

UNIVERSITÉ DE NANTES
FACULTÉ DE MÉDECINE

ÉCOLE DOCTORALE • CHIMIE BIOLOGIE

N° attribué par la bibliothèque

Année 2006

0 | 6 | N | A | N | T | 1 | 8 | V | S |

RÔLE DES SYSTÈMES NORADRÉNERGIQUE ET
GABAÉRGIQUE DANS L'ACTIVITÉ DE TYPE
ANXIOLYTIQUE LIÉE AUX RÉCEPTEURS 5-HT₂
DANS LE TEST DES QUATRE PLAQUES CHEZ LA
SOURIS

THESE DE DOCTORAT

Discipline : Médecine

Spécialité : Neuropsychopharmacologie

Présentée

et soutenue publiquement par

Fabienne MASSÉ

Le 5 octobre 2006, devant le jury ci-dessous

Président M. SPEDDING Michael, *Directeur des Sciences Expérimentales • SERVIER,*
Paris

Rapporteurs Mme BELZUNG Catherine, *Professeur de Pharmacologie • Université de*
Tours

M. JAFFARD Robert, *Professeur • Université de Bordeaux*
Examineur Mme FONTAINE-PERUS Josiane, *Directeur de Recherche • CNRS, Nantes*

Directeur de Thèse : M. BOURIN Michel, *Professeur en Pharmacologie • Université*
de Nantes

Mme. HASCOËT-LE CLEACH Martine, *Docteur en*
Pharmacologie, HDR, Université de Nantes

SOMMAIRE

| | |
|---|-----------|
| 1 INTRODUCTION..... | 7 |
| 1.1 PROBLEMATIQUE..... | 8 |
| 1.2 MODELES ANIMAUX DE L'ANXIETE..... | 12 |
| 1.2.1 Le test des quatre plaques (Boissier et al. 1968) | 15 |
| 1.3 LE SYSTEME NORADRENERGIQUE | 18 |
| 1.3.1 Système sérotoninergique et système noradrénergique (Figure 3)..... | 19 |
| 1.3.2 IRSSs et système noradrénergique..... | 22 |
| 1.4 LE SYSTEME GABAERGIQUE..... | 27 |
| 1.4.1 Système sérotoninergique et système GABAergique..... | 29 |
| 1.4.2 Antidépresseurs et système GABA..... | 32 |
| 1.5 DISTRIBUTION DES RECEPTEURS 5-HT2 DANS LE SYSTEME NERVEUX CENTRAL..... | 34 |
| 1.5.1 Les récepteurs 5-HT2A..... | 34 |
| 1.5.2 Les récepteurs 5-HT2B..... | 35 |
| 1.5.3 Les récepteurs 5-HT2C..... | 36 |
| 1.6 NEUROBIOLOGIE DE L'ANXIETE..... | 38 |
| 1.6.1 L'amygdale | 39 |
| 1.6.2 La PAG (Substance Grise Periaqueducule)..... | 43 |
| 1.6.3 L'hippocampe..... | 44 |
| 1.6.4 Autres structures | 46 |
| 1.6.5 Modèle de Deakin et Graeff..... | 47 |
| 2 MATERIELS ET METHODES..... | 53 |
| 2.1 ANIMAUX ET SUBSTANCES UTILISÉES..... | 54 |
| 2.1.1 Animaux..... | 54 |
| 2.1.2 Molécules utilisées | 54 |
| 2.2 ADMINISTRATION DES TRAITEMENTS..... | 56 |
| 2.2.1 Injections intra-péritonéales..... | 56 |
| 2.2.2 Injections locales au niveau de trois structures cérébrales..... | 56 |
| 2.2.2.1 Anesthésie..... | 56 |
| 2.2.2.2 Dispositif d'injection..... | 56 |
| 2.2.2.3 Chirurgie stéréotaxique..... | 57 |
| 2.2.2.4 Préparation de la solution..... | 57 |
| 2.2.2.5 Procédure d'injection..... | 57 |
| 2.2.2.6 Contrôle histologique..... | 58 |
| 2.3 MODÈLES COMPORTEMENTAUX | 58 |
| 2.3.1 Procédure générale..... | 58 |
| 2.3.2 Test d'actimétrie (Boissier et Simon 1965) | 58 |
| 2.3.3 Test des quatre plaques (FPT) (Aron et al. 1971; Boissier et al. 1968)..... | 61 |
| 2.4 DÉPLÉTIONS..... | 63 |
| 2.4.1 Substances utilisées..... | 63 |
| 2.4.2 Protocoles expérimentaux..... | 63 |
| 2.5 ANALYSES NEUROCHIMIQUES..... | 63 |
| 2.5.1 Prélèvement des structures..... | 63 |
| 2.5.2 Mesure de la concentration de neurotransmetteurs cérébraux..... | 66 |
| 2.6 ANALYSE STATISTIQUE..... | 67 |
| 2.6.1 Etudes Effets propres..... | 67 |
| 2.6.2 Etudes d'interaction..... | 67 |

| | |
|--|------------|
| 2.6.3 Etudes neurochimiques | 67 |
| 3 RESULTATS..... | 68 |
| 3.1 ETUDE 1 : | 69 |
| 3.1.1 Etude 1a : | 69 |
| 3.1.1.1 OBJECTIFS DE L'ETUDE 1a..... | 70 |
| 3.1.1.2 DISCUSSION DE L'ETUDE 1a..... | 84 |
| 3.1.2 Etude 1b : | 86 |
| 3.1.2.1 OBJECTIF DE L'ETUDE 1b | 87 |
| 3.1.2.2 RESULTATS DE L'ETUDE 1b | 88 |
| 3.1.2.3 DISCUSSION DE L'ETUDE 1b | 94 |
| 3.2 ETUDE 2 : | 95 |
| 3.2.1 OBJECTIFS DE L'ETUDE 2..... | 96 |
| 3.2.2 DISCUSSION DE L'ETUDE 2..... | 110 |
| 3.3 ETUDE 3 : | 112 |
| 3.3.1 Etude 3a : | 112 |
| 3.3.1.1 OBJECTIF DE L'ETUDE 3a..... | 113 |
| 3.3.1.2 DISCUSSION DE L'ETUDE 3a | 127 |
| 3.3.2 Etude 3b : | 129 |
| 3.3.2.1 OBJECTIF DE L'ETUDE 3b | 130 |
| 3.3.2.2 RESULTATS DE L'ETUDE 3b | 131 |
| 3.3.2.3 DISCUSSION DE L'ETUDE 3b | 136 |
| 3.4 ETUDE 4 : | 137 |
| 3.4.1 OBJECTIF DE L'ETUDE 4..... | 138 |
| 3.5 EFFECT OF GABAERGIC LIGANDS ON THE ANXIOLYTIC-LIKE ACTIVITY OF DOI (A 5-HT(2A/2C) AGONIST) IN THE FOUR-PLATE TEST IN MICE..... | 140 |
| 3.5.1 DISCUSSION DE L'ETUDE 4..... | 172 |
| 3.6 ETUDE 5 : | 174 |
| 3.6.1 OBJECTIF DE L'ETUDE 5..... | 175 |
| 3.6.2 RESULTATS DE L'ETUDE 5..... | 176 |
| 3.6.3 DISCUSSION DE L'ETUDE 5..... | 182 |
| 3.7 ETUDE 6 : | 183 |
| 3.7.1 OBJECTIF DE L'ETUDE 6..... | 184 |
| 3.7.2 RESULTATS DE L'ETUDE 6..... | 186 |
| 3.7.3 DISCUSSION DE L'ETUDE 6 | 191 |
| 4 DISCUSSION GENERALE..... | 194 |
| 4.1 EFFET D'UNE DÉPLÉTION DU SYSTÈME 5-HT ET D'UNE LÉSION DU SYSTÈME NA SUR L'ACTIVITÉ DE TYPE ANXIOLYTIQUE DES ADS ET DU DOI DANS LE FPT..... | 198 |
| 4.2 RELATIONS ENTRE LE SYSTÈME GABA ET LE SYSTÈME 5-HT DANS LE FPT | 201 |
| 4.3 EFFET DES RÉCEPTEURS A2-NORADRÉNERGIQUES SUR L'ACTIVITÉ DE TYPE ANXIOLYTIQUE DES ADS ET DU DOI DANS LE FPT..... | 204 |
| 4.4 LOCALISATION STRUCTURELLE DES RÉCEPTEURS CIBLES IMPLIQUÉS DANS L'EFFET DU DOI | 205 |
| 5 CONCLUSION | 211 |
| 6 REFERENCES..... | 212 |

ABRÉVIATIONS

μl : microlitre

5-HIAA : acide 5-hydroxy-3-indol-acétique

5,7 DHT : 5,7-dihydroxytryptamine

5-HT : 5-hydroxytryptamine ; sérotonine

6-OHDA : 6-hydroxy-dopamine

ADs : antidépresseurs

aCSF : liquide cérébro-spinal artificiel

ANOVA : analyse globale des variances

ARNm : acide ribonucléique messenger

BZD : benzodiazépine

DA : dopamine

EPM : labyrinthe en croix surélevé

ESM : écart standard à la moyenne

FPT : test des quatre plaques

g : gramme

GABA : acide gamma amino butyrique

GAD : anxiété généralisée

HPLC : chromatographie en phase liquide à haute performance

HVA : acide homovanillique

IRN : inhibiteur de la recapture de la noradrénaline

IRSN : inhibiteur mixte de la recapture de la sérotonine et de la noradrénaline

IRSS : inhibiteur spécifique de la recapture de la sérotonine

min : minute

ml : millilitre

mm : millimètre

NA : noradrénaline

ng : nanogramme

OCD : troubles obsessionnels compulsifs

PAG : substance grise périaqueducule

p-CPA : para-chloro-phenylalanine

PD : troubles paniques

PTSD : stress post-traumatique

SAD : anxiété généralisée

1 INTRODUCTION

1.1 PROBLEMATIQUE

La peur est une réaction normale à une situation menaçante, fréquemment observée dans la vie de tous les jours, qui entraîne une réponse comportementale permettant de se soustraire à l'évènement menaçant. La peur peut servir de mécanisme adaptatif d'alerte pour l'organisme, cependant elle peut aussi devenir un préjudice quand le sentiment anxieux persiste, entraînant un effet négatif sur la vie de tous les jours. Lorsque cette peur devient donc plus importante que ne l'exige la situation ou lorsqu'elle apparaît dans une situation inappropriée, le trouble anxieux existe.

Les troubles anxieux affectent environ 2 à 8% de la population adulte et serait plus fréquents chez la femme que chez l'homme. Le DSM IV (Diagnostic and Statistical Manual of Mental Disorders, 4e édition) décrit différentes formes de troubles anxieux : l'anxiété généralisée (GAD), les troubles paniques (PD), le stress post-traumatique (PTSD), les troubles obsessionnels compulsifs (OCD) ainsi que les phobies sociales (SAD). A partir de 1957, le développement des benzodiazépines (BZDs) en tant qu'anxiolytiques a été la première étape à la fois dans le traitement des troubles anxieux mais également dans la découverte des mécanismes neurobiologiques impliqués dans ces troubles. Des effets secondaires importants, tels que la dépendance et la sédation induites par les BZDs lors d'un traitement à long terme, ont poussé différentes équipes à chercher de nouvelles molécules anxiolytiques chez l'homme. De plus, aujourd'hui il est bien connu que l'efficacité des BZDs est limitée au traitement de l'anxiété généralisée et la phase aiguë des troubles paniques. La plus grande découverte des 30 dernières années concernant la neurobiologie des troubles anxieux a été l'implication de la sérotonine (5-HT). La première théorie décrivant l'implication de la 5-HT dans l'anxiété suggère qu'une augmentation de la transmission 5-HT favoriserait le syndrome anxieux alors qu'une diminution de l'activité de la 5-HT entraînerait une diminution des troubles anxieux (Iversen 1984). Mais de nombreuses études réalisées à posteriori ont montré des effets plus complexes de la 5-HT. En effet, dans les 15 dernières années, l'introduction des inhibiteurs sélectifs de la recapture de la sérotonine (IRSSs) dans les traitements cliniques des troubles anxieux en est un exemple. Les IRSSs se sont montrés efficaces dans de nombreux troubles anxieux tels que PD, OCD, SAD et GAD (Allgulander et al. 2004; Allgulander et Nilsson 2001; Bourin 2003; Denys et al. 2003; Figgitt et McClellan 2000; Kent et al. 1998; Lecrubier et Judge 1997; Lepola et al. 2004; Piccinelli et al. 1995; Varia et

Rauscher 2002). De plus, deux molécules possédant des propriétés antidépressives ont obtenu une extension d'autorisation de mise sur le marché, en France. Il s'agit de la paroxétine (un IRSS) pour le traitement de l'anxiété généralisée, l'anxiété sociale et le trouble panique, et de la venlafaxine (un inhibiteur mixte de la sérotonine et de la noradrénaline IRSN) pour le traitement de l'anxiété généralisée.

Les modèles animaux sont indispensables à l'étude de la neurobiologie des états anxieux. La mise au point de ces modèles d'anxiété reste difficile puisque cette pathologie est composée de peu de paramètres physiologiques qui peuvent être reproductibles chez l'animal comme c'est le cas dans d'autres pathologies tel que le diabète où l'on observe une augmentation de la glycémie. La plupart de tests comportementaux de l'anxiété ont été validés grâce à leur sensibilité aux agents pharmacologiques cliniquement efficaces chez l'homme (validité prédictive). Cependant lorsque la majorité des tests comportementaux ont été développés, seuls les BZDs étaient reconnus comme traitement, ces tests ont donc été uniquement basés sur leur sensibilité aux BZDs. L'apparition des molécules sérotoninergiques a montré les limites de ces tests, ils se sont en effet montrés peu sensibles à ces molécules (Borsini et al. 2002). Le modèle animal utilisé dans cette étude est un test comportemental chez la Souris basé sur une réponse conditionnée: le test des quatre plaques (ou four-plate test ou FPT). Ce test est considéré comme simple, efficace et rapide. Il est basé sur la suppression d'un comportement inné chez la Souris (l'exploration d'un nouvel environnement) par l'administration de chocs électriques. Cette situation expérimentale entraîne chez la Souris une augmentation de l'anxiété. Ce test a été choisi dans cette étude car il a préalablement montré une grande robustesse ainsi qu'une grande reproductibilité et s'est montré être répondeur aux deux traitements de choix chez l'Homme, les BZDs et les inhibiteurs de la recapture de la 5-HT (Bourin et al. 1992; Hascoet et al. 2000).

Une première étude réalisée en 1992 a montré que l'administration unique de BZDs induit un effet de type anxiolytique sur les souris. L'administration de diazépam à la dose de 1 mg/kg et d'alprazolam à la dose de 0.25 mg/kg entraîne une augmentation significative du nombre de passages punis acceptés par les souris par rapport aux souris contrôles. Cette augmentation du nombre de passages punis est assimilée dans ce test à un effet de type anxiolytique (Bourin et al. 1992). Une autre étude réalisée sur un certain nombre d'antidépresseurs (IRSS, IRSN, inhibiteur de la monoamine oxydase et antidépresseurs tricycliques) a montré que seuls les IRSSs (paroxétine, sertraline, citalopram, fluvoxamine) et les IRSNs (venlafaxine et milnacipran) augmentent le nombre de passages punis. La désipramine, un inhibiteur

spécifique de la recapture de la noradrénaline (IRN), au contraire, entraîne une diminution significative du nombre de passages punis acceptés par les souris. Des effets similaires sont observés après une administration aiguë de maprotiline (un IRN) et de trazodone (un antidépresseur tricyclique) pour les fortes doses utilisées 32 mg/kg et 16 mg/kg respectivement (Hascoet et al. 2000). Cette diminution est assimilée à un effet de type anxiogène. Ces deux études ont permis de montrer que le FPT est sensible aux BZDs et aux antidépresseurs ayant une action importante sur le système 5-HT au niveau central.

Afin de définir et de comprendre plus précisément le mécanisme d'action des antidépresseurs (ADs) ayant une action sur le système 5-HT, le laboratoire a étudié des molécules plus spécifiques de certains récepteurs du système 5-HT. Ces études ont permis de mettre en évidence un effet des agonistes 5-HT₂ dans le FPT. L'administration aiguë de DOI, un agoniste des récepteurs 5-HT_{2A/2C}, entraîne une augmentation importante et significative du nombre de passages punis acceptés par les souris. L'administration de BW 723C86, un agoniste des récepteurs 5-HT_{2B}, dans les mêmes conditions, entraîne également une augmentation significative du nombre de passages punis mais d'une moindre importance. Par contre le RO 60-0175, un agoniste des récepteurs 5-HT_{2C}, et le mCPP, un agoniste non spécifique des récepteurs 5-HT₂, ne modifient pas le nombre de passages punis en comparaison avec les souris non traitées (Nic Dhonnchadha et al. 2003a). L'étude de l'action du DOI semble montrer que l'effet de cette molécule dans le FPT est médié uniquement par les récepteurs 5-HT_{2A} puisque quand des antagonistes des récepteurs 5-HT₂ sont co-administrés avec le DOI, seul l'antagoniste spécifique des récepteurs 5-HT_{2A} inhibe l'effet du DOI dans ce test (Nic Dhonnchadha et al. 2003b).

Les sous-types 5-HT_{2A} des récepteurs sérotoninergiques semblent également être particulièrement impliqués dans l'effet d'un IRSS, la paroxétine, et d'un IRSN, la venlafaxine, dans le FPT. Le DOI potentialise l'effet de ces deux antidépresseurs. De plus, un antagoniste 5-HT_{2A} (SR 46349B) inhibe l'effet de ces antidépresseurs dans le FPT (Nic Dhonnchadha et al. 2005). Une autre étude réalisée dans le test des vocalisations ultrasoniques chez le rat obtient des effets similaires puisque un antagoniste sélectif des récepteurs 5-HT_{2A}, le MDL 100,907, inhibe l'effet de type anxiolytique de la paroxétine et du DOI (Schreiber et al. 1998).

Au regard des études pharmacologiques récemment réalisées, il semble que l'étude d'un système de neurotransmission isolé n'est pas suffisante à la compréhension des effets

anxiolytiques de certaines molécules. Nous avons donc décidé dans ce travail de thèse d'étudier les possibles interactions existantes entre des molécules spécifiques du système sérotoninergique (le DOI et certains antidépresseurs) avec deux autres systèmes de neurotransmission : le système noradrénergique et le système GABAergique. Ces deux systèmes possèdent de nombreuses interactions avec le système sérotoninergique et sont fortement impliqués dans les mécanismes neurobiologiques de l'anxiété.

Afin d'étudier l'implication de différentes structures cérébrales dans les mécanismes neurobiologiques du FPT, les concentrations de neurotransmetteurs (noradrénaline, sérotonine et dopamine) ont ensuite été évaluées dans l'hypothalamus, l'hippocampe, le cortex et le striatum, chez des animaux naïfs et chez des animaux ayant été préalablement exposés au FPT.

L'étude plus fine de l'implication de certaines structures dans l'effet de type anxiolytique du DOI dans le FPT a été poursuivie par l'injection de DOI dans trois structures connues pour être impliquées dans la neurobiologie anxieuse, l'hippocampe, l'amygdale et la PAG. _____

1.2 MODELES ANIMAUX DE L'ANXIETE

Un certain nombre d'indices cliniques ont conceptualisé les désordres anxieux humains comme des désordres de défense (Deakin et Graeff 1991; Kidman 1989) dans lesquels la caractéristique clé concerne l'activation inappropriée du comportement défensif venant d'une évaluation erronée du danger. Certaines études ont montré une remarquable similarité parmi les vertébrés dans les systèmes neuronaux impliqués dans la détection du danger et les procédures de réponses défensives (Davis 1992). Comme ce système est aussi fortement conservé dans l'évolution, Le Doux 1995 argumente de façon convaincante qu'un certain nombre de choses pouvait être appris sur les réactions de peur et de défense chez l'Homme en étudiant d'autres espèces (LeDoux 1995).

Les modèles animaux sont devenus maintenant des modèles d'étude essentiels dans la découverte de la neurobiologie des désordres psychiatriques. Ces modèles sont utilisés comme préparations expérimentales développées chez une espèce pour étudier des phénomènes qui ont lieu dans une autre espèce (McKinney 1984). Ils sont employés dans la recherche de nouveaux agents thérapeutiques ou comme simulateurs pour l'étude de mécanismes impliqués dans les désordres anxieux (Vermetten et Bremner 2002). Ces deux objectifs ne sont pas indépendants. L'information sur le mode d'action d'un nouveau composé peut aboutir à de nouvelles approches dans l'étude des bases de l'anxiété et ces connaissances sur les mécanismes d'action peuvent entraîner le développement plus rationnel de nouvelles molécules.

Idéalement, la construction d'un modèle animal est basée sur 3 critères de validité (Willner 1984). Malheureusement aucun modèle animal connu à ce jour ne possède à la fois un fort potentiel prédictif et explicatif. C'est pour cette raison que nous observons trois grands groupes de modèles correspondant chacun à un des trois critères de validité.

-Les modèles isomorphes (validité créative) : le comportement induit doit être similaire à celui observé chez les patients atteints de troubles anxieux. Pour les modèles animaux de l'anxiété chez les rongeurs, la possibilité d'un isomorphisme entre le comportement humain et celui du rongeur dans le contexte de l'évolution est suggérée.

-Les modèles homologues (validité théorique) : les mécanismes neurobiologiques doivent être les mêmes chez l'animal et chez le patient.

-Les modèles prédictifs ou corrélationnistes (validité prédictive) : le modèle doit être sensible aux agents pharmacologiques cliniquement efficaces chez l'Homme. Dans les modèles

animaux d'anxiété, le modèle doit être sensible aux anxiolytiques. Inversement les composés anxiogènes doivent induire un effet opposé et les agents non actifs ne doivent pas avoir d'effet dans les tests.

Les modèles animaux d'anxiété sont divisés en deux classes (Lister 1990) :

- Les modèles animaux d'anxiété « trait » reflètent une anxiété qui ne varie pas d'un moment à l'autre, donc à long terme, et qui est caractéristique d'un individu. Parmi ces modèles, on retrouve des lignées de Souris qui sont naturellement plus anxieuses que d'autres (ex : Souris de souche BALB/c) (Griebel et al. 1993), des lignées de Souris génétiquement modifiées dont un gène précis a été inactivé tels que le gène des récepteurs 5-HT_{1A} (Heisler et al. 1998; Parks et al. 1998; Ramboz et al. 1998), CRF₂ (Bale et al. 2000; Coste et al. 2000; Kishimoto et al. 2000b) ou le gène de la sous unité γ_2 des récepteurs GABA_A (Homanics et al. 1999), ou dont une protéine cible tel que le facteur de libération de la corticotrophine (Heinrichs et al. 1997; Stenzel-Poore et al. 1996) ou le neuropeptide Y (Inui et al. 1998) a été surexprimé. Malheureusement, ces modèles sont basés sur l'inactivation d'un seul gène et il est clair que les processus neurobiologiques de l'anxiété induisent plusieurs gènes (Belzung et Griebel 2001). L'inactivation d'un gène chez ces animaux entraîne des phénomènes adaptatifs lors du développement de l'animal qui ne peuvent pas non plus être négligés. On peut également trouver, dans ce groupe, des modèles consistant en une exposition chronique des animaux à des agents stressants.

- Les modèles animaux d'anxiété « état » reflètent une anxiété présente à un moment particulier et qui se trouve augmentée par la présence d'un stimulus anxiogène. Dans cette classe sont inclus deux sous-classes les modèles à réponse non conditionnée et ceux à réponse conditionnée (Tableau 1). Les modèles animaux à réponses non conditionnées sont des tests comportementaux éthologiques basés sur des réponses spontanées et naturelles de l'animal aux stimuli stressants qui n'induisent pas explicitement une gène. Le plus utilisé de ces tests est le labyrinthe en croix surélevé (EPM) car ce test est sensible aux BZDs, qui servent de références pour la validité du test, et aux nouvelles molécules à portée anxiolytique spécifiques du système sérotoninergique tel que la buspirone ou le 8-OHDPAT. L'autre groupe de modèles animaux d'anxiété « état » inclut des modèles basés sur des réponses conditionnées où les animaux répondent à un stress induit par la punition. La punition est créée par la survenue d'un choc électrique non douloureux lors de l'émission d'une réponse comportementale donnée. Il peut s'agir d'une prise alimentaire, d'appui sur un levier pour obtenir de la nourriture ou d'un comportement exploratoire. C'est cette dernière réponse qui

est impliquée dans le test utilisé dans notre étude : Le test des quatre plaques (four plate test ou FPT).

| | | |
|---|---|--|
| Modèles basés sur une réponse conditionnée | Tests de conflit | Test de Geller-Seifter Tests de conflit chez le pigeon et le singe Test de Vogel |
| | Divers | Test d'évitement passif ou actif Stimulation de la dPAG Réflexe de fuite induit par la peur Test des quatre plaques Enfouissement défensif Aversion gustative |
| Modèles basés sur une réponse non conditionnée | Modèles basés sur l'exploration | Labyrinthe en croix surélevé Planche à trous Test de la double enceinte illuminé Open field |
| | Modèles basés sur des réponses sociales | Test d'interaction sociale Vocalisations ultrasoniques Compétition sociale |
| | Divers | Batterie de test peur/anxiété Enfouissement de billes |

Tableau 1 : Classement des modèles animaux d'anxiété

1.2.1 Le test des quatre plaques (Boissier et al. 1968)

Ce modèle a été pour la première fois décrit par Boissier et ses confrères comme un modèle d'étude des effets des anxiolytiques sur la suppression d'un comportement exploratoire inné chez la Souris par la punition. La suppression de ce comportement est annulée par un traitement des animaux avec les anxiolytiques types (les BZDs). Ce modèle est un test simple et rapide qui permet la détection des effets anxiolytiques ou anxiogènes des molécules étudiées. Le FPT est resté très peu employé dans d'autres laboratoires ou seulement pour détecter l'effet anxiolytique de nouveaux médicaments (Griebel et al. 2002; Jones et al. 1994; Klodzinska et al. 1999; Klodzinska et al. 2004b; Serradeil-Le Gal et al. 2002; Tatarczynska et al. 2001; Ward et Stephens 1998; Wesolowska et al. 2003).

Les études réalisées dans notre laboratoire ont permis d'asseoir la validité du test en démontrant sa sensibilité, en plus de celle aux BZDs, aux inhibiteurs de la recapture de la 5-HT (Tableau 2) (Bourin et al. 1992; Hascoet et al. 2000). Salome et al (2002) suggèrent que la fiabilité d'un test doit être caractérisée par sa reproductibilité dans le laboratoire mais également entre laboratoires et dans le temps (Salome et al. 2002). Faute de données dans la littérature, il nous est impossible d'étudier la reproductibilité du test entre laboratoires mais dans le notre, le test s'est révélé être reproductible dans le temps. Les résultats induits par l'administration de certains antidépresseurs dans l'étude de Hascoët et al en 2000 ont été reproduits dans l'étude de Nic Dhonnchadha et al en 2005.

Bien que dans les autres laboratoires, ce test est utilisé uniquement pour la détection des effets anxiolytiques ou anxiogènes de nouveaux médicaments, nous avons réussi à mettre en évidence certains mécanismes neurobiologiques impliqués dans l'effet anxiolytique de certaines molécules comme par exemple l'implication de récepteurs 5-HT₂ dans les mécanismes de type anxiolytique de la venlafaxine et de la paroxétine (Nic Dhonnchadha et al. 2005).

Le FPT a également été utilisé dans notre laboratoire suivant le protocole du test-retest. Les résultats obtenus lors de ce protocole montrent que lors du retest, les BZDs perdent leur activité de type anxiolytique (Ripoll et al. 2005). Ces résultats sont similaires à ceux obtenus selon le même protocole (test-retest) sur un autre modèle animal, le labyrinthe en croix surélevé (File et al. 1992; Holmes et Rodgers 1999).

Comme dans tous les modèles impliquant des chocs électriques, l'effet analgésique des molécules peut être suspecté dans le FPT. Dans l'étude initiale de Boissier, l'administration de morphine n'entraîne pas d'augmentation du nombre de passages punis reçus par les souris. Afin de confirmer ces résultats, une étude plus large a été menée dans notre laboratoire. Cette étude démontre que l'effet analgésique de nombreuses molécules, telle que la morphine, n'entraîne pas d'augmentation du nombre de passages punis (Ripoll et al. 2006). Il n'existe donc aucune corrélation entre l'effet analgésique dans le test de la plaque chauffante et l'effet anxiolytique dans le FPT.

| Antidépresseurs | Effet dans le FPT | | |
|-----------------|-------------------|----------------|----------------|
| | Anxiolytique | Sans effet | Anxiogène |
| <i>IRSSs</i> | | | |
| Paroxétine | X (4-16 mg/kg) | | |
| Citalopram | X (4-32 mg/kg) | | |
| Sertraline | X (4-32 mg/kg) | | |
| Fluvoxamine | X (4-32 mg/kg) | | |
| Fluoxétine | | X (1-32 mg/kg) | |
| <i>IRSNs</i> | | | |
| Milnacipran | X (4-32 mg/kg) | | |
| Venlafaxine | X (4-32 mg/kg) | | |
| <i>Autres</i> | | | |
| Désipramine | | | X (4-32 mg/kg) |
| Moclobémide | | X (1-32 mg/kg) | |
| Trazodone | | | X (32 mg/kg) |
| Maprotiline | | | X (16 mg/kg) |
| Miansérine | | X (2-32 mg/kg) | |
| Imipramine | | X (1-32 mg/kg) | |
| Dothiépine | | X (1-32 mg/kg) | |

Tableau 2 : Effet d'une administration aiguë de différents antidépresseurs dans le FPT

1.3 LE SYSTEME NORADRENERGIQUE

Le système noradrénergique fait également partie des systèmes de neurotransmission qui semblent largement impliqués dans l'anxiété. De nombreuses projections noradrénergiques sont retrouvées au niveau de structures fortement impliquées dans l'anxiété comme l'hippocampe, le cortex, l'amygdale. Dans une étude menée sur des patients atteints de GAD, le taux plasmatique de noradrénaline (NA) chez les malades est augmenté par rapport à celui des patients sains et le nombre de récepteurs α_2 -noradrénergiques est diminué dans le plasma des malades indiquant une régulation négative de ces récepteurs. L'activité noradrénergique semble donc être augmentée chez les patients atteints de GAD (Sevy et al. 1989).

Des modifications du taux de NA ont également été démontrées après l'exposition d'animaux à un stress. Un stress induit par une immobilisation forcée ou par l'administration de chocs électriques plantaires chez le rat entraîne une augmentation de la libération de NA mesurée par microdialyse dans le noyau latéral du lit de la strie terminale, dans l'amygdale et dans l'hippocampe (Cecchi et al. 2002a; Galvez et al. 1996; Hajos-Korcsok et al. 2003; Quirarte et al. 1998; Tanaka et al. 2000; Tanaka et al. 1991).

Des altérations des récepteurs α_2 -noradrénergiques dans de nombreuses régions cérébrales telles que le cortex frontal, le locus coeruleus, l'hippocampe ou l'amygdale ont été détectées après une exposition des animaux à un stress aigu ou chronique (Flugge 1996; Flugge et al. 1997; Nukina et al. 1987; Tejani-Butt et al. 1994). L'implication des récepteurs α_2 -noradrénergiques dans la neurobiologie de l'anxiété semble bien établie mais le mécanisme d'action de ces récepteurs reste encore flou. Les agonistes de ces récepteurs semblent engendrer des effets de type anxiolytique dans certains modèles animaux et des effets similaires ont également été rapportés pour les antagonistes de ces récepteurs (Cole et al. 1995; Handley et Mithani 1984; La Marca et Dunn 1994; Millan et al. 2000; Zarrindast et al. 2000). Ces différences ne semblent pas être dues au type de tests utilisés (tests de conflit ou éthologiques) puisque la yohimbine, par exemple, se trouve être, selon les études, anxiolytique ou anxiogène dans l'EPM.

De même, des résultats contradictoires sont observés dans la littérature pour l'effet des récepteurs α_1 -noradrénergiques dans l'anxiété mais la balance semble pencher vers une activité de type anxiogène après stimulation de ces récepteurs (Cecchi et al. 2002a; Handley et Mithani 1984; Soderpalm et Engel 1990).

Une haute concentration de récepteurs β_1 -noradrénergiques et β_2 -noradrénergiques a été observée dans des structures fortement impliquées dans les mécanismes des troubles anxieux telles que le cortex, l'amygdale ou l'hippocampe (Nicholas et al. 1996; Rainbow et al. 1984), ce qui laisse penser que les récepteurs β -noradrénergiques ont un rôle dans le contrôle de l'anxiété mais les études chez l'animal n'ont jamais fait ressortir d'effet significatif des ligands spécifiques de ces récepteurs (Cao et Rodgers 1997; Sanchez 2003).

1.3.1 Système sérotoninergique et système noradrénergique (Figure 3)

Il existe de nombreuses relations entre le système noradrénergique et le système sérotoninergique. De plus, il existe un parallèle au niveau anatomique entre les projections noradrénergiques et sérotoninergiques dans le système nerveux central (Figure 1 et 2). Le noyau dorsal et le noyau médian du raphé envoient et reçoivent de nombreux axones du locus coeruleus (Baraban et Aghajanian 1980; Berridge et Waterhouse 2003) ce qui entraîne une régulation d'un système sur l'autre par l'activation de différents récepteurs. De plus, la lésion des neurones NA issus du locus coeruleus ou l'inhibition de synthèse de la NA avec un inhibiteur de la tyrosine hydroxylase ou de la dopamine- β -hydroxylase, deux enzymes impliquées dans la synthèse de NA, produit une augmentation nette de la synthèse de 5-HT dans le raphé (Barr et al. 1977; Saavedra et al. 1976). Dans le sens inverse, la lésion des noyaux du raphé induit une augmentation de l'activité de la tyrosine hydroxylase dans le locus coeruleus (McRae-Degueurce et al. 1982) et le prétraitement avec un inhibiteur de synthèse de la 5-HT le parachlorophenylalanine (*p*-CPA) augmente la tyrosine hydroxylase et la décharge des neurones NA du locus coeruleus (Crespi et al. 1980; Reader et al. 1986).

L'effet inhibiteur de la NA sur le système 5-HT semble être médié par l'activation des récepteurs α_2 -noradrénergiques. Dans des études *in vitro* menées sur des coupes de cortex, de raphé dorsal et médian et d'hippocampe de rat, la perfusion d'agoniste des récepteurs α_2 -noradrénergiques (clonidine, oxymétazoline, dexmedetomidine et UK 14,304) inhibe la libération de 5-HT (Frankhuijzen et al. 1988; Hopwood et Stamford 2001; Jackisch et al. 1999). L'effet inhibiteur d'une perfusion de dexmedetomidine sur la libération de 5-HT au niveau raphé est bloqué par la perfusion d'un antagoniste spécifique des récepteurs α_{2A} -noradrénergiques, le BRL 44408, mais pas par un antagoniste des récepteurs $\alpha_{2B/C}$ -

noradrénergiques, le ARC 239. Ces résultats indiquent que l'effet inhibiteur de la dexmedetomidine est médié par une activation des récepteurs α_{2A} -noradrénergiques (Hopwood et Stamford 2001). Dans cette étude *in vitro*, l'application de NA entraîne également un effet inhibiteur sur la libération de 5-HT et cet effet est annulé par des antagonistes des récepteurs α_2 -noradrénergiques, la yohimbine et la rauwolscine. La NA endogène a donc un effet inhibiteur sur la 5-HT par la stimulation des récepteurs α_2 -noradrénergiques.

