ayant la même mutation que cette étude, a observée pour WT et Tph2$^{-/-}$ une moyenne de ~19 et ~23 billes enterrées sur une possibilité de 24 billes en 30 minutes dans une cage de 25x36x18 cm. La taille de l'échantillon était sexuellement balancée avec 8 et 9 individus. Une bille considérée comme enterrée était ensevelie au complet. Malgré tous ces paramètres variables, les souris Tph2$^{-/-}$ semblent avoir une propension générale à enterrer plus de billes que les souris WT, un comportement, qui par le passé, a été proposé comme représentatif de compulsivité. Pour ce qui est de l'effet d'un traitement HF rTMS de 5 jours, cela ne semble pas affecter le comportement des souris WT et Tph2$^{-/-}$.

Dans le cadre de cette étude, on observe que les souris Tph2$^{-/-}$ enterrent un nombre de billes en moyenne plus élevé que les WT. Les manipulations reliées à cette étude ne semblent pas affecter cette tendance. Le génotype Tph2$^{-/-}$ semble démontrer un comportement représentatif de la compulsivité plus élevé que les groupes WT dans le MBT. Un traitement HF rTMS de 5 jours ne semble pas avoir d'impact sur les comportements compulsifs des souris WT et Tph2$^{-/-}$.

Dans le cas du DLET, la conclusion ne concorde pas avec la littérature déjà existante : il ne semble pas y avoir de différence significative dans les comportements anxieux des souris WT et Tph2$^{-/-}$. Pour s'assurer que les manipulations n'apportaient aucuns biais significatifs, une cohorte de souris balancées sexuellement WT (n=10) et Tph2$^{-/-}$ (n=11) a été utilisée pour faire le DLET. Les résultats sans manipulations se sont avérés semblables aux résultats avec manipulations. Toutefois, un

traitement HF rTMS de 5 jours semble avoir un effet anxiogène sur les souris WT dans le temps requis avant le premier passage vers la zone lumineuse.

Une seule étude a évalué le comportement anxieux des souris Tph2$^{-/-}$ au DLET. Beaulieu *et al*. (2008) a enregistré 3 paramètres : le temps requis avant de traverser vers la zone lumineuse pour la première fois, le nombre de passages d'une pièce à l'autre et l'activité dans la zone lumineuse. Dans les trois paramètres, Tph2$^{-/-}$ avait une propension significativement plus grande à prendre plus de temps avant de traverser vers la zone lumineuse pour la première fois, effectuait plus de passage d'une zone à l'autre et avait une activité moindre dans la zone lumineuse que les souris WT. Dans la présente étude, aucun comportement significativement différent n'a été répertorié dans le temps requis avant le passage vers la zone lumineuse, la distance parcourue dans la zone lumineuse, le nombre d'entrées dans la zone lumineuse et le temps passé dans la zone lumineuse entre WT et Tph2$^{-/-}$, même si dans les 4 tests, les souris Tph2$^{-/-}$ contrôles montrent des comportements généralement plus anxieux sans que ce soit significatif. Les différences entre ces deux études sont surprenantes, puisque le même modèle de souris a été utilisé : il a été vérifié que les manipulations n'influençaient pas les comportements, les cohortes étaient sexuellement balancées (sauf le groupe WT contrôle de cette étude qui comprenait 8 mâles et 4 femelles) et les ANOVAs n'ont répertoriées aucune différence significative liée au sexe dans les 4 paramètres évalués et le test durait 5 minutes pour chaque étude. Une différence pouvant expliquer cette contradiction dans les résultats est la luminosité de la zone éclairée du test. La luminosité de la zone éclairée dans le DLET de Beaulieu *et al*. (2008) n'est pas spécifiée tandis que celle de cette étude n'a pas été enregistrée systématiquement, sauf pour les dernières cohortes où une luminosité de 700 lux a été utilisée. Le lux est une mesure sensible, il est facile d'avoir une différence 200-300 lux sans que cela soit visible pour l'œil humain, mais peut-être cette différence est-elle significativement perçue par une souris qui montrera des signes d'anxiété moindre si luminosité est de 500 lux contre 700. Le fait de n'avoir mesuré la luminosité du test que sur le tard peut certainement avoir joué un rôle dans les résultats et pourrait même expliquer la différence dans les comportements observés si Beaulieu utilisait une luminosité moindre de 500-600 lux pouvant affecter le comportement des souris. Une autre source d'erreur potentielle provient du fait que les souris proviennent de deux animaleries à environnement différent. À mi-chemin de l'étude, un test de t a été fait pour évaluer s'il y avait des différences comportementales entre les individus provenant des 2 animaleries différentes, mais rien de significatif n'a été relevé. Dans le futur, augmenter la taille des cohortes et faire des ANOVAs pour vérifier si en plus du sexe et du traitement/génotype, l'animalerie peut changer significativement la réponse des souris aux tests serait une possibilité, mais avec les données actuelles, les groupes étaient trop petits.

Un autre facteur pouvant engendrer un biais réside dans l'injection quotidienne des souris. Au départ, l'équipe voulait évaluer le rôle du HDACi et les premières cohortes ont été manipulées en ce sens.

L'idée a été abandonnée quelques cohortes plus tard, mais par souci d'uniformité, les souris ont continué à être injectées à la saline. Il se peut que les injections quotidiennes ont joué un rôle et venues perturber le comportement des souris dans les tests. Il est néanmoins peu probable que ce soit le cas, puisque les cohortes à la base sans manipulations, donc sans injection, affichaient les mêmes résultats que les cohortes manipulées.

Aussi, les mâles étaient hébergés en solitaire, alors que les femelles étaient hébergées en groupe, même si les femelles Tph2$^{-/-}$ peuvent être assez agressives entre elles. Dans le futur, héberger les souris en solitaire, peu importe le sexe, pourrait peut-être aider à diminuer les interférences observées dans les résultats.

Pour ce qui est de l'effet d'un traitement HF rTMS de 5 jours sur les génotypes WT et Tph2$^{-/-}$, la stimulation à haute fréquence à un effet significativement anxiogène sur les souris WT dans le temps requis avant le premier passage vers la zone lumineuse comparativement au contrôle. Cette tendance est aussi observée dans les 3 autres paramètres, sans toutefois être significative. Même tendance non-significative chez les souris Tph2$^{-/-}$ stimulées, mais inverse cette fois, alors que la HF rTMS semble avoir un effet anxiolytique sur Tph2$^{-/-}$ stimulé comparativement au contrôle.

Dans le cadre de cette étude, on observe que les souris Tph2$^{-/-}$ ont un comportement anxieux similaire au WT. Les manipulations reliées à cette étude ne semblent pas affecter cette tendance, quoiqu'elle aille à l'encontre des conclusions de Beaulieu *et al*. (2008). En effet, dans le DLET chez les groupes placebo, les souris WT entraient dans la pièce illuminée significativement plus rapidement et montraient une activité dans la pièce illuminée significativement plus grande que les souris Tph2$^{-/-}$ dans l'étude de Beaulieu *et al*. (2008), tandis que dans cette étude, même si les souris WT semblent montrer une tendance comportementale moins anxieuse que les Tph2$^{-/-}$, aucun résultat n'est significatif même si l'échantillonnage est plus grand dans cette étude. De plus, un traitement HF rTMS de 5 jours semble avoir un effet anxiogène significatif sur les souris WT et une tendance anxiolytique non significative chez Tph2$^{-/-}$.

À la lumière de tous ces paramètres variables entre les études, il va sans dire que la méthodologie joue un rôle primordial dans l'obtention des résultats d'un traitement rTMS. Au même moment où O'Reardon et collègues (2017) menait leur étude qui allait mener à l'approbation de la FDA du traitement rTMS comme antidépresseur, une étude allemande et autrichienne arrivait à des résultats différents (aucune différence significative entre traitement et placebo) (Herwig *et al*., 2007). Les deux études stimulaient à la même fréquence (10Hz) et au même endroit (DLPFC. Néanmoins, quelques détails différaient comme la durée du train (4 sec. vs 2 sec.), l'intervalle entre les trains (26 sec. vs.

8 secs) et la durée totale d'une séance (37,5 min vs. 16,6 min). Il faut donc user de prudence lorsque vient le temps de comparer des résultats provenant de plusieurs études ayant eu des conclusions différentes et porter une attention particulière à la méthodologie.

Il se peut que la durée du traitement n'était pas adéquate pour observer des changements comportementaux chez Tph2$^{-/-}$. En effet, sur modèle humain, pour observer des résultats significatifs dans le traitement de la MDD, il est conseillé qu'un traitement rTMS devrait durer au moins de 3 à 6 semaines (George *et al*., 2013).

Dans une optique plus générale, l'absence d'effet d'un traitement HF rTMS de 5 jours sur les souris Tph2$^{-/-}$ pourrait provenir de la zone de stimulation. En effet, on observe dans les études humaines qu'un traitement HF rTMS appliqué sur le côté gauche du DLPFC, une région considérée comme hypoactive dans la dépression, avait un effet antidépresseur. Au contraire, un traitement rTMS à basse fréquence (LF rTMS) appliqué sur le côté droit du DLPFC, une région considérée comme hyperactive dans la dépression, avait un effet antidépresseur. Une hypothèse expliquant l'absence de différences chez les souris pourrait provenir du fait que la stimulation se faisait sur l'entièreté du cortex frontal à haute fréquence. Peut-être l'effet combiné de la stimulation du cortex frontal gauche et droit s'annulait entre eux. Néanmoins, des études de stimulation bilatérale sur humains dans le cadre de la dépression ont été effectuées avec des conclusions différentes : une étude observait des résultats supérieurs avec une stimulation bilatérale, 4 études observaient des résultats égaux et 2 autres études arrivaient à des résultats inférieurs (Lefaucheur, 2014).