Les récepteurs α_2 -noradrénergiques sont localisés au niveau présynaptique sur les neurones NA (autorécepteurs) mais également sur les terminaisons axonales des neurones 5-HT (hétérorécepteurs) (French 1995). Les mesures de la libération de 5-HT *in vivo* sont en accord avec les résultats obtenus *in vitro*. L'administration d'agonistes des récepteurs α_2 -noradrénergiques, le UK 14,304, la clonidine et le S18616, diminue la libération de 5-HT dans le raphé dorsal et dans le cortex de rat anesthésié. De plus, l'idazoxan, le BRL 44408 et la mirtazapine, trois antagonistes des récepteurs α_2 -noradrénergiques, antagonisent l'effet inhibiteur des agonistes de ces récepteurs (Haddjeri et al. 1996; 1997a; Millan et al. 2000; Numazawa et al. 1995). Certaines de ces études font apparaître que l'inhibition induite par les agonistes des récepteurs α_2 -noradrénergiques implique les hétérorécepteurs présents sur les neurones 5-HT (Haddjeri et al. 1996; 1997a; Numazawa et al. 1995) alors que d'autres études montrent qu'une destruction des neurones NA par de la 6-hydroxydopamine (6-OHDA) ou du DSP-4 (qui détruit uniquement les neurones NA issus du locus coeruleus) rend les neurones du raphé insensibles à l'effet inhibiteur de la clonidine administrée par voie intraveineuse (Bortolozzi et Artigas 2003; Svensson et al. 1975). Cette différence de résultats peut être expliquée par une étude qui montre que la clonidine agit de façon différente selon la dose utilisée. A faible dose la clonidine augmente la libération de 5-HT par une inhibition de la libération de NA (activation des autorécepteurs), alors qu'à forte dose la clonidine diminue la libération de 5-HT par stimulation des hétérorécepteurs présents sur les terminaisons axonales 5-HT (Mongeau et al. 1993).

Les récepteurs α_1 -noradrénergiques semblent avoir un effet opposé à celui des récepteurs α_2 -noradrénergiques. L'activation de ces récepteurs par injection d'agoniste, la cirazoline et la phényléphrine, au niveau local dans le cortex préfrontal et dans le raphé médian de rat, entraîne une augmentation de la libération de 5-HT dans ces structures et cet effet est inhibé par la co-perfusion d'un antagoniste des récepteurs α_1 -noradrénergiques, la prazosine (Adell et Artigas 1999; Amargos-Bosch et al. 2003). De plus, une administration locale systémique

ou sous cutanée de prazosine induit une diminution de la libération de 5-HT dans le raphé dorsal et dans l'hippocampe (Bortolozzi et Artigas 2003; Millan et al. 2000; Weikop et al. 2004). Des résultats opposés sont observés dans deux études *in vitro* puisque dans l'une, l'application de phényléphrine sur des coupes de raphé dorsal et médian de rat diminue la libération de 5-HT, alors que dans l'autre, une haute concentration de phényléphrine cause une augmentation dose-dépendante de la décharge des neurones de ces deux structures (Hopwood et Stamford 2001; Judge et Gartside 2006).

La NA peut également avoir une action excitatrice indirecte grâce à la stimulation des récepteurs α_2 -noradrénergiques présents sur les neurones spécifiques de l'acide γ -aminobutyrique (GABA) qui entraînent une diminution de la stimulation des récepteurs inhibiteurs GABA_A présent sur les neurones 5-HT (Lechin et al. 2006).

Les récepteurs β -noradrénergiques ne semblent pas impliqués dans les interactions existant entre ces deux systèmes puisqu'une administration sous-cutanée d'un antagoniste des récepteurs β_1 -noradrénergiques, le betaxolol, et d'un antagoniste des récepteurs β_2 -noradrénergiques, l'ICI118,551, ne modifie pas la concentration de 5-HT dans le cortex préfrontal de rat (Gobert et Millan 1999a).

D'un autre côté, la 5-HT régule la libération de NA par l'intermédiaire de l'activation de certains de ces récepteurs. Les récepteurs 5-HT_{1A} sont localisés sur les dendrites des neurones 5-HT du raphé en tant qu'autorécepteurs inhibiteurs mais peuvent aussi être localisés au niveau post-synaptique dans l'hippocampe, le septum, l'amygdale, la PAG, le cortex et également au niveau du locus coeruleus. Les agonistes des récepteurs 5-HT_{1A} (8-OH DPAT, flesinoxan ou MDL 73005EF) entraînent une augmentation de la libération de NA dans le cortex frontal, l'hippocampe, l'hypothalamus et le locus coeruleus de rat (Clement et al. 1992; Gobert et Millan 1999a; Haddjeri et al. 1997b; Hajos-Korcsok et al. 1999; Pudovkina et al. 2001; Suwabe et al. 2000; Suzuki et al. 1995; Szabo et Blier 2001a). Cet effet des agonistes des récepteurs 5-HT_{1A} n'est pas antagonisé par une lésion préalable du système 5-HT (injection de 5,7-DHT) ou par une administration d'un inhibiteur de synthèse de la 5-HT (le *p*-CPA) (Hajos-Korcsok et al. 1999; Suzuki et al. 1995) ce qui démontre un effet des agonistes des récepteurs 5-HT_{1A} au niveau post-synaptique. La quantité de récepteurs 5-HT_{1A} s'est révélé être faible au niveau du locus coeruleus, on pourrait donc penser que les agonistes de récepteurs 5-HT_{1A} stimulent l'activité noradrénergique par une action sur les afférences du locus coeruleus.

A l'inverse, les récepteurs 5-HT₂ auraient un effet inhibiteur sur la libération de NA (Clement et al. 1992). Une administration sous-cutanée de DOI ou de DOB (deux agonistes des récepteurs 5-HT_{2A/2C}) diminue la libération de NA au niveau de l'hippocampe et du locus coeruleus et ces effets sont inhibés par une co-administration d'antagonistes non spécifiques des récepteurs 5-HT₂ la ritansérine et la kétansérine (Done et Sharp 1992; Gorea et Adrien 1988). Des résultats opposés, c'est à dire une augmentation de la NA après administration sous-cutanée de DOI, ont été obtenus dans le cortex frontal de rat (Gobert et Millan 1999b).

Les récepteurs 5-HT₂ agissant sur la NA semblent être localisés au niveau post-synaptique puisqu'une lésion des neurones 5-HT n'entraîne aucune modification de l'effet (Gorea et Adrien 1988). L'effet des récepteurs 5-HT₂ sur l'activité des neurones du locus coeruleus peut être médié par l'activation de récepteurs 5-HT₂ présents sur des afférences du locus coeruleus. Les récepteurs 5-HT₂ peuvent stimuler les neurones du noyau hypoglosse, et la lésion bilatérale du noyau réduit significativement l'effet des ligands 5-HT₂ sur l'activité du locus coeruleus (Bobker 1994; Gorea et al. 1991). L'inhibition observée de l'activation des récepteurs 5-HT₂ sur le système NA peut également être due à la stimulation de récepteurs 5-HT₂ présents sur les neurones GABA innervant le locus coeruleus (Szabo et Blier 2001b).

L'effet des récepteurs 5-HT₃ sur la libération de 5-HT ne semble pas encore bien établi puisque les études de la littérature se contredisent. Dans une étude *in vitro*, l'application de 2-méthyl-5-HT (un agoniste des récepteurs 5-HT₃) augmente la libération de NA induite par stimulation électrique dans le cortex frontal, l'hippocampe et l'hypothalamus, cet effet est antagonisé par la co-perfusion d'ondansétron (un antagoniste des récepteurs 5-HT₃) (Mongeau et al. 1994). A l'inverse, une autre étude montre que le 2-méthyl-5-HT inhibe la libération de NA dans l'hippocampe de rat vigile, un effet également observé après administration de 5-HT. L'effet de la 5-HT est antagonisé dans l'étude par une co-administration d'ondansétron, ce qui démontre un effet inhibiteur de la 5-HT sur la NA principalement médié par les récepteurs 5-HT₃ (Matsumoto et al. 1995).

1.3.2 IRSSs et système noradrénergique

Des antidépresseurs tels que la fluoxétine, le citalopram ou la paroxétine ont la capacité d'augmenter significativement la concentration de NA dans de nombreuses structures comme

le cortex frontal ou l'hippocampe chez le rat (Beyer et al. 2002; Bymaster et al. 2002; Hajos-Korcsok et al. 2000; Hughes et Stanford 1996; Mateo et al. 2000; Szabo et Blier 2002). Une étude *in vivo* menée chez la Souris montre également l'effet de la paroxétine et du citalopram sur la libération de NA (David et al. 2003). Il existe deux hypothèses quant à la capacité des IRSSs à modifier la concentration extracellulaire de NA. La première hypothèse implique que les IRSSs agissent directement par blocage du transporteur spécifique de la NA. L'étude de la recapture de [3H] noradrénaline dans des synaptosomes a contribué à montrer la capacité des IRSSs à inhiber la recapture de NA (Hughes et Stanford 1996). Shinka et al 2005 montrent que la paroxétine inhibe l'activité fonctionnelle du transporteur de la NA en agissant sur le site de liaison de la désipramine (Shinkai et al. 2005). De plus, l'augmentation de la quantité extracellulaire de NA après l'administration d'IRSSs est abolie par un prétraitement avec une neurotoxine du système NA, suggérant que les IRSSs peuvent directement se lier aux transporteurs de la NA localisés sur les neurones noradrénergiques (Hughes et Stanford 1998). La seconde hypothèse suggère une action indirecte des IRSSs. L'administration d'IRSSs augmenterait la 5-HT extracellulaire qui augmenterait, à son tour, la libération de NA au niveau des terminaisons nerveuses des neurones NA. Cette hypothèse est soutenue par le fait qu'une administration locale de citalopram chez le rat augmente la libération de NA et que cet effet est inhibé par un prétraitement avec du *p*-CPA, un inhibiteur de synthèse de la 5-HT (Mateo et al. 2000).

Les IRSSs peuvent également avoir des effets sur la NA via des récepteurs 5-HT. L'augmentation de la NA observée après une administration de fluoxétine ne semble pas être due à un blocage non sélectif du transporteur de la NA, mais à une interaction avec les récepteurs 5-HT_{2C} bloquant ainsi l'inhibition de la 5-HT sur la libération de NA dans le locus coeruleus (Bymaster et al. 2002). Seule la fluoxétine semble répondre à cette hypothèse car elle seule possède une forte affinité pour les récepteurs 5-HT_{2C}.

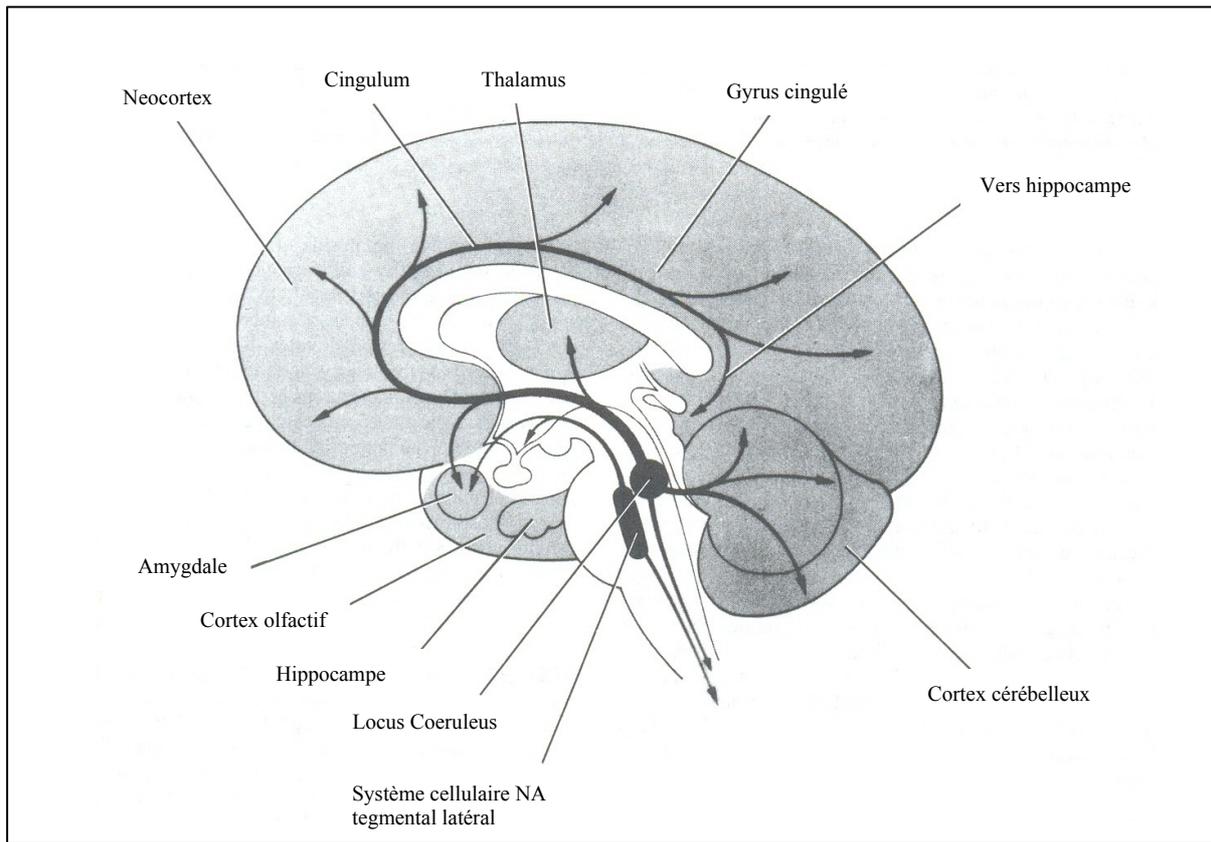


Figure 1 : schéma des différentes projections noradrénergiques dans le système nerveux central chez l'homme

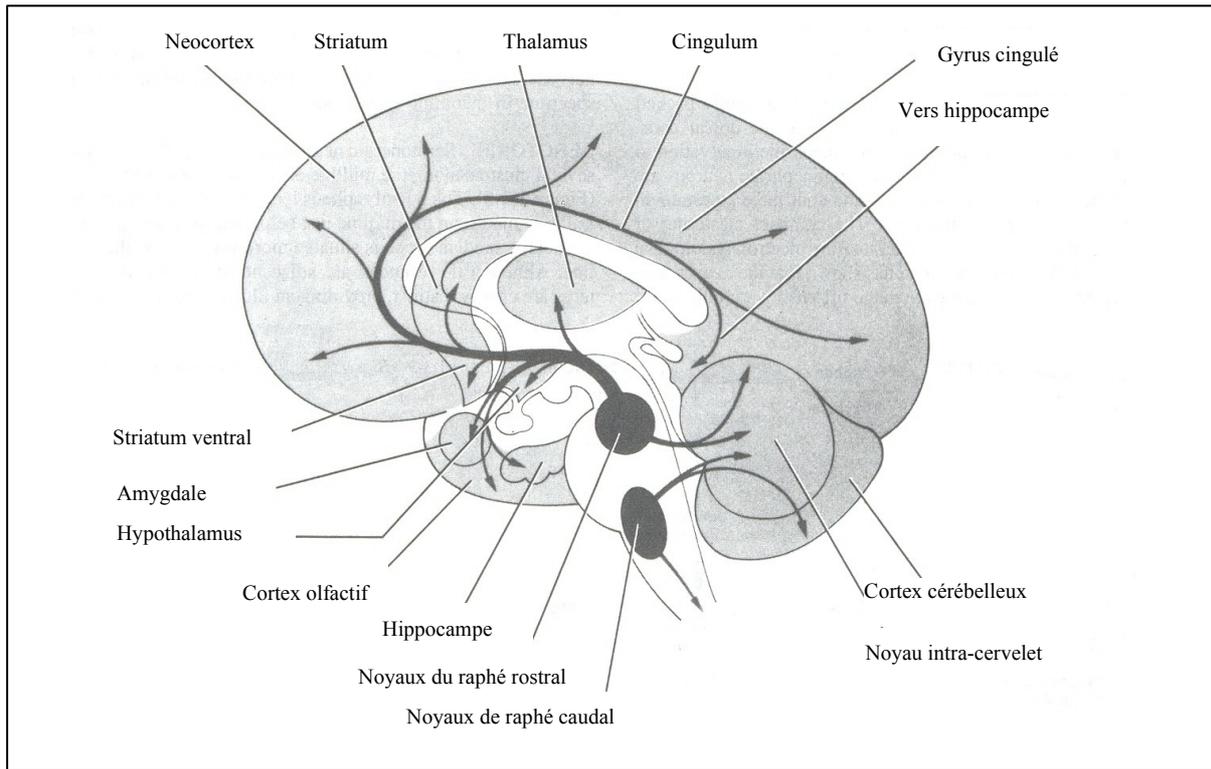


Figure 2 : schéma des différentes projections sérotoninergiques dans le système nerveux central chez l'homme *D'après Kaplan et Sadock, 1995*

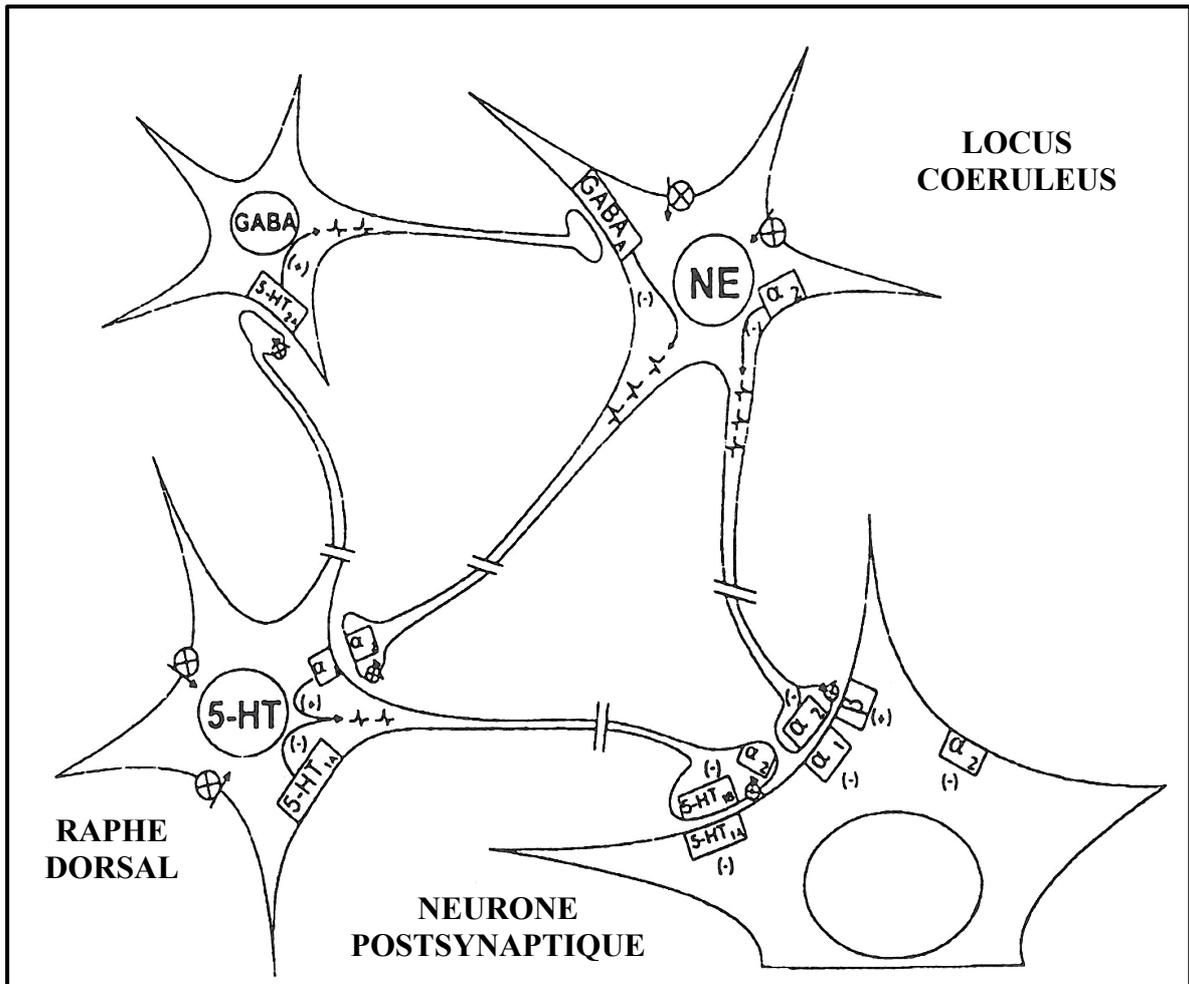


Figure 3 : Interactions mutuelles entre un neurone sérotoninergique, noradrénergique et un neurone postsynaptique.

D'après (Blier 2003)

1.4 LE SYSTEME GABAERGIQUE

Le système GABA constitue le neurotransmetteur inhibiteur le plus important dans le système nerveux central. Les structures limbiques impliquées dans la modulation des états anxieux comme l'hippocampe, l'amygdale et la PAG contiennent une grande quantité d'interneurones GABA et dans certains cas, des projections GABAergiques (Barbaresi et al. 1998; Carlsen 1988; Commons et Milner 1996; Griffiths et Lovick 2002; McDonald et Augustine 1993; Sloviter et Nilaver 1987) (Figure 4). Les premières molécules connues pour leur efficacité clinique dans le traitement des troubles anxieux sont les BZDs, molécules qui en se liant au site spécifique des BZDs sur le récepteur GABA_A entraîne une modification conformationnelle du récepteur, et de par ce fait, augmente son affinité au GABA.

L'implication du système GABA dans les mécanismes de l'anxiété a aussi été démontrée chez l'animal. L'exposition de souris à un stress conditionné (un son associé pendant la période d'apprentissage à un choc électrique plantaire) entraîne chez l'animal une diminution du niveau de GABA dans l'amygdale (Stork et al. 2002). Les manipulations génétiques du système GABA chez la Souris, montrent également des modifications de comportement. Les souris déficientes en acide glutamique décarboxylase, une enzyme clé de la synthèse de GABA, montrent une augmentation du comportement de type anxieux dans le labyrinthe en zéro surélevé et dans le test de peur conditionnée à un signal auditif (Kash et al. 1999; Stork et al. 2003). De plus, l'acide valproïque, un inhibiteur de la GABA alpha cétoglutarate transaminase, augmente le taux de GABA au niveau cérébral et entraîne une réduction du comportement de type anxieux dans l'EPM chez la Souris (Dalvi et Rodgers 1996).

Parallèlement, des études pharmacologiques ont montré les effets des ligands non benzodiazépiniques spécifiques des récepteurs du système GABA. Le muscimol, un agoniste des récepteurs GABA_A, possède une activité de type anxiolytique dans le labyrinthe en croix surélevé chez la Souris (Sasaki et al. 2002) et le baclofen, un agoniste des récepteurs GABA_B, ainsi que le GS39783, un nouveau modulateur allostérique positif du récepteurs GABA_B, ont des capacités similaires dans le labyrinthe en T surélevé et le labyrinthe en zéro surélevé chez la Souris (Bueno et al. 2005; Cryan et al. 2004).

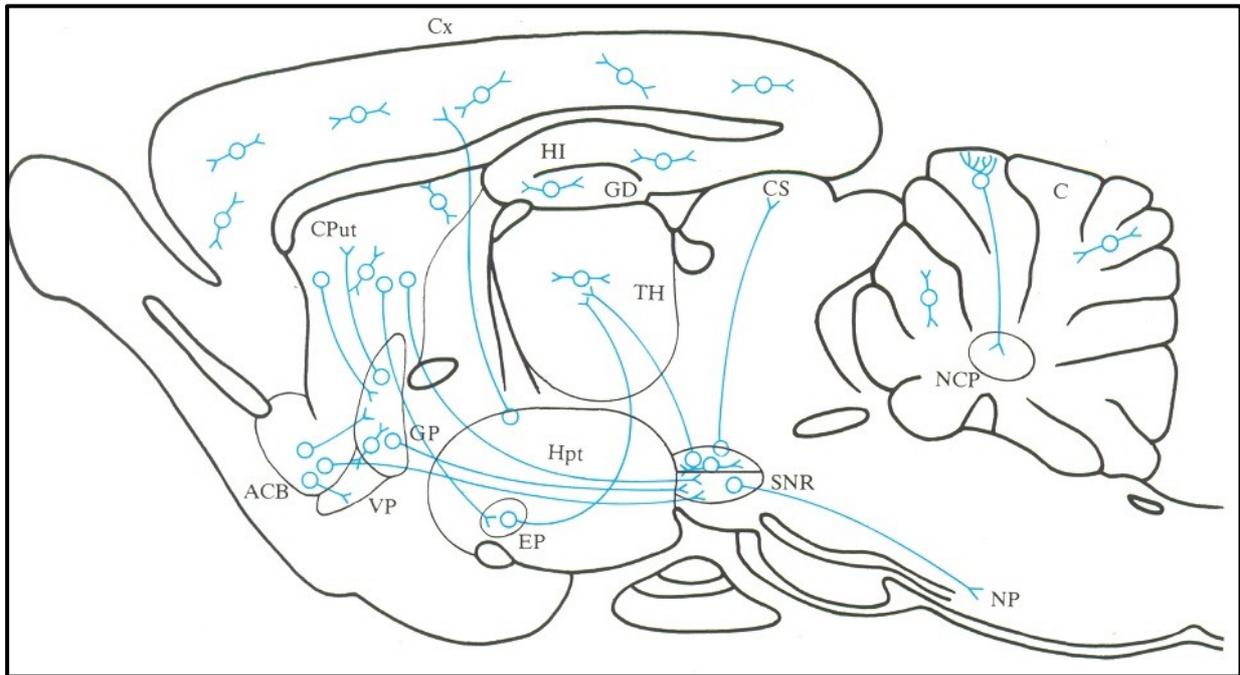


Figure 4 : Schéma des principales voies GABAergiques au niveau du système nerveux central de rat (non exhaustif)

ACB : noyau accumbens ; C : cervelet ; CPut : caudé-putamen ; CS : colliculus supérieur ; Cx : cortex ; EP : entopédonculaire ; GD : gyrus denté ; GP : globus pallidus ; HI : hippocampe ; Hpt : hypothalamus ; NCP : noyaux cérébelleux profonds ; NP : noyaux pontiques ; SNR substance noire réticulée ; TH : thalamus ; VP : pallidum ventral

1.4.1 Système sérotoninergique et système GABAergique

L'effet inhibiteur du GABA sur le système 5-HT semblerait participer aux propriétés anxiolytiques des agents GABAergiques (Millan 2003). De plus, l'activité de type anxiolytique induite dans le test de Vogel chez le Rat par une déplétion du système 5-HT est antagonisée par une administration d'antagonistes des récepteurs GABA_A, la bicuculline et la picrotoxine, alors qu'un antagoniste des benzodiazépines, le flumazénil, n'a aucun effet sur l'activité de type anxiolytique. Ces données suggèrent l'implication des récepteurs GABA_A dans l'effet de type anxiolytique induit par une déplétion du système 5-HT (Soderpalm et Engel 1991).

In vitro, l'activation des récepteurs GABA_A par un agoniste spécifique (le THIP ou le muscimol) inhibe la décharge des neurones 5-HT dans les noyaux du raphé dorsal et médian et la bicuculline, un antagoniste de récepteurs GABA_A, augmente la décharge de ces neurones (Judge et al. 2006; Kaura et al. 2006). L'effet positif de la bicuculline sur les neurones du raphé a également été observé chez le rat vigile (Fiske et al. 2006).

L'administration de BZDs par voie intra-péritonéale a montré des résultats surprenant car l'alprazolam, une triazolobenzodiazépine, augmente la libération de 5-HT alors que le diazépam, une benzodiazépine typique, entraîne une diminution de la libération de 5-HT dans l'hippocampe de rat. Les auteurs de cette étude suggèrent que l'augmentation induite par l'alprazolam serait due à un effet inhibiteur sur la NA qui de façon concomitante produirait une augmentation de la 5-HT (Broderick 1997).

La présence de récepteurs GABA_B a été démontrée sur les neurones 5-HT du raphé (Abellan et al. 2000; Burman et al. 2003). L'activation *in vitro* de ces récepteurs par la présence d'un agoniste, le baclofen, entraîne une diminution de la libération de 5-HT sur des coupes de cortex de souris et de rat (Gray et Green 1987; Schlicker et al. 1984). Dans une étude *in vivo*, l'administration de GABA dans le raphé médian diminue de façon dose dépendante la décharge des neurones 5-HT de ce noyau, alors que l'administration de baclofen augmente la décharge des neurones 5-HT dans cette structure. Les mêmes résultats sont observés lorsque le baclofen est administré par voie sous cutanée, dans le raphé dorsal et médian, le striatum dorsal et le cortex frontal (Abellan et al. 2000). L'étude du baclofen sur les ondes thêta de l'hippocampe a montré que cette molécule, quand elle est administrée au niveau du raphé

médian, améliore l'activité thêta de l'hippocampe et que cet effet est antagonisé par un antagoniste des récepteurs GABA_B. Les auteurs suggèrent que la grande quantité de récepteurs GABA_B dans le raphé dorsal et médian a des effets sur les ondes thêta de l'hippocampe par la suppression de l'influx 5-HT provenant du raphé médian (Varga et al. 2002).

En retour, la 5-HT possède la capacité de réguler la libération de GABA. Les études *in vitro* montrent que l'application d'agonistes des récepteurs 5-HT_{1A} (tandospirone et 8-OH DPAT) sur des coupes de cerveau de rat inhibe la libération de GABA des interneurons projetant vers la région CA1 de l'hippocampe. L'application de ces mêmes agonistes sur des coupes d'amygdale et de PAG ou sur des synaptosomes cortico-hippocampique de rat diminue la fréquence du courant post-synaptique inhibiteur induit par la stimulation de récepteurs GABA_A (Katsurabayashi et al. 2003; Kishimoto et al. 2000a; 2001; Koyama et al. 2002; Soderpalm et al. 1997). Ces récepteurs semblent être localisés au niveau présynaptique sur les terminaisons axonales des neurones GABA (Katsurabayashi et al. 2003; Kishimoto et al. 2000a).

Des études comportementales ont également montré des relations entre les récepteurs 5-HT_{1A} et les récepteurs GABA. Les ligands 5-HT_{1A} tels que le 8-OH DPAT et l'ipsapirone ont une action de type anxiolytique dans différents modèles animaux d'anxiété (le test d'enfouissement chez le Rat et un test comportemental d'évitement chez la Souris). Cette action est inhibée par la co-administration de flumazénil et potentialisée par la co-administration de diazépam (Fernandez-Guasti et Lopez-Rubalcava 1998; Lopez-Rubalcava et al. 1992). Des changements comportementaux sont aussi observés chez des souris dont le gène des récepteurs 5-HT_{1A} est inactivé puisque l'administration de diazépam chez ces souris n'induit pas d'effet de type anxiolytique dans le labyrinthe en croix surélevé contrairement aux souris témoins (Sibille et al. 2000).

La stimulation des récepteurs 5-HT_{1B} entraîne de la même façon des effets inhibiteurs sur la libération de GABA. Sur des coupes d'aire tegmentale ventrale de rat, le CP 93129 (un agoniste des récepteurs 5-HT_{1B}) ainsi que le RU 24969 (un agonistes des récepteurs 5-HT_{1A/1B}) inhibent la libération de GABA, induite par la présence de potassium. Cette inhibition est antagonisée par le SB 216641 (un antagoniste 5-HT_{1B}) (Yan et Yan 2001). L'inhibition du courant inhibiteur post-synaptique des neurones de la substance noire induit par la stimulation des récepteurs GABA_A est antagonisée par le pindolol (un antagoniste 5-HT_{1B}).

D'un autre coté, l'effet de type anxiolytique du SB 216641 est bloqué par le flumazénil dans le test de Vogel chez le Rat ce qui suggère une implication des récepteurs GABA_A. Les récepteurs 5-HT_{1B} impliqués semblent être des hétérorécepteurs ou des récepteurs post-synaptiques, puisque la destruction des neurones 5-HT ne modifie pas l'effet de l'antagoniste 5-HT_{1B} (Chojnacka-Wojcik et al. 2005).

La 5-HT semble également agir sur le système GABA par l'intermédiaire de récepteurs 5-HT₂. Le sous type spécifique 5-HT_{2A} de ces récepteurs a été retrouvé sur les neurones GABA du cortex préfrontal, de l'hippocampe et de la PAG de rat (Griffiths et Lovick 2002; Luttgen et al. 2004; Santana et al. 2004), alors que le sous type 5-HT_{2C} a été retrouvé sur les neurones GABA des noyaux antérieurs du raphé (Serrats et al. 2005). Les récepteurs 5-HT₂ semblent activer la transmission GABAergique.

L'administration systémique de DOI, un agoniste des récepteurs 5-HT_{2A/2C}, augmente l'immunoréactivité de la protéine fos dans le raphé dorsal, et cette immunoréactivité est localisée sur les neurones GABA. Ces résultats laissent sous entendre un effet de rétrocontrôle négatif des récepteurs 5-HT₂ sur la libération de 5-HT par l'intermédiaire d'une activation du système GABA (Boothman et Sharp 2005). Une étude *in vitro* semble confirmer cette hypothèse puisque la 5-HT et le MDL 100,907 (un agoniste 5-HT₂) augmente la fréquence du courant post-synaptique inhibiteur et cet effet est bloqué par la bicuculline (Liu et al. 2000).

L'action des récepteurs 5-HT₂ semble également avoir été observée dans d'autres structures telles que le cortex préfrontal et l'amygdale basolatérale dans des études *in vivo*, ainsi que dans l'hippocampe et le cortex préfrontal dans des études *in vitro* (Abi-Saab et al. 1999; Cozzi et Nichols 1996; Rainnie 1999; Shen et Andrade 1998). L'étude de l'effet de la trazodone (un antidépresseur antagoniste des récepteurs 5-HT_{2A}) montre que cette molécule aux doses où elle agit uniquement sur les récepteurs 5-HT_{2A} diminue la libération de GABA dans le cortex de rat par son effet antagoniste, alors qu'à plus forte dose où elle inhibe la recapture de 5-HT, elle augmente la libération de GABA (Luparini et al. 2004).

Il semblerait que les récepteurs 5-HT₂ puissent également agir au niveau de la cascade de signalisation intracellulaire induite par la stimulation des récepteurs GABA_A post-synaptique des neurones pyramidaux du cortex préfrontal de rat. L'application de DOI sur des coupes de cortex préfrontal de rat inhibe le courant post-synaptique, normalement induit par la stimulation des récepteurs GABA_A, par une augmentation de l'activité catalytique de la protéine kinase C et donc en potentialisant la phosphorylation des récepteurs GABA_A par la protéine kinase C (Feng et al. 2001).

La présence de récepteurs 5-HT₃ sur les interneurons GABA du cortex préfrontal de rat a été démontrée par hybridation *in situ*. Les récepteurs 5-HT₃ semblent avoir une influence positive sur la transmission GABAergique. Les études *in vitro* menées sur différentes structures cérébrales comme l'hippocampe, l'amygdale basolatérale, le gyrus denté et l'hypothalamus montrent une augmentation de la transmission GABAergique induite par la stimulation des récepteurs 5-HT₃ alors que le blocage de ces récepteurs entraîne une diminution de la transmission GABAergique (Katsurabayashi et al. 2003; Koyama et al. 2002; Meyer et al. 1991; Piguet et Galvan 1994; Ropert et Guy 1991; Turner et al. 2004; Ye et al. 1997). De plus, l'excitation des neurones GABA du cortex préfrontal, induite par la stimulation de raphé, est bloquée par l'administration intraveineuse d'antagoniste des récepteurs 5-HT₃ chez le rat (l'ondansetron et le tropisetron) (Puig et al. 2004).

Les récepteurs 5-HT₄ possèdent un effet complexe sur la libération de GABA puisque leur effet varie selon la dose de ligand utilisé. A faible dose, un agoniste des récepteurs 5-HT₄ (BIMU-8) augmente la libération de GABA des neurones de l'hippocampe et du cortex frontal, alors qu'à forte dose, il l'inhibe (Bianchi et al. 2002; Cai et al. 2002). Les auteurs suggèrent une action indirecte des récepteurs 5-HT₄ qui passerait par la libération d'acétylcholine.

Les récepteurs 5-HT₇ sont présents au niveau du raphé (Ruat et al. 1993; To et al. 1995). Sur des coupes de raphé dorsal de Cobaye, le SB-269970A (un antagoniste des récepteurs 5-HT₇) inhibe la libération de 5-HT et cette inhibition est atténuée par la bicuculline (un antagoniste GABA_A). Les auteurs suggèrent que les 5-HT₇ sont présents sur des neurones GABA au niveau du raphé et que leur activation entraîne une diminution de la libération de GABA d'où une diminution de l'influence inhibitrice du GABA sur la 5-HT (Roberts et al. 2004).