Au final, au niveau comportemental, le modèle de souris déficitaires en sérotonine utilisée dans cette étude semble être un bon modèle d'évaluation de la compulsivité dans la tendance aux souris Tph2$^{-/-}$ d'enterrer plus de billes pendant le MBT. La souris Tph2$^{-/-}$ ne semble toutefois pas être un indicateur de comportement anxieux dans ces circonstances vu l'absence de différences observées dans l'OFT et le DLET. Dans le passé, un modèle de souris déficitaires en sérotonine similaire à celui utilisé dans cette étude a rapporté des résultats significatifs de comportements liés à la dépression lors du FST (Mosienko *et al*., 2012). Le but visé de la souris mutante à l'allèle R439H Tph2$^{-/-}$ est de simuler une condition humaine équivalente rare (R441H) retrouvée chez une cohorte d'individus souffrant de TRD et d'une cohorte d'adolescents souffrant d'OCD (Zill *et al*., 2004; Zhang *et al*., 2005; Mössner *et al*., 2006). Les souris déficitaires en sérotonine Tph2$^{-/-}$ affichent des comportements de dépression (Mosienko *et al*., 2012) et de compulsivité dans ce projet de recherche ainsi que dans les études de Savelieva *et al*. (2008), et de Jacobsen *et al*. (2012) : l'utilisation de telles souris dans la recherche sur la TRD et l'OCD peut donc s'avérer pertinente. Outre la différence entre les deux génotypes contrôles, un traitement HF rTMS de 5 jours semble avoir un effet négligeable sur le comportement des souris WT et Tph2$^{-/-}$. Ce type de traitement ne semble pas avoir d'impact dans les comportements

locomoteurs et de compulsivité. Une tendance anxiolytique non significative est néanmoins observée chez les souris Tph2$^{-/-}$ dans les paramètres anxieux et une tendance anxiogène non significative dans la majorité des paramètres chez les souris WT.

5. CONCLUSION

En ciblant non invasivement les fonctions corticales de certaines parties du cerveau et leurs circuits neuronaux spécifiques, la rTMS représente une approche de plus en plus accessible et prometteuse pouvant mener à une modification de l'excitabilité de certaines régions cérébrales et engendrant des effets secondaires limités. Bien que la rTMS soit un traitement reconnu de la MDD/TRD, son mécanisme d'action sur le substrat neurobiologique demeure en grande partie inconnu. Dans ce projet, nous avons voulu évaluer les effets d'un traitement HF rTMS quotidien de 5 jours sur l'expression des gènes et son potentiel effet sur le comportement de souris modèles de la TRD ayant un déficit en sérotonine dû à l'absence de l'enzyme de synthèse Tph2. Le volet moléculaire n'a pu être complété en raison de circonstances logistiques et temporelles. Au niveau comportemental, ce traitement n'a eu aucun effet significatif sur les comportements d'anxiété et de compulsivité en comparaison avec les groupes contrôles Tph2$^{-/-}$ non stimulés. Les souris Tph2$^{-/-}$ non stimulées en comparaison avec le groupe WT ont néanmoins confirmé être un modèle de compulsivité dans le MBT, mais pas dans les comportements d'anxiété (OFT-DLET). Même si aucune différence dans le comportement n'a été observée chez Tph2$^{-/-}$, il est toutefois possible qu'un traitement HF rTMS ait engendré des modifications dans l'expression de certains gènes comme l'ont observés Etiévant *et al*. (2015), mais pas au point d'apporter des modifications comportementales. Peut-être l'observation de différences comportementales nécessite une plus grande durée exposition à la HF rTMS, mais en ce qui a trait aux conclusions de ce projet, les questionnements entourant le fonctionnement de la rTMS et ses effets sur le substrat moléculaire des souris Tph2$^{-/-}$ restent entiers.

BIBLIOGRAPHIE

Baeken, C., De Raedt, R., Bossuyt, A., Van Hove, C., Mertens, J., Dobbeleir, A., ... & Goethals, I. (2011). The impact of HF-rTMS treatment on serotonin 2A receptors in unipolar melancholic depression. *Brain Stimulation*, *4*(2), 104-111.

Beaulieu, J. M., Zhang, X., Rodriguiz, R. M., Sotnikova, T. D., Cools, M. J., Wetsel, W. C., ... & Caron, M. G. (2008). Role of GSK3β in behavioral abnormalities induced by serotonin deficiency. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, *105*(4), 1333-1338.

Ben-Shachar, D., Gazawi, H., Riboyad-Levin, J., & Klein, E. (1999). Chronic repetitive transcranial magnetic stimulation alters β-adrenergic and 5-HT 2 receptor characteristics in rat brain. *Brain Research*, *816*(1), 78-83.

Berlim, M. T., Neufeld, N. H., & Van den Eynde, F. (2013). Repetitive transcranial magnetic stimulation (rTMS) for obsessive–compulsive disorder (OCD): An exploratory meta-analysis of randomized and sham-controlled trials. *Journal of Psychiatric Research*, *47*(8), 999-1006.

Berlim, M. T., Van den Eynde, F., Tovar-Perdomo, S., & Daskalakis, Z. J. (2014). Response, remission and drop-out rates following high-frequency repetitive transcranial magnetic stimulation (rTMS) for treating major depression: a systematic review and meta-analysis of randomized, double-blind and sham-controlled trials. *Psychological Medicine*, *44*(02), 225-239.

Berton, O., & Nestler, E. J. (2006). New approaches to antidepressant drug discovery: beyond monoamines. *Nature Reviews Neuroscience*, *7*(2), 137-151.