1.4.2 Antidépresseurs et système GABA

Un traitement chronique ou aigu avec des antidépresseurs entraîne une modification de la neurotransmission GABA dans certaines structures. Le ratio GABA/créatine, mesuré par résonance magnétique dans le cortex occipital de volontaires sains après une administration aiguë de citalopram par voie intra-veineuse, est augmenté significativement de 35% comparé aux volontaires n'ayant reçu que du liquide physiologique (Bhagwagar et al. 2004). La

concentration de GABA dans le cortex occipital chez 11 patients atteints de dépression est significativement augmentée après un traitement de 2 mois avec du citalopram et de la fluoxétine (Sanacora et al. 2002). Un traitement chronique d'ADs chez l'animal entraîne également des modifications de la libération de GABA, puisque chez le rat un traitement chronique de fluoxétine induit une diminution du courant post-synaptique inhibiteur des récepteurs GABA_A dans les neurones pyramidaux du cortex préfrontal (Zhong et Yan 2004). Les auteurs de cette étude suggèrent qu'un traitement chronique de fluoxétine entraîne une régulation négative de la fonction synaptique des récepteurs 5-HT₂, d'où une diminution de l'excitabilité des neurones GABA. Le taux cérébral d'alloprégnanolone, un modulateur allostérique positif des récepteurs GABA, est également modifié après un traitement avec les antidépresseurs. Après isolation sociale, les souris voient leur taux cérébral d'alloprégnanolone diminué et cette diminution est inhibée par un traitement avec de la fluoxétine (Pinna et al. 2005).

Les antidépresseurs ont également la capacité de modifier la densité des récepteurs GABA_A. L'augmentation de la densité des récepteurs GABA_A corticaux après une bulbectomie est inhibée par l'administration durant 21 jours de clorgyline, de désipramine et de paroxétine (Dennis et al. 1994).

Les récepteurs GABA_B semblent également modifiés suite à une administration d'ADs. L'administration de fluoxétine pendant 21 jours par l'intermédiaire d'une mini-pompe osmotique placée en sous-cutané altère l'hyperpolarisation médiée par les récepteurs GABA_B dans la région CA1 de l'hippocampe (Beck et al. 1997). De plus, l'administration chronique d'ADs semble augmenter la fonction des récepteurs GABA_B et la capacité de liaison des ligands (Pilc et Nowak 2005; Pratt et Bowery 1993).

1.5 DISTRIBUTION DES RECEPTEURS 5-HT₂ DANS LE SYSTEME NERVEUX CENTRAL

1.5.1 Les récepteurs 5-HT_{2A}

Au niveau cellulaire, les récepteurs 5-HT_{2A} sont situés au niveau des corps cellulaires et des dendrites (Roth et al. 1998; Xu et Pandey 2000) mais ne semblent pas s'étendre dans les terminaisons axonales ou les épines dendritiques (Cornea-Hebert et al. 1999).

Les récepteurs 5-HT_{2A} sont retrouvés en grande quantité dans le cortex (Cornea-Hebert et al. 1999). Certaines études d'hybridation *in situ* menées sur des cerveaux de rats montrent une quantité assez importante d'ARNm codant pour les récepteurs 5-HT_{2A} dans les couches profondes du cortex et dont la majorité est localisée au niveau des neurones pyramidaux de la couche III et V (Burnet et al. 1995). La même représentation est retrouvée dans le cortex frontal, cingulé, pariétal, temporal et infralimbique avec une grande quantité d'ARNm codant pour les récepteurs 5-HT_{2A} dans les couches III, IV et V chez le singe et le rat (Amargos-Bosch et al. 2004; Lopez-Gimenez et al. 2001b).

La mesure de la protéine, et non de l'ARNm, des récepteurs 5-HT_{2A} semble également montrer une grande quantité de ces récepteurs sur les cellules pyramidales du cortex (Willins et al. 1997). Le marquage des récepteurs 5-HT_{2A} dans le cerveau de rat par l'utilisation d'anticorps monoclonaux montre une forte concentration de récepteurs 5-HT_{2A} dans les neurones de la couche V et dans leurs dendrites proximales qui sont ramifiées au niveau des couches II et III. Il semble que le marquage soit absent de la couche I et très peu présent dans les couches IV et VI (Hamada et al. 1998; Wu et al. 1998; Xu et Pandey 2000). Des données semblables ont été retrouvées chez le singe (Jakab et Goldman-Rakic 1998).

La quantification des sites de liaison pour les récepteurs 5-HT_{2A} par autoradiographie montre par contre une grande quantité de récepteurs 5-HT_{2A} majoritairement localisée dans la couche IV du cortex préfrontal chez l'Homme et chez le Rat (Pazos et al. 1985; Pompeiano et al. 1994; Rosel et al. 2002).

La présence d'ARNm codant spécifiquement pour les récepteurs 5-HT_{2A} a été également caractérisée dans le système olfactif cérébral (Cornea-Hebert et al. 1999) et plus particulièrement dans la couche cellulaire mitrale ainsi que dans le noyau olfactif antérieur (Pompeiano et al. 1994) et le bulbe olfactif (Mijnster et al. 1997; Pompeiano et al. 1994). Les

études réalisées sur les sites de liaison de ces récepteurs montrent une régionalisation similaire (Pazos et al. 1985; Wu et al. 1998; Xu et Pandey 2000).

Les récepteurs 5-HT_{2A} ont été trouvés en quantité modérée dans l'amygdale, l'hypothalamus, la PAG et l'hippocampe (Burnet et al. 1995; Forutan et al. 2002; Griffiths et Lovick 2002; Hall et al. 2000; Hamada et al. 1998; Lopez-Gimenez et al. 2001b; Pazos et al. 1985; Pompeiano et al. 1994; Wu et al. 1998; Zea-Ponce et al. 2002). Les récepteurs présents dans l'hippocampe semblent plus spécifiquement localisés au niveau des cellules pyramidales de la région CA1 et CA3, et dans leurs dendrites situées dans le *stratum radiatum* et le *stratum lucidum* respectivement. Très peu voire aucun de ces récepteurs n'ont été vus dans le septum, les ganglions de la base, le thalamus, les noyaux du pons ou le striatum (Burnet et al. 1995; Hall et al. 2000; Lopez-Gimenez et al. 2001b; Pazos et al. 1985; Pompeiano et al. 1994; Wu et al. 1998; Zea-Ponce et al. 2002).

Les résultats concernant la localisation de ces récepteurs au niveau du cervelet sont contradictoires puisque de nombreuses études observent très peu de récepteurs 5-HT_{2A} dans cette structure (Burnet et al. 1995; Forutan et al. 2002; Lopez-Gimenez et al. 2001b; Pazos et al. 1985; Zea-Ponce et al. 2002) alors que deux autres études montrent une quantité assez importante de ces récepteurs dans cette structure (Geurts et al. 2002; Wu et al. 1998).

1.5.2 Les récepteurs 5-HT_{2B}

Sur des cultures d'astrocytes de cortex et d'hippocampe de rats, l' α -methyl 5-HT (un agoniste 5-HT_{2B}) produit un courant calcique entrant alors que la rauwolscine (un antagoniste des récepteurs 5-HT_{2B}) est capable d'inhiber cet effet. Ces résultats démontrent la présence de récepteurs 5-HT_{2B} fonctionnels dans le cortex et l'hippocampe de rat (Sanden et al. 2000). L'ARNm codant pour ces récepteurs a été quantifié dans l'hippocampe, le raphé dorsal, le cortex, le locus coeruleus, le noyaux paraventriculaire et le cervelet de rat (Bonaventure et al. 2002). L'ARNm codant pour ces récepteurs est également exprimé dans le cerveau humain (Kursar et al. 1994).

D'un autre côté, l'expression des récepteurs 5-HT_{2B} a aussi été observée dans de nombreuses structures cérébrales telles que l'amygdale médian, le septum latéral, l'hypothalamus, le cortex et le cervelet chez le rat (Duxon et al. 1997a) et également au niveau de cellule de Purkinje dans le cervelet de souris (Choi et Maroteaux 1996). Il semble que la localisation

cellulaire de ces récepteurs soit membranaire au niveau des corps cellulaires et des dendrites (Duxon et al. 1997a).

Des études comportementales ont également montré la présence de récepteurs 5-HT_{2B} fonctionnels au niveau de l'amygdale puisque l'administration d'un agoniste de ces récepteurs le BW 723C86 dans l'amygdale entraîne un effet de type anxiolytique chez le Rat dans le test d'interaction sociale et dans le labyrinthe en croix surélevé (Duxon et al. 1995; Duxon et al. 1997b).

1.5.3 Les récepteurs 5-HT_{2C}

Chez l'homme, la présence de récepteur 5-HT_{2C} a été retrouvée en majorité dans le plexus choroïde qui semble posséder beaucoup plus de récepteurs que les autres structures (Hoyer et al. 1986; Marazziti et al. 1999; Pasqualetti et al. 1999). Les données obtenues chez le rat et le singe montrent également une forte concentration de ces récepteurs dans le plexus choroïde et plus spécifiquement dans les cellules épithéliales (Abramowski et al. 1995; Hoffman et Mezey 1989; Lopez-Gimenez et al. 2001a; Sharma et al. 1997).

Les données concernant la quantité de récepteurs dans le cortex ne sont pas concordantes. Marazziti et al (1999) trouve très peu de récepteurs 5-HT_{2C} dans le néocortex comme l'étude de Pompeiano et al (1994) qui montre les même résultats sauf dans le cortex frontal alors que de nombreuses études ont observé un taux assez important de ces récepteurs dans cette structure (Abramowski et al. 1995; Clemett et al. 2000; Hoyer et al. 1986; Lopez-Gimenez et al. 2001a; Molineaux et al. 1989; Pasqualetti et al. 1999; Sharma et al. 1997).

L'hippocampe est une autre structure qui semble posséder une quantité importante de ce sous-type de récepteurs avec une localisation plus spécifique dans les régions CA1, CA2 et CA3, mais à l'inverse des récepteurs 5-HT_{2A}, les récepteurs 5-HT_{2C} ne sont pas présents au niveau du gyrus denté (Abramowski et al. 1995; Clemett et al. 2000; Garcia-Alcocer et al. 2006; Hoyer et al. 1986; Marazziti et al. 1999; Molineaux et al. 1989; Pasqualetti et al. 1999; Pompeiano et al. 1994).

Une quantité modérée de ces récepteurs a également été trouvée dans le locus coeruleus, le raphé dorsal et médian, le septum, l'hypothalamus, le putamen caudé, le noyau de l'accumbens et la substance noire (Abramowski et al. 1995; Hoffman et Mezey 1989; Lopez-Gimenez et al. 2001a; Marazziti et al. 1999; Molineaux et al. 1989; Pasqualetti et al. 1999; Pompeiano et al. 1994; Serrats et al. 2005; Sharma et al. 1997).

Les études menées par Pompeiano et al (1994) et Abramowski et al (1995) montrent une quantité modérée de récepteurs 5-HT_{2C} dans le cervelet, alors que les études plus récentes de Pasqualetti et al (1999) et Clemett et al (2000) ne trouvent aucune trace de ces récepteurs dans cette structure.

| Régions Cérébrales | 5-HT _{2A} | 5-HT _{2B} | 5-HT _{2C} |
|---------------------|----------------------|--------------------|---------------------------|
| <i>Télencéphale</i> | | | |
| Système Olfactif | ++++ ^{c, g} | | +++ ^{b, c, d, g} |
| Cortex Cérébrale | ++++ ^c | ++ ^a | ++++ ^{b, c, d} |
| Ganglion Basale | ++ ^c | | ++ ^{b, c, d} |
| Septum | - ^c | +++ ^a | +++ ^{b, c, d} |
| Hippocampe | ++ ^c | | +++ ^{b, c, d} |
| Amygdale | ++ ^c | +++ ^a | +++ ^{b, c, d, g} |
| <i>Diencéphale</i> | | | |
| Thalamus | ++ ^c | | +++ ^{b, c, d, g} |
| Hypothalamus | ++ ^c | +++ ^a | +++ ^{b, c, d, g} |
| <i>Mésencéphale</i> | | | |
| Substance Grise | - ^c | | ++ ^{b, c, d, f} |
| Substance Noire | ++ ^c | | +++ ^{b, c, d} |
| <i>Métencéphale</i> | | | |
| Cervelet | ++ ^{c, e} | +++ ^a | ++ ^{b, c, d, g} |
| Raphé Dorsal | + ^c | | +++ ^d |
| Raphé Médian | + ^c | | +++ ^d |

Tableau 3 : Distribution des récepteurs 5-HT₂ au niveau du SNC

La densité des récepteurs est représentée par : ++++ Très forte, +++ Forte, ++ Intermédiaire, + Basse, - Pas détectée ; ^a = Duxon et al., 1997, ^b = Abramowski et al., 1995, ^c = Pompeiano et al 1994, ^d = Clemett et al., 2000, ^e = Geurts et al., 2002, ^f = Griffiths et Lovick, 2002, ^g = Marazziti et al., 1999.

D'après la thèse de Brid Nic Dhonnchadha 2003

1.6 NEUROBIOLOGIE DE L'ANXIÉTÉ

Il semble largement démontré que le système cérébral de la peur est impliqué dans une grande partie des troubles anxieux (LeDoux 1996; Ohman 1992) et c'est pour cette raison qu'il est important de connaître dans le détail comment fonctionne le système de la peur.

La majeure partie de nos comportements est déterminée par l'accumulation de peurs conditionnées acquises tout au long de notre vie. Cette peur conditionnée est retrouvée dans de nombreuses espèces, elle a donc été largement étudiée dans les laboratoires de recherche. La technique la plus utilisée consiste à coupler un stimulus neutre (nommé stimulus conditionné) à un événement aversif. Le stimulus neutre suffit par la suite (une fois l'apprentissage effectué) à déclencher la réaction de peur chez l'animal. Une grande variété de modèles, autres que la technique décrite ci-dessus, a été également utilisée pour étudier les mécanismes impliqués dans la peur. Le point commun de ces modèles est donc d'induire un sentiment de peur qui entraîne différents comportements, comme l'interruption d'un comportement inné ou la prostration de l'animal. Dans d'autres modèles, la peur est mesurée par les modifications qui peuvent intervenir sur des paramètres physiologiques tels que le pouls, la pression artérielle ou la respiration ainsi que la production d'hormones comme les corticostéroïdes. Grâce à ces modèles animaux il a été possible de déterminer la neuroanatomie de l'anxiété. Deux concepts importants soulignent l'anatomie fonctionnelle de l'anxiété (Sandford et al. 2000). Le premier concept implique un système particulier pour chaque type d'anxiété. Ceci inclut le système de défense et le système d'inhibition comportemental ainsi que d'autres systèmes. Le deuxième concept implique une organisation en différents niveaux des circuits neuronaux de l'anxiété. Par exemple, les réponses automatiques simples sont médiées par des structures inférieures comme la PAG, le locus coeruleus ou l'hypothalamus alors que ce sont des structures intermédiaires (amygdale et système septo-hippocampique) qui permettent l'apparition de réponses plus étudiées. Les régions corticales plus hautes (cortex paralimbique) seraient impliquées dans des situations impliquant des composantes plus cognitives.

1.6.1 L'amygdale

L'Amygdale est une structure composée de 13 petits groupes cellulaires (ou noyaux) qui reçoivent des afférences de différentes aires cérébrales. Des informations sensorielles provenant de différentes aires corticales aboutissent au noyau latéral et le noyau basolatéral de l'amygdale qui en retour projettent vers le noyau central de l'amygdale (Aggleton 1985; Burwell et al. 1995; Pitkanen et al. 1995; Savander et al. 1995). Ce noyau central envoie des projections vers l'hypothalamus et d'autres aires qui interviennent dans les signes spécifiques de l'anxiété et de la peur. Il semble donc que l'amygdale et ces afférences forment le système cérébral de la peur impliquant l'expression et l'acquisition de la peur conditionnée (Davis 1997) et que l'ensemble des noyaux formant l'amygdale est le site d'une interface entre les stimuli sensoriels externes et la réponse motrice importante pour l'apprentissage et la mémoire de la peur ainsi que pour les réponses comportementales induites par la peur.

Les projections directes de l'amygdale vers l'hypothalamus (Krettek et Price 1978; Price et Amaral 1981) semblent impliquées dans l'activation du système nerveux sympathique observée durant les réactions de peur ou d'anxiété (LeDoux et al. 1988). Les projections directes de l'amygdale vers le noyau moteur dorsal de nerf vague, le noyau du tractus solitaire et la moelle ventrolatérale doivent être impliquées dans l'effet modulateur de l'amygdale sur le pouls et la pression artérielle (Gray et Magnuson 1987; Price et Amaral 1981; Schwaber et al. 1982; Takeuchi et al. 1983; Veening et al. 1984). Les projections du noyau central de l'amygdale vers le noyau parabrachial semblent, quant à elles, impliquées dans les changements respiratoires survenus lors de la peur (Hopkins et Holstege 1978; Krettek et Price 1978; Price et Amaral 1981; Takeuchi et al. 1982). De plus, les projections directes de ce noyau central de l'amygdale vers le noyau paraventriculaire de l'hypothalamus, ou indirectes par l'intermédiaire du noyau de la strie terminale et l'aire préoptique doivent induire la réponse endocrine importante engendrée par des stimuli stressants (Gray et al. 1989). Enfin, les projections directes de l'amygdale vers le locus coeruleus, ou indirectes par l'intermédiaire des neurones sérotoninergiques du raphé, augmentent la libération de noradrénaline et de sérotonine au niveau des neurones moteurs et donc entraînent une augmentation des performances motrices durant la peur (McCall et Aghajanian 1979; White et Neuman 1980).

D'un autre coté, certaines aires de l'hippocampe ventral (CA1 et le subiculum) projettent vers les noyaux basolatéral et basomédian de l'amygdale (Canteras et Swanson 1992) et ces projections doivent être impliquées dans le conditionnement contextuel puisque des lésions de ces aires interfèrent dans ce type de conditionnement (Maren et Fanselow 1995). (Figure 5)

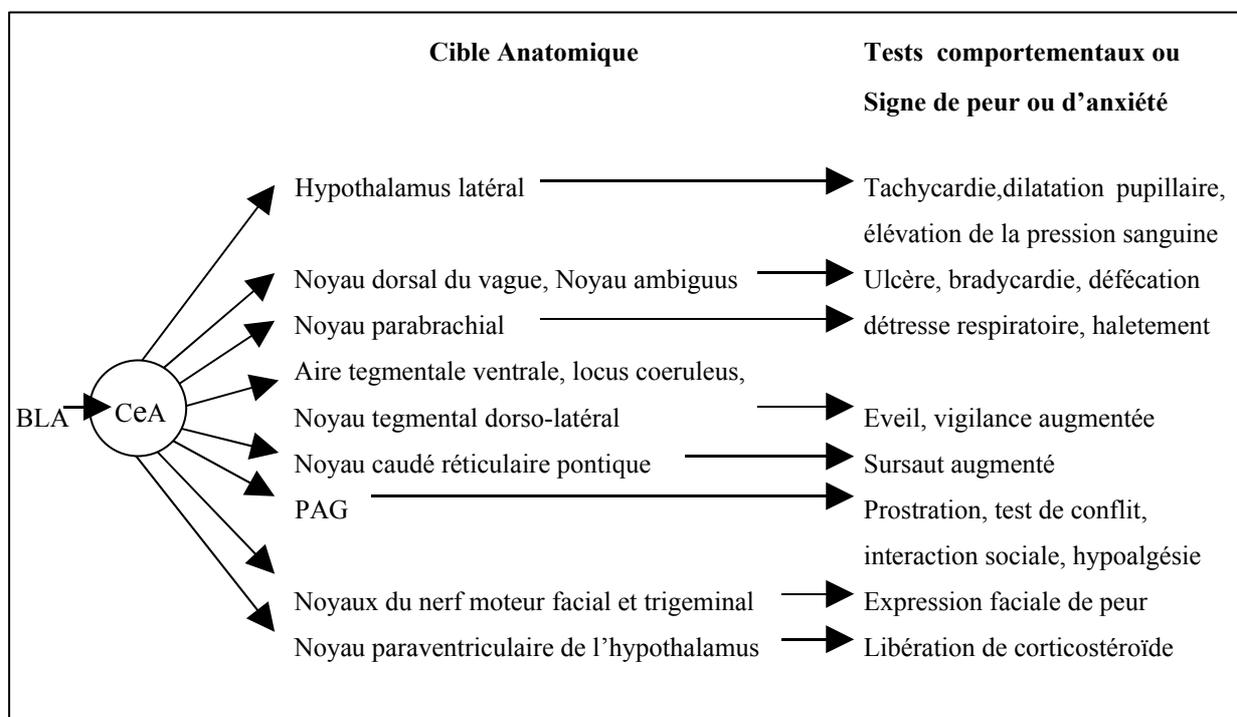


Figure 5 : Représentation des nombreuses projections du noyau central de l'amygdale vers des aires pouvant intervenir dans les conséquences comportementales, autonomiques et électrophysiologiques de la peur et de l'anxiété. (BLA = noyau basal de l'amygdale ; CeA = noyau central de l'amygdale)

D'après (Walker et al. 2003)

De nombreux auteurs ont étudié les effets d'une lésion de l'amygdale chez un certain nombre d'espèces. Cette lésion chez le rat abolit complètement la réponse défensive innée face à un chat (Blanchard et Blanchard 1972; Fox et Sorenson 1994). Les souris lésées confrontées à un nouvel environnement ne possèdent plus le comportement d'estimation des risques permettant aux animaux non lésés d'étudier le nouvel endroit (Misslin 2003). Chez les oiseaux, la lésion de l'archistriatum, la structure homologue à l'amygdale des mammifères, entraîne une diminution de la peur des oiseaux face à un homme (Misslin 2003).

Chez l'Homme, de fréquents changements émotionnels sont également vus dans la maladie d'Alzheimer et dans d'autres maladies neurologiques associées à des pathologies de l'amygdale (Aggleton 1993; Kromer Vogt et al. 1990), ce qui démontre une implication de l'amygdale dans les émotions humaines. De plus, une lésion bilatérale de l'amygdale semble également rendre les patients incapables de reconnaître l'expression de la peur sur un visage (Adolphs et al. 1994).

Les premières expérimentations de lésions de l'amygdale ont été réalisées chez le singe. Les observations faites après une lésion de l'amygdale montrent de nombreux changements comportementaux. Une ablation des lobes temporaux incluant l'amygdale et l'hippocampe entraîne une absence d'émotions ou de réactions vocales normalement associées à des stimuli ou des situations de peur chez ces animaux (Kluver et Bucy 1939). Ces lésions semblent également causer de profonds changements dans le comportement social des animaux puisque, dans les colonies de singes lésés, la dominance hiérarchique est rapidement abolie. Une étude récente a également rapportée que la période d'évaluation d'un nouvel objet placé dans la cage d'un singe, ainsi que leurs réactions d'évitement face à un serpent, réactions normalement observées chez le singe, sont abolies chez les animaux lésés (Amaral 2002). De plus, Emery et al (2001) montrent une suppression de la période d'observation de deux singes inconnus placés dans la même cage chez les animaux lésés (Emery et al. 2001). Cette réaction est normalement observée chez les singes avant toute interaction sociale positive afin d'éviter une agression de la part de l'autre d'où une diminution de l'anxiété chez les animaux lésés. Les études de lésion de l'amygdale s'accordent toutes pour montrer une diminution de l'anxiété dans différentes espèces.

La stimulation électrique et chimique de l'amygdale a montré des effets dans certains modèles animaux d'anxiété. La stimulation électrique du noyau basolatéral de l'amygdale produit une augmentation du temps passé dans les bras ouverts dans le test du labyrinthe en croix surélevé chez le Rat, et une augmentation du nombre de chocs acceptés par les rats dans le test

d'enfouissement défensif. Ces résultats démontrent un effet de type anxiolytique induit par la stimulation électrique de l'amygdale (Saldivar-Gonzalez et al. 2003).

L'administration locale de benzodiazépines ou d'agonistes des récepteurs GABA_A dans l'amygdale induit des effets de type anxiolytique dans le test de la double enceinte illuminée chez la souris (Costall et al. 1989) ou dans le labyrinthe en croix surélevé chez le rat (Green et Vale 1992; Pesold et Treit 1995). Dans le test de Vogel, le test d'interaction sociale et le test du labyrinthe en croix surélevé, l'effet de type anxiolytique des benzodiazépines apparaît après une administration locale de ces molécules dans le noyau latéral et le noyau basolatéral (Gonzalez et al. 1996; Green et Vale 1992; Petersen et al. 1985; Scheel-Kruger et Petersen 1982; Thomas et al. 1985; Zangrossi Junior et Graeff 1994). Les données concernant le noyau central semblent contradictoires. Dans certaines études, une administration de benzodiazépines dans le noyau central montre des effets de type anxiolytique dans le test de Geller-Seifter (Shibata et al. 1982; Shibata et al. 1986; Takao et al. 1992) alors que d'autres études ne montrent aucun effet de l'administration de ces molécules, dans le test du labyrinthe en croix surélevé et dans le test de Vogel (Green et Vale 1992; Scheel-Kruger et Petersen 1982).

L'administration d'antagonistes des récepteurs GABA_A, picrotoxine et bicuculline, dans le noyau basolatéral antérieur de l'amygdale, entraîne un effet de type anxiogène dans le test d'interaction social, alors que quand ces produits sont injectés dans le noyau central aucun effet n'est observé (Sanders et Shekhar 1995) ce qui concorde avec l'effet de type anxiolytique des BZDs observé lors d'une administration locale.

D'un autre côté, l'administration locale au niveau de l'amygdale d'agonistes des récepteurs 5-HT_{1A} entraîne un effet de type anxiogène dans le test de conflit de Geller-Seifter (Hodges et al. 1987; Takao et al. 1992) alors que l'administration de ces agonistes entraîne un effet de type anxiolytique dans le test des vocalisations ultrasoniques (Schreiber et De Vry 1993).

Un effet de type anxiolytique est obtenu après une administration d'agoniste spécifique du sous type de récepteur 5-HT_{2B} dans les tests du labyrinthe en croix surélevé et d'interaction sociale (Duxon et al. 1995; Duxon et al. 1997b). L'injection d'agonistes du sous type de récepteurs 5-HT_{2C} semble, à l'opposé, avoir des effets de type anxiogène dans l'« open field » et le methysergide, un antagoniste spécifique de ces récepteurs, entraîne un effet de type anxiolytique dans le test de Geller Seifter (Campbell et Merchant 2003; de Mello Cruz et al. 2005; Hodges et al. 1987).

Enfin, les antagonistes des récepteurs 5-HT₃, après injection locale au niveau de l'amygdale, induisent un effet de type anxiolytique dans le test d'interaction sociale et le test de la double enceinte illuminée (Costall et al. 1989; Higgins et al. 1991).

1.6.2 La PAG (Substance Grise Periaqueducule)

La stimulation de la PAG est bien connue chez l'Homme pour engendrer de la peur (Nashold et al. 1969). La réponse aversive produit par la stimulation de la PAG dorsale a permis d'aider à la compréhension des processus d'anxiété et de leurs bases pharmacologiques. Chez le chat et le rat, la stimulation de la PAG rostral entraîne des comportements observés normalement chez un individu se trouvant face à une menace. Ainsi, des vocalisations et des réactions de fuite sont observées chez ces animaux (Behbehani 1995). La stimulation de la PAG caudal produit une immobilité chez l'animal (Bandler et Carrive 1988; Bandler et Depaulis 1988).

L'aversion chez l'animal ainsi que l'anxiété et la peur induites chez l'Homme produites par la stimulation de la PAG, indiquent que cette structure est fortement impliquée dans les mécanismes neurobiologiques de la peur ou de l'anxiété. Des études menées chez le rat montrent que la prostration d'un rat, lorsqu'il est exposé à un prédateur tel que le chat, est annulé chez des animaux dont la PAG et l'amygdale ont été préalablement lésées (Fanselow 1991). Fanselow, dans cette étude, suggère que les stimuli dangereux activent des régions de l'amygdale qui projettent vers la PAG activant ainsi cette structure et entraînant les réactions de défense. Ces résultats font apparaître un modèle où les signaux de danger activent les régions de l'amygdale qui projettent vers la PAG ventrale. Cette activation produit un comportement de prostration. Quand les animaux rencontrent un danger (un rat se retrouve face à un chat), les projections de l'amygdale vers la PAG latérale sont activées et produisent les réactions de fuite souvent associées à des vocalisations de l'animal. En accord avec ce modèle, il y aurait donc une interaction inhibitrice entre la PAG ventrale et la PAG dorsale, puisque les données précédentes suggèrent que la stimulation de la PAG dorsale induit la fuite et les réponses défensives, et que la stimulation de la PAG ventrale produit l'immobilisation et la prostration des animaux (Behbehani 1995).

La pharmacologie des systèmes de peur et de fuite de la PAG implique la 5-HT, la cholecystokinine (CCK) et le GABA. Le rôle de la 5-HT dans le fonctionnement de la PAG est complexe car la PAG possèdent de nombreux sous-types de récepteurs dont les effets sont opposés. Une micro-injection de 5-HT au niveau de la PAG dorsale entraîne une

augmentation du seuil de stimulation produisant des réponses aversives (Graeff et al. 1986b; Schutz et al. 1985). Cet effet est mimé par l'administration locale de DOI et potentialisé par un IRSS, la zimelidine, alors qu'il est bloqué par des antagonistes des récepteurs 5-HT₂ suggérant l'implication des récepteurs 5-HT₂ (Graeff et al. 1986b; Jacob et al. 2002; Schutz et al. 1985). D'un autre côté, l'injection locale d'un agoniste des récepteurs 5-HT_{1A}, 8 OH-DPAT, semble réduire le comportement de fuite et induire un effet anti-aversif qui se trouve être bloqué par un antagoniste des récepteurs 5-HT_{1A}, le WAY 100635 (Nogueira et Graeff 1995). De plus, l'application de 8 OH-DPAT dans la PAG hyperpolarise et inhibe la décharge des neurones de la PAG dorsale (Behbehani et al. 1993).

La PAG contient une grande quantité de neurones GABAergiques et ce système GABAergique de la PAG est impliqué dans l'aversion et l'anxiété. L'administration locale de midazolam, un agoniste du site benzodizépinique des récepteurs GABA_A, au niveau de la PAG, entraîne un effet de type anti-panique dans le labyrinthe en T surélevé et un effet de type anxiolytique dans le labyrinthe en croix surélevé. De plus, l'administration locale de FG 7142, un agoniste inverse du site benzodiazépinique, entraîne des effets de type anxiogène (Bueno et al. 2005; Russo et al. 1993). De plus, le blocage des récepteurs GABA_A, par l'administration d'antagoniste de ce type de récepteurs, cause une augmentation de la décharge des neurones de la PAG (Behbehani et al. 1990) et produit une réponse aversive (Graeff et al. 1986a; Lloyd et al. 1983; Shaikh et Siegel 1990).

Des neurones contenant de la cholecystokinine (CCK) sont également présents au niveau de la PAG et l'application locale de CCK entraîne une excitation des neurones de la PAG *in vivo* et *in vitro* (Liu et al. 1994). L'effet de la CCK dans la PAG semble passer par l'excitation des récepteurs CCK-2 puisque l'effet anxiogène induit par l'injection locale de CCK-8 (un octapeptide sulfaté) est inhibé par le PD 135158, un antagoniste des récepteurs CCK-2 dans le labyrinthe en croix surélevé et le labyrinthe en T surélevé (Netto et Guimaraes 2004; Zanoveli et al. 2004). Pour confirmer ces résultats, une récente étude montre que la CCK-4, un agoniste des récepteurs CCK-2, entraîne une action de type panique (Bertoglio et Zangrossi 2005).

1.6.3 L'hippocampe

L'argument clé de la participation du système septo-hippocampique dans l'anxiété est la similarité entre l'effet de molécules anxiolytiques et les lésions de l'hippocampe. Les

nouvelles molécules anxiolytiques qui n'interagissent pas avec le récepteur GABA_A possèdent également cette similarité d'effet avec les lésions de l'hippocampe.

D'un autre côté, de nombreuses études ont montré que les anxiolytiques classiques de type benzodiazépine et les nouvelles molécules anxiolytiques de type antidépresseur sont efficaces dans des tests qui semblent être spécifique d'une forme de mémoire sensible à l'hippocampe (McNaughton et Morris 1987; 1992; Money et al. 1992; Tan et al. 1989; 1990). Ces résultats lient l'action anxiolytique de ces molécules à des changements d'un type de mémoire normalement attribué à l'hippocampe.

Les molécules anxiolytiques produisent également des changements caractéristiques de l'activité électrique de l'hippocampe (Fontani et Carli 1997; McNaughton et Gray 2000; Yamamoto 1998). L'activité électrique régulière de l'hippocampe est générée par des cellules stimulatrices dans le septum médian et est convoyée dans tout l'hippocampe par les fibres du fornix et de la fimbria. L'activité thêta régulerait le flux d'information traité par l'hippocampe. La fréquence des ondes thêta est faible (<7 Hz) quand les animaux sont immobiles en alerte ou ont un comportement routinier spécifique de l'espèce, et haute (> 8.5 Hz) quand les animaux bougent rapidement dans leur environnement. Les fréquences importantes dans l'anxiété seraient les fréquences intermédiaires de 7 à 8.5 Hz. L'administration de molécules anxiolytiques entraîne une inhibition de ces ondes thêta intermédiaires de l'hippocampe (Caudarella et al. 1987; Longo et al. 1988). Ils semblent que les récepteurs GABA_A soient impliqués dans cet effet puisque l'administration d'un modulateur allostérique négatif (FG 7142 ou Ro 15-4513) de ces récepteurs induit l'activité thêta dans l'hippocampe (Marrosu et al. 1988; Ongini et al. 1983) alors que les benzodiazépines inhibent cette activité dans l'hippocampe (McNaughton et Coop 1991; Yamadera et al. 1993).

En plus de ces effets des BZDs sur l'hippocampe, le stress peut entraîner des changements anatomiques. Chez l'Homme, des études menées sur des patients souffrant d'un état de stress post-traumatique ont montré une réduction de 6 à 8% du volume de l'hippocampe (Bremner et al. 1995; Smith 2005). Chez l'animal, un stress constant provoque une dégénérescence de l'hippocampe induit par un taux élevé chronique de glucocorticoïdes (McEwen et Magarinos 1997).

Les benzodiazépines (midazolam et diazépam) injectés localement dans l'hippocampe dorsal entraîne des effets de type anxiolytique dans le test de conflit de Vogel (Kataoka et al. 1991; Plaznik et al. 1994; Stefanski et al. 1993a). Les agonistes des récepteurs 5-HT_{1A} semblent induire des effets similaires dans le test de conflit de Vogel ainsi que dans le test de

vocalisations ultrasoniques (Jolas et al. 1995; Kataoka et al. 1991; Przegalinski et al. 1994; Schreiber et De Vry 1993; Stefanski et al. 1993a). L'effet de type anxiolytique de ces molécules a également été observé dans le test du labyrinthe en croix surélevé (Menard et Treit 1998). Le seul ligand des récepteurs 5-HT₂ à avoir été testé par injection locale dans l'hippocampe est le mCPP possédant une forte affinité pour les récepteurs 5-HT_{2C}. Cette molécule a démontré avoir un effet de type anxiogène dans le test d'interaction sociale (Whitton et Curzon 1990). Aucune étude n'a observé l'effet d'autres ligands spécifiques des sous type de récepteurs 5-HT₂. Les antagonistes des récepteurs 5-HT₃ possèdent un effet de type anxiolytique dans le test de conflit de Vogel lorsqu'ils sont injectés au niveau de l'hippocampe dorsal (Stefanski et al. 1993b).