Bibb, J. A., Chen, J., Taylor, J. R., Svenningsson, P., Nishi, A., Snyder, G. L., ... & Nestler, E. J. (2001). Effects of chronic exposure to cocaine are regulated by the neuronal protein Cdk5. *Nature*, *410*(6826), 376-380.

Blier, P., & de Montigny, C. (1998). Possible serotonergic mechanisms underlying the antidepressant and anti-obsessive–compulsive disorder responses. *Biological Psychiatry*, *44*(5), 313-323.

Bocchio-Chiavetto, L., Miniussi, C., Zanardini, R., Gazzoli, A., Bignotti, S., Specchia, C., & Gennarelli, M. (2008). 5-HTTLPR and BDNF Val66Met polymorphisms and response to rTMS treatment in drug resistant depression. *Neuroscience Letters*, *437*(2), 130-134.

Bonasera, S. J., & Tecott, L. H. (2000). Mouse models of serotonin receptor function: toward a genetic dissection of serotonin systems. *Pharmacology & Therapeutics*, *88*(2), 133-142.

Brown, S. M., Peet, E., Manuck, S. B., Williamson, D. E., Dahl, R. E., Ferrell, R. E., & Hariri, A. R. (2005). A regulatory variant of the human tryptophan hydroxylase-2 gene biases amygdala reactivity. *Molecular Psychiatry*, *10*(9), 884-888.

Burt, T., Lisanby, S. H., & Sackeim, H. A. (2002). Neuropsychiatric applications of transcranial magnetic stimulation: a meta analysis. *International Journal of Neuropsychopharmacology*, *5*(1), 73-103.

Challis, C., & Berton, O. (2015). Top-down control of serotonin systems by the prefrontal cortex: A path toward restored socioemotional function in depression. *ACS Chemical Neuroscience*, *6*(7), 1040-1054.

Chen, J., Zhang, Y., Kelz, M. B., Steffen, C., Ang, E. S., Zeng, L., & Nestler, E. J. (2000). Induction of cyclin-dependent kinase 5 in the hippocampus by chronic electroconvulsive seizures: role of ΔFosB. *Journal of Neuroscience*, *20*(24), 8965-8971.

Cirillo G, Di Pino G, Capone F, Ranieri F, Florio L, Todisco V, Tedeschi G, Funke K, Di Lazzaro V, Neurobiological after-effects of non-invasive brain stimulation, *Brain Stimulation* (2016), doi: 10.1016/j.brs.2016.11.009.

Cohen, H., Kaplan, Z., Kotler, M., Kouperman, I., Moisa, R., & Grisaru, N. (2004). Repetitive transcranial magnetic stimulation of the right dorsolateral prefrontal cortex in posttraumatic stress disorder: a double-blind, placebo-controlled study. *American Journal of Psychiatry*, *161*(3), 515-524.

Conca, A., Koppi, S., König, P., Swoboda, E., & Krecke, N. (1996). Transcranial magnetic stimulation: a novel antidepressive strategy? *Neuropsychobiology*, *34*(4), 204-207.

Crawley, J., & Goodwin, F. K. (1980). Preliminary report of a simple animal behavior model for the anxiolytic effects of benzodiazepines. *Pharmacology Biochemistry and Behavior*, *13*(2), 167-170.

Crawley, J. N. (1981). Neuropharmacologic specificity of a simple animal model for the behavioral actions of benzodiazepines. *Pharmacology Biochemistry and Behavior*, *15*(5), 695-699.

Cruz, A. P. M., Frei, F., & Graeff, F. G. (1994). Ethopharmacological analysis of rat behavior on the elevated plus-maze. *Pharmacology Biochemistry and Behavior*, *49*(1), 171-176.

Cryan, J. F., & Holmes, A. (2005). The ascent of mouse: advances in modelling human depression and anxiety. *Nature Reviews Drug Discovery*, *4*(9), 775-790.

D'Arsonval, A. (1896). Dispositifs pour la mesure des courants alternatifs de toutes fréquences. *CR Soc Biol (Paris)*, *2*, 450-451.

Dierckx, B., Heijnen, W. T., van den Broek, W. W., & Birkenhäger, T. K. (2012). Efficacy of electroconvulsive therapy in bipolar versus unipolar major depression: a meta-analysis. *Bipolar Disorders*, *14*(2), 146-150.

Drevets, W. C. (2000). Neuroimaging studies of mood disorders. *Biological Psychiatry*, *48*(8), 813-829.

Dunlop, K., Hanlon, C. A., & Downar, J. (2016). Noninvasive brain stimulation treatments for addiction and major depression. *Annals of the New York Academy of Sciences,* 1-24.

Erhardt, A., Sillaber, I., Welt, T., Müller, M. B., Singewald, N., & Keck, M. E. (2004). Repetitive transcranial magnetic stimulation increases the release of dopamine in the nucleus accumbens shell of morphine-sensitized rats during abstinence. *Neuropsychopharmacology*, *29*(11), 2074.

Etiévant, A., Manta, S., Latapy, C., Magno, L. A. V., Fecteau, S., & Beaulieu, J. M. (2015). Repetitive transcranial magnetic stimulation induces long-lasting changes in protein expression and histone acetylation. *Scientific Reports*, *5*.

Fava, M. (2003). Diagnosis and definition of treatment-resistant depression. *Biological Psychiatry*, *53*(8), 649-659.

Ferrari, A. J., Charlson, F. J., Norman, R. E., Patten, S. B., Freedman, G., Murray, C. J., ... & Whiteford, H. A. (2013). Burden of depressive disorders by country, sex, age, and year: findings from the global burden of disease study 2010. *PLoS Med*, *10*(11), e1001547.

Fleischmann, A., Prolov, K., Abarbanel, J., & Belmaker, R. H. (1995). The effect of transcranial magnetic stimulation of rat brain on behavioral models of depression. *Brain Research*, *699*(1), 130-132.

Fox, M. D., Buckner, R. L., White, M. P., Greicius, M. D., & Pascual-Leone, A. (2012). Efficacy of transcranial magnetic stimulation targets for depression is related to intrinsic functional connectivity with the subgenual cingulate. *Biological Psychiatry, 72*(7), 595-603.

Funke, K., & Benali, A. (2011). Modulation of cortical inhibition by rTMS–findings obtained from animal models. *The Journal of Physiology*, *589*(18), 4423-4435.

Gaynes, B. N., Lloyd, S. W., Lux, L., Gartlehner, G., Hansen, R. A., Brode, S., ... & Lohr, K. N. (2014). Repetitive transcranial magnetic stimulation for treatment-resistant depression: a systematic review and meta-analysis. *The Journal of Clinical Psychiatry, 75*(5), 477-489.

Ketter, T. A., & Post, R. M. (1994). Prefrontal cortex dysfunction in clinical depression. *Depression*, *2*(2), 59-72.

George, M. S., Wassermann, E. M., Williams, W. A., Callahan, A., Ketter, T. A., Basser, P., … & Post, R. M. (1995). Daily repetitive transcranial magnetic stimulation (rTMS) improves mood in depression. *Neuroreport*, *6*(14), 1853-1856.

George, M. S., & Aston-Jones, G. (2010). Noninvasive techniques for probing neurocircuitry and treating illness: vagus nerve stimulation (VNS), transcranial magnetic stimulation (TMS) and transcranial direct current stimulation (tDCS). *Neuropsychopharmacology*, *35*(1), 301-316.

George, M. S., Lisanby, S. H., Avery, D., McDonald, W. M., Durkalski, V., Pavlicova, M., ... & Holtzheimer, P. E. (2010). Daily left prefrontal transcranial magnetic stimulation therapy for major depressive disorder: a sham-controlled randomized trial. *Archives of General Psychiatry*, *67*(5), 507-516.

George, M. S., Taylor, J. J., & Short, E. B. (2013). The expanding evidence base for rTMS treatment of depression. *Current Opinion in Psychiatry*, *26*(1), 13.

Gorelick, D. A., Zangen, A., & George, M. S. (2014). Transcranial magnetic stimulation in the treatment of substance addiction. *Annals of the New York Academy of Sciences*, *1327*(1), 79-93.

Gur, E., Lerer, B., Dremencov, E., & Newman, M. E. (2000). Chronic repetitive transcranial magnetic stimulation induces subsensitivity of presynaptic serotonergic autoreceptor activity in rat brain. *Neuroreport*, *11*(13), 2925-2929.

Hallett, M. (2007). Transcranial magnetic stimulation: a primer. *Neuron*, *55*(2), 187-199.

Hamada, M., Ugawa, Y., & Tsuji, S. (2008). High-frequency rTMS over the supplementary motor area for treatment of Parkinson's disease. *Movement Disorders*, *23*(11), 1524-1531.

Herwig, U., Fallgatter, A. J., HÖPPNER, J., Eschweiler, G. W., Kron, M., HAJAK, G., ... & Grossheinrich, N. (2007). Antidepressant effects of augmentative transcranial magnetic stimulation. *The British Journal of Psychiatry, 191*(5), 441-448.

Höflich, G., Kasper, S., Hufnagel, A., Ruhrmann, S., & Möller, H. J. (1993). Application of transcranial magnetic stimulation in treatment of drug-resistant major depression—a report of two cases. *Human Psychopharmacology: Clinical and Experimental*, *8*(5), 361-365.

Jacobsen, J. P. R., Siesser, W. B., Sachs, B. D., Peterson, S., Cools, M. J., Setola, V., ... & Caron, M. G. (2012). Deficient serotonin neurotransmission and depression-like serotonin biomarker

alterations in tryptophan hydroxylase 2 (Tph2) loss-of-function mice. *Molecular Psychiatry*, *17*(7), 694-704.

Jelovac, A., Kolshus, E., & McLoughlin, D. M. (2013). Relapse following successful electroconvulsive therapy for major depression: a meta-analysis. *Neuropsychopharmacology*, *38*(12), 2467-2474.

Kanno, M., Matsumoto, M., Togashi, H., Yoshioka, M., & Mano, Y. (2003). Effects of repetitive transcranial magnetic stimulation on behavioral and neurochemical changes in rats during an elevated plus-maze test. *Journal of the Neurological Sciences*, *211*(1), 5-14.

Kemp, A., & Manahan-Vaughan, D. (2005). The 5-hydroxytryptamine4 receptor exhibits frequency-dependent properties in synaptic plasticity and behavioural metaplasticity in the hippocampal CA1 region in vivo. *Cerebral Cortex*, *15*(7), 1037-1043.