1.6.4 Autres structures

Le locus coeruleus contient les corps cellulaires de neurone noradrénergiques qui constituent le faisceau noradrénergique dorsal. Les terminaisons de ces neurones se retrouvent au niveau de nombreuses structures comprenant le cortex, les aires limbiques et le thalamus (Valentino et Aston-Jones 1996). La stimulation électrique du locus coeruleus chez le singe entraîne des comportements similaires à ceux observés quand l'animal se trouve dans des situations sociales impliquant le conflit ou face à un danger correspondant à une manifestation de peur ou d'anxiété (Redmond et Huang 1979; Redmond et al. 1976). Ces comportements peuvent être bloqués par une lésion du locus coeruleus, par des molécules anti-adrénergiques ou des substances anxiolytiques (Uhde et al. 1984). D'un autre côté, l'innervation noradrénergique de l'hippocampe semble également importante dans l'anxiété. L'inhibition de la synthèse de NA ou la lésion sélective du système noradrénergique inhibe les ondes thêta de l'hippocampe de fréquences 7.7 Hz (Gray et al. 1975; McNaughton et al. 1977). Cet effet est également induit par l'administration de molécules anxiolytiques (voir ci-dessus). L'activation du locus coeruleus par le stress ou des stimuli aversifs (Stanford 1990) et son rôle dans le conditionnement des stimuli émotionnels (Rasmussen et Jacobs 1986) impliquent le locus coeruleus dans l'orchestration des réactions d'alerte (Charney et Heninger 1986; Redmond 1986).

L'hypothalamus reçoit des projections du système limbique et du locus coeruleus et possède un rôle clé dans la coordination de la réponse endocrine à l'anxiété. La stimulation électrique de l'hypothalamus induit des réactions d'évitements et facilite les comportements agressifs et

défensifs accompagné d'une augmentation de la peur et de l'anxiété (Graeff 1994; Milani et Graeff 1987). Ces effets sont supprimés par l'administration locale de muscimol, un agoniste des récepteurs GABA_A, ou de diazépam (Milani et Graeff 1987; Sajdyk et al. 1997). D'autres études ont montré que les stress inévitables ainsi que les tests de conflit diminuent significativement le niveau de 5-HT dans l'hypothalamus ventro-médian, alors qu'une augmentation de la concentrations de 5-HT dans cette structure est accompagnée d'un effet de type anxiolytique (Martin et al. 1990).

1.6.5 Modèle de Deakin et Graeff

Grâce aux modèles animaux, l'implication et le rôle de nombreuses structures cérébrales ont été déterminés. A partir de ces données, Deakin et Graeff ont tenté de modéliser l'implication de certaines structures et de la sérotonine dans les troubles anxieux (Graeff 2004). Deakin (1989) suggère que la stimulation des récepteurs 5-HT₂ dans des structures telles que l'amygdale ou le cortex frontal augmente la sensibilité aux stimuli aversifs (un stress aigu) et donc augmente l'anxiété (Deakin 1989). Dans le même temps, la stimulation des récepteurs 5-HT_{1A} dans l'hippocampe pourrait augmenter la résistance à un stress chronique. L'idée d'une balance inverse entre ces deux types de récepteurs 5-HT est alors émise. Deux faisceaux ascendants sont impliqués dans ce modèle. L'amygdale et le cortex frontal sont largement innervés par le noyau de raphé dorsal, alors que l'hippocampe possède de nombreuses terminaisons axonales sérotoninergiques provenant du noyau du raphé médian (Azmitia et Segal 1978). Cette hypothèse implique que le blocage des récepteurs 5-HT₂ diminue l'anxiété. Une étude clinique a montré l'efficacité de la ritansérine (un antagoniste non spécifique des récepteurs 5-HT₂) chez des patients atteints de GAD (Ceulemans et al. 1985). A l'inverse, une autre étude fait apparaître une aggravation des symptômes dans les troubles paniques (PD) après un traitement par la ritansérine (Den Boer et Westenberg 1990). Deakin conclut que la GAD et les PD sont modulés dans des directions opposées par la 5-HT, corrélant l'action facilitatrice ou inhibitrice de la 5-HT à des structures du système limbique et la PAG respectivement (Graeff 1991). Ce modèle ferait donc intervenir trois faisceaux 5-HT. Le premier est un faisceau de neurones 5-HT, issus du noyau du raphé dorsal, qui projette vers la PAG et l'hypothalamus médian. Ce faisceau 5-HT inhibe le comportement de fuite ou de combat induit par un stimulus non conditionné, comme la suffocation ou un danger proche. Ces réactions peuvent être corrélées au PD. Le second faisceau va du noyau dorsal du raphé vers l'amygdale et le cortex frontal. Il est supposé faciliter l'anxiété anticipatoire déterminé

par des stimuli aigus. Ce type d'anxiété peut être corrélé au GAD. Le dernier faisceau a pour origine le noyau de raphé médian et projette vers l'hippocampe. Dans cette structure le 5-HT améliore les processus neuronaux pour permettre à l'animal de s'adapter à des situations chroniques stressantes.

Tableau 4 : Résumé de Modèle de Deakin et Graeff

D'après Graeff 2004

Voir la thèse papier page 46

| | | |
|--|--|--|
| | | |
|--|--|--|

2 MATERIELS ET METHODES

2.1 Animaux et substances utilisées

2.1.1 Animaux

Les animaux utilisés tout au long de ce travail sont des souris mâles de souche SWISS issu de l'élevage JANVIER, Le genest, France. Les animaux sont réceptionnés et hébergés dans l'animalerie du laboratoire pendant 4 à 7 jours avant les expérimentations, par groupe de 18 animaux dans des cages de dimensions 40 × 28 × 17 cm avec l'eau et la nourriture distribués ad libitum. La température de l'animalerie est maintenue à 21 ± 1 °C et le cycle d'éclairage est un cycle standard (lumière entre 7h et 19h). Chaque groupe expérimental est constitué de 10 animaux naïfs au test dont le poids est homogène (20 ± 2g). Les expérimentations sont réalisées le matin entre 7 et 12h.

Les règles éthiques du Ministère Français de l'Agriculture concernant l'expérimentation animale ont été respectées tout au long de l'étude (décret n° 87-848 du 19 octobre 1987).

2.1.2 Molécules utilisées

Antidépresseurs: paroxétine, HCl [(3S-trans)-3[1,3-benzodioxol-5-yloxy)methyl-4-(4-fluorophenyl)-piperidine] (SmithKline Beecham, France); citalopram, HBr [1-[3-(Diméthylamino)propyl]-1-(4-fluorophenyl)-1,3-dihydro-5-isobenzofurancarbonitrile] (Lundbeck, Danemark); venlafaxine, HCl [1-[2-(Diméthylamino)-1-(4-méthoxyphényl)éthyl]cyclohexanol] (Wyeth-Ayerst, France); milnacipran [Chlorhydrate de (Z)-1-diéthylaminocarbonyl-2-aminoéthyl-1-phényl-cyclopropane] (Pierre Fabre, France).

Agoniste des récepteurs 5-HT_{2A/2C}: (±)-DOI, HCl ([±]-2,5-Diméthoxy-4-iodoamphétamine) (Sigma, France).

Antagonistes des récepteurs 5-HT₂: SR 46349B [2-propen-1-one, 1-(2-fluorophényl)-3-(4-hydroxyphényl)-O-[2-diméthylamino)éthyl]oxime] (Sanofi, France); SB 206553, HCl [N-3-pyridinyl-3,5-dihydro-5methyl-benzo[1,2-b:4,5-b']dipyrrole-1[2H]carboxamide] (Sigma, France); kétansérine tartrate ([-(2-[4-(4-Fluorobenzoyl)-1-piperidinyl]éthyl)-2,4(1H,3H)-quinazoline-dione tartrate] (Janssen, France).

Agoniste des récepteurs α_1 -noradrénergiques: adrafinil [2-[(diphenylmethyl)sulfinyl]-N-hydroxyacetamide] (Lafon, France)

Antagoniste des récepteurs α_1 -noradrénergique: prazosine, HCl [1-(4-Amino-6,7-dimethoxy-2-quinazoliny)-4-(2-furanylcarbonyl)piperazine hydrochloride] (Tocris, France).

Agonistes des récepteurs α_2 -noradrénergiques: clonidine, HCl [2-[(2,6-Dichlorophenyl)amino]-2-imidazoline hydrochloride] (RBI, France); guanabenz acétate [(2,6-Dichlorobenzylidene)amino]guanidine acetate] (Tocris, France); guanfacine [N (Aminoiminomethyl)-2,6-dichlorobenzeneacetamide] (Sigma, France).

Antagonistes des récepteurs α_2 -noradrénergiques: idazoxan, HCl [(±)-2-[1,4-Benzodioxan-2-yl]-2-imidazoline hydrochloride] (Tocris, France).

Agonistes du site aux benzodiazépines des récepteurs $GABA_A$: diazépam [(7-chloro-1-methyl-5-phenyl-3H-1,4-benzodiazepine-2[1H]-one)] (Sigma, France), alprazolam (8-Chloro-1-methyl-6-phenyl-4H-[1,2,4]-triazolo[4,3-a][1,4]benzodiazepine) (Sigma, France).

Agoniste des récepteurs $GABA_A$: muscimol hydrobromide (5-Aminomethyl-3-hydroxyisoxazole hydrobromide) (Sigma, France).

Antagonistes des récepteurs $GABA_A$: picrotoxine (Sigma, France); 1(S),9(R)-(-)-bicuculline methobromide [R-(R*,S*)]-5-(6,8-Dihydro-8-oxofuro[3,4-e]-1,3-benzodioxol-6-yl)-5,6,7,8-tetrahydro-6,6-dimethyl-1,3-dioxolo[4,5-g]isoquinidinium bromide (Sigma, France).

Agoniste des récepteurs $GABA_B$: R(+)-baclofen, HCl (R(+)- β -(Aminomethyl)-4-chlorobenzenepropanoic acid hydrochloride) (Sigma, France)

Antagoniste des récepteurs $GABA_B$: CGP 35348 (3-Aminopropyl)diethoxymethyl)-phosphonic acid (Sigma, France).

2.2 Administration des traitements

2.2.1 **Injections intra-péritonéales**

Lors des études d'effets propres, les ligands sont administrées par voie intra-péritonéale (i.p.) sous un volume de 0.5ml/20g de poids corporel 30 min avant le début du test. Dans les études d'interactions, le prétraitement est administré 45 min avant le début du test et le traitement 30 min avant le test. Les animaux contrôles reçoivent le même nombre d'injections que les animaux traités comprenant uniquement de l'eau distillée.

Toutes ces substances sont dissoutes dans de l'eau distillée, à l'exception du SR46349B, du diazépam, de l'alprazolam qui sont solubilisés dans une suspension aqueuse contenant 5% de Tween 80 (Merck, Allemagne).

2.2.2 **Injections locales au niveau de trois structures cérébrales**

2.2.2.1 **Anesthésie**

Afin de réaliser les opérations de chirurgie stéréotaxique permettant d'installer le dispositif d'injection locale, les souris sont anesthésiées par une injection intra-péritonéale d'hydrate de chlorale à 400 mg/kg à raison de 0.1 ml de solution pour 20 g de poids corporel.

2.2.2.2 **Dispositif d'injection**

Le dispositif d'injection est constitué d'un guide canule (tube en acier inoxydable de 0,60 mm de diamètre externe et de 0,35 mm de diamètre interne, de 7 à 11 mm de long selon la structure cérébrale visée) (UNIMED, Suisse) implanté dans l'hippocampe, la PAG ou l'amygdale. Les canules d'injection sont constituées d'un tube d'acier inoxydable (0,30 de diamètre externe et 0,15 de diamètre interne, 18 à 25 mm de long) coulissant parfaitement dans le guide canule. La longueur de la canule est ajustée, à l'aide d'un guide canule, de façon à ce qu'elle ne dépasse pas du guide canule lorsqu'elle est y sont introduite.

Après l'implantation du guide canule, un fil d'acier (0,28 mm de diamètre et 7 mm de long) est placé à l'intérieur du guide canule afin d'éviter son obstruction.

2.2.2.3 Chirurgie stéréotaxique

Les animaux sont fixés au cadre stéréotaxique à l'aide de barres d'oreilles. Le crâne est incisé et mis à nu. Les tissus conjonctifs qui le recouvrent sont éliminés par application d'eau oxygénée. L'emplacement des guides canules (bilatéralement) est déterminé grâce aux repères stéréotaxiques que constituent les sutures de la boîte crânienne et les coordonnées des structures sont déterminées à partir de l'atlas stéréotaxiques Franklin et Paxinos (1997). Pour assurer la fixation du guide canule, un ciment dentaire verre ionomère GC Fuji IX (Henri Shein, France) est appliqué sur la boîte crânienne de l'animal. Enfin le guide canule est obturé par le fil d'acier. L'animal est ensuite placé dans une cage individuelle pendant 3 jours pour la récupération puis replacé par groupe de 6 animaux. Le passage dans le test comportemental se fait 7 jours après l'opération.

Les coordonnées utilisées pour le positionnement du guide canule sont :

- pour le l'hippocampe : antero-postériorité - 2,5 mm, latéralité 1,75 mm, profondeur 2 mm
- pour l'amygdale : antero-postériorité – 1,5 mm, latéralité 2,75 mm, profondeur 5 mm
- pour le PAG : antéro-postériorité – 4,6 mm, latéralité 0 mm, profondeur 2 mm.

2.2.2.4 Préparation de la solution

Le DOI est dissout dans une solution de liquide cérébro-spinal artificiel (aCSF) et la concentration de la solution est adaptée en fonction du volume injecté. Les souris contrôles reçoivent une injection locale d'aCSF.

2.2.2.5 Procédure d'injection

La canule d'injection est reliée à une seringue Hamilton de 2 μ l par un cathéter. La seringue et la cathéter sont remplis soit d'aCSF pour les souris contrôles ou de DOI dissous dans l'aCSF pour les souris traitées. Avant l'injection le fil d'acier est retiré du guide canule et remplacé par la canule. Pour l'hippocampe, le volume injecté est de 0,5 μ l par hippocampe (d'où un volume par souris de 1 μ l) avec une vitesse d'injection de 0,5 μ l/min. Pour l'amygdale et la PAG, le volume est de 0,2 μ l dans chaque hémisphère d'où un volume total de 0,4 μ l par

animal avec une vitesse de 0,2 µl/min. Les souris sont exposées au test comportemental immédiatement après la fin de l'injection.

2.2.2.6 Contrôle histologique

Une dizaine de souris après chaque expérimentation sont injectés avec du bleu de méthylène à volume et vitesse identique à ceux utilisés pendant l'expérimentation puis sont sacrifiées par dislocation cervicale. Les animaux sont ensuite décapités et les têtes sont plongées pendant au moins 48h dans du paraformaldéhyde à 4% afin de fixer les tissus. Après extraction de la boîte crânienne, les cerveaux sont coupés au cryostat en coupes d'environ 40 µm d'épaisseur. Ceci permet la vérification du point d'injection.

2.3 Modèles comportementaux

2.3.1 Procédure générale

Les tests sont réalisés entre 7h et 13h dans des pièces calmes. Les souris sont placés dans la salle d'expérimentation au moins 1h avant le début du test dans des cages par groupe de 6 à 10 souris et sont replacés dans la même cage après chaque piqûre afin que les animaux s'acclimatent à ce nouvel environnement et que la réponse néo-phobique soit minimisée au maximum. Chaque groupe de traitement est constitué de 12 souris et à la fin de l'expérimentation les souris ayant fait des scores extrêmes sont ôtées pour obtenir des groupes dont le nombre de souris est égal à 10.

2.3.2 Test d'actimétrie (Boissier et Simon 1965)

L'activité locomotrice spontanée des animaux naïfs de chaque molécule utilisée est déterminée dans un actimètre (Boissier et Simon 1965). L'appareil est constitué de compartiments munis de cellules photoélectriques qui constituent deux faisceaux (Figure 6). Les ruptures de ces faisceaux sont comptabilisées pour témoigner de l'activité horizontale de l'animal. Cette activité est enregistrée sur une durée de 10 min. Ce test est réalisé

indépendamment du test des quatre plaques ce qui permet de supprimer les doses trop sédatives ou trop stimulantes.



Figure 6: Test d'actimétrie

2.3.3 Test des quatre plaques (FPT) (Aron et al. 1971; Boissier et al. 1968)

L'appareillage (BIOSEB, Chaville, France) est constitué d'une cage (18 cm × 25 cm × 16 cm) dont le sol est composé de quatre plaques en métal (8 cm × 11 cm) séparées l'une de l'autre par un espace de 4 mm (Figure 7). Ces quatre plaques sont reliées à un générateur de chocs électrique. Les chocs administrés ont une intensité de 0.6 mA et de durée 0.5 secondes.

Après une période de latence de 15 secondes l'animal reçoit un choc électrique plantaire chaque fois qu'il passe d'une plaque à l'autre. Le nombre de chocs électriques ou punitions est comptabilisé pendant 60 secondes. L'administration d'une substance ayant une activité anxiolytique induit une augmentation du nombre de punitions acceptées par les animaux.



Figure 7 : Test des quatre Plaques

2.4 Déplétions

2.4.1 **Substances utilisées**

p-CPA [para-chlorophénylalanine] (Sigma, France)

DSP-4 [N-(2-chloroéthyl)-N-éthyl-2-bromobenzylamine HCl] (Sigma, France)

2.4.2 **Protocoles expérimentaux**

Lésion du système noradrénergique

La lésion du système noradrénergique est réalisée par l'administration unique de 50 mg/kg d'une neurotoxine, le DSP-4, par voie intra-péritonéale (i.p.) 168 heures avant le FPT.

Déplétion en sérotonine

La déplétion en sérotonine est obtenue par l'administration répétée de *p*-CPA 72, 48 et 24 heures avant le test, le *p*-CPA étant un inhibiteur de synthèse de la 5-HT.

2.5 Analyses neurochimiques

2.5.1 **Prélevement des structures**

Les souris sont euthanasiées par dislocation cervicale. Le cerveau est prélevé et placé sur une plaque réfrigérante (Leica EG 1130, Nussloch, Allemagne) dont la température est réglée à environ -5°C (Figure 8). Quatre structures cérébrales (hypothalamus, hippocampe, striatum et cortex) sont isolées selon la technique d'Iversen et Glowinski (1966). Le cervelet est enlevé puis le cerveau est posé sur la face dorsale afin de prélever l'hypothalamus. Ensuite les deux hémisphères sont séparés pour pouvoir prélever l'hippocampe de chaque hémisphère. Le corps calleux est ôté pour pouvoir prélever le striatum et le tissu restant correspond au cortex (Figure 9).



Figure 8 : Plaque réfrigérante

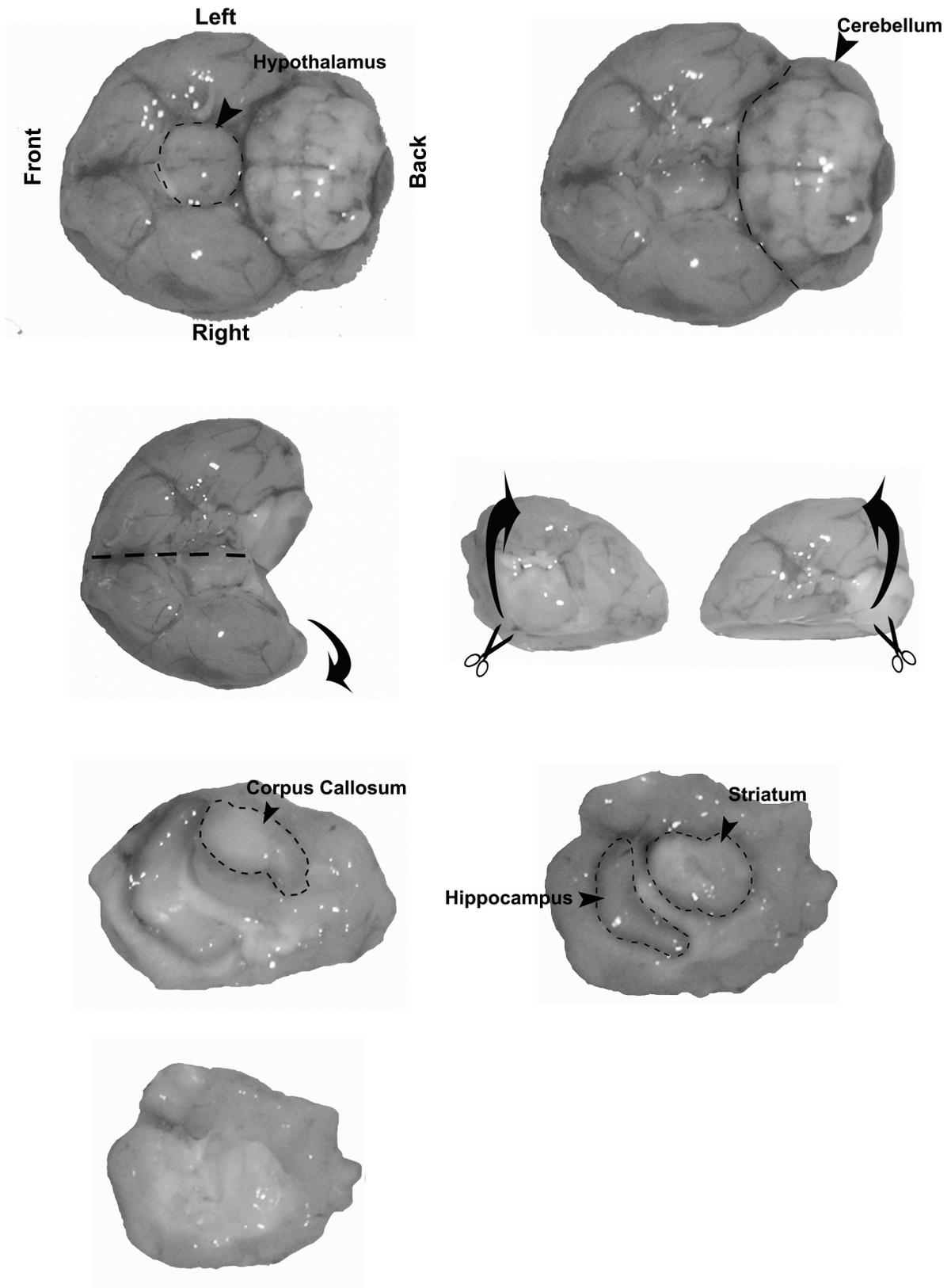


Figure 9 : Dissection de structures cérébrales (Chenu et al. 2006)

2.5.2 Mesure de la concentration de neurotransmetteurs cérébraux

Chaque structure est placée dans un tube de polypropylène d'une capacité de 1,5 ml préalablement pesé. 600µl, pour les tubes contenant l'hypothalamus et l'hippocampe, et 1200µl, pour les tubes contenant le striatum et le cortex, d'une solution acide contenant 8,8 mg d'acide ascorbique, 122mg d'EDTA dans 1litre de acide perchlorique 0,1M sont ajoutés dans chaque tube. Les tissus sont ensuite disloqués par ultrasons (Branson Sonifer) puis centrifugés à 12000g pendant 10min à une température de + 4°C (Hareus Biofuge). Le surnageant est enfin prélevé est stocké à – 80°C avant l'analyse HLPC (chromatographie en phase liquide à haute performance).

Le système d'analyse HPLC est constitué d'une pompe Varian modèle Prostar (Sunnyvale, USA), d'un injecteur automatique réfrigéré Waters Wisp modèle 717 (Milford, USA), un détecteur ampérométrique Decade (Leiden, Pays Bas) avec une cellule électrochimique Antec Leyden (Zolterwoude, Pays Bas) model VT-03 (0,5 V) et une colonne C18 (Nucleosil, taille des particules 5µm, 15 cm, Colochrom, Gagny, France) thermostaté à 45°C. Le débit de la pompe est de 1,6ml/min, la durée d'analyse est de 25 min, 20µl de surnageant sont injectés dans le système.

La phase mobile est composée de 4,2g/l d'acide citrique monohydraté, 6,8g/l d'acétate de sodium trihydraté, 0,8g/l d'acide octane sulfonique, 0,05g/l d'EDTA, 0,02% (v/v) de dibutylamine et 7% (v/v) de méthanol. Son débit, lors de la chromatographie, est de 1,6ml/min. La chromatographie dure 25 minutes et la quantité d'échantillon injecté est de 20µL. Le potentiel de détection est de 0,48 V et le détecteur ampérométrique lié à l'ordinateur permet l'enregistrement du signal.

Pour chaque série d'analyse, une gamme constituée d'un mélange de 5-HT, DA, HVA (métabolite de la dopamine), 5-HIAA (métabolite de la 5-HT) et NA est préparée dans la solution d'homogénéisation additionnée. Les courbes de calibration sont calculées par régression linéaire. Les concentrations cérébrales sont exprimées par le rapport entre la concentration en amine extraite dans le surnageant et le poids de la structure cérébrale.

2.6 Analyse statistique

Les analyses statistiques sont réalisées grâce au programme SPSS. Les résultats sont exprimés sous forme de moyenne des valeurs observées (nombre de coupures de faisceau) dans le test d'actimétrie avec un nombre d'animaux égal à 10. Dans le test des quatre plaques, les résultats sont exprimés sous forme de moyenne \pm écarts standard à la moyenne (ESM). Le paramètre étudié dans ce test est le nombre de passages punis acceptés par les souris.

2.6.1 **Etudes Effets propres**

Les données sont analysées grâce à un test paramétrique d'homogénéité des variances (ANOVA) à un facteur. Une ANOVA significative ($p < 0,05$) permet la réalisation d'un test *a posteriori* de Dunnett pour détecter d'éventuelle différence entre les groupes traités et le groupe contrôle.

Les effets du diazépam ou de l'alprazolam inclut comme des témoins standards dans les tests d'anxiété sont comparés au groupe contrôle par un test *t* de Student ($p < 0,05$).

2.6.2 **Etudes d'interaction**

Les données des études d'interactions sont analysées grâce à une ANOVA à deux facteurs (pré-traitement x traitement). Pour l'étude de l'effet du *p*-CPA et du DSP-4 sur la co-administration de clonidine avec du DOI, une ANOVA à trois facteurs a été utilisée. Une différence significative de l'ANOVA ($p < 0,05$) permet de réaliser un test *a posteriori* de Sidak pour comparer l'effet des pré-traitements sur les traitements administrés.

Les effets du diazépam ou de l'alprazolam inclut comme des témoins standards dans les tests d'anxiété sont comparés au groupe contrôle par un test *t* de Student ($p < 0,05$).

2.6.3 **Etudes neurochimiques**

Un test *t* de Student a été réalisé afin de comparer le groupe traité au groupe contrôle pour chaque structure cérébrale et chaque neurotransmetteur.

3 RESULTATS

3.1 Etude 1 :

Etude de l'implication des systèmes NA et 5-HT dans le mécanisme d'action du milnacipran et effet de la déplétion de ces deux systèmes sur deux IRSSs et deux IRSNs dans le FPT.

3.1.1 **Etude 1a** :

Anxiolytic-like effect of milnacipran in the four-plate test in mice: mechanism of action. Bourin Michel, Massé Fabienne, Dailly Eric, Hascoët Martine. Pharmacol Biochem Behav. 2005, 81(3):p. 645-56.

3.1.1.1 OBJECTIFS DE L'ETUDE 1a

Les IRSNs constituent une classe d'antidépresseurs parmi lesquels on trouve de nombreuses molécules qui se sont révélés avoir des effets de types anxiolytiques dans un certains nombres de modèles animaux d'anxiété (ex : venlafaxine). Malheureusement, le mécanisme impliqué dans l'effet anxiolytique de ces molécules n'est pas encore totalement élucidé. Le milnacipran est un inhibiteur mixte de la recapture de la 5-HT et de la noradrénaline (NA), il ne produit pas de métabolite pharmacologiquement actif contrairement à la plupart des autres antidépresseurs, donc ses effets neurochimique, pharmacologique et clinique sont dus à la molécule en elle-même (Puozzo et Leonard 1996).

Deux études de microdialyse ont montré que l'administration de milnacipran par voie orale entraînait une augmentation de la 5-HT et de la NA, dans l'hypothalamus de rat ou dans l'hypothalamus de cobaye, par contre aucune modification de la concentration en dopamine n'est observée (Moret et Briley 1997; Moret et al. 1985). Ces augmentations sont dues à la capacité du milnacipran à inhiber la recapture de la 5-HT et de la NA. L'étude de l'inhibition de la recapture des monoamines dans des synaptosomes de rat montrent que le milnacipran possède une capacité d'inhibition de la recapture de la 5-HT et la NA similaire alors que la venlafaxine a une capacité d'inhibition de recapture de la 5-HT deux fois supérieure à celle de la NA (Briley 1998).

Des études d'affinité sur différents récepteurs ne montrent pas de sélectivité particulière du milnacipran pour les récepteurs noradrénergiques, muscariniques, GABAergiques et sérotoninergiques contrastant avec les antidépresseurs tricycliques qui eux possèdent une affinité pour les récepteurs α_1 noradrénergiques, muscariniques et histaminergiques de sous-type H_1 (Mochizuki et al. 2002; Moret et al. 1985).

Le milnacipran a préalablement montré un effet de type anxiolytique dans un test d'anxiété chez la souris : le FPT (Hascoet et al. 2000). Afin de comprendre les mécanismes impliqués dans cet effet, la co-administration de milnacipran avec des ligands des systèmes GABAergique (un antagoniste du site benzodiazépinique des récepteurs $GABA_A$, le flumazénil) et noradrénergique (un antagoniste des récepteurs α_1 , la prazosine et un antagoniste des récepteurs α_2 , l'idazoxan) est réalisée. Nous avons aussi choisi d'étudier le système sérotoninergique en utilisant des antagonistes des récepteurs 5-HT₂ (un antagoniste mixte des récepteurs 5-HT_{2A/2C}, la kétansérine ; un antagoniste des récepteurs 5-HT_{2A}, le SR46349B et un antagoniste des récepteurs 5-HT_{2B}, le SB206553). Le choix de l'étude de ces

sous-types particuliers de récepteurs s'est fait au vu des résultats obtenus précédemment qui montrent que le sous-type 5-HT₂ semble être impliqué dans l'effet de type anxiolytique d'une administration aiguë de deux autres antidépresseurs la paroxétine et la venlafaxine dans le FPT (Nic Dhonnchadha et al. 2005). De plus, le DOI un agoniste des récepteurs 5-HT_{2A/C} induit un effet de type anxiolytique dans le FPT quand il est administré en aigu 30 min avant le début du test (Nic Dhonnchadha et al. 2003a).

Dans un second temps nous avons voulu vérifier que l'effet du milnacipran observé dans le test est bien dû à son activité inhibitrice sur la recapture de la 5-HT et de la NA. Pour cela nous avons étudié l'effet du milnacipran après une déplétion du système 5-HT et une lésion des neurones NA issus du locus coeruleus par l'utilisation de *p*-CPA, un inhibiteur de synthèse de la 5-HT, et de DSP-4, une neurotoxine sélective des neurones NA issus du locus coeruleus respectivement.

Dans cette étude, l'administration de milnacipran se fait 30 min avant le test et les ligands 5-HT, NA et GABA sont administrés 45 min avant le début du test. Seul le milnacipran est utilisé à des doses qui induisent un effet dans le test, les autres molécules aux doses utilisées n'induisent aucun effet par elle-même dans le FPT.



Anxiolytic-like effect of milnacipran in the four-plate test in mice: Mechanism of action

Michel Bourin*, Fabienne Masse, Eric Dailly, Martine Hascoët

EA 3256 Neurobiologie de l'anxiété et de la dépression Faculté de Médecine BP 53508, 1, rue Gaston Veil, 44035 Nantes Cedex 01, France

Received 27 September 2004; received in revised form 18 April 2005; accepted 28 April 2005

Available online 14 June 2005

Abstract

Milnacipran is a serotonin/noradrenaline reuptake inhibitor (SNRI) which has not yet been systematically studied preclinically or clinically for the treatment of anxiety disorders. In the four-plate test (FPT) which is known to predict anxiolytic-like activity in mice, milnacipran (4, 8, 16 and 32 mg/kg) demonstrated strong anti-punishment effects following acute administration. The anxiolytic-like effect of milnacipran was not reversed by the selective GABA_A receptor antagonist, flumazenil (2 and 4 mg/kg), the selective α_1 -adrenoceptor antagonist, prazosin (0.5 and 2 mg/kg), the selective α_2 -adrenoceptor antagonist, idazoxan (1 and 4 mg/kg) or the selective 5-HT_{2B} receptor antagonist, SB 206553 (0.1 and 1 mg/kg). In contrast, the selective 5-HT_{2A} receptor antagonist, SR 46349B (0.1 and 1 mg/kg), and the non-selective 5-HT₂ receptor antagonist, ketanserin (0.125 and 0.5 mg/kg), completely abolished the anxiolytic-like effect of milnacipran in FPT. Neurochemical depletion of NA or 5-HT completely abolished the activity of milnacipran.

These results strongly suggest that activation of 5-HT_{2A} receptors is critically involved in the anxiolytic activity of milnacipran. On the other hand the lack of activity of milnacipran after depletion of NA or 5-HT is consistent with milnacipran acting on the locus coeruleus to induce 5-HT release. The present data suggest a strong connection between 5-HT_{2A} receptors and NA neurotransmission.

© 2005 Elsevier Inc. All rights reserved.

Keywords: Milnacipran; Anxiety; Four-plate test; 5-HT_{2A} receptors; Noradrenaline

1. Introduction

Over the last 10 years, growing evidence suggests that antidepressants including the selective serotonin/noradrenaline reuptake inhibitor (SNRI) milnacipran constitute a novel class of drugs acting in anxiety disorders, but their exact mechanism of action remains unclear (Bourin and Hascoët, 2001).

Milnacipran is an SNRI (Lambert and Bourin, 2002) which has not yet been systematically studied preclinically or in humans for the treatment of anxiety disorders. Milnacipran simultaneously inhibits 5-HT and NA reuptake. In contrast to venlafaxine, the reuptake inhibition of both monoamines is more balanced (Bourin, 1999). Although

reuptake inhibition is dose-dependent the balance between NA and 5-HT reuptake blockade remains constant. In a previous paper we studied the activity of a wide range of antidepressants including milnacipran on the four-plate test (FPT) which is known to predict anxiolytic-like activity in mice (Hascoët et al., 2000). The number of punished crossings was dramatically increased by the SSRIs citalopram, fluvoxamine and paroxetine but not fluoxetine. The SNRIs, milnacipran and venlafaxine, also demonstrated strong anti-punishment effects following acute administration. In contrast, the specific NA reuptake inhibitors, desipramine and maprotiline, and the atypical antidepressant, trazodone, enhanced freezing behaviour suggesting anxiogenic-like behaviour. It was concluded that, in the FPT, a model based on spontaneous responses, where animals are exposed to an aversive environment from which they can only escape by being motionless, this kind of behaviour might be related to anticipatory anxiety. In this

* Corresponding author. Tel.: +33 2 40 41 28 52; fax: +33 2 40 41 28 56.
E-mail address: michel.bourin@univ-nantes.fr (M. Bourin).

situation, antidepressants acting acutely on 5-HT transmission possessed clear anxiolytic-like effects but the balance between the two transmitters, 5-HT and NA, seemed to be a crucial factor in the anxiolytic-like effect (Hascoët et al., 2000).

In a recent paper, (Nic Dhonnchadha et al., 2003a) we hypothesised that the FPT and the elevated plus maze (EPM) generated different kinds of anxiety. Indeed, the injection of benzodiazepines into the amygdala or lesions of the amygdala are without effect in the plus maze possibly implicating the peri-aqueductal gray area (PAG) in the kind of anxiety generated by exposure to the mouse EPM. (Gonzalez et al., 1996; Menard and Treit, 1996). The activation of central 5-HT₂ receptors resulting in anxiolytic-like effects in some regions of the brain (e.g. medial amygdala) while anxiogenic effects in others (e.g. dorsal hippocampus) also lends to support to this speculation (Menard and Treit, 1999). Using three mice models of anxiety in mice we have shown that DOI, a 5-HT₂ receptor agonist, induced anxiolytic-like effect in the FPT and the EPM (Nic Dhonnchadha et al., 2003a) and these effects are likely to be 5-HT_{2A} receptor-mediated in both tests (Nic Dhonnchadha et al., 2003b). Even though DOI possesses affinity for all three 5-HT₂ receptor subtypes, it is nevertheless considered as one of the most selective 5-HT_{2A} agonists available (Porter et al., 1999).