Kendler, K. S. (2001). Twin studies of psychiatric illness: an update. *Archives of General Psychiatry*, *58*(11), 1005-1014.

Kennedy, S. H., Milev, R., Giacobbe, P., Ramasubbu, R., Lam, R. W., Parikh, S. V., ... & Ravindran, A. V. (2009). Canadian Network for Mood and Anxiety Treatments (CANMAT) Clinical guidelines for the management of major depressive disorder in adults.: IV. Neurostimulation therapies. *Journal of Affective Disorders*, *117*, S44-S53.

Kessler, R. C., Berglund, P., Demler, O., Jin, R., Koretz, D., Merikangas, K. R., ... & Wang, P. S. (2003). The epidemiology of major depressive disorder: results from the National Comorbidity Survey Replication (NCS-R). *Jama*, *289*(23), 3095-3105.

Khedr, E. M., Kotb, H., Kamel, N. F., Ahmed, M. A., Sadek, R., & Rothwell, J. C. (2005a). Longlasting antalgic effects of daily sessions of repetitive transcranial magnetic stimulation in central and peripheral neuropathic pain. *Journal of Neurology, Neurosurgery & Psychiatry*, *76*(6), 833-838.

Khedr, E. M., Ahmed, M. A., Fathy, N., & Rothwell, J. C. (2005b). Therapeutic trial of repetitive transcranial magnetic stimulation after acute ischemic stroke. *Neurology*, *65*(3), 466-468.

Kim, E. J., Kim, W. R., Chi, S. E., Lee, K. H., Park, E. H., Chae, J. H., ... & Choi, J. S. (2006). Repetitive transcranial magnetic stimulation protects hippocampal plasticity in an animal model of depression. *Neuroscience Letters*, *405*(1), 79-83.

Kornberg, R. D., & Lorch, Y. (1999). Twenty-five years of the nucleosome, fundamental particle of the eukaryote chromosome. *Cell*, *98*(3), 285-294.

Lai, K. O., & Ip, N. Y. (2009). Recent advances in understanding the roles of Cdk5 in synaptic plasticity. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Molecular Basis of Disease*, *1792*(8), 741-745.

Lefaucheur, J. P., André-Obadia, N., Antal, A., Ayache, S. S., Baeken, C., Benninger, D. H., ... & Devanne, H. (2014). Evidence-based guidelines on the therapeutic use of repetitive transcranial magnetic stimulation (rTMS). *Clinical Neurophysiology*, *125*(11), 2150-2206.

Lenz, M., Müller-Dahlhaus, F., & Vlachos, A. (2016). Cellular and Molecular Mechanisms of rTMS-induced Neural Plasticity. In *Therapeutic rTMS in Neurology* (pp. 11-22). Springer International Publishing.

Li, J., Guo, Y., Schroeder, F. A., Youngs, R. M., Schmidt, T. W., Ferris, C., ... & Akbarian, S. (2004). Dopamine D2-like antagonists induce chromatin remodeling in striatal neurons through cyclic AMP-protein kinase A and NMDA receptor signaling. *Journal of Neurochemistry*, *90*(5), 1117-1131.

Lisanby, S. H., Husain, M. M., Rosenquist, P. B., Maixner, D., Gutierrez, R., Krystal, A., ... & Canterbury, R. (2009). Daily left prefrontal repetitive transcranial magnetic stimulation in the acute treatment of major depression: clinical predictors of outcome in a multisite, randomized controlled clinical trial. *Neuropsychopharmacology*, *34*(2), 522-534.

Lisanby, S. H., & Belmaker, R. H. (2000). Animal models of the mechanisms of action of repetitive transcranial magnetic stimulation (RTMS): Comparisons with electroconvulsive shock (ECS). *Depression and Anxiety*, *12*(3), 178-187.

Luger, K., & Richmond, T. J. (1998). The histone tails of the nucleosome. *Current Opinion in Genetics & Development*, *8*(2), 140-146.

Ma, J., Zhang, Z., Su, Y., Kang, L., Geng, D., Wang, Y., ... & Cui, H. (2013). Magnetic stimulation modulates structural synaptic plasticity and regulates BDNF–TrkB signal pathway in cultured hippocampal neurons. *Neurochemistry International*, *62*(1), 84-91.

Maeda, F., Keenan, J. P., Tormos, J. M., Topka, H., & Pascual-Leone, A. (2000). Interindividual variability of the modulatory effects of repetitive transcranial magnetic stimulation on cortical excitability. *Experimental Brain Research*, *133*(4).

Mann, J. J. (1999). Role of the serotonergic system in the pathogenesis of major depression and suicidal behavior. *Neuropsychopharmacology*, *21*, 99S-105S.

Mayberg, H. S., Lozano, A. M., Voon, V., McNeely, H. E., Seminowicz, D., Hamani, C., ... & Kennedy, S. H. (2005). Deep brain stimulation for treatment-resistant depression. *Neuron*, *45*(5), 651-660.

Melas, P. A., Rogdaki, M., Lennartsson, A., Björk, K., Qi, H., Witasp, A., ... & Lavebratt, C. (2012). Antidepressant treatment is associated with epigenetic alterations in the promoter of P11 in a genetic model of depression. *International Journal of Neuropsychopharmacology*, *15*(5), 669-679.

Merton, P. A., & Morton, H. B. (1980). Stimulation of the cerebral cortex in the intact human subject. *Nature*, *285*(5762), 227-227.

Mosienko, V., Bert, B., Beis, D., Matthes, S., Fink, H., Bader, M., & Alenina, N. (2012). Exaggerated aggression and decreased anxiety in mice deficient in brain serotonin. *Translational Psychiatry*, *2*(5), e122.

Mössner, R., Walitza, S., Geller, F., Scherag, A., Gutknecht, L., Jacob, C., ... & Fleischhaker, C. (2006). Transmission disequilibrium of polymorphic variants in the tryptophan hydroxylase-2 gene in children and adolescents with obsessive–compulsive disorder. *International Journal of Neuropsychopharmacology*, *9*(4), 437-442.

Müller, M. B., Toschi, N., Kresse, A. E., Post, A., & Keck, M. E. (2000). Long-term repetitive transcranial magnetic stimulation increases the expression of brain-derived neurotrophic factor and cholecystokinin mRNA, but not neuropeptide tyrosine mRNA in specific areas of rat brain. Neuropsychopharmacology, 23(2), 205-215.

Müller-Dahlhaus, F., & Vlachos, A. (2013). Unraveling the cellular and molecular mechanisms of repetitive magnetic stimulation. *Frontiers in Molecular Neuroscience*, *6*, 50.

Nicolas, L. B., Kolb, Y., & Prinssen, E. P. (2006). A combined marble burying–locomotor activity test in mice: a practical screening test with sensitivity to different classes of anxiolytics and antidepressants. *European Journal of Pharmacology*, *547*(1), 106-115.

Nemeroff, C. B. (2007). Prevalence and management of treatment-resistant depression. *Journal of Clinical Psychiatry*, *68*(8), 17.

Normann, C., & Clark, K. (2005). Selective modulation of Ca 2+ influx pathways by 5-HT regulates synaptic long-term plasticity in the hippocampus. *Brain Research*, *1037*(1), 187-193.

O'Reardon, J. P., Solvason, H. B., Janicak, P. G., Sampson, S., Isenberg, K. E., Nahas, Z., ... & Demitrack, M. A. (2007). Efficacy and safety of transcranial magnetic stimulation in the acute treatment of major depression: a multisite randomized controlled trial. *Biological Psychiatry*, *62*(11), 1208-1216.

Owens, M. J., & Nemeroff, C. B. (1994). Role of serotonin in the pathophysiology of depression: focus on the serotonin transporter. *Clinical Chemistry*, *40*(2), 288-295.

Pascual-Leone, A., Rubio, B., Pallardó, F., & Catalá, M. D. (1996). Rapid-rate transcranial magnetic stimulation of left dorsolateral prefrontal cortex in drug-resistant depression. *The Lancet*, *348*(9022), 233-237.

Pell, G. S., Roth, Y., & Zangen, A. (2011). Modulation of cortical excitability induced by repetitive transcranial magnetic stimulation: influence of timing and geometrical parameters and underlying mechanisms. *Progress in Neurobiology*, *93*(1), 59-98.

Pellow, S., Chopin, P., File, S. E., & Briley, M. (1985). Validation of open: closed arm entries in an elevated plus-maze as a measure of anxiety in the rat. *Journal of Neuroscience Methods*, *14*(3), 149-167.

Pellow, S., & File, S. E. (1986). Anxiolytic and anxiogenic drug effects on exploratory activity in an elevated plus-maze: a novel test of anxiety in the rat. *Pharmacology Biochemistry and Behavior*, *24*(3), 525-529.

Porsolt, R. D., Anton, G., Blavet, N., & Jalfre, M. (1978). Behavioural despair in rats: a new model sensitive to antidepressant treatments. *European Journal of Pharmacology*, *47*(4), 379-391.

Rocha, F. L., Fuzikawa, C., Riera, R., & Hara, C. (2012). Combination of antidepressants in the treatment of major depressive disorder: a systematic review and meta-analysis. *Journal of Clinical Psychopharmacology*, *32*(2), 278-281.

Rossi, S., Hallett, M., Rossini, P. M., Pascual-Leone, A., & Safety of TMS Consensus Group. (2009). Safety, ethical considerations, and application guidelines for the use of transcranial magnetic stimulation in clinical practice and research. *Clinical Neurophysiology*, *120*(12), 2008-2039.

Roth, Y., Zangen, A., & Hallett, M. (2002). A coil design for transcranial magnetic stimulation of deep brain regions. *Journal of Clinical Neurophysiology*, *19*(4), 361-370.

Rush, A. J., Trivedi, M. H., Wisniewski, S. R., Nierenberg, A. A., Stewart, J. W., Warden, D., ... & McGrath, P. J. (2006). Acute and longer-term outcomes in depressed outpatients requiring one or several treatment steps: a STAR* D report. *American Journal of Psychiatry*, *163*(11), 1905-1917.

Salling, M. C. & Martinez, D. Brain Stimulation in Addiction. *Neuropsychopharmacology* accepted article preview 31 May 2016; doi: 10.1038/npp.2016.80.