Recently, we have demonstrated that direct binding to 5-HT₂ receptors seems to be implicated in the acute effect of antidepressants, including the selective reuptake inhibitor (SSRI), paroxetine, and the serotonin noradrenaline reuptake inhibitor (SNRI), venlafaxine, in the FPT (Nic Dhonnchadha et al., 2005) and that the 5-HT_{2A} receptor subtype seemed to be implicated.

The aim of the present study was to investigate the mechanism of action of milnacipran in the FPT after acute administration. Experiments using antagonists were performed to determine the role of the GABAergic, noradrenergic and serotonergic systems by combining available antagonists selective for each system. Flumazenil was expected to antagonise the anxiolytic-like effect of milnacipran, if it acts via a GABAergic mechanism. Two subtypes of noradrenergic receptors were investigated, the α_1 and α_2 receptor subtypes using the antagonists prazosin and idazoxan, respectively. Regarding the serotonergic system, the 5-HT_{2A} ligand SR 46349B was used as the antagonist, the 5-HT_{2B} receptor antagonist SB 206553 was chosen even though it possesses some affinity for the 5-HT_{2C} receptor since a more selective antagonist is not yet available. The mixed 5-HT_{2A/C} antagonist ketanserin was also studied. Doses of the antagonists that were inactive by themselves were selected based on preliminary experiments including a spontaneous locomotor activity test (Boissier and Simon, 1965) and one or two animal models of anxiety (FPT or EPM) with large range doses of the compounds. The dose-effect of SR 46349B, SB 206553 and ketanserin have been previously evaluated on locomotion and anxiolytic-like

activity (Nic Dhonnchadha et al., 2003a). Flumazenil was found to have no effect in the same tests (Clenet et al., 2004). The dose-effect of prazosin and idazoxan was determined just before the interaction studies.

The activity of milnacipran in the FPT was also investigated after depletion of NA or 5-HT by specific neurochemical lesion using DSP-4 and *p*-CPA.

2. Materials and methods

2.1. Animals

Male Swiss mice (4 weeks old) were purchased from R. Janvier (Le Genest, France). Their average body weight on the day of the study was 20 ± 2 g. These animals were housed in groups of 18 per cage (40 cm \times 28 cm \times 17 cm), at a constant temperature (20 °C), and a standard light cycle (lights on between 0700 h and 1900 h). The animals had free access to food and water.

2.2. Drugs

Milnacipran (Laboratoire Pierre Fabre), benzodiazepine receptor antagonist: flumazenil (RO 15-178) (Hoffmann-La Roche SA). 5-HT₂ ligands: SR 46349B [2-propen-1-one, 1-(2-fluorophenyl)-3-(4-hydroxyphenyl)-O-[2-(dimethylamino) ethyl] oxime] (Sanofi Recherche, France), SB 206553 hydrochloride (-3-pyridinyl-3,5-dihydro-5-methyl-benzo[1,2-*b*:4,5-*b'*]dipyrrole-1[2H]carboxamide hydrochloride) (Sigma, France) ketanserin tartrate (Tocris, Fisher Bioblock scientific France). Noradrenergic ligands: prazosin (Tocris, Fisher Bioblock Scientific France) and idazoxan (Tocris; Fisher Bioblock scientific France). *p*-Chlorophenylalanine (*p*-CPA) (RBI, Sigma-Aldrich chimie France), DSP-4 HCl (RBI, Sigma-Aldrich chimie France). Alprazolam (Tocris, Fisher Bioblock Scientific France).

All drugs were dissolved in a 5% concentration of Tween 80. All drugs or vehicle were administered i.p. in a volume of 0.5 ml/20 g of body weight. Control animals received vehicle only.

2.2.1. Locomotor activity test (Boissier and Simon, 1965)

The spontaneous activity of naive animals was recorded using a photoelectric actimeter (OSYS). This apparatus consists of a transparent cage from which the animal's activity is measured by light beams connected to a photoelectric cell. The total number of horizontal cage crossings was recorded over a period of 10 min. The actimeter test was performed independently of the FPT in order to examine the effect of drugs on spontaneous locomotor activity of mice.

2.2.2. The "four-plate" test (FPT) (Aron et al., 1971)

This apparatus consists of a cage (18 cm \times 25 cm \times 16) floored by four identical rectangular metal plates (8

cm × 11 cm) separated from one another by a gap of 4 mm. The plates are connected to a device that generated electric shocks (0.6 mA, 0.5 s). Following a 15-s habituation period, the animal is subjected to an electric shock triggered by a foot pedal when crossing from one plate to another. The number of crossings is recorded during a 1-min test period.

2.2.3. Neurochemical assays

The method is adapted from the assay described by Baker et al. (1987). Briefly, mice were killed by cervical dislocation without anaesthesia. The brain was rapidly removed from the cranium and dissected on a cooled aluminium apparatus. The brain sections (cortex, striatum, hippocampus, hypothalamus) were weighed and disrupted by sonication in 600 µl of an acid solution (8.8 mg of ascorbic acid and 122 mg of EDTA in 1000 ml of perchloric acid 0.1 M). After sonication, the solution was centrifuged at 12,000×*g* for 10 min at +4 °C. The supernatant was stored at –80 °C before use. The concentrations of noradrenaline (NA), serotonin (5-HT) and dopamine (DA) were measured in the supernatant by high performance liquid chromatography with electrochemical detection [Decade amperometric detector (Leiden, The Netherlands) with an electrochemical Antec Leyden model VT-03 Flow cell (Zolterwoude, The Netherlands)]. The chromatographic conditions were (i) a C18 column (Nucleosil, 5 µm particle size, 15 cm, Colochrom, Gagny, France) in a column heater (+45 °C), (ii) an oxidation potential for amperometric detection of 0.48 V, (iii) a mobile phase composed of 4.2 g/L of citric acid monohydrate, 6.8 g/L of sodium acetate trihydrate, 0.8 g/L of octanesulphonic acid sodium salt, 0.05 g/L of EDTA, 0.02% (v/v) dibutyl amine, 7%(v/v) methyl alcohol (iv) a rate flow of 1.6 ml/min, and (v) a total run time of 25 min. With these chromatographic conditions detection limits were 3×10^{-5} mg/L for NA, 7.5×10^{-5} mg/L for DA and 16.7×10^{-5} mg/L for 5-HT in the supernatant. The concentrations in brain tissues of NA, 5-HT and DA are calculated from supernatant concentrations, the volume of the acid solution used to dilute brain sections and the weight of these brain sections. Results are expressed as ng of NA, 5-HT, or DA per g of brain section tissue.

2.3. Experimental protocol

Dose–effect relationship of milnacipran was determined after acute administration in the FPT, 30 min before testing. The doses of 4 to 32 mg/kg were investigated together with a vehicle control group and alprazolam 0.25 mg/kg as internal control. Two inactive doses of the antagonists (45 min before testing) were co-administered with active doses of milnacipran (30 min before the test) in the FPT. For each experiment, all doses of antagonists used in this study were studied alone and in combination

with milnacipran, alprazolam (0.25 mg/kg) was used as a positive control.

Serotonergic lesion was carried out using the 5-HT synthesis inhibitor *p*-CPA (300 mg/kg) administered intraperitoneally 72 h, 48 h and 24 h before the test (Artaiz et al., 1998; Dursun and Handley, 1993), milnacipran was administered 30 min before testing. The extent of depletion was determined in vehicle control using HPLC by comparing concentration of NA, 5-HT and DA in vehicle-treated depleted group and vehicle-treated non-depleted group.

Lesion of the noradrenergic system was achieved by systemic pre-treatment with the selective noradrenergic neurotoxin, DSP-4 (50 mg/kg) administered intraperitoneally 168 h before the test (Yu et al., 1994), milnacipran was administered 30 min before testing. The extent of depletion was determined in vehicle control using HPLC by comparing concentration of NA, 5-HT and DA in vehicle-treated depleted group and vehicle-treated non-depleted group.

2.4. Statistics

2.4.1. Behavioural studies

The mean number of responses for each group and for each test was calculated, and the final results expressed as a mean (with standard error of the mean in parentheses).

Statistical comparisons were performed initially via an one-way analysis of variance (ANOVA) for independent groups, after verifying the normality of distribution by a Kolmogorof–Smirnov non-parametric test. If any statistical change was observed, data was further analysed using post-hoc comparisons, with a Dunnett's test, to detect eventual differences between control and treated groups. Data was deemed significant when $p < 0.05$. The effects of alprazolam, included as internal standards in the anxiety model, were compared to the control group via a Student's *t*-test ($p < 0.05$). For interaction and association studies a two-way ANOVA (pre-treatment × treatment) was employed for global analysis purposes. If the ANOVA showed a significant difference between groups ($p < 0.05$), a Sidak post-hoc comparison test was performed to compare the effects of pre-treatment on treatment administered.

2.4.2. Neurochemical studies

The mean concentration of monoamines was calculated, and the final results expressed as a mean (with standard error of the mean in parentheses) and percentage residual from controls. Statistical comparisons were performed initially via a one-way analysis of variance (ANOVA) for independent groups, after verifying the normality of distribution by a Kolmogorof–Smirnov non-parametric test. If any statistical change was observed, data was further analysed using post-hoc comparisons, with a Fisher test, to detect eventual differences between control and *p*-CPA or DSP-4 treated groups. Data was deemed significant when $p < 0.05$.

Table 1

Effects of acute administration of compounds injected i.p. 30 min before the test on mouse spontaneous locomotor activity in the actimeter test

| Compounds | Dose (mg/kg) | | | | | | | | | | | | |
|-------------|--------------|-------|--------|--------|-------|-------|--------|--------|-------|--------|--------|--------|-------|
| | Vehicle | 0.03 | 0.06 | 0.125 | 0.25 | 0.5 | 1 | 2 | 4 | 8 | 16 | 32 | |
| Ketanserin | 100% | 103% | 105% | 106% | 95% | 87% | 53%*** | 37%*** | | | | | |
| SR 46349B | 100% | 109% | 104% | 90% | 111% | 86% | 78% | 83% | | | | | |
| SB 206553 | 100% | 110% | 111% | 112% | 111% | 100% | 112% | 114% | 116% | | | | |
| Flumazenil | 100% | 99.2% | 120.3% | 103.3% | 90.1% | 93.2% | | | | | | | |
| Idazoxan | 100% | | | 114% | 122%* | 125%* | 120% | 90% | 112% | 110% | | | |
| Prazosin | 100% | | | 74%* | 65%* | 51%** | 38%** | 21%*** | 36%** | | | | |
| Milnacipran | 100% | | | | | | | | | 103.6% | 105.8% | 101.5% | 93.8% |

All data are given as a percentage of the value observed in control animals ($n=10$). Significantly different from relative control group, * $p=0.05$, ** $p=0.01$ and *** $p=0.001$, determined by one-way ANOVA followed by a Dunnett's test.

The ethical rules of the French Ministry of Agriculture for experiments with laboratory animals (no. 87.848) were followed at all times.

3. Results

3.1. Effects of compounds in the actimeter test

Ketanserin (1 and 2 mg/kg) and prazosin (0.125 to 4 mg/kg) significantly reduced spontaneous locomotor activity of mice. Idazoxan (0.25 and 0.5 mg/kg) increased locomotor activity of mice. From the dose ranges of all compounds tested, non-psycho-stimulant doses for subsequent anxiety tests were chosen (Table 1).

3.2. Effects of milnacipran in the FPT

Milnacipran (4–32 mg/kg) significantly increased the number of shocks accepted by mice, [$F_{(5,54)}=6.943$, $p<0.001$]. The maximum effect was observed for the dose of 8 mg/kg with 8.2 ± 0.6 punished crossings ($p<0.01$). Alprazolam (0.25 mg/kg) used as internal control dramatically increased the number of punished

crossings accepted by mice (9 ± 0.6 versus 4 ± 0.3 for vehicle control) ($p<0.001$). The active doses of 8 and 16 mg/kg milnacipran were chosen for interaction studies (Fig. 1).

3.3. Effect of flumazenil on the anxiolytic-like effect of alprazolam in the FPT

Flumazenil was used at the doses of 2 and 8 mg/kg. At these doses it had no effect per se on the number of punished passages ($p>0.05$) in the FPT. Alprazolam (0.25 mg/kg) significantly increased the number of punished passages in comparison with vehicle controls ($p<0.001$) [$F_{(1,54)}=39.808$, $p<0.001$]. Flumazenil (2 and 8 mg/kg) significantly antagonized the anxiolytic like-effect of alprazolam treated mice ($p<0.001$ for both doses) [$F_{(2,54)}=6.084$, $p=0.004$] (Table 2a).

3.4. Effect of flumazenil on milnacipran anxiolytic-like effect in the FPT

Flumazenil was used at the doses of 2 and 4 mg/kg. In the FPT, the doses of 8 and 16 mg/kg of milnacipran significantly increased the number of punished crossings in

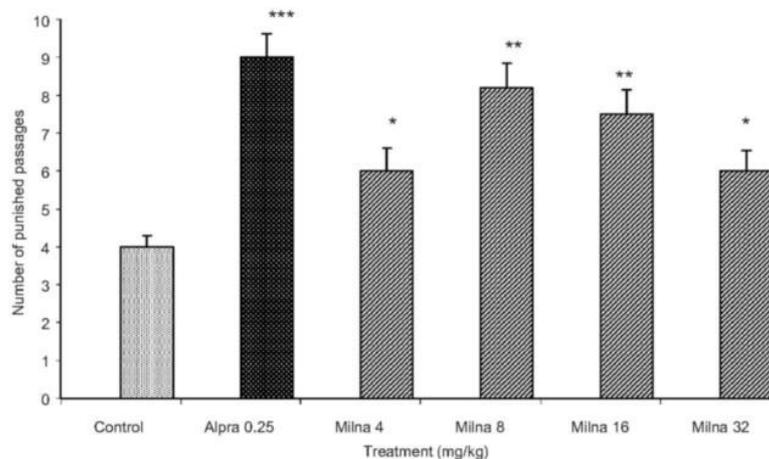


Fig. 1. Effects of acute administration of milnacipran (Milna), i.p. 30 min in the FPT. The results are cited as means \pm S.E.M. ($n=10$). Statistical analysis was performed by a one-way ANOVA followed by a Dunnett's test for comparisons between treated groups and control group: *** ($p<0.001$), ** ($p<0.01$), * ($p<0.05$). A Student's t -test was used for statistical analysis between the alprazolam (Alpra) group and control group: *** ($p<0.001$).

Table 2a
Effects of acute administration of flumazenil, (i.p. 45 min pre-test) and alprazolam or milnacipran (i.p. 30 min pre-test) in the FPT

| Antagonist (mg/kg) | Antidepressant | Punished passages |
|--------------------|-----------------|-------------------------|
| Vehicle | Vehicle | 3.75±0.3 |
| Vehicle | Alprazolam 0.25 | 7.25±0.7*** |
| Flumazenil 2 | Vehicle | 4±0.3 |
| Flumazenil 8 | Vehicle | 3.67±0.3 |
| Flumazenil 2 | Alprazolam 0.25 | 5.08±0.4 ^{†††} |
| Flumazenil 8 | Alprazolam 0.25 | 5.67±0.8 ^{†††} |
| Vehicle | Vehicle | 4.3±0.3 |
| Vehicle | Milnacipran 8 | 5.8±0.4* |
| Vehicle | Milnacipran 16 | 6.0±0.4** |
| Flumazenil 2 | Vehicle | 4.2±0.4 |
| Flumazenil 4 | Vehicle | 4.7±0.3 |
| Flumazenil 2 | Milnacipran 8 | 6.2±0.2 |
| Flumazenil 4 | Milnacipran 4 | 6.1±0.2 |
| Flumazenil 2 | Milnacipran 16 | 6.3±0.4 |
| Flumazenil 4 | Milnacipran 16 | 6.1±0.2 |
| Vehicle | Alprazolam 0.25 | 7.1±0.4*** |

The data are cited as means±S.E.M., ($n=10$). Statistical analysis was performed by a one-way ANOVA followed by a Dunnett's test for comparisons between alprazolam or milnacipran treated groups and vehicle control group: ***($p<0.001$), **($p<0.01$), * ($p<0.05$).

For interaction with flumazenil, statistical analysis was performed by a two-way ANOVA followed by a Sidak test [^{†††}($p<0.001$), ^{††}($p<0.01$), [†]($p<0.05$), versus appropriate control group].

comparison with vehicle controls ($p<0.05$ and $p<0.01$, respectively) [$F_{(9,90)}=7.747$, $p<0.001$].

Flumazenil (2 and 4 mg/kg) had no effect alone on the number of punishments accepted by mice ($p>0.05$, after a post-hoc analysis) in comparison with control group. Flumazenil, at any doses, failed to antagonise milnacipran anxiolytic-like effect in the FPT ($p>0.05$ for both doses) [$F_{(4,90)}=2.322$, $p=0.063$]. The positive control alprazolam increased the number of punished crossing as compared with vehicle control ($p<0.001$) (Table 2a).

3.5. Noradrenergic system: effect of prazosin and idazoxan on milnacipran anxiolytic-like effects in the FPT

First, the effect–dose of prazosin and idazoxan was determined in the FPT after acute administration. For a dose range from 0.25 mg/kg to 8 mg/kg neither idazoxan nor prazosin showed any anxiolytic-like effect in the FPT (results not shown).

3.5.1. Prazosin

In the FPT, the doses of 8 and 16 mg/kg of milnacipran significantly increased the number of punished crossings when compared with vehicle controls ($p<0.05$ and $p<0.01$, respectively) [$F_{(9,90)}=11.18$, $p<0.001$]. The positive control alprazolam dramatically increased the number of punished crossing as compared with vehicle control ($p<0.001$). Prazosin alone (0.5 and 2 mg/kg) had no effect on the number of punishments accepted by mice ($p>0.05$) after post-hoc analysis with control group. The co-administration of prazosin (0.5 and 2 mg/kg) with milnacipran (8

and 16 mg/kg) failed to alter the anti-punishment effect of milnacipran. The association of milnacipran (16 mg/kg) and prazosin (2 mg/kg) resulted in a weak but non-significant decreased of punished crossing ($p>0.05$, after a post-hoc analysis) [$F_{(4,90)}=3.733$, $p=0.008$].

3.5.2. Idazoxan

In the FPT, the doses of 8 and 16 mg/kg of milnacipran significantly increased the number of punished crossings in comparison with vehicle controls ($p<0.05$ and $p<0.01$, respectively) [$F_{(9,90)}=14.54$, $p<0.001$]. The positive control alprazolam dramatically increased the number of punished crossing as compared with vehicle control ($p<0.001$). Idazoxan (1 and 4 mg/kg) had no effect on the number of punishments accepted by mice ($p>0.05$, after post-hoc analysis) with control group. Neither of the two doses of milnacipran were antagonised by idazoxan at the doses of 1 and 4 mg/kg ($p>0.05$, after a post-hoc analysis) [$F_{(4,90)}=2.507$, $p=0.047$] (Table 2b).

Table 2b
Effects of acute administration of antagonists, (i.p. 45 min pre-test) and milnacipran, (i.p. 30 min pre-test) in the FPT

| Antagonists (mg/kg) | Antidepressant | Punished passages |
|---------------------|-----------------|-------------------|
| Vehicle | Vehicle | 4.8±0.2 |
| Vehicle | Milnacipran 8 | 7.1±0.7* |
| Vehicle | Milnacipran 16 | 7.7±0.7*** |
| Prazosin 0.5 | Vehicle | 3.9±0.3 |
| Prazosin 2 | Vehicle | 4.6±0.3 |
| Prazosin 0.5 | Milnacipran 8 | 6.3±0.4 |
| Prazosin 2 | Milnacipran 8 | 8.4±0.6 |
| Prazosin 0.5 | Milnacipran 16 | 7.0±0.8 |
| Prazosin 2 | Milnacipran 16 | 5.4±0.4 |
| Vehicle | Alprazolam 0.25 | 9.9±0.7*** |
| Vehicle | Vehicle | 4.4±0.2 |
| Vehicle | Milnacipran 8 | 6.3±0.6* |
| Vehicle | Milnacipran 16 | 6.8±0.5** |
| Idazoxan 1 | Vehicle | 4.2±0.2 |
| Idazoxan 4 | Vehicle | 4.2±0.2 |
| Idazoxan 1 | Milnacipran 8 | 5.9±0.3 |
| Idazoxan 4 | Milnacipran 8 | 5.4±0.3 |
| Idazoxan 1 | Milnacipran 16 | 7.0±0.5 |
| Idazoxan 4 | Milnacipran 16 | 5.7±0.5 |
| Vehicle | Alprazolam 0.25 | 9.5±0.6*** |
| Vehicle | Vehicle | 4.3±0.3 |
| Vehicle | Milnacipran 8 | 6.3±0.3** |
| Vehicle | Milnacipran 16 | 6.2±0.4** |
| SB 206553 0.1 | Vehicle | 4.6±0.2 |
| SB 206553 1 | Vehicle | 5.0±0.1 |
| SB 206553 0.1 | Milnacipran 8 | 5.7±0.4 |
| SB 206553 1 | Milnacipran 8 | 5.5±0.6 |
| SB 206553 0.1 | Milnacipran 16 | 5.0±0.3 |
| SB 206553 1 | Milnacipran 16 | 5.0±0.3 |
| Vehicle | Alprazolam 0.25 | 6.9±0.5*** |

The data are cited as means±S.E.M., ($n=10$). Statistical analysis was performed by a one-way ANOVA followed by a Dunnett's test for comparisons between milnacipran treated groups and vehicle control group: ***($p<0.001$), **($p<0.01$), * ($p<0.05$). A Student's *t*-test was used for statistical analysis between the alprazolam group and control group: ***($p<0.001$).

For interaction with selective antagonists, no significant difference between groups was observed [two-way ANOVA].

3.6. Serotonergic system: effect of 5-HT₂ receptor antagonists on milnacipran anxiolytic-like effects in the FPT

3.6.1. 5-HT_{2A} receptor antagonist: SR 46349B

In the FPT, the dose of 16 mg/kg of milnacipran significantly increased the number of punished crossings when compared with vehicle controls ($p < 0.01$) [$F_{(9,90)} = 9.44$, $p < 0.001$]. On the day of experiment the lowest dose of milnacipran weakly increased the number of punished crossing but the result did not reach statistical significance ($p = 0.11$). The positive control alprazolam increased the number of punished crossing as compared with vehicle control ($p < 0.001$). SR 46349B (0.1 and 1 mg/kg) alone had no effect on the number of punishments accepted by mice ($p > 0.05$, after post-hoc analysis) in comparison with control group. Pre-treatment of SR 46349B (0.1 and 1 mg/kg) had no effect on the anti-punishment action of milnacipran (8 mg/kg) in FPT ($p > 0.05$, after a post-hoc analysis). This might be due to the weak effect of milnacipran 8 mg/kg on the day of experiment. On the other hand, the pre-treatment of SR 46349B (0.1 and 1 mg/kg) did antagonise the anti-punishment effect of milnacipran 16 mg/kg ($p < 0.05$) [$F_{(4,90)} = 3.688$, $p = 0.008$] (Fig. 2).

3.6.2. 5-HT_{2B} receptor antagonist: SB 206553

In the FPT, the doses of 8 and 16 mg/kg of milnacipran significantly increased the number of punished crossings when compared with vehicle controls ($p < 0.01$) [$F_{(9,90)} = 5.02$, $p < 0.001$]. The positive control alprazolam increased the number of punished crossing as compared with vehicle control ($p < 0.001$). SB 206553 (0.1 and 1 mg/kg) alone had no effect on the number of punishments accepted by mice ($p > 0.05$) after post-hoc analysis with control group.

Neither of the two doses of milnacipran were antagonised by SB 206553 at the doses of 0.1 and 1 mg/kg [$F_{(4,90)} = 2.189$, $p = 0.078$] (Tables 2a and 2b).

3.6.3. The mixed 5-HT₂ receptor antagonist ketanserin

In the four-plate test the doses of 8 and 16 mg/kg of milnacipran significantly increased the number of punished crossings when compared with vehicle controls ($p < 0.05$ and $p < 0.01$, respectively) [$F_{(9,90)} = 20.22$, $p < 0.001$]. The positive control alprazolam increased the number of punished crossing as compared with vehicle control ($p < 0.001$). Ketanserin (0.125 and 0.5 mg/kg) alone had no effect on the number of punishments accepted by mice ($p > 0.05$) after post-hoc analysis with control group. Both doses of ketanserin (0.125 and 0.5 mg/kg) strongly antagonised the anxiolytic-like effect of milnacipran at the doses of 8 and 16 mg/kg ($p < 0.001$) [$F_{(4,90)} = 8.332$, $p < 0.001$] (Fig. 3).

3.7. Neurochemical analysis

3.7.1. Effect of DSP-4 and p-CPA on noradrenaline concentrations

The noradrenaline levels were decreased in the hippocampus ($p < 0.05$) and the cortex ($p < 0.05$) following DSP-4 administration, but not affected by p-CPA (Table 3).

3.7.2. Effect of DSP-4 and p-CPA on serotonin concentrations

The serotonin concentrations were reduced in the hypothalamus, hippocampus, striatum and the cortex following p-CPA administration ($p < 0.05$). 5-HT concentration was also decreased in DSP-4 treated mice in the hypothalamus ($p < 0.05$) (Table 4).

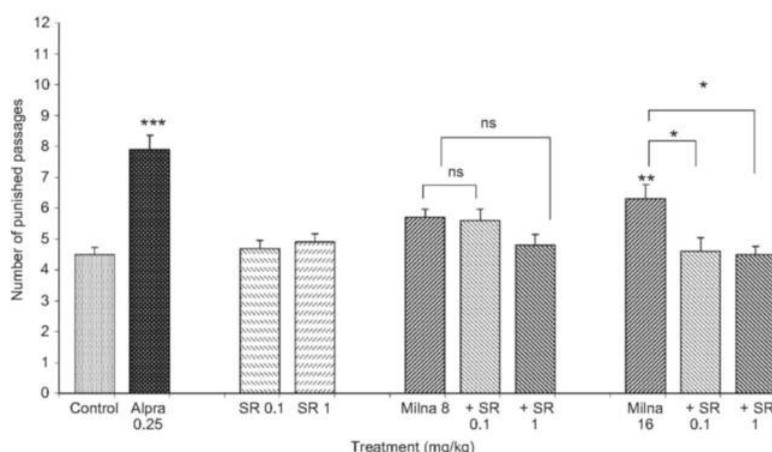


Fig. 2. Effects of acute administration of SR 46349B (SR) (i.p. 45 min pre-test) and milnacipran (Milna) (i.p. 30 min pre-test), on the number of punishments accepted by mice in the FPT. The data are cited as means \pm S.E.M. ($n = 10$). Statistical analysis was performed by a one-way ANOVA followed by a Dunnett's test for comparisons between milnacipran treated groups and vehicle control group: *** ($p < 0.001$), ** ($p < 0.01$), * ($p < 0.05$). For interaction studies, statistical analysis was performed by a two-way ANOVA followed by a Sidak test [*** ($p < 0.001$), ** ($p < 0.01$), * ($p < 0.05$), versus appropriate control group]. A Student's t -test was used for statistical analysis between the alprazolam (Alpra) group and control group: *** ($p < 0.001$).

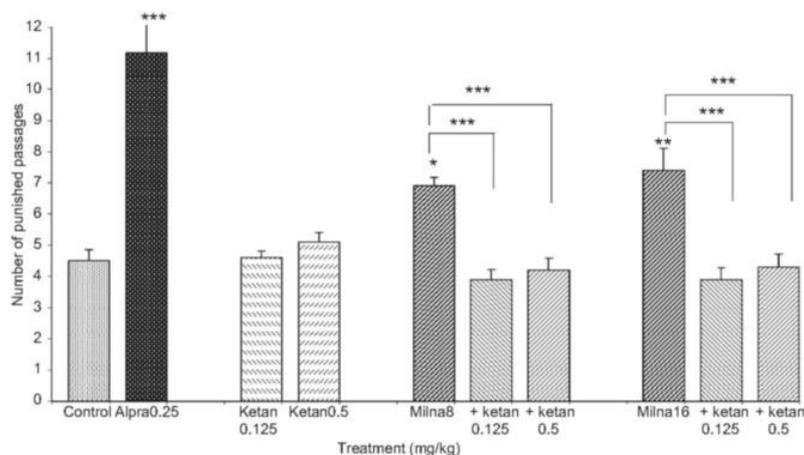


Fig. 3. Effects of acute administration of ketanserin (Ketan) (i.p. 45 min pre-test) and milnacipran (Milna) (i.p. 30 min pre-test), on the number of punishments accepted by mice in the FPT. The data are cited as means±S.E.M. ($n=10$). Statistical analysis was performed by a one-way ANOVA followed by a Dunnett's test for comparisons between milnacipran treated groups and vehicle control group: *** ($p<0.001$), ** ($p<0.01$), * ($p<0.05$). For interaction studies, statistical analysis was performed by a two-way ANOVA followed by a Sidak test [*** ($p<0.001$), ** ($p<0.01$), * ($p<0.05$), versus appropriate control group]. A Student's *t*-test was used for statistical analysis between the alprazolam (Alpra) group and control group: *** ($p<0.001$).

3.7.3. Effect of DSP-4 and *p*-CPA on dopamine concentrations

The dopamine levels were affected neither by DSP-4 nor by *p*-CPA administration (Table 5).

3.8. Behavioural analysis

3.8.1. Effect of DSP-4 on milnacipran anxiolytic-like activity in the FPT

Milnacipran at the doses of 8 and 16 mg/kg dramatically increased the number of shocks accepted by naive mice (non-depleted) [$F_{(5,54)}=6.943$, $p<0.001$].

Alprazolam (0.25 mg/kg), used as a positive control, dramatically increased the number of shocks accepted by mice ($p<0.001$). DSP-4 treatment had no effect on the number of punishments accepted by mice ($p>0.05$, after post-hoc analysis) in comparison with control group. DSP-4 treatment totally abolished the anxiolytic-like effect of milnacipran (8 and 16 mg/kg) (Fig. 4).

3.8.2. Effect of *p*-CPA on milnacipran anxiolytic like activity in the FPT

Milnacipran at the doses of 8 and 16 mg/kg dramatically increased the number of shocks accepted by mice [$F_{(5,54)}=8.54$, $p<0.001$].

Alprazolam (0.25 mg/kg), used as positive control, dramatically increased the number of shocks accepted by mice (8.6 ± 0.6 versus 4.2 ± 0.3 for vehicle control) ($p<0.001$). *p*-CPA treatment had no effect on the number of punishments accepted by mice ($p>0.05$, after post-hoc analysis) in comparison with control group. *p*-CPA treatment totally abolished the anxiolytic-like effect of milnacipran (8 and 16 mg/kg) [$F_{(9,90)}=12.62$, $p<0.001$] (Fig. 5).

4. Discussion

Even though it is now well established that 5-HT selective antidepressants possess anxiolytic properties, their

Table 3
Effect of DSP-4 and *p*-CPA on noradrenaline concentrations

| | Hypothalamus ng/g±S.E.M. (% residual) | Hippocampus ng/g±S.E.M. (% residual) | Striatum ng/g±S.E.M. (% residual) | Cortex ng/g±S.E.M. (% residual) |
|---------------|---|--|---|---------------------------------------|
| Controls | 1614.3±52.6 | 346.8±9.3 | 153.6±9 | 227.6±6.1 |
| DSP-4 | 1666.5±89.2 | 160.0±27.7 | 178.8±26.7 | 140.9±19.1 |
| <i>p</i> -CPA | 1693.7±98.4 | 345.7±16 | 163.3±14 | 252.0±8.6 |
| | 104.9 | 99.7 | 106.3 | 110.7 |

Results are expressed as mean of concentration ng/g tissue±S.E.M. and % residual from controls. Statistical analysis was performed by a one-way ANOVA followed by a Fisher test for comparisons between *p*-CPA or DSP-4 groups and vehicle control group. Statistic: $p\leq 0.05$. NS, non-significant.

Table 4
Effect of DSP4 and *p*-CPA on serotonin concentrations

| | Hypothalamus ng/g tissue±S.E.M. (% residual) | Hippocampus ng/g tissue±S.E.M. (% residual) | Striatum ng/g tissue±S.E.M. (% residual) | Cortex ng/g tissue±S.E.M. (% residual) |
|---------------|---|--|---|---|
| Controls | 1165±41.9 | 577.7±26 | 420.9±28.3 | 507±11.6 |
| DSP-4 | 980.1±68.4 | 552.8±30.7 | 390.6±42.7 | 540.7±20.5 |
| | 84.1 | 95.7 | 92.8 | 106.6 |
| | <i>p</i> ≤ 0.05 | NS | NS | NS |
| <i>p</i> -CPA | 628.3±45.2 | 288.9±22.5 | 255.6±17.7 | 298.4±16.8 |
| | 53.9 | 50.0 | 60.7 | 58.9 |
| | <i>p</i> ≤ 0.05 | <i>p</i> ≤ 0.05 | <i>p</i> ≤ 0.05 | <i>p</i> ≤ 0.05 |

Results are expressed as mean of concentration ng/g tissue±S.E.M. and % residual from controls. Statistical analysis was performed by a one-way ANOVA followed by a Fisher test for comparisons between *p*-CPA or DSP-4 groups and vehicle control group.

Statistic: *p* ≤ 0.05. NS, non-significant.

underlying neuropharmacological mechanism of action is still not understood (Zohar and Westenberg, 2000; Bourin et al., 2002; Lambert and Bourin, 2002; Vaswani et al., 2003; Nemeroff, 2003). Here, we examined the effects of the mixed 5-HT/NA reuptake inhibitor (SNRI) milnacipran in the mouse four-plate test (FPT). In synaptosomes from rat cerebral cortex, the ratio of IC₅₀ of 5-HT uptake/IC₅₀ of NA uptake was 0.95, showing that milnacipran inhibits both 5-HT and NA uptake with similar potency with no affinity for the dopaminergic (DA) transporter (Mochizuki et al., 2002). Furthermore, milnacipran was devoid of any affinity (*K_i* > 10,000) for 5-HT receptors including the 5-HT₂ subtypes and noradrenergic receptors, especially the α₁ and α₂ receptor subtypes (Mochizuki et al., 2002). Milnacipran administered intraperitoneally at the doses of 4 to 32 mg/kg potentially increased the number of punished passages accepted by mice in the FPT paradigm with a maximum effect seen for the dose of 8 mg/kg. These results are in accordance with a previous study (Hascoët et al., 2000) that demonstrated strong anxiolytic-like effect of both SSRIs (excepting fluoxetine) and SNRIs including milnacipran in the FPT. In the conditioned fear stress model of anxiety in the rat, milnacipran decreased freezing behaviour indicating anxiolytic like effect for doses of 10 and 60 mg/kg p.o. (Mochizuki et al., 2002) and for lower doses from 0.5 to 4 mg/kg i.p. in mice (Miyamoto et al., 2002).

First, we have evaluated the implication of the BZD/GABA system in the activity observed in the FPT. The effect of milnacipran was not antagonised by antagonism of BZD receptors flumazenil proving that the BZD/GABA

system was not implicated in the mechanism of action of this drug on the FPT. In the same test, however, flumazenil totally antagonised the anti-punished behaviour induced by alprazolam.

One aim of the present article was to examine the potential role of α-adrenoreceptors in the anxiolytic-like effects of milnacipran in the FPT. Excitatory α₁-adrenoreceptors are expressed in the dorsal raphe nucleus where they modulate the activity of ascending serotonergic neurones (Adell and Artigas, 1999). α₂-Autoreceptors act as the inhibitory somatodendritic and presynaptic autoreceptor at noradrenergic afferents from the locus coeruleus, as well as heteroreceptors on serotonergic neurones in the prefrontal cortex and hippocampus. Blockade of α₂-adrenoreceptors at noradrenergic afferents in the dorsal raphe nucleus has been shown to enhance the firing rate and 5-HT release at the terminal areas (Weikop et al., 2004). In view of the reports that α₂-adrenoreceptors are strongly implicated in the modulation of not only noradrenergic but also serotonergic and dopaminergic neurotransmission, it was of interest to further investigate the effects of the prototypical α₂-adrenoreceptor antagonist, idazoxan, following the administration of milnacipran. In addition, the α₁-adrenoreceptor antagonist prazosin was used to evaluate the regulatory role of α₁-receptors.

Neither blockade of α₁- nor α₂-noradrenergic receptor subtypes modified the effect of milnacipran, suggesting that these receptors do not participate in the milnacipran anxiolytic-like effect in the FPT.

The implication of α₂-adrenoreceptors in anxiety has been demonstrated but there is still considerable confusion

Table 5
Effect of DSP-4 and *p*-CPA on dopamine concentrations

| | Hypothalamus ng/g tissue±S.E.M. (% residual) | Hippocampus ng/g tissue±S.E.M. (% residual) | Striatum ng/g tissue±S.E.M. (% residual) | Cortex ng/g tissue±S.E.M. (% residual) |
|---------------|---|--|---|---|
| Controls | 313.4±11.2 | Undetected | 5720.84±144.7 | 599.65±22.0 |
| DSP-4 | 377.2±24.3 | Undetected | 5260±185.0 | 667.09±36.6 |
| | 120.3 | – | 91.95 | 61.9 |
| | NS | – | NS | NS |
| <i>p</i> -CPA | 349.7±32.1 | Undetected | 5885.36±211.0 | 657.72±34.32 |
| | 111.6 | – | 102.88 | 109.68 |
| | NS | – | NS | NS |

Results are expressed as mean of concentration ng/g tissue±S.E.M. and % residual from controls. Statistical analysis was performed by a one-way ANOVA followed by a Fisher test for comparisons between *p*-CPA or DSP-4 groups and vehicle control group.

Statistic: *p* ≤ 0.05. NS, non-significant.

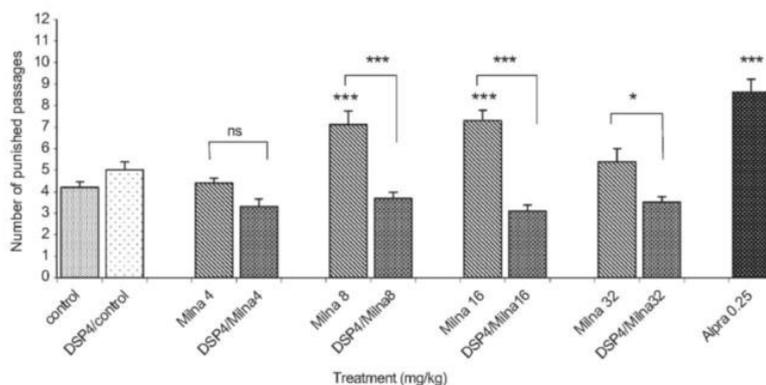


Fig. 4. Effects of DSP-4 pre-treatment on milnacipran (Milna) acute administration, i.p. 30 min in the FPT. The results are given as means \pm S.E.M. ($n=10$). Statistical analysis was performed by a one-way ANOVA followed by a Dunnett's test for comparisons between treated groups and control group: *** ($p<0.001$), ** ($p<0.01$), * ($p<0.05$).

as to the effects of agonists or antagonist (Millan, 2003). The α_2 -adrenoceptor antagonist yohimbine elicited anxiety in man (Stine et al., 2002). In the FPT, however, no effect was detected even after administration of a large dose range (0.25 to 8 mg/kg i.p.) of idazoxan (results not shown). On the other hand, a strong anxiogenic action of yohimbine has been found in many but not all animal models of anxiety (Cole et al., 1995). One hypothesis is that such actions might reflect an induction of NA and DA release in corticolimbic structures (Millan et al., 2000) with a suppressive influence upon the activity of GABAergic neurones. Here, however, as shown by the lack of effect of flumazenil, the GABAergic system does not seem to be implicated. Recently, a combined treatment with idazoxan and venlafaxine has been found to cause an enhancement of NA and DA levels in the prefrontal cortex and hippocampus compared to rats only treated by venlafaxine. However, no elevation of the 5-HT level was found following idazoxan and venlafaxine or duloxetine administration, suggesting

that the inhibition of α_2 -adrenoceptors had no enhancing effect on SNRI-induced accumulation of extracellular 5-HT in either structure (Weikop et al., 2004; Gobert et al., 1997). In the present study the lack of effect of idazoxan on the anxiolytic-like effect of milnacipran suggests that either direct blockade of α_2 -adrenoceptors is not sufficient to counteract milnacipran's activity in the FPT or in view that idazoxan also possesses some activity at α_1 receptors, it might exert activity via blockade of postsynaptic α_1 -adrenoceptors (Millan, 2003).

Prazosin (0.25 to 8 mg/kg) was found to have no action in the four-plate test and did not modify the anxiolytic-like effect of milnacipran in the present study or the effects of venlafaxine (unpublished results). The implication of α_1 -adrenoceptors needs further evaluation. Nevertheless despite limited and contradictory evidence for a role of α_1 -adrenoceptors in anxiety, the balance of evidence favours an anxiogenic-like action following α_1 -adrenoceptor activation (Cecchi et al., 2002; Millan, 2003).

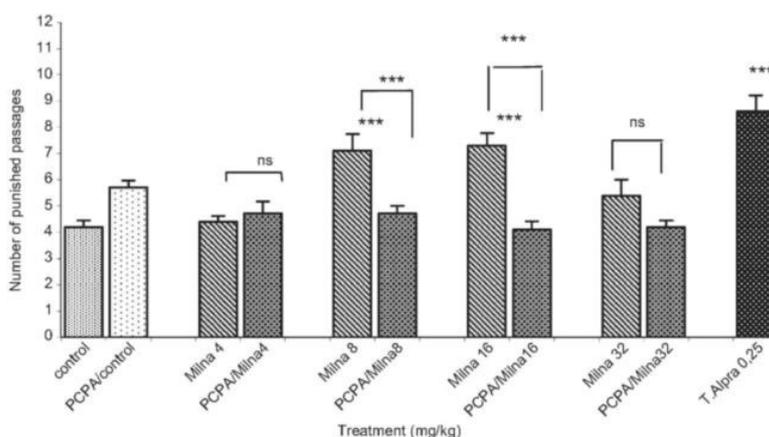


Fig. 5. Effects of p-CPA pre-treatment on milnacipran (Milna) acute administration, i.p. 30 min in the FPT. The results are given as means \pm S.E.M. ($n=10$). Statistical analysis was performed by a one-way ANOVA followed by a Dunnett's test for comparisons between treated groups and control group: *** ($p<0.001$), ** ($p<0.01$), * ($p<0.05$).

As stated above it does not seem that α -adrenoceptors participate directly in milnacipran anxiolytic-like effect. However, it would be of great interest to evaluate the effect of a direct agonist at the α_2 -autoreceptor on milnacipran anxiolytic-like effect in the FPT. This would be expected to decrease 5-HT efflux through an α_2 -adrenoceptor-mediated mechanism.

The effects of milnacipran (8 and 16 mg/kg) were not reversed by the selective 5-HT_{2B/2C} receptor antagonist SB 206553 (0.1 and 1 mg/kg), at doses which lack any effect when administered alone. In contrast, the selective 5-HT_{2A} receptor antagonist, SR 46349B (1 mg/kg), completely abolished the milnacipran-induced increase in punished crossings. In addition, the non-selective 5-HT₂ antagonist, ketanserin, totally abolished the anti-punishment activity of milnacipran in the FPT at all doses studied.

Preliminary research implicating the 5-HT₂ receptors in anxiety utilised non-selective 5-HT_{2A/2C} receptor antagonists (the majority of studies involving ritanserin or ketanserin). Few studies have examined the effects of selective 5-HT_{2A} receptor agonists, due to the lack of suitable ligands and the interest in 5-HT_{2A} receptor blockade. It has been suggested that the burying of glass marbles by mice could constitute a useful test for anxiolytic activity since it was differentially inhibited by a variety of anxiolytics (Broekkamp et al., 1986). The 5-HT_{2A/2C} receptor agonists, TFMPP (1-(3-trifluoromethylphenyl)piperazine), and DOI selectively reduced burying at doses not affecting locomotor activity (Njungé and Handley, 1991). Subsequent studies revealed opposing effects of DOI; no influence in the mouse EPM (Rodgers et al., 1995) and both anxiolytic and anxiogenic-like effects in another study depending on the mouse strain and dose of DOI administered (Onaivi et al., 1995).

Enduring changes following stress are of particular importance to the development of pathological responses and thus it is interesting that long-lasting changes in 5-HT_{2A} receptors were found after a single exposure to stress (Stanford, 1996). Of the various compounds with antagonist properties at the 5-HT_{2A} receptor that have been tested clinically, serazepine (CGS-15040A) showed efficacy in a multicenter trial in GAD (Jones and Blackburn, 2002). Among the accepted effective anxiolytic treatments, buspirone has been shown to markedly increase 5-HT_{2A} receptor mRNA levels in various brain areas. This was accompanied by a significant increase in the level of 5-HT_{2A} receptor binding sites in all sub-hippocampal regions. These results demonstrated that chronic buspirone treatment differentially regulates 5-HT_{1A} and 5-HT_{2A} receptor mRNA as well as their expression in various regions of the hippocampus (Chen et al., 1995) which could implicate this receptor subtype in its anxiolytic properties. Equally, it has been suggested that decreased serotonin metabolism and characteristic distribution of 5-HT_{2A} receptors can underlie the expression of genetic predisposition to anxiety (Popova et al., 1996).

Clinical studies have demonstrated SSRI-induced anxiety and even occasional panic attacks at initiation of SSRI treatment, a phenomenon suggested to be mediated by stimulation of 5-HT₂ receptors in the serotonin pathway that projects to the hippocampus and limbic cortex. Equally the 5-HT_{2A} receptor antagonist properties are believed to enhance antidepressant and anti-anxiety activities of many antidepressants (Szabo and Blier, 2002). In contrast, in a previous study (Nic Dhonnchadha et al., 2003a,b), we have observed an anxiolytic-like action of 5-HT_{2A/2B} receptor agonists in the FPT. Different brain areas may be implicated in the anxiolytic-like responses detected, with 5-HT₂ receptors in the peri-aqueductal gray area (PAG) involved in the anxiolytic response observed in the mouse EPM (unconditioned fear), whereas the same receptors in the amygdala may be involved in the response which was provoked in the FPT (conditioned fear), thus explaining different or opposing effects being observed with the same molecule, depending on the paradigm used.

In a more recent study (Nic Dhonnchadha et al., 2005), the anti-punishment action of venlafaxine, another SNRI, was eliminated by both SR 46349B and SB 206553 which when administered alone were without effect. The 5-HT_{2C} receptor antagonist RS 10-2221 failed to alter the effects of venlafaxine, implicating both the 5-HT_{2A} and 5-HT_{2B} receptor subtypes but not the 5-HT_{2C} receptors in the anxiolytic-like action of venlafaxine in the FPT. In addition, in the conditioned fear stress paradigm Miyamoto et al. (2002) suggested that since 5-HT_{2A} receptors are localized postsynaptically, both fluvoxamine and milnacipran may indirectly activate 5-HT_{2A} receptors by increasing the amount of endogenous 5-HT at nerve terminal.

In order to investigate the role of the noradrenergic system in the anxiolytic-like effect of milnacipran, a lesion was induced by systemic administration of the neurotoxin DSP-4, which destroys noradrenergic axon terminals from the locus coeruleus but not those from non-locus coeruleus neurones.

Following DSP-4 lesions, nearly all noradrenergic axons terminals are destroyed in the neocortex, hippocampus, olfactory bulb, thalamus, tectum, cerebellum and spinal cord horn. In contrast most noradrenergic axons are unaffected in the basal forebrain, hypothalamus reticular formation, brain stem motor nuclei and spinal cord ventral horn (Fritschy and Grzanna, 1989). Our present results agree with the above finding that the hypothalamus was not affected by the neurotoxin effect but that the NA concentration was significantly decreased in both hippocampus and cortex but left 5-HT and dopamine intact. The DSP-4 lesion reduced the noradrenaline content of the cortex and the hippocampus to 61.9% and 46.1% of control levels, respectively. These results are in accordance with those of Haddjari et al. (1997).

The resulting lesion completely prevented milnacipran-induced anxiolytic-like effects in the FPT suggesting a strong influence of the noradrenergic axon terminals from

the locus coeruleus. Furthermore, depletion of brain 5-HT content by administration of *p*-CPA also resulted in complete abolition of the anxiolytic-like effect of milnacipran. The depletion of 5-HT was about 50% in all structures studied. Although *p*-CPA administered alone was found to produce anxiolytic-like effects in a modified light–dark test in mice (Artaiz et al., 1998), the integrity of the 5-HT system seems to be necessary for the expression of milnacipran activity in the FPT.

We can conclude that the integrity of both systems NA and 5-HT is required for the effect of milnacipran in the FPT.

Our results have also to be discussed in terms of the antinociceptive effects seen in animals and man with various antidepressants and which can possibly participate in the anxiolytic-like effect observed in the FPT. In animal experiments, systemic administration of antidepressants has yielded confusing results in tests of nociception. Theoretically, a possible analgesic action could account for the effects observed in FPT. However, at doses active in alleviating pain in various tests, morphine did not increase the number of shocks received in the FPT (Boissier et al., 1968). Antinociceptive activity was not observed in the hot plate reaction test with citalopram (Hyttel, 1994) except at high doses (Fasmer et al., 1989), although citalopram was found to induce strong anxiolytic-like effects in the FPT (Hascoët et al., 2000). In addition the antinociceptive effect of paroxetine was found at higher doses than those producing anxiolytic-like effects and was affected by 5-HT₂ mechanism (Duman et al., 2004).

Although most SSRIs and SNRIs have both been found to have analgesic properties, they were not all found to be active in the FPT (Hascoët et al., 2000). For example, fluoxetine did not induce any anti-punishment effects in the FPT. Although milnacipran have been found to induce a dose-dependent antinociceptive effect using the formalin test in rat (Yokogawa et al., 1994), we did not find any effect in the hot plate test in mice at doses inducing anxiolytic-like effect in the FPT (Ripoll et al., in press). Thus, one may conclude that the effects found with antidepressants in the FPT were indeed anxiolytic-like and not analgesic effects.

In conclusion, our results strongly suggest that activation of 5-HT_{2A} receptors is critically involved in the anxiolytic activity of milnacipran but not the other 5-HT₂ receptor subtypes. These results also demonstrate the implication of this receptor in the anxiolytic-like activity on FPT even if benzodiazepines are strongly active on this test. There is evidence that increased level of extracellular 5-HT acting at hetero-receptor can modify noradrenaline release in the brain (Hughes and Stanford, 1996) perhaps via the 5-HT_{2A} receptor subtype. On the other hand, the NA system mediates presynaptic inhibition of the 5-HT system, probably via α_2 -adrenoceptors, which may limit the efficacy of SNRI treatment. (Rénéric et al., 2002). The lack of action of milnacipran after NA depletion may result from the

abolition of the activity of milnacipran on the locus coeruleus through which 5-HT release was increased (Mongeau, 1998) in addition to the 5-HT_{2A} receptor mediated enhancement of NA levels (Gobert and Millan, 1999) which would not be possible after depletion. The present data lead to the idea of a strong connection between 5-HT_{2A} receptors and NA. Studies using NA-deficient mice have already suggested interdependence between 5-HT and NA (Cryan et al., 2004), and that NA and 5-HT are both essential for the manifestation of the acute behavioural effects of milnacipran.

References

- Adell A, Artigas F. Regulation of the release of 5-hydroxytryptamine in the median raphe nucleus of the rat by catecholaminergic afferents. *Eur J Neurosci* 1999;11:2305–11.
- Aron C, Simon P, Larousse C, Boissier JM. Evaluation of a rapid technique detecting minor tranquilizers. *Neuropharmacology* 1971;10:459–69.
- Artaiz I, Zazpe A, Del Rio J. Characterisation of serotonergic mechanism involved in the behavioural inhibition induced by 5-hydroxytryptophan in a modified light–dark test in mice. *Behav Pharmacol* 1998;9:103–12.
- Baker GB, Coutts RT, Rao TS. Neuropharmacological and neurochemical properties of *N*-(2-cyanoethyl)-2-phenylethylamine, a prodrug of 2-phenylethylamine. *Br J Pharmacol* 1987;92:243–55.
- Boissier JR, Simon P. Action of caffeine on the spontaneous motility of the mouse. *Arch Int Pharmacodyn Ther* 1965;158:212–21.
- Boissier JR, Simon P, Aron C. A new method for rapid screening of minor tranquilizers in mice. *Eur J Pharmacol* 1968;4:145–51.
- Bourin M. Profil psychopharmacologique de la venlafaxine. *Encéphale* 1999;Sp II:21–2.
- Bourin M, Hascoët M. Drug mechanisms in anxiety. *Curr Opin Investig Drugs* 2001;2:259–65.
- Bourin M, David DJ, Jolliet P, Gardier A. Mechanism of action of antidepressants and therapeutic perspectives. *Thérapie* 2002;57:385–96.
- Broekkamp CL, Rijk HW, Joly-Gelouin D, Lloyd KL. Major tranquilizers can be distinguished from minor tranquilizers on the basis of effects on marble burying and swim-induced grooming in mice. *Eur J Pharmacol* 1986;126:223–9.
- Cecchi M, Khoshbouei H, Javors M, Morilak DA. Modulatory effects of norepinephrine in the lateral bed nucleus of the stria terminalis on behavioral and neuroendocrine responses to acute stress. *Neuroscience* 2002;112:13–21.
- Chen H, Zhang L, Rubinow DR, Chuang DM. Chronic buspirone treatment differentially regulates 5-HT_{1A} and 5-HT_{2A} receptor mRNA and binding sites in various regions of the rat hippocampus. *Brain Res Mol Brain Res* 1995;32:348–53.
- Clenet F, Hascoët M, Fillion G, Gallons H, Bourin M. Role of GABAergic and serotonergic systems in the anxiolytic mechanism of action of a 5-HT-moduline antagonist in the mouse elevated plus maze. *Behav Brain Res* 2004 [on line].
- Cole JC, Burroughs GJ, Laverty CR, Sheriff NC, Sparham EA, Rodgers RJ. Anxiolytic-like effects of yohimbine in the murine plus-maze: strain independence and evidence against alpha 2-adrenoceptor mediation. *Psychopharmacology (Berl)* 1995;118:425–36.
- Cryan JF, O'Leary OF, Jin S-H, Friedland JC, Ouyang M, Hirsch BR, et al. Norepinephrine-deficient mice lack responses to antidepressant drugs, including selective serotonin reuptake inhibitors. *Proc Natl Acad Sci* 2004;101:8186–91.
- Duman EN, Kesim M, Kadioglu M, Yaris E, Kalyoncu NI, Erciyes N. Possible involvement of opioide and serotonergic mechanisms in antinociceptive effect of paroxetine in acute pain. *J Pharmacol Sci* 2004;94:161–5.

- Dursun SM, Handley SL. The effect of α_2 -adrenoceptor antagonists on the inhibition of 1-(2,5-dimethoxy-4-iodophenyl)-2-aminopropane (DOI)-induced head shakes by 5-HT_{1A} receptor agonists in the mouse. *Br J Pharmacol* 1993;109:1046–52.
- Fasmer OB, Hunskaar S, Hole K. Antinociceptive effects of serotonergic reuptake inhibitors in mice. *Neuropharmacology* 1989;12:1363–6.
- Fritschy J-M, Grzanna R. Immunohistochemical analysis of the neurotoxic effects of DSP-4 identifies two populations of noradrenergic axon terminals. *Neuroscience* 1989;30:181–97.
- Gobert A, Millan MJ. Serotonin (5-HT)_{2A} receptor activation enhances dialysate levels of dopamine and noradrenaline, but not 5-HT, in the frontal cortex of freely-moving rats. *Neuropharmacology* 1999;38:315–7.
- Gobert A, Rivett JM, Cistarelli L, Melon C, Millan MJ. Alpha2-adrenergic receptor blockade markedly potentiates duloxetine- and fluoxetine-induced increases in noradrenaline, dopamine, and serotonin levels in the frontal cortex of freely moving rats. *J Neurochem* 1997;69:2616–9.
- Gonzalez LE, Andrews N, File SE. 5-HT_{1A} and benzodiazepine receptors in the basolateral amygdala modulate anxiety in the social interaction test, but not in the elevated plus maze. *Brain Res* 1996;732:145–53.
- Haddjari, de Montigny C, Blier P. Modulation of the firing activity of noradrenergic neurones in the rat locus coeruleus by the 5-hydroxytryptamine system. *Br J Pharmacol* 1997;120:865–75.
- Hascoët M, Bourin M, Colombel MC, Fiocco AJ, Baker GB. Anxiolytic-like effects of antidepressants after acute administration in a four-plate test in mice. *Pharmacol Biochem Behav* 2000;65:339–44.
- Hughes ZA, Stanford SC. Increased noradrenaline efflux induced by local infusion of fluoxetine in the rat frontal cortex. *Eur J Pharmacol* 1996;317:83–90.
- Hytel J. Pharmacological characterization of selective serotonin reuptake inhibitors (SSRIs). *Int Clin Psychopharmacol* 1994;9:19–26.
- Jones BJ, Blackburn TP. The medical benefit of 5-HT research. *Pharmacol Biochem Behav* 2002;71:555–68.
- Lambert O, Bourin M. SNRIs: mechanism of action and clinical features. *Expert Rev Neurotherapeutics* 2002;2:849–58.
- Menard J, Treit D. Lateral and medial septal lesions reduce anxiety in the plus maze and probe burying tests. *Physiol Behav* 1996;60:845–53.
- Menard J, Treit D. Effects of centrally administered anxiolytic compounds in animal models of anxiety. *Neurosci Biobehav Rev* 1999;23:591–613.
- Millan MJ. The neurobiology and control of anxious states. *Prog Neurosci* 2003;70:83–244.
- Millan MJ, Newman-Tancredi A, Audinot V, Cussac D, Lejeune F, Nicolas JP, et al. Agonist and antagonist action of yohimbine as compared to fluparoxan at α_2 adrenergic receptors (ARs), serotonin (5-HT_{1A}), 5-HT_{1B}, 5-HT_{1D} and dopamine D2 and D3 receptors; significance for the modulation of frontocortical monoaminergic transmission and depressive state. *Synapse* 2000;35:79–95.
- Miyamoto J, Tsuji M, Takeda H, Ohzeki M, Nawa H, Matsumiya T. Characterisation of the anxiolytic effects of fluvoxamine, milnacipran and risperidone in mice using the conditioned fear stress paradigm. *Eur J Pharmacol* 2002;504:97–103.
- Mochizuki D, Tsujita R, Yamada S, Kawasaki K, Otsuka Y, Hashimoto S, et al. Neurochemical and behavioural characterisation of milnacipran, a serotonin and noradrenalin reuptake inhibitor in rats. *Psychopharmacology* 2002;162:323–32.
- Mongeau R. Differential effects of neurokinin-1 receptor activation in subregions of the periaqueductal gray matter on conditional and unconditional fear behaviours in rats. *Behav Neurosci* 1998;112:1125–35.
- Nemeroff CB. Anxiolytics: past, present, and future agents. *J Clin Psychiatry* 2003;62:22–5.
- Nic Dhonnchadha BÀ, Bourin M, Hascoët M. Anxiolytic-like effect of 5-HT₂ ligands on three mouse models of anxiety. *Behav Brain Res* 2003a;140:203–14.
- Nic Dhonnchadha BÀ, Hascoët M, Jolliet P, Bourin M. Evidence for a 5-HT_{2A} receptor mode of action in the anxiolytic-like properties of DOI in mice. *Behav Brain Res* 2003b;147:175–84.
- Nic Dhonnchadha BÀ, Ripoll N, Clénet F, Hascoët M, Bourin M. The implication of 5-HT₂ receptor subtypes in the mechanism of action of antidepressants. *Psychopharmacology* 2005 [on line].
- Njunge K, Handley SL. Effects of 5-HT uptake inhibitors, agonists and antagonists on the burying of harmless objects by mice; a putative test for anxiolytic agents. *Br J Pharmacol* 1991;104:105–12.
- Onaivi ES, Bishop-Robinson C, Darmani NA, Sanders-Bush E. Behavioural effects of (+/-)-1-(2,5-dimethoxy-4-iodophenyl)-2-aminopropane, (DOI) in the elevated plus-maze test. *Life Sci* 1995;57:2455–66.
- Popova NK, Kulikov AV, Avgustinovich DF, Shigantsov SN. The characteristics of the brain serotonin system and anxiety in the C57BL and CBA mouse strains. *Zh Vyssh Nerv Deiat Im I P Pavlova* 1996;46:348–54.
- Porter RH, Benwell KR, Lamb H, Malcolm CS, Allen NH, Revell DF, et al. Functional characterization of agonists at recombinant human 5-HT_{2A}, 5-HT_{2B} and 5-HT_{2C} receptors in CHO-K1 cells. *Br J Pharmacol* 1999;128:13–20.
- Rénérac JP, Bouvard M, Stinus L. In the rat forced swimming test, NA-system mediated interactions may prevent the 5-HT properties of some subacute antidepressant treatments being expressed. *Eur Neuropsychopharmacol* 2002;12:17–159.
- Ripoll N, Hascoët M, Bourin M. The four plate test: anxiolytic paradigm or analgesic one? *Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiat* in press.
- Rodgers RJ, Johnson NJT, Norton SJ, Cole JC. Effects of ritanserin and 1-(2,5-dimethoxy-4-iodophenyl)-2-aminopropane (DOI) in the murine elevated plus maze test of anxiety: an ethological study. *J Psychopharmacol* 1995;9:38–42.
- Stanford SC. Stress: a major variable in the psychopharmacologic response. *Pharmacol Biochem Behav* 1996;54:211–7.
- Stine SM, Southwick SM, Petrakis IL, Kosten TR, Charney DS, Krystal JH. Yohimbine-induced withdrawal and anxiety symptoms in opioid-dependent patients. *Biol Psychiatry* 2002;51:642–51.
- Szabo ST, Blier P. Effects of serotonin (5-hydroxytryptamine, 5-HT) reuptake inhibition plus 5-HT_{2A} receptor antagonism on the firing activity of norepinephrine neurons. *J Pharmacol Exp Ther* 2002;302:983–91.
- Vaswani M, Linda FK, Ramesh S. Role of selective serotonin reuptake inhibitors in psychiatric disorders: a comprehensive review. *Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry* 2003;27:85–102.
- Weikop P, Kehr J, Scheel-Krüger J. The role of α_1 and α_2 adrenoceptors on venlafaxine-induced elevation of extracellular serotonin, noradrenaline and dopamine levels in the rat prefrontal cortex and hippocampus. *J Psychopharmacol* 2004;18:395–403.
- Yokogawa F, Kiuchi Y, Ishikawa Y, Otsuka N, Masuda Y, Oguchi K, et al. An investigation of monoamine receptors involved in antinociceptive effects of antidepressants. *Anesth Analg* 1994;95:163–8.
- Yu PH, Davis BA, Fang J, Boulton AA. Neuroprotective effects of some monoamine oxidase-B inhibitors against DSP-4 induced noradrenaline depletion in the mouse hippocampus. *J Neurochem* 1994;63:1820–8.
- Zohar J, Westenberg HG. Anxiety disorders: a review of tricyclic antidepressants and selective serotonin reuptake inhibitors. *Acta Scand Suppl* 2000;403:39–49.

3.1.1.2 DISCUSSION DE L'ETUDE 1a

Le milnacipran entraîne une augmentation significative du nombre de passages punis dans le FPT pour les doses de 4 à 32 mg/kg avec un maximum d'effet obtenu pour la dose de 8mg/kg. Ces résultats sont similaires à ceux obtenus en 2000 par Hascoët et al qui démontrent un effet de type anxiolytique important (Hascoët et al. 2000).

Dans cette étude, l'effet du milnacipran n'est pas modifié quand il est co-administré avec du flumazénil. Ces résultats indiquent que le site de liaison aux benzodiazépines des récepteurs GABA_A n'est pas impliqué dans l'activité du milnacipran dans le test.

Un antagoniste des récepteurs α_2 noradrénergiques, l'idazoxan n'a aucun effet sur l'activité du milnacipran dans le test. Pourtant des études ont montré qu'un antagoniste des récepteurs α_2 noradrénergiques différent de celui utilisé dans notre étude, la yohimbine pouvait entraîner une augmentation de l'anxiété chez l'homme et un effet de type anxiogène dans le labyrinthe en croix surélevé chez la souris (Cole et al. 1995; Stine et al. 2002). Cependant, certains auteurs ont montré que la co-administration d'idazoxan et de venlafaxine n'entraîne aucune élévation du taux de 5-HT dans le cortex préfrontal et l'hippocampe de rats par rapport à une administration seule de venlafaxine (Weikop et al. 2004), ce qui pourrait expliquer le manque d'effet de l'idazoxan sur le milnacipran dans notre étude. Il est également possible que l'idazoxan engendre une activité de type anxiolytique par son effet antagoniste sur les récepteurs post-synaptiques α_1 noradrénergiques (Millan 2003) ce qui entraînerait une compétitivité des effets. L'effet antagoniste sur les récepteurs α_2 noradrénergiques de l'idazoxan ne serait pas suffisant pour inhiber l'effet du milnacipran dans le test.

La prazosine (un antagoniste des récepteurs α_1 noradrénergiques) ne modifie pas non plus l'effet du milnacipran dans le test. Les effets des récepteurs α_1 noradrénergiques semblent encore très discutés dans la littérature mais une majorité d'études montre une activité de type anxiogène lors de l'activation de ces récepteurs (Cecchi et al. 2002a; Millan 2003).

Les effets du milnacipran sont complètement inhibés par la co-administration de kétansérine (un antagoniste non sélectif des récepteurs 5-HT_{2A/2C}) et de SR46349B (un antagoniste des récepteurs 5-HT_{2A}) mais pas par le SB206553 (un antagoniste des récepteurs 5-HT_{2B}). En accord avec ces résultats, Miyamoto en 2002 suggère que le milnacipran et la fluvoxamine activeraient indirectement les récepteurs 5-HT_{2A} post-synaptiques par augmentation de la libération de 5-HT (Miyamoto et al. 2004). De plus ces résultats sont concordant avec une

précédente étude menée dans notre laboratoire qui montre que le venlafaxine un autre IRSN et la paroxétine sont également inhibés par le SR46349B (Nic Dhonnchadha et al. 2005).

L'administration de DSP-4 induit une lésion partielle du système noradrénergique. Le DSP-4 est une neurotoxine qui détruit uniquement les extrémités terminales des axones des neurones noradrénergiques issus du locus coeruleus (Fritschy et Grzanna 1989; 1991). Le dosage par HPLC de la NA tissulaire montre une diminution de sa concentration dans l'hippocampe et dans le cortex mais pas dans l'hypothalamus et le striatum. Ces résultats sont en accord avec ceux obtenus par Haddjeri et al (1997) qui montrent également que l'administration de DSP-4 diminue la concentration de NA uniquement dans l'hippocampe et dans le cortex (Haddjeri et al. 1997b). La lésion résultant de l'administration de DSP-4 inhibe l'effet de type anxiolytique d'une administration aigue de milnacipran dans le FPT. Pour dépléter le système sérotoninergique des souris, on utilise le *p*-CPA (un inhibiteur de synthèse de la 5-HT) qui entraîne une diminution significative de la 5-HT dans les quatre structures étudiées. Les résultats de l'étude montrent que cette déplétion inhibe également l'effet du milnacipran à dose active dans le test.

Il semble donc que l'intégrité des deux systèmes est indispensable pour que le milnacipran puisse entraîner une activité de type anxiolytique dans le FPT. On peut donc en déduire que l'action du milnacipran se fait par le blocage des transporteurs spécifiques de la 5-HT et de la NA localisés au niveau présynaptique sur les neurones sérotoninergiques et noradrénergiques respectivement.

En résumé, ces résultats démontrent un effet prépondérant des récepteurs 5-HT_{2A} dans l'activité du milnacipran dans le FPT. De plus, il paraît essentiel que les systèmes 5-HT et NA restent intacts pour que le milnacipran induise son effet. Cette étude suggère donc une très forte relation entre les récepteurs 5-HT_{2A} et le système noradrénergique dans l'effet de type anxiolytique du milnacipran dans le FPT.

3.1.2 **Etude 1b :**

Effet de la déplétion des systèmes sérotoninergique et noradrénergique sur l'activité de type anxiolytique de la venlafaxine (un IRSN), de la paroxétine et du citalopram (deux IRSSs)

3.1.2.1 OBJECTIF DE L'ETUDE 1b

Comme le milnacipran, d'autres antidépresseurs se sont montrés être actifs dans le FPT (Hascoet et al. 2000). Mais seuls les IRSSs et les IRSNs ont montré un effet de type anxiolytique après une administration aigue dans le FPT.

Dans l'étude 1a, l'activité du milnacipran observée dans le FPT est inhibée par une administration de *p*-CPA qui entraîne une déplétion du système 5-HT ou par celle de DSP-4 qui entraîne la destruction des terminaisons axonales des neurones NA issus du locus coeruleus. Dans cette étude, nous avons tout d'abord voulu savoir si cette perte d'effet est spécifique au milnacipran ou si l'effet est reproductible avec un autre IRSN, la venlafaxine. La venlafaxine est un IRSN qui a obtenu récemment une extension d'autorisation de mise sur le marché (AMM) pour ses effets dans les troubles anxieux.

L'effet des IRSS observé dans le FPT est similaire à celui des IRSN. Pour savoir si les mêmes mécanismes sont impliqués dans cet effet de type anxiolytique chez les IRSSs et les IRSNs, nous avons également étudié l'effet de la déplétion du système 5-HT et de la lésion du système NA sur l'activité des deux IRSSs, la paroxétine et le citalopram. La paroxétine est un IRSS qui a aussi obtenu une extension d'AMM dans l'anxiété et le citalopram est un IRSS qui est connu pour posséder la plus grande spécificité pour le transporteur impliqué dans la recapture de la 5-HT (Sambunaris et al. 1997).

3.1.2.2 RESULTATS DE L'ETUDE 1b

Etude de l'administration de DSP-4 sur les effets de type anxiolytique de la venlafaxine, de la paroxétine et du citalopram dans le FPT

Dans l'expérience concernant la venlafaxine, on observe une légère augmentation significative du nombre de passages punis acceptés par les souris pour le groupe témoin lésé par le DSP-4 ($p=0,044$) [$F_{(1, 90)} = 65,148$; $p<0,001$]. Par contre aucun effet n'a été observé dans la deuxième expérience, impliquant la paroxétine et le citalopram, pour le même groupe d'animaux ($p>0,05$) [$F_{(1, 36)} = 6,648$; $p= 0,014$].

Les doses actives utilisées de venlafaxine, paroxétine et citalopram augmentent de façon significative le nombre passages punis reçus par les souris (respectivement [$F_{(1, 36)} = 3,086$; $p= 0,020$], [$F_{(1, 36)} = 67,673$; $p<0,001$], [$F_{(1, 36)} = 73,970$; $p<0,001$]). L'analyse statistique démontre un effet significatif entre le prétraitement (DSP-4) et le traitement (les antidépresseurs) [$F_{(4, 90)} = 12,377$; $p< 0,001$] pour la venlafaxine, [$F_{(1, 36)} = 5,442$; $p= 0,025$] pour la paroxétine et [$F_{(1, 36)} = 4,347$; $p= 0,044$] pour le citalopram. Le DSP-4 réduit significativement l'effet anti-punition de la venlafaxine ($p<0,05$), de la paroxétine ($p=0,008$) et du citalopram ($p=0,02$). L'administration d'alprazolam ou de diazépam, utilisés comme témoin positif, augmente significativement le nombre de passages punis acceptés par les souris ($p<0,001$).

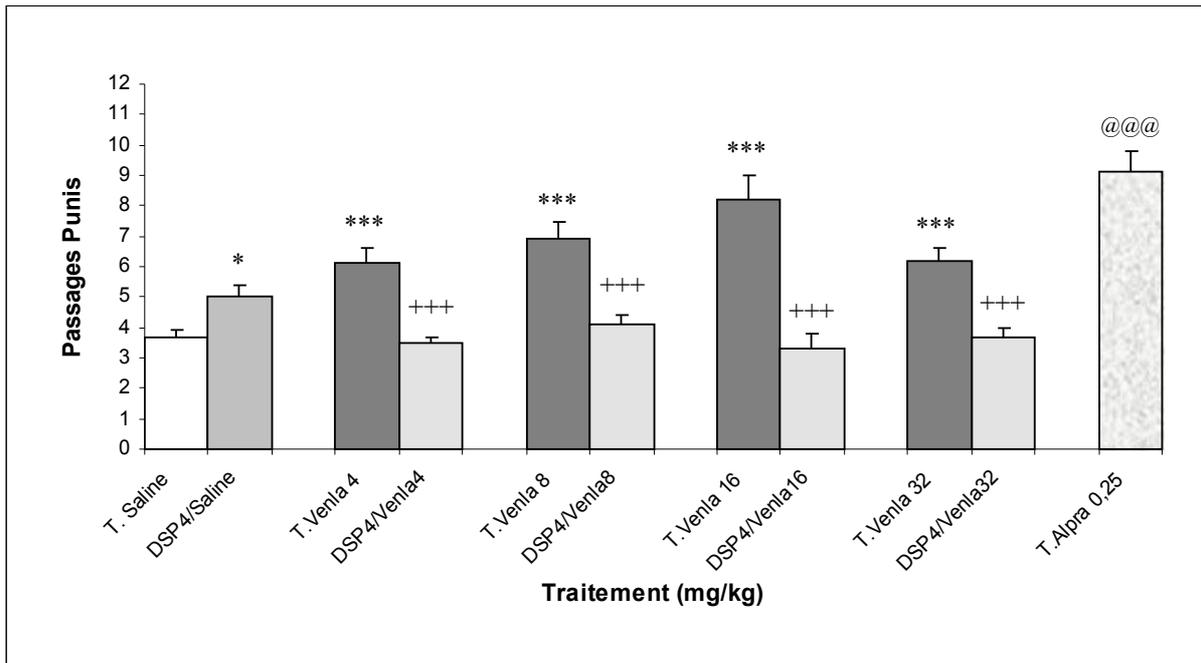


Figure 15 : Effet de l'administration de DSP-4 (i.p.168h avant le test) et de la venlafaxine (i.p.30 min avant le test) sur le nombre de passages punis acceptés par les souris dans le FPT.

Les résultats sont exprimés en moyenne (\pm écart standard à la moyenne ou ESM) du nombre de passages punis reçus par les souris (n=10). L'analyse statistique est réalisée par une ANOVA à deux facteurs suivie d'un test de Sidak [*** ($p < 0,001$), * ($p < 0,05$) versus groupe contrôle et +++ ($p < 0,001$) versus T. venla]. Un test *t* de Student est utilisé pour l'analyse statistique du groupe alprazolam comparé au groupe contrôle : @@@ ($p < 0,001$).

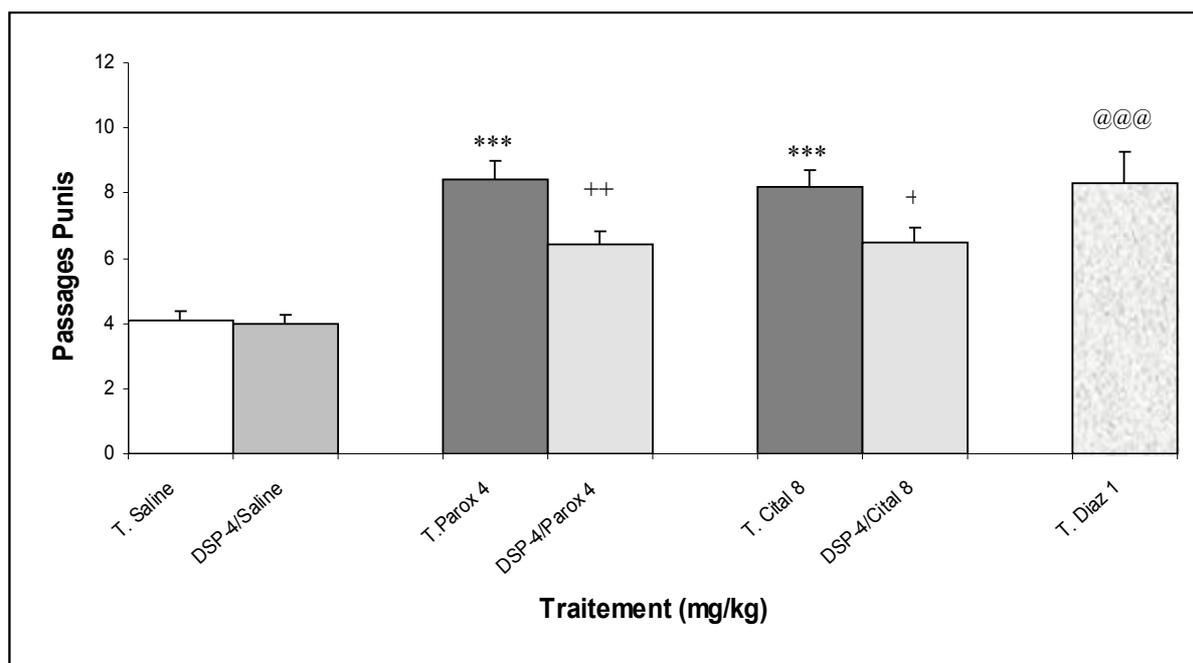


Figure 16 : Effet de l'administration de DSP-4 (i.p.168h avant le test) et de la paroxétine ou du citalopram (i.p. 30min avant le test) sur le nombre de passages punis reçus par les souris dans le FPT.

Les résultats sont exprimés en moyenne (\pm ESM) du nombre de passages punis acceptés par les souris ($n=10$). L'analyse statistique est réalisée par une ANOVA à deux facteurs suivie d'un test de Sidak [*** ($p<0,001$) versus groupe contrôle et ++ ($p<0,01$) et + ($p<0,05$) versus T. parox ou cital]. Un test t de Student est utilisé pour l'analyse statistique du groupe diazépam comparé au groupe contrôle : @@@ ($p<0,001$).

Etude de l'administration de p-CPA sur les effets de type anxiolytique de la venlafaxine, de la paroxétine et du citalopram dans le FPT

Dans l'expérience concernant la venlafaxine, on observe une augmentation significative du nombre de passages punis induit par l'administration de p-CPA ($p<0,003$) [$F_{(1, 90)} = 38,837$; $p<0,001$]. Par contre aucun effet n'a été observé dans la deuxième expérience quand le p-CPA est administré seul ($p>0,05$) [$F_{(1, 36)} = 28,741$; $p<0,001$].

Les doses de venlafaxine, paroxétine et citalopram utilisées augmentent de façon significative le nombre passages punis reçus par les souris [$F_{(4, 90)} = 3,006 ; p=0,022$], [$F_{(1, 36)} = 47,021 ; p<0,001$] et [$F_{(1, 36)} = 46,577 ; p<0,001$] respectivement. L'analyse statistique démontre un effet significatif entre le prétraitement (*p*-CPA) et le traitement (les antidépresseurs) [$F_{(4, 90)} = 12,377 ; p<0,001$] pour la venlafaxine, [$F_{(1, 36)} = 40,430 ; p<0,001$] pour la paroxétine et [$F_{(1, 36)} = 37,865 ; p<0,001$] pour le citalopram. Le *p*-CPA réduit significativement l'effet anti-punition de la venlafaxine ($p<0,05$), de la paroxétine ($p<0,001$) et du citalopram ($p<0,001$). L'administration d'alprazolam ou de diazépam, utilisés comme témoins positifs, augmente significativement le nombre de passages punis acceptés par les souris ($p<0,001$).

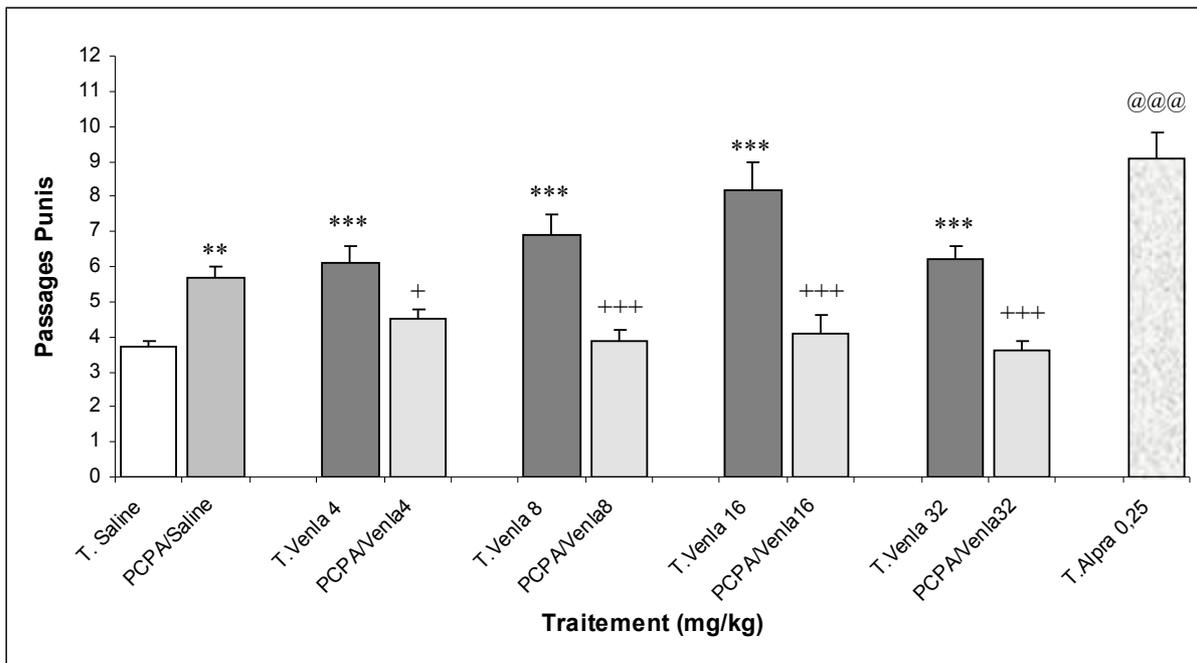


Figure 17 : Effet de l'administration de *p*-CPA (i.p.72 ; 48 ; 24 h avant le test) et de la venlafaxine (i.p.30 min avant le test) sur le nombre de passages punis acceptés par les souris dans le FPT.

Les résultats sont exprimés en moyenne (\pm ESM) du nombre de passages punis acceptés par les souris ($n=10$). L'analyse statistique est réalisée par une ANOVA à deux facteurs suivie d'un test de Sidak [*** ($p<0,001$) versus groupe contrôle et +++ ($p<0,001$), + ($p<0,05$) versus T. venla]. Un test t de Student est utilisé pour l'analyse statistique du groupe alprazolam comparé au groupe contrôle : @@@ ($p<0,001$).

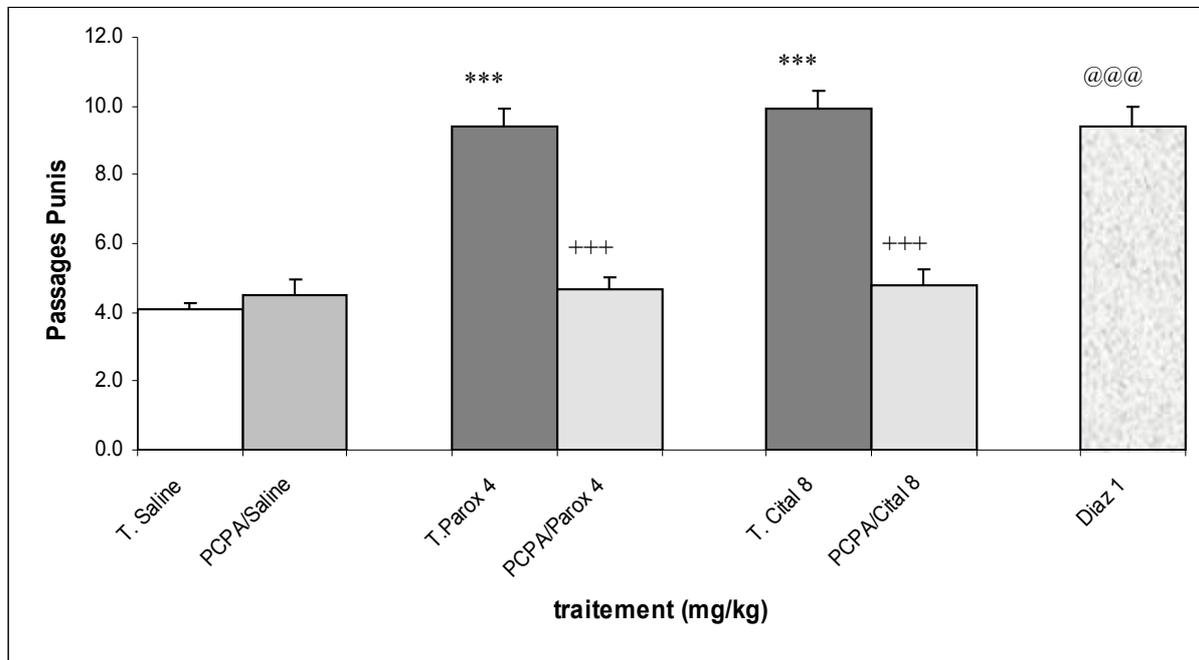


Figure 18 : Effet de l'administration de *p*-CPA (i.p.72, 48 et 24 h avant le test) et de la paroxétine ou du citalopram (i.p. 30min avant le test) sur le nombre de passages punis reçu par les souris dans le FPT.

Les résultats sont exprimés en moyenne (\pm ESM) du nombre de passages punis acceptés par les souris ($n=10$). L'analyse statistique est réalisée par une ANOVA à deux facteurs suivie d'un test de Sidak [*** ($p<0,001$) versus groupe contrôle et ++ ($p<0,01$) versus T. parox ou cital]. Un test t de Student est utilisé pour l'analyse statistique du groupe diazépam comparé au groupe contrôle : @@@ ($p<0,001$).

Etude de l'administration de DSP-4 et de p-CPA sur les concentrations de NA, 5-HT et DA.

Comme les expériences concernant la venlafaxine ont été réalisées en parallèle de l'étude 1a, les dosages des monoamines après administration de DSP-4 et *p*-CPA dans ces expériences sont ceux déjà exposés dans l'étude 1a. Pour les expériences concernant la paroxétine et le citalopram, le résultat des dosages des trois neurotransmetteurs après administration de DSP-4 et *p*-CPA sera exposé dans l'étude 3a car un seul groupe de témoins a été prélevé pour les deux études puisque ces expériences ont été réalisées en parallèle.

3.1.2.3 DISCUSSION DE L'ETUDE 1b

La déplétion des terminaisons axonales des neurones NA issus du locus coeruleus réalisée par l'administration de DSP-4 entraîne une diminution significative de l'activité de l'IRSN (venlafaxine) et des deux IRSSs (citalopram et paroxétine). En effet, l'administration de DSP-4 entraîne une inhibition totale de l'activité de type anxiolytique de la venlafaxine dans le FPT puisque le nombre de passages punis est similaire à celui du groupe contrôle. De même, l'administration de DSP-4 chez des animaux ayant reçu une dose active de paroxétine ou de citalopram diminue également significativement le nombre de passages punis comparé au groupe traité avec l'un ou l'autre des deux IRSSs. Ce nombre de passages punis reste cependant légèrement supérieur à celui du groupe contrôle.

L'administration de *p*-CPA préalable à l'exposition des souris au FPT inhibe l'effet anti-punition de la venlafaxine, la paroxétine et le citalopram. On observe une inhibition complète de leurs effets puisque le nombre de passages punis acceptés par les souris ayant reçus un prétraitement par du *p*-CPA et un traitement par des antidépresseurs est comparable à celui des souris contrôle.

L'effet observé avec le milnacipran n'est donc pas spécifique à la molécule puisqu'il est reproductible avec un autre IRSN et deux IRSSs. De plus, ces résultats montrent que la déplétion d'un seul des deux systèmes NA ou 5-HT est suffisante pour entraîner l'inhibition de l'effet de type anxiolytique des IRSNs et des IRSSs dans le FPT. Ces résultats sont en accord avec les données de la littérature qui montrent que les IRSNS et les IRSSs ont des effets sur la libération de NA et de 5-HT dans différentes structures cérébrales (Bandoh et al. 2004; Beyer et al. 2002; Hajos-Korcsok et al. 2000; Hughes et Stanford 1996; Mateo et al. 2000; Piacentini et al. 2003).

Cette étude permet donc de conclure que l'intégrité du système NA et du système 5-HT est essentielle pour que les ADs expriment leur activité de type anxiolytique dans le FPT.

3.2 Etude 2 :

Etude de l'effet de deux agonistes des récepteurs α_2 noradrénergiques sur l'activité de type anxiolytique de quatre antidépresseurs dans le test des quatre plaques.

alpha2-Adrenergic agonists antagonise the anxiolytic-like effect of antidepressants in the four-plate test in mice. Massé Fabienne, Hascoët Martine, Bourin Michel. Behav Brain Res. 2005, 164(1): p.17-28.

3.2.1 OBJECTIFS DE L'ETUDE 2

L'étude 1 a montré que l'intégrité des systèmes 5-HT et NA est obligatoire pour induire l'effet de type anxiolytique du milnacipran dans le FPT (Bourin et al. 2005). La même perte d'effet a été obtenue avec la venlafaxine, la paroxétine et le citalopram dans ce test chez des souris préalablement traitées avec du *p*-CPA ou avec du DSP-4 (étude 1b). L'étude de différentes catégories d'antidépresseurs dans le FPT a montré que seul les IRSSs et les IRSNs augmentent le nombre de passages punis acceptés par les souris. Cette même étude montre également qu'un inhibiteur spécifique de la recapture de la noradrénaline, la désipramine, diminue le nombre de passages punis acceptés par les animaux, entraînant donc un effet de type anxiogène dans le FPT (Hascoet et al. 2000). Ces résultats semblent impliquer de façon très importante le système NA dans le FPT.

Les récepteurs α_2 noradrénergiques font partis des sous types de récepteurs noradrénergiques les plus étudiés dans l'anxiété. Dans la littérature, des résultats contradictoires concernant l'effet de ces récepteurs sont observés. Certains antagonistes des récepteurs α_2 noradrénergiques (yohimbine et idazoxan) possèdent des effets de type anxiolytique, anxiogène voir aucun effet selon les modèles animaux d'anxiété utilisés comme l'exposition à un prédateur, le test de la double enceinte illuminée ou le test du labyrinthe en croix surélevé (Belzung et Berton 1997; Cole et al. 1995; La Marca et Dunn 1994; Venault et al. 1993; Wright et al. 1992; Zarrindast et al. 2000). Quant aux agonistes des récepteurs α_2 noradrénergiques tel que la clonidine, ils entraînent un effet de type anxiolytique dans plusieurs modèles animaux d'anxiété tels que le labyrinthe en croix surélevé, le test de Vogel et le test de la double enceinte illuminée (de Angelis 1995; Handley et Mithani 1984; Millan et al. 2000).

Deux études réalisées dans notre laboratoire montrent que la clonidine potentialise l'activité de nombreux antidépresseurs utilisés à dose inactives dans un test comportemental de dépression, le test de la nage forcée ou test de Porsolt, qui se traduit par une augmentation de la mobilité de la souris. Parmi les antidépresseurs, on retrouve des antidépresseurs tricycliques (la dothiépine, l'imipramine et l'amitriptyline), des IRSSs (la fluoxétine, le citalopram, la fluvoxamine, la paroxétine, l'indalpine ainsi que la clovoxamine), un IRSN (la maprotiline) et de nombreux antidépresseurs atypiques parmi lesquels on peut trouver la miansérine, l'iprindole, la viloxamine et la trazodone (Bourin et al. 1991; Bourin et al. 1996).

Dans l'étude 2, nous avons premièrement étudié l'effet propre de deux agonistes des récepteurs α_2 noradrénergiques, la clonidine et le guanabenz, en administration aiguë 30 min avant le début du test des quatre plaques. Puis dans un second temps, nous avons regardé si ces deux molécules possédaient la capacité de modifier l'augmentation du nombre de passages punis induite par l'administration aiguë de deux IRSSs, la paroxétine et le citalopram, et de deux IRSNs, la venlafaxine et le milnacipran. Lors des études d'interaction, la clonidine et le guanabenz sont administrés 15 min avant l'administration des ADs qui sont administrés eux-mêmes 30 min avant le début du test. Puis, les ADs sont administrés 45min avant le début du test et les agonistes des récepteurs α_2 noradrénergiques 15 min après les ADs. En parallèle l'étude de l'activité spontanée de ces produits co-administrés est réalisée afin de vérifier que la co-administration de ces molécules n'a pas d'effet trop sédatif ou psychostimulant pouvant interférer avec les effets obtenus dans le FPT.



ELSEVIER

Available online at www.sciencedirect.com

SCIENCE @ DIRECT®

Behavioural Brain Research 164 (2005) 17–28

BEHAVIOURAL
BRAIN
RESEARCH

www.elsevier.com/locate/bbr

Research report

α_2 -Adrenergic agonists antagonise the anxiolytic-like effect of antidepressants in the four-plate test in mice

Fabienne Massé, Martine Hascoët, Michel Bourin*

Neurobiology of Anxiety and Depression, Faculty of Medicine, BP 53508, 1 rue Gaston Veil, F44035 Nantes Cedex 01, France

Received 14 March 2005; received in revised form 3 May 2005; accepted 4 May 2005

Available online 2 August 2005

Abstract

Selective serotonin reuptake inhibitors (SSRIs) and serotonin/noradrenaline reuptake inhibitors (SNRIs) has been reported to be efficient in anxiety disorders. Some animal models have demonstrated an anxiolytic-like effect following acute administration, however, it is not yet known how noradrenergic receptors are implicated in the therapeutic effects of antidepressants (ADs) in anxiety.

The effects of two α_2 -adrenoceptor agonists (clonidine, guanabenz) on anxiolytic-like effect of two SSRIs (paroxetine and citalopram) and two SNRIs (venlafaxine and milnacipran) were evaluated in the four-plate test (FPT) in mice.

Paroxetine (4 mg/kg), citalopram (8 mg/kg), venlafaxine (8 mg/kg), and milnacipran (8 mg/kg) administered intraperitoneally (i.p.) increased the number of punishments accepted by mice in the FPT. Clonidine (0.0039–0.5 mg/kg) and guanabenz (0.03–0.5 mg/kg) had no effect on the number of punishments accepted by mice. Clonidine (0.03 and 0.06 mg/kg) and guanabenz (0.125 and 0.5 mg/kg) (i.p. –45 min) reversed the anti-punishment effect of paroxetine, citalopram, venlafaxine and milnacipran (i.p. –30 min). But if the antidepressants are administered 45 min before the test and α_2 -adrenoceptor agonists 30 min before the test, α_2 -adrenoceptor agonists failed to alter the anti-punishment effect of antidepressants.

The results of this present study indicate that α_2 -adrenoceptor agonists antagonise the anxiolytic-like effect of antidepressants in mice when they are administered 15 min before the administration of antidepressant suggesting a close inter-regulation between noradrenergic and serotonergic system in the mechanism of SSRIs and SNRIs in anxiety-like behaviour.

© 2005 Elsevier B.V. All rights reserved.

Keywords: SSRIs; SNRIs; α_2 -Adrenoceptor agonists; Mice; Four-plate test

1. Introduction

Some SSRIs and SNRIs have demonstrated an efficacy in different types of anxiety disorders (generalized anxiety disorder, simple social phobia, obsessive-compulsive disorder and panic disorder [3,16,56,63]). The use of antidepressants (ADs) in the treatment of anxiety disorders is now an effective alternative to benzodiazepines but their neurochemical underlying mechanism of action is still not understood. A previous study [34] demonstrated the efficacy of some antidepressants in the four-plate test (FPT) in mice.

The FPT is an animal model of anxiety, in which a simple ongoing behaviour (exploration of novel surrounding) is suppressed by the delivery of mild electric foot shock contingent on quadrant crossing. A strong anxiolytic-like effect was observed for some selective serotonin reuptake inhibitors (SSRIs): paroxetine, citalopram, sertraline, fluvoxamine and some serotonin/noradrenaline reuptake inhibitors (SNRIs): venlafaxine and milnacipran. The specific noradrenaline reuptake inhibitors, desipramine and maprotiline, the atypical AD trazodone displayed anxiogenic-like profile after acute administration while the monoamine oxidase inhibitors (MAOIs) had no effect in this test. A balance between serotonin (5-HT) and noradrenaline (NA) seems to be a crucial factor in the acute effect of ADs in the FPT.

* Corresponding author. Tel.: +33 2 40412852; fax: +33 2 40412856.
E-mail address: michel.bourin@univ-nantes.fr (M. Bourin).

Studies have been carried out to evaluate the contribution of serotonin receptor subtypes, in particular, the contribution of 5-HT₂ receptor subtypes, in the anxiolytic action of ADs in the four-plate test [46]. Co-administration of 5-HT₂ receptor agonists and antagonists strongly suggested that activation of 5-HT_{2A} receptors was critically involved in the anxiolytic-like effect of paroxetine in the FPT, while 5-HT_{2A/2B} receptors are implicated in the anxiolytic-like action of venlafaxine.

Recently, milnacipran has been shown to exert an anxiolytic-like effect in the FPT after acute administration. Depletion of noradrenergic or serotonergic systems, by DSP-4 or p-CPA respectively, completely abolished the milnacipran-induced increase in punished passages, suggesting the implication of both systems in the therapeutic effect of antidepressants in anxiety [17].

The present study focuses on the interrelation between the two neurotransmitters, 5-HT and NA. These neurotransmitters are both involved in anxiety and depressive disorders [47]. In a mice behavioural model of depression, the forced swimming test, the acute co-administration of a recently available full and selective 5-HT_{2C} agonist, the Ro 60-0175, resulted in the potentiation of some ADs including imipramine and three SSRIs, paroxetine, citalopram and fluvoxamine [19]. These results together with our experiments on the FPT provide some evidence of the implication of 5-HT₂ subtype receptors. Furthermore, early studies showed that clonidine, an α_2 -adrenoceptor agonist, potentiated the anti-immobility effect of ADs, including tricyclics, SSRIs, and certain atypicals, in the mouse forced swimming test at the dose of 0.06 mg/kg [13,40]. Clonidine has also been reported to potentially increase the action of ADs in the forced swimming test in mice via 5-HT₂ receptors suggesting that clonidine may not act only via α_2 -autoreceptors activation but also partly through an action at specific serotonergic receptor subtypes [51]. It is therefore also of interest to examine the association of clonidine and ADs in the FPT.

The implication of NA and more specifically the α_2 -adrenoceptor receptors in anxiety disorders has been demonstrated [55]. One of the functions of α_2 -adrenoceptors in the brain is the regulation of central NA release. The release of NA stimulates α_2 -autoreceptors, localized on the cell bodies of locus coeruleus neurons, initiating a negative feedback mechanism. Stimulation of α_2 -adrenoceptors also inhibits the release of 5-HT in corticolimbic structures and cholinergic systems where α_2 -adrenoceptors are present as heteroreceptors on both 5-HT- and cholinergic-containing terminals [27]. Many microdialysis and high performance liquid chromatography studies have reported that submitting animals to a stress results in an increase of NA concentration in different brain areas [18,29,49,52,62]. However, reports are inconsistent and results about the effects of α_2 -noradrenergic ligands administration are conflicting. α_2 -adrenoceptor antagonists, yohimbine and idazoxan, have been reported to induce anxiolytic-like effects in the elevated plus-maze test in mice, in the Vogel lick-shock conflict paradigm in rats [20,37,68],

anxiogenic-like effects in light–dark choice and conditioned conflict situations in mice [64,67] and to have no effect in the free exploratory paradigm in BALB/c mice [8]. On the other hand, α_2 -noradrenergic agonists such as clonidine and guanabenz demonstrated anxiolytic-like effects in the Vogel paradigm, elevated plus-maze and social interaction tests in rats [33,44,68]. A balance between pre- and postsynaptic α_2 -noradrenergic receptor localisation has been suggested as an explanation of these discrepancy [43].

The aim of the present study was undertaken in order to investigate whether the co-administration of α_2 -adrenoceptor agonists, guanabenz and clonidine, could modify the anxiolytic-like effect of ADs in the FPT in mice. Two SSRIs active in the FPT, paroxetine, one of the most potent and, citalopram the most selective [53] were chosen, together with two SNRIs, venlafaxine and milnacipran. Locomotor activity studies were conducted in parallel to investigate the effects of the compounds on the spontaneous motor activity of mice and to avoid the use of stimulant doses.

2. Materials and methods

2.1. Animals

Male Swiss mice, weighing on average 20 ± 2 g on the day of the study, were purchased from R. Janvier (Le Genest, France). These animals were housed in groups of 18 per cage (40 cm \times 28 cm \times 17 cm) for a minimum of 1 week prior to experiments, at a constant temperature (20 °C) and a standard light cycle (lights on between 07:00 and 19:00 h). There was free access to food and water. Each experimental group consisted of naive mice used once only. Mice were allocated randomly to the treatment groups ($n = 10$ or 12). All experiments were performed under the guidelines of the French Ministry of Agriculture for experiments with laboratory animals (law 87.848).

2.2. Drugs and treatment

Antidepressants: citalopram HBr [1-[3-(dimethylamino)propyl]-1-(4-fluorophenyl)-1,3-dihydro-5-isobenzofurancarboxonitrile hydrobromide] (Lundbeck, Denmark), paroxetine HCl [(3*S*-*trans*)-3-[(1,3-benzodioxol-5-yloxy)methyl]-4-(4-fluorophenyl)-piperidine] (GlaxoSmithKline, France), venlafaxine HCl [1-[2-(dimethylamino)-1-(4-methoxyphenyl)ethyl]cyclohexanol] (Wyeth-Ayerst, France), milnacipran HCl [chlorhydrate de (Z)-1-diéthylaminocarbonyl-2-aminoéthyl-1-phényl-cyclopropane] (Pierre Fabre, France).

α_2 -Adrenoceptor agonists: clonidine HCl [2-[(2,6-dichlorophenyl)amino]-2-imidazoline hydrochloride] (RBI, France), guanabenz acetate [(2,6-dichlorobenzylidene)amino]guanidine acetate] (Tocris, France).

BZD ligand: diazepam [(7-chloro-1-methyl-5-phenyl-3H-1,4-benzodiazepine-2[1H]-one)] (Sigma, France).

All drugs were dissolved in distilled water. Antidepressants, α_2 -adrenoceptor agonists (clonidine and guanabenz) and diazepam were injected intraperitoneally (i.p.) in a constant volume of 0.5 ml/20 g body weight, 30 or 45 min, according to the experimental protocol, prior to testing. Control animals received vehicle (distilled water) only.

2.3. Experimental design

Testing was performed between 09:00 and 13:00 h. All tests were performed in a quiet room. The mice were kept in this room at least 1 h before the test in groups of 6 per cage. After injection (vehicle or treatment), mice were placed in their holding cage in order to reduce any neophobic response to the test-room environment.

The doses of ADs chosen in the present study were based on previous studies. Citalopram and milnacipran (4–32 mg/kg) [17,34], paroxetine (2–16 mg/kg) [34,46] and venlafaxine (2–32 mg/kg) [34,46] demonstrated a strong anxiolytic-like effect in the FPT and no effect on the locomotor activity following acute administration in mice. In the present study, the doses of 4 mg/kg for paroxetine and 8 mg/kg for citalopram, venlafaxine and milnacipran were chosen for interaction studies.

The doses of α_2 -adrenergic agonists used in the study will be determined as doses inducing no psycho-stimulant effect in the actimeter test and no effect on the punished passages accepted by mice in the FPT.

Two inactive doses of clonidine and guanabenz in the FPT were co-administered with an active dose of ADs. In first part of experiment, the α_2 -adrenergic agonists were administered 15 min prior to the ADs. In second part of experiment, the α_2 -adrenergic agonists were administered 15 min after the ADs.

2.4. Psychopharmacological tests

2.4.1. Locomotor activity (actimeter) test [10]

The spontaneous activity of naive animals was recorded using a photoelectric actimeter (OSYS, France). This apparatus consists of a transparent cage in which the animal's activity is measured by the detection of interruption of light beams by photoelectric cells. The total number of horizontal cage crossings was recorded over a period of 10 min. The actimeter test was performed independently of the four-plate test in order to examine the effect of drugs on spontaneous locomotor activity of mice.

2.4.2. Four-plate test (FPT) [5]

This apparatus (Bioseb, Chaville, France) consist of a cage (18 cm \times 25 cm \times 16 cm) floored by four identical rectangular plates (11 cm \times 8 cm) separated from one another by a gap of 4 mm. The plates are connected to a device that can generate electric foot shocks (0.6 mA; 0.5 s (s)). Following a 15 s habituation period, the animal is subjected to an electric shock when crossing (transition) from one plate to another, i.e. two legs on one plate and two legs on another. The number of punished crossings is calculated for a period of 60 s. An anxiolytic substance is capable of increasing the number of punished passages.

2.5. Statistical analysis

Results were expressed as a mean number of beam interruptions (\pm SEM) for the locomotor activity or as a mean of punished passages (\pm SEM) for the FPT. The normal distribution of data was verified by a Kolmogorof–Smirnov test. Effect of drug alone on mouse behaviour in all tests was determined by a one-way ANOVA followed by Dunnett's test for comparison with control group. For interaction studies a two-way ANOVA (pre-treatment \times treatment) was employed. If the ANOVA showed a significant difference, a Sidak's test was performed to compare the effect of pre-treatment

on treatment. The effect of diazepam, included as internal standards in the anxiety model, was compared to the control group via a student *t*-test ($p < 0.05$). All analyses were conducted using the SPSS program for IBM compatible computer.

3. Results

3.1. Effect of α_2 -adrenoceptor agonists, administered alone 45 min before testing, on mouse behaviour in the actimeter and four-plate tests

• Actimeter test (Table 1)

Clonidine (0.0078–2 mg/kg) weakly decreased the spontaneous locomotor activity at the doses of 0.015 and 0.06 mg/kg ($p \leq 0.05$). From doses of 0.125 at 2 mg/kg, clonidine dramatically decreased the spontaneous locomotor activity ($p \leq 0.001$) in comparison with the control group [$F_{(9,111)} = 35.546$; $p < 0.001$].

Guanabenz (0.03–4 mg/kg) decreased the spontaneous locomotor activity from the dose of 0.5 mg/kg ($p < 0.001$) [$F_{(8,99)} = 29.144$; $p < 0.001$] in comparison with the control group.

• Four-plate test (Fig. 1)

In the two experiments an acute administration of diazepam (1 mg/kg), included as internal control, increased the number of punished passages accepted by mice ($p < 0.001$) (results not shown).

Clonidine (0.0039–0.5 mg/kg) did not modified the number of punishments of mice in this test [$F_{(8,81)} = 1.569$; $p = 0.147$] in comparison with the control group for all tested doses.

Post hoc analysis revealed that guanabenz (0.03–4 mg/kg) did not modify the number of punished passages of mice in this test ($p > 0.5$) in comparison with the control group [$F_{(8,81)} = 2.562$; $p = 0.015$].

Table 1

The effects of acute administration of clonidine and guanabenz, i.p. 45 min, on the locomotor activity in the actimeter test

| | Clonidine | Guanabenz |
|--------------|--------------------|--------------------|
| Controls | 177.8 \pm 13.1 | 189.8 \pm 11.1 |
| 0.0078 mg/kg | 159.7 \pm 8.3 | |
| 0.015 mg/kg | 138.0 \pm 6.4* | |
| 0.03 mg/kg | 142.2 \pm 12.7 | 165.2 \pm 12.6 |
| 0.06 mg/kg | 139.3 \pm 9.0* | 178.7 \pm 12 |
| 0.125 mg/kg | 76.1 \pm 9.6*** | 198.4 \pm 13.9 |
| 0.25 mg/kg | 38.8 \pm 5.3*** | 164.8 \pm 14.2 |
| 0.5 mg/kg | 52.1 \pm 6.6*** | 99.2 \pm 9.6*** |
| 1 mg/kg | 51.3 \pm 13.9*** | 87.7 \pm 13.4*** |
| 2 mg/kg | 27.0 \pm 4.3*** | 49.3 \pm 6.3*** |
| 4 mg/kg | | 40.4 \pm 6.5*** |

Effects of acute administration of α_2 -adrenoceptor agonists (guanabenz and clonidine), i.p. 45 min, before the actimeter test. All data are cited as mean \pm SEM ($n = 12$). Statistical analysis was performed by one-way ANOVA followed by a Dunnett's test for comparisons between treated groups and control group.

* $p < 0.05$.

*** $p < 0.001$.

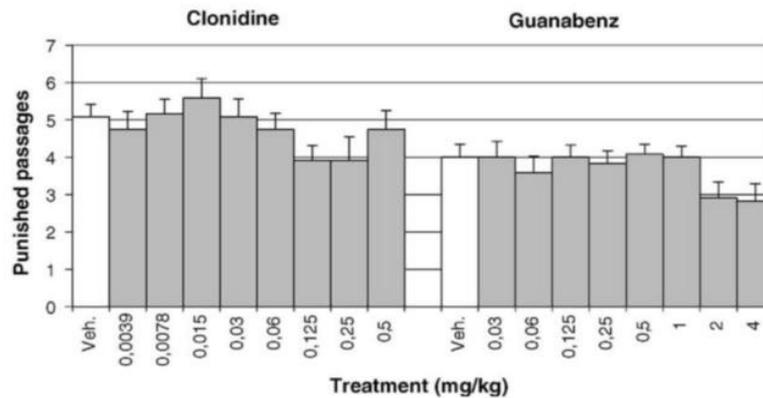


Fig. 1. Effects of acute treatment of guanabenz and clonidine, i.p. 45 min before the test in the FPT. The results are cited as mean \pm SEM ($n=10$). Statistical analysis was performed by a one-way ANOVA followed by a Dunnett's test for comparisons between treated groups and control group.

3.2. Effect of co-administration of α_2 -adrenoceptor agonists, i.p. 45 min before testing, and antidepressants, i.p. 30 min before testing, on mouse behaviour in actimeter test (Table 2)

The co-administration of clonidine (0.06 mg/kg) or guanabenz (0.125 and 0.5 mg/kg) with citalopram did not significantly modify the locomotor activity of mice in the actimeter test in comparison with control group [$F_{(5,59)} = 11.832$; $p < 0.001$]. Citalopram co-administered with clonidine (0.03 mg/kg) significantly increased the locomotor activity of mice ($p = 0.029$) [$F_{(5,59)} = 11.462$; $p < 0.001$] (Table 2).

The co-administration of clonidine (0.03 and 0.06 mg/kg) or guanabenz (0.125 and 0.5 mg/kg) with paroxetine did not modify the locomotor activity of mice $p > 0.05$ after a post hoc analysis ([$F_{(5,59)} = 2.067$; $p = 0.084$] and [$F_{(5,59)} = 2.768$; $p = 0.027$], respectively).

When co-administered with clonidine (0.03 and 0.06 mg/kg) or guanabenz (0.125 and 0.5 mg/kg), venlafaxine had no effect on the locomotor activity of mice

in the actimeter test $p > 0.05$ after a post hoc analysis ([$F_{(5,59)} = 6.566$; $p < 0.001$] and [$F_{(5,59)} = 8.216$; $p < 0.001$], respectively).

The co-administration of milnacipran and clonidine (0.06 mg/kg) or guanabenz (0.5 mg/kg) significantly decreased the locomotor activity of mice in the actimeter test $p = 0.005$ and $p < 0.001$ after a post hoc analysis. When co-administered with clonidine (0.03 mg/kg) and guanabenz (0.125 mg/kg), milnacipran did not modify the locomotor activity of mice $p > 0.05$ after a post hoc analysis. ([$F_{(5,59)} = 3.584$; $p < 0.01$] for clonidine and [$F_{(5,59)} = 10.262$; $p < 0.001$] for guanabenz).

3.3. Interaction studies

According from above results, the doses of clonidine (0.03 and 0.06 mg/kg) and guanabenz (0.125 and 0.5 mg/kg) were chosen for interaction studies as they have no effect on the punished passages accepted by mice in the FPT in comparison with control groups. In all interaction studies, clonidine (0.03 and 0.06 mg/kg) and guanabenz (0.125 and 0.5 mg/kg)

Table 2

The effects of co-administration of clonidine and guanabenz, i.p. 45 min, with antidepressants, i.p. 30 min, on the locomotor activity in the actimeter test

| α_2 Agonists (mg/kg) | Citalopram 8 mg/kg | Paroxetine 4 mg/kg | Venlafaxine 8 mg/kg | Milnacipran 4 mg/kg |
|-----------------------------|--------------------|--------------------|---------------------|---------------------|
| Controls | 141.9 \pm 10.4 | 161.2 \pm 12.6 | 144.1 \pm 6.8 | 143.9 \pm 6.6 |
| Clonidine 0.03 | 104.5 \pm 11.6 | 132.7 \pm 7.8 | 122.8 \pm 11.1 | 107.6 \pm 11.1 |
| Clonidine 0.06 | 97.9 \pm 11.6 | 168.4 \pm 10.9 | 83.3 \pm 6.4** | 111.1 \pm 11.2 |
| Guanabenz 0.125 | 124.6 \pm 11.8 | 141.1 \pm 13 | 103.2 \pm 6.9 | 113.2 \pm 7.7 |
| Guanabenz 0.5 | 78.1 \pm 7.2** | 136.9 \pm 10.9 | 100.2 \pm 8.3* | 93.6 \pm 10.8*** |
| ADs | 178.7 \pm 13.6 | 168.8 \pm 10.4 | 165.2 \pm 8.5 | 132.1 \pm 10.3 |
| Clonidine 0.03 + ADs | 196.7 \pm 12.9* | 174.6 \pm 8.9 | 124.5 \pm 10.6 | 112.0 \pm 11.4 |
| Clonidine 0.06 + ADs | 168.5 \pm 12.1 | 150.7 \pm 12.6 | 108.2 \pm 13.2 | 89.5 \pm 10.3** |
| Guanabenz 0.125 + ADs | 184.6 \pm 8.1 | 189.4 \pm 10.4 | 109.7 \pm 13.9 | 115.4 \pm 5.2 |
| Guanabenz 0.5 + ADs | 157.8 \pm 16 | 145.0 \pm 13.7 | 136.5 \pm 13.3 | 61.6 \pm 10*** |

Effects of acute administration of α_2 -adrenoceptor agonists (guanabenz and clonidine), i.p. 45 min, with antidepressants, i.p. 30 min before the actimeter test. All data are cited as mean \pm SEM ($n = 12$). Statistical analysis was performed by one-way ANOVA followed by a Sidak test for comparisons between treated groups and control group.

* $p < 0.05$.

** $p < 0.01$.

*** $p < 0.001$.

did not modify the number punished passages in the FPT ($p > 0.05$ following a post hoc Sidak test. Moreover, diazepam (1 mg/kg) used as an internal control significantly increased the number of punished passages ($p < 0.001$ by Student's t -test).

3.3.1. Effects of α_2 -agonists (15 min prior to ADs, i.p.) on the anti-punishment action of antidepressants (30 min before the test, i.p.) in the FPT

3.3.1.1. Co-administration of clonidine. Citalopram (8 mg/kg) significantly increased the number of punished passages (post hoc analysis $p < 0.001$) in the FPT [$F_{(1,36)} = 16.333; p < 0.001$]. Clonidine (0.03 and 0.06 mg/kg) potently inhibited the anti-punishment action of citalopram when co-administered ($p < 0.001$) in comparison with citalopram alone [$F_{(1,36)} = 9.902; p < 0.001$] and [$F_{(1,36)} = 11.694; p = 0.002$], respectively (Fig. 2a and b).

Post hoc analysis revealed that, in comparison with control group, paroxetine (4 mg/kg) significantly increased the number of punished passages ($p < 0.001$) in this test

[$F_{(1,36)} = 21.928; p < 0.001$]. Clonidine (0.03 and 0.06 mg/kg) inhibited the anti-punishment action of paroxetine when co-administered with paroxetine ($p \leq 0.001$) [$F_{(1,36)} = 9.264; p = 0.004$] for clonidine 0.03 mg/kg and [$F_{(1,36)} = 14.370; p = 0.001$] for clonidine 0.06 mg/kg (Fig. 2a and b).

Venlafaxine (8 mg/kg) significantly increased the number of punished passages in this test (post hoc analysis $p = 0.001$) [$F_{(1,36)} = 12.210; p < 0.001$]. An interaction between the two treatments was observed, clonidine (0.03 and 0.06 mg/kg) inhibited the anti-punishment action of venlafaxine ($p = 0.001$) [$F_{(1,36)} = 21.512; p < 0.001$] and ($p = 0.018$) [$F_{(1,36)} = 4.558; p = 0.015$], respectively (Fig. 3a and b).

Post hoc analysis revealed that milnacipran (8 mg/kg) significantly increased the number of punished passages in this test ($p < 0.001$) [$F_{(1,36)} = 8.134; p < 0.001$]. When co-administered, both doses of clonidine (0.03 and 0.06 mg/kg) potently inhibited the anti-punishment action of milnacipran ($p < 0.001$) [$F_{(1,36)} = 19.280; p < 0.001$] and [$F_{(1,54)} = 13.909; p = 0.004$], respectively (Fig. 3a and b).

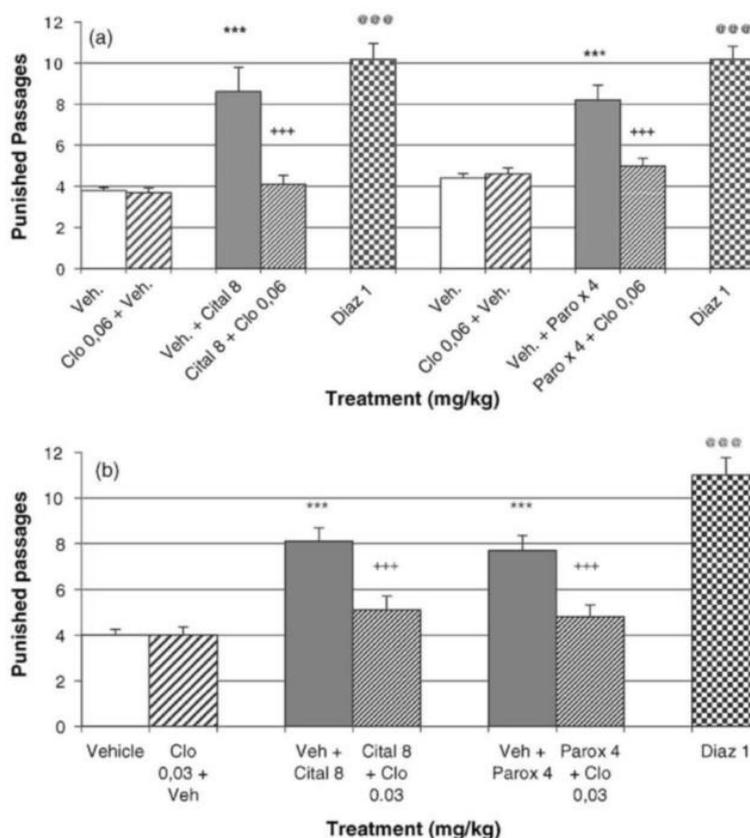


Fig. 2. (a) Effects of co-administration of clonidine (0.06 and 0.5 mg/kg), i.p. 45 min pre-test, and two SSRIs (citalopram and paroxetine), i.p. 30 min pre-test, on the number of punishments accepted by mice in the FPT. The data are cited as mean \pm SEM ($n = 10$). Statistical analysis was performed by two-way ANOVA followed by a Sidak test, *** ($p < 0.001$) vs. control group and +++ ($p < 0.001$) vs. vehicle + citalopram or paroxetine group. A Student's t -test was used for statistical analysis between the diazepam group and control group, @@@ ($p < 0.001$). (b) Effects of co-administration of clonidine (0.03 mg/kg), i.p. 45 min pre-test, and two SSRIs (citalopram and paroxetine), i.p. 30 min pre-test, on the number of punishments accepted by mice in the FPT. The data are cited as mean \pm SEM ($n = 10$). Statistical analysis was performed by two-way ANOVA followed by a Sidak test, *** ($p < 0.001$) vs. control group and +++ ($p < 0.001$) vs. vehicle + citalopram or paroxetine group. A Student's t -test was used for statistical analysis between the diazepam group and control group, @@@ ($p < 0.001$).

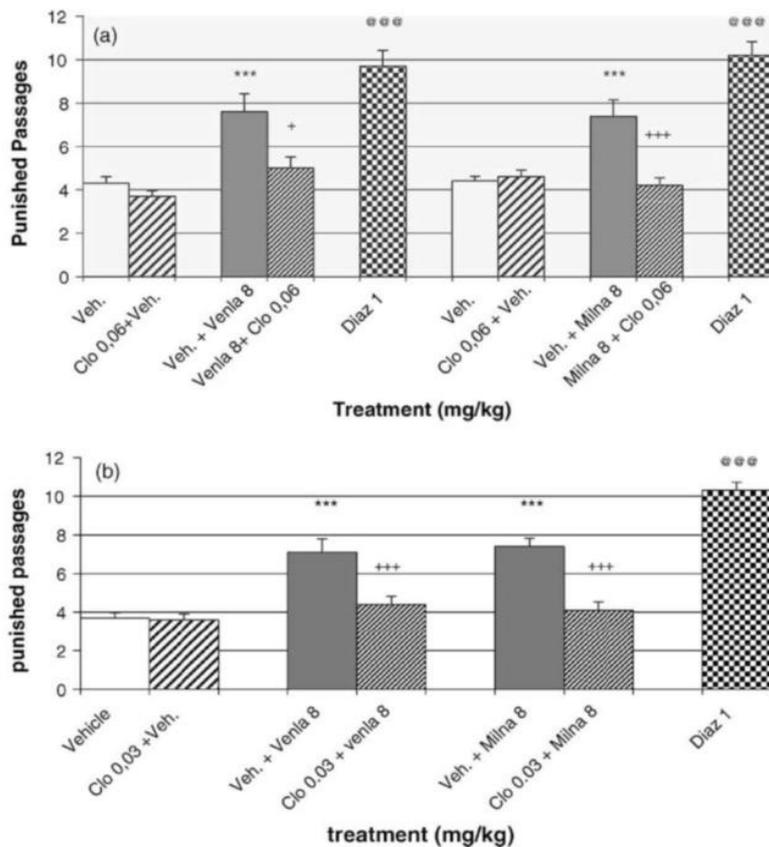


Fig. 3. (a) Effects of co-administration of clonidine (0.06 and 0.5 mg/kg), i.p. 45 min pre-test, and two SNRIs (venlafaxine and milnacipran), i.p. 30 min pre-test, on the number of punishments accepted by mice in the FPT. The data are cited as mean \pm SEM ($n=10$). Statistical analysis was performed by two-way ANOVA followed by a Sidak test, *** ($p < 0.001$) vs. control group and +++ ($p \leq 0.001$), + ($p \leq 0.05$) vs. vehicle + venlafaxine or milnacipran group. A Student's t -test was used for statistical analysis between the diazepam group and control group, @@@ ($p < 0.001$). (b) Effects of co-administration of clonidine (0.03 mg/kg), i.p. 45 min pre-test, and two SNRIs (venlafaxine and milnacipran), i.p. 30 min pre-test, on the number of punishments accepted by mice in the FPT. The data are cited as mean \pm SEM ($n=10$). Statistical analysis was performed by two-way ANOVA followed by a Sidak test, *** ($p < 0.001$) vs. control group and +++ ($p \leq 0.001$), vs. vehicle + venlafaxine or milnacipran group. A Student's t -test was used for statistical analysis between the diazepam group and control group, @@@ ($p < 0.001$).

3.3.1.2. Co-administration of guanabenz. The administration of citalopram (8 mg/kg) increased significantly the number of punishment accepted by mice in comparison with the vehicle treated group after post hoc analysis ($p < 0.001$) [$F_{(1,54)} = 13.144$; $p = 0.001$]. The co-administration of guanabenz (0.125 and 0.5 mg/kg) antagonised the anti-punishment action of citalopram in this test ($p < 0.001$) [$F_{(2,54)} = 10.961$; $p < 0.001$] for both doses (Fig. 4).

The administration of paroxetine (4 mg/kg) significantly increased the number of punished passages accepted by mice in this test after post hoc analysis ($p < 0.001$) [$F_{(1,54)} = 41.884$; $p < 0.001$]. There was an interaction between both treatments, when co-administered (guanabenz \times paroxetine) [$F_{(2,54)} = 18.717$; $p < 0.001$]. Both doses of guanabenz antagonised the anti-punishment effect of paroxetine ($p < 0.001$) (Fig. 4).

The administration of venlafaxine (8 mg/kg) significantly increased the number of punished passages accepted

by mice in this test after post hoc analysis ($p < 0.001$) [$F_{(1,54)} = 15.383$; $p < 0.001$]. When co-administered, guanabenz (0.125 and 0.5 mg/kg) antagonised the anti-punishment effect of venlafaxine ($p = 0.012$ and $p < 0.001$, respectively) [$F_{(2,54)} = 5.154$; $p = 0.009$] (Fig. 5).

The administration of milnacipran (8 mg/kg) increased significantly the number of punishment accepted by mice in comparison with the vehicle treated group ($p < 0.001$) [$F_{(1,54)} = 8.281$; $p = 0.006$]. The administration of both doses of guanabenz antagonised the anti-punishment action of milnacipran in this test ($p < 0.001$) [$F_{(2,54)} = 10.869$; $p < 0.001$] (Fig. 5).

3.3.2. Effects of α_2 -agonists (15 min after ADs, i.p.) on the anti-punishment action of antidepressants (45 min before the test, i.p.) in the FPT

3.3.2.1. Co-administration of clonidine. Citalopram (8 mg/kg) significantly increased the number of punished passages after post hoc analysis ($p < 0.001$) in this test

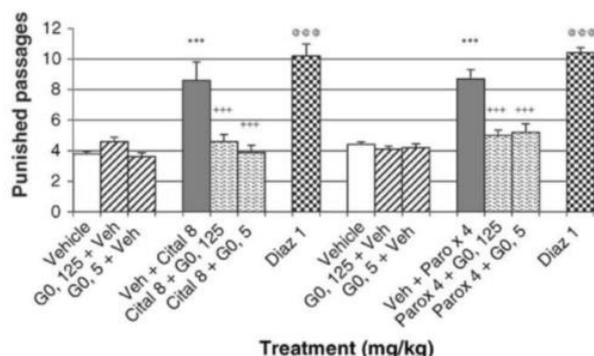


Fig. 4. Effects of co-administration of guanabenz (0.125 and 0.5 mg/kg), i.p. 45 min pre-test, and two SSRIs (citalopram and paroxetine), i.p. 30 min pre-test, on the number of punishments accepted by mice in the FPT. The data are cited as mean \pm SEM ($n=10$). Statistical analysis was performed by two-way ANOVA followed by a Sidak test, *** ($p<0.001$) vs. control group and +++ ($p\leq 0.001$), vs. vehicle+citalopram or paroxetine group. A Student's t -test was used for statistical analysis between the diazepam group and control group, @@@ ($p<0.001$).

[$F_{(1,54)} = 49.957$; $p<0.001$]. Co-administration of clonidine (0.06 and 0.03 mg/kg) with citalopram failed to significantly alter the anti-punishment effect of citalopram [$F_{(2,54)} = 1.898$; $p=0.160$] (Table 3).

The administration of paroxetine (4 mg/kg) significantly increased the number of punished passages after post hoc analysis ($p<0.001$) in this test [$F_{(1,36)} = 28.409$; $p<0.001$]. Co-administration of clonidine 0.03 or 0.06 mg/kg with paroxetine failed to significantly alter the anti-punishment effect of paroxetine [$F_{(1,36)} = 2.410$; $p=0.129$] for clonidine 0.03 mg/kg and [$F_{(2,54)} = 0.006$; $p=0.941$] (Table 3).

Venlafaxine (8 mg/kg) significantly increased the number of punished passages after post hoc analysis ($p<0.001$) in this test [$F_{(1,54)} = 69.389$; $p<0.001$]. There was no interac-

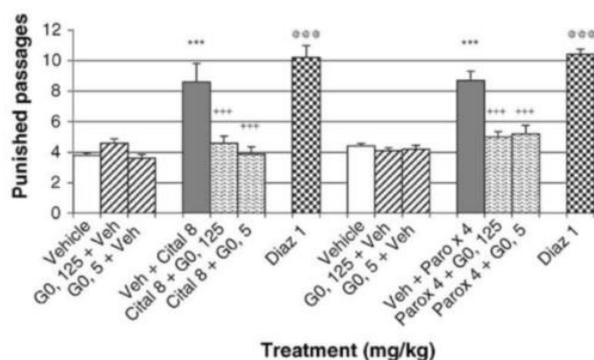


Fig. 5. Effects of co-administration of guanabenz (0.125 and 0.5 mg/kg), i.p. 45 min pre-test, and two SNRIs (venlafaxine and milnacipran), i.p. 30 min pre-test, on the number of punishments accepted by mice in the FPT. The data are cited as mean \pm SEM ($n=10$). Statistical analysis was performed by two-way ANOVA followed by a Sidak test, *** ($p<0.001$) vs. control group and +++ ($p\leq 0.001$), + ($p\leq 0.05$) vs. vehicle+venlafaxine or milnacipran group. A Student's t -test was used for statistical analysis between the diazepam group and control group, @@@ ($p<0.001$).

Table 3

The effects of co-administration of clonidine (30 min before the test) and antidepressants (45 min before the test) on the number of punishments accepted by mice in the FPT

| α_2 Agonists (mg/kg) | Antidepressants | Number of punished passages |
|-----------------------------|-----------------|-----------------------------|
| Vehicle | Vehicle | 4.3 \pm 0.2 |
| Vehicle | Citalopram | 8.4 \pm 0.8*** |
| Clonidine 0.06 | Vehicle | 3.9 \pm 0.3 |
| Clonidine 0.03 | Vehicle | 4.4 \pm 0.2 |
| Clonidine 0.06 | Citalopram | 6.5 \pm 0.7 |
| Clonidine 0.03 | Citalopram | 6.2 \pm 0.5* |
| Vehicle | Vehicle | 3.6 \pm 0.3 |
| Vehicle | Paroxetine | 9.7 \pm 0.7*** |
| Clonidine 0.03 | Vehicle | 3.9 \pm 0.3 |
| Clonidine 0.03 | Paroxetine | 8.2 \pm 0.9*** |
| Vehicle | Vehicle | 4.1 \pm 0.2 |
| Vehicle | Paroxetine | 7.6 \pm 0.7** |
| Clonidine 0.06 | Vehicle | 4.4 \pm 0.5 |
| Clonidine 0.06 | Paroxetine | 8 \pm 1*** |
| Vehicle | Vehicle | 4.5 \pm 0.2 |
| Vehicle | Venlafaxine | 8.3 \pm 0.7*** |
| Clonidine 0.06 | Vehicle | 3.9 \pm 0.5 |
| Clonidine 0.03 | Vehicle | 4.3 \pm 0.3 |
| Clonidine 0.06 | Venlafaxine | 7.6 \pm 0.7*** |
| Clonidine 0.03 | Venlafaxine | 7.7 \pm 0.6*** |
| Vehicle | Vehicle | 4.3 \pm 0.2 |
| Vehicle | Milnacipran | 7.6 \pm 0.6*** |
| Clonidine 0.03 | Vehicle | 4.3 \pm 0.3 |
| Clonidine 0.03 | Milnacipran | 7.1 \pm 0.6*** |
| Vehicle | Vehicle | 4.1 \pm 0.2 |
| Vehicle | Milnacipran | 7.5 \pm 0.5*** |
| Clonidine 0.06 | Vehicle | 4.4 \pm 0.5 |
| Clonidine 0.06 | Milnacipran | 5.4 \pm 0.6 |

Effects of co-administration of clonidine (0.03 and 0.06 mg/kg), i.p. 30 min pre-test, and four antidepressants, i.p. 45 min pre-test, on the number of punishments accepted by mice in the FPT. The data are cited as mean \pm SEM ($n=10$). Statistical analysis was performed by two-way ANOVA followed by a Sidak test for comparisons between treated groups and control group.

* $p<0.05$.
 ** $p<0.01$.
 *** $p<0.001$.

tion between clonidine and venlafaxine in these conditions of experimentation [$F_{(2,54)} = 0.076$; $p=0.927$] (Table 3).

The administration of milnacipran (8 mg/kg) significantly increased the number of punished passages after post hoc analysis ($p<0.001$) in this test [$F_{(1,36)} = 21.726$; $p<0.001$]. Co-administration of clonidine for the dose of 0.06 mg/kg but not 0.03 mg/kg, 15 min after administration of milnacipran altered the anti-punishment effect of milnacipran, $p=0.02$ after a post hoc analysis ([$F_{(1,36)} = 6.464$; $p=0.015$] [$F_{(1,36)} = 0.315$; $p=0.578$], respectively) (Table 3).

3.3.2.2. Co-administration of guanabenz. The administration of citalopram (8 mg/kg) significantly increased the number of punished passages accepted by mice in this test after post hoc analysis ($p<0.001$) [$F_{(1,54)} = 107.475$; $p<0.001$]. When guanabenz was co-administered with citalopram, there was no interaction between treatments (guanabenz \times citalopram) [$F_{(2,54)} = 0.400$; $p=0.672$] (Table 4).

Table 4

The effects of co-administration of guanabenz (30 min before the test) and antidepressants (45 min before the test) on the number of punishments accepted by mice in the FPT

| α_2 Agonists (mg/kg) | Antidepressants | Number of punished passages |
|-----------------------------|-----------------|-----------------------------|
| Vehicle | Vehicle | 4.3 ± 0.3 |
| Vehicle | Citalopram | 9 ± 0.4*** |
| Guanabenz 0.125 | Vehicle | 4.1 ± 0.3 |
| Guanabenz 0.5 | Vehicle | 4.1 ± 0.5 |
| Guanabenz 0.125 | Citalopram | 8.4 ± 0.7*** |
| Guanabenz 0.5 | Citalopram | 7.9 ± 0.8*** |
| Vehicle | Vehicle | 3.6 ± 0.3 |
| Vehicle | Paroxetine | 9.7 ± 0.7*** |
| Guanabenz 0.125 | Vehicle | 4.6 ± 0.3 |
| Guanabenz 0.5 | Vehicle | 3.8 ± 0.4 |
| Guanabenz 0.125 | Paroxetine | 8.4 ± 0.7*** |
| Guanabenz 0.5 | Paroxetine | 7.5 ± 0.6*** |
| Vehicle | Vehicle | 4.3 ± 0.3 |
| Vehicle | Venlafaxine | 7.4 ± 0.6** |
| Guanabenz 0.125 | Vehicle | 4.1 ± 0.3 |
| Guanabenz 0.5 | Vehicle | 4.1 ± 0.5 |
| Guanabenz 0.125 | Venlafaxine | 7.8 ± 0.5*** |
| Guanabenz 0.5 | Venlafaxine | 8.2 ± 1.1*** |
| Vehicle | Vehicle | 4.3 ± 0.2 |
| Vehicle | Milnacipran | 7.6 ± 0.6*** |
| Guanabenz 0.125 | Vehicle | 4.2 ± 0.2 |
| Guanabenz 0.5 | Vehicle | 4.7 ± 0.5 |
| Guanabenz 0.125 | Milnacipran | 7.1 ± 0.6** |
| Guanabenz 0.5 | Milnacipran | 6.8 ± 0.5** |

Effects of co-administration of guanabenz (0.125 and 0.5 mg/kg), i.p. 30 min pre-test, and four antidepressants, i.p. 45 min pre-test, on the number of punishments accepted by mice in the FPT. The data are cited as mean ± SEM ($n = 10$). Statistical analysis was performed by two-way ANOVA followed by a Sidak test for comparisons between treated groups and control group.

** $p < 0.01$.

*** $p < 0.001$.

The administration of paroxetine (4 mg/kg) significantly increased the number of punished passages accepted by mice in this test after post hoc analysis ($p < 0.001$) [$F_{(1,54)} = 110.471$; $p < 0.001$]. When guanabenz was co-administered with paroxetine, no interaction between the two treatments was observed [$F_{(2,54)} = 3.998$; $p = 0.05$] (Table 4).

The administration of venlafaxine (8 mg/kg) significantly increased the number of punished passages accepted by mice in this test after post hoc analysis ($p < 0.001$) [$F_{(1,54)} = 41.331$; $p < 0.001$]. When guanabenz was co-administered with venlafaxine, no interaction between the two treatments was observed [$F_{(2,54)} = 0.540$; $p = 0.466$] (Table 4).

The administration of milnacipran (8 mg/kg) significantly increased the number of punished passages accepted by mice in this test after post hoc analysis ($p < 0.001$) [$F_{(1,54)} = 51.368$; $p < 0.001$]. Co-administration of guanabenz 15 min after milnacipran failed to alter the anti-punishment effect of milnacipran [$F_{(2,54)} = 0.824$; $p = 0.444$] (Table 4).

4. Discussion

In the present study, the effects of clonidine and guanabenz on the anti-punishment effect of four ADs, parox-

etine and citalopram (two SSRIs), venlafaxine and milnacipran (two SNRIs) were evaluated in mouse FPT. When the α_2 -adrenoreceptor agonists were administered prior to the antidepressants (ADs administered 30 min before the test; clonidine and guanabenz administered 15 min after the ADs), they abolished the anti-punishment action of the four ADs, in the FPT in mice. Administration of clonidine and guanabenz 15 min after the administration of ADs, however, did not modify the anti-punishment effect of the ADs in the FPT excepted for milnacipran co-administered with clonidine 0.06 mg/kg. This modification of anti-punishment effect of milnacipran was not observed with either doses of guanabenz in the same conditions. The reason of this discrepancy remains unclear.

Clonidine (0.03 mg/kg) and guanabenz (0.125 mg/kg) did not induce any decrease in spontaneous locomotor activity when administered alone in the actimeter test.

Whatever the results of clonidine or guanabenz with ADs on spontaneous locomotor activity, i.e. decrease, increase or no effect, the same co-administration induced a significant antagonism of the two α_2 -adrenergic agonists in the FPT. These results agree with the fact that the anxiolytic-like effect observed in the FPT does not interfere with spontaneous locomotor activity for non-incapacitating doses. Moreover, in a previous study Bourin et al. [14] have demonstrated that a sedative effect did not induce an abolition of anxiolytic-like effect in FPT. Alprazolam and diazepam demonstrated sedative effects for doses of 0.05–4 and 2–8 mg/kg respectively while both benzodiazepines increased the number of punished crossings in the FPT in mice for a range doses from 0.25 to 1 mg/kg and from 1 to 4 mg/kg respectively.

The effect of α_2 -adrenergic ligands on anxiety has been extensively studied in animal models of anxiety with contradictory results. Soderpalm et al. demonstrated that clonidine (10 μ g/kg i.p.) antagonized the anti-conflict effect of yohimbine (4 mg/kg i.p.) in a modified Vogel's drinking conflict test [60]. Others studies demonstrated an anxiolytic-like effect of α_2 -adrenergic agonists (clonidine and guanabenz) in different animal models of anxiety [27,33,39,44]. The administration of antisense oligodeoxynucleotide for α_{2A} -adrenoceptors into the locus coeruleus for 3 days (1 nmol/5 μ l/day) increased significantly the percentage of open arm entries displayed in a rat elevated plus maze test [57,58]. Our present results show that the two α_2 -adrenergic agonists, clonidine and guanabenz, had neither anxiolytic nor anxiogenic effects per se in the FPT in mice when administered acutely.

In the present study, the acute administration of paroxetine, citalopram, venlafaxine and milnacipran resulted in strong anxiolytic-like effects in the FPT. No difference was observed on the number of punished passages induce by an acute administration of ADs when they were administered 30 or 45 min before the test. These results are in agreement with previous study using the same paradigm [34]. Many studies have demonstrated an anxiolytic-like effect following chronic administration of ADs in animal models of anxiety including the light/dark choice procedure in mice, the elevated plus maze in rats and the rat social interaction

test [12,24,30,38,59]. However, some studies have shown anxiolytic-like effects of ADs after an acute administration in the ultrasonic vocalisations in mice and the conditioned fear stress paradigm in rats [26,35,36,45], whereas anxiogenic-like effects have been observed by other authors in social interaction anxiety test in rat and elevated plus maze in mice [6,24,42].

In the present study, we have demonstrated a strong implication of α_2 -adrenoceptors in the mechanism of action of SSRIs and SNRIs in the FPT. When administered 15 min before ADs, clonidine (0.03 and 0.06 mg/kg) inhibited the anxiolytic-like effect of citalopram (8 mg/kg), paroxetine (4 mg/kg), venlafaxine (8 mg/kg) and milnacipran (8 mg/kg). The same results were obtained with guanabenz (0.125 and 0.5 mg/kg).

Previous studies in our laboratory have already demonstrated an interrelation between clonidine and ADs in the forced swimming test (FST) and in the tail suspension test (TST), two models of depression in mice [15,50]. Clonidine was shown to be a potentially useful tool for enhancing the effects of ADs in the FST and the TST. However, the effect of α_2 -adrenoceptor agonists is different in the case of antidepressant or anti-anxiety effects with a synergic effect in one case and an antagonism in the other respectively. The exact mechanism involved in this anxiolytic-like effect is not clear.

α_2 -adrenoceptors are present in different structures of the brain with high concentrations in thalamus, bed nucleus of the stria terminalis, amygdala and locus coeruleus. The frontal cortex, hypothalamus and CA fields of hippocampus contain a moderate density of α_2 -adrenoceptors while the globus pallidus and caudate putamen exhibit low levels of α_2 -adrenoceptors [28]. Complex modulation exists between the noradrenergic and serotonergic system. The α_2 -adrenoceptors can act at different levels on these two neurotransmitter systems. α_2 -autoreceptors noradrenergic present on noradrenergic nerve terminals of the locus coeruleus inhibit NA release and can prevent the inhibition of NA on the 5-HT release [25]. Several studies have showed that the firing of 5-HT neurons in the raphe nucleus is inhibited by the stimulation of α_2 -heteroreceptor noradrenergic present in nerve terminals 5-HT [2,31,61]. Moreover, the inhibition of NA release may also decrease the excitatory effect of α_1 -adrenoceptors present in the serotonergic neurons in the raphe nuclei [4].

The effect of SSRIs and SNRIs on the level of NA in various structures of brain has been extensively studied by microdialysis. Recent microdialysis studies have reported a significant increase of NA in cortex after injection of paroxetine, venlafaxine and citalopram in mice and rat [9,23,48]. Another microdialysis study has reported that rats, treated twice daily for 14 days with paroxetine (5 mg/kg), had two-fold greater concentrations of NA in hippocampus compared to saline-injected controls [32]. An administration of citalopram (1–100 μ M) in the locus coeruleus increased NA extracellular content in this structure and simultaneously

decreased extracellular noradrenaline in the cingulate cortex [41].

Moreover, it was demonstrated that idazoxan, an antagonist of α_2 -adrenoceptors, produced a potent enhancement of the venlafaxine effect in increasing the extracellular NA level in the rat prefrontal cortex and hippocampus [66].

In addition, following DSP-4 administration, which induces a long lasting depletion of NA in some noradrenergic axon terminals originating from the locus coeruleus, we observed a loss of activity of milnacipran in the FPT. A depletion of brain 5-HT content by administration of p-CPA also led to the inhibition of the anxiolytic-like effect of milnacipran in the FPT [17]. These results agrees with microdialysis study that suggest that blockade of α_2 -adrenoceptors may play an important role in augmentation of the effects of venlafaxine. However, despite electrophysiological work concerning the actions of milnacipran, little knowledge is available about how antidepressant affects the neurochemical and biochemical properties between locus coeruleus and dorsal raphe nucleus neurons [7]. Furthermore, Cryan et al. using NA-deficient mice demonstrate the inter-dependence of both neurotransmitter systems. Indeed, the effect of various ADs including SSRIs were absent in the noradrenaline-deficient mice in the TST [22]. In the FPT, the anxiolytic-like effect induced by SSRIs and SNRIs, might be indirectly mediated through NA release. The negative feedback on NA release from NA nerve terminal, induced by previous administration of α_2 -adrenoceptors agonists, prevent the ADs to exert their anxiolytic-like effect. When α_2 -adrenoceptor agonists were administered 15 min after the ADs, their action on α_2 -autoreceptors are ineffective.

The administration of α_2 -adrenoceptor agonists can activate the α_2 -heteroreceptors present on the terminal nerve of 5-HT neurons, that