Savelieva, K. V., Zhao, S., Pogorelov, V. M., Rajan, I., Yang, Q., Cullinan, E., & Lanthorn, T. H. (2008). Genetic disruption of both tryptophan hydroxylase genes dramatically reduces serotonin and affects behavior in models sensitive to antidepressants. *PloS one*, *3*(10), e3301.

Schroeder, F. A., Penta, K. L., Matevossian, A., Jones, S. R., Konradi, C., Tapper, A. R., & Akbarian, S. (2008). Drug-induced activation of dopamine D1 receptor signaling and inhibition of class I/II

histone deacetylase induce chromatin remodeling in reward circuitry and modulate cocaine-related behaviors. *Neuropsychopharmacology*, *33*(12), 2981-2992.

Speer, A. M., Kimbrell, T. A., Wassermann, E. M., Repella, J. D., Willis, M. W., Herscovitch, P., & Post, R. M. (2000). Opposite effects of high and low frequency rTMS on regional brain activity in depressed patients. *Biological Psychiatry*, *48*(12), 1133-1141.

Strahl, B. D., & Allis, C. D. (2000). The language of covalent histone modifications. *Nature*, *403*(6765), 41-45.

Teixeira, R. M., Santos, A. R., Ribeiro, S. J., Calixto, J. B., Rae, G. A., & De Lima, T. C. (1996). Effects of central administration of tachykinin receptor agonists and antagonists on plus-maze behavior in mice. *European Journal of Pharmacology*, *311*(1), 7-14.

Tsankova, N., Renthal, W., Kumar, A., & Nestler, E. J. (2007). Epigenetic regulation in psychiatric disorders. *Nature Reviews Neuroscience*, *8*(5), 355-367.

Tsien, J. Z. (2000). Building a brainier mouse. *Scientific American*, *282*(4), 62-68.

Verhagen, M., van der Meij, A., Janzing, J. G., Arias-Vásquez, A., Buitelaar, J. K., & Franke, B. (2009). Effect of the 5-HTTLPR polymorphism in the serotonin transporter gene on major depressive disorder and related comorbid disorders. *Psychiatric Genetics*, *19*(1), 39-44.

Walther, D. J., Peter, J. U., Bashammakh, S., Hörtnagl, H., Voits, M., Fink, H., & Bader, M. (2003). Synthesis of serotonin by a second tryptophan hydroxylase isoform. *Science*, *299*(5603), 76-76.

Weissman, J. D., Epstein, C. M., & Davey, K. R. (1992). Magnetic brain stimulation and brain size: relevance to animal studies. *Electroencephalography and Clinical Neurophysiology/Evoked Potentials Section*, *85*(3), 215-219.

Xie, Z., Sanada, K., Samuels, B. A., Shih, H., & Tsai, L. H. (2003). Serine 732 phosphorylation of FAK by Cdk5 is important for microtubule organization, nuclear movement, and neuronal migration. *Cell*, *114*(4), 469-482.

Yao, W. D., Gainetdinov, R. R., Arbuckle, M. I., Sotnikova, T. D., Cyr, M., Beaulieu, J. M., ... & Caron, M. G. (2004). Identification of PSD-95 as a regulator of dopamine-mediated synaptic and behavioral plasticity. *Neuron*, *41*(4), 625-638.

Yoshioka, M., Matsumoto, M., Togashi, H., & Saito, H. (1995). Effects of conditioned fear stress on 5-HT release in the rat prefrontal cortex. *Pharmacology Biochemistry and Behavior*, *51*(2), 515-519.

Yue, L., Xiao-lin, H., & Tao, S. (2009). The effects of chronic repetitive transcranial magnetic stimulation on glutamate and gamma-aminobutyric acid in rat brain. *Brain Research*, *1260*, 94-99.

Zhang, X., Gainetdinov, R. R., Beaulieu, J. M., Sotnikova, T. D., Burch, L. H., Williams, R. B., ... & Caron, M. G. (2005). Loss-of-function mutation in tryptophan hydroxylase-2 identified in unipolar major depression. *Neuron*, *45*(1), 11-16.

Zill, P., Baghai, T. C., Zwanzger, P., Schüle, C., Eser, D., Rupprecht, R., ... & Ackenheil, M. S. N. P. (2004). SNP and haplotype analysis of a novel tryptophan hydroxylase isoform (TPH2) gene provide evidence for association with major depression. *Molecular Psychiatry*, *9*(11), 1030-1036.

Zyss, T. (1992). Will electroconvulsive therapy induce seizures: magnetic brain stimulation as hypothesis of a new psychiatric therapy. *Psychiatria Polska*, *26*(6), 531.

Zyss, T., Górka, Z., Kowalska, M., & Vetulani, J. (1997). Preliminary comparison of behavioral and biochemical effects of chronic transcranial magnetic stimulation and electroconvulsive shock in the rat. *Biological Psychiatry*, *42*(10), 920-924.

Zyss, T., Mamczarz, J., & Vetulani, J. (1999). The influence of rapid-rate transcranial magnetic stimulation (rTMS) parameters on rTMS effects in Porsolt's forced swimming test. *International Journal of Neuropsychopharmacology*, *2*(1), 31-34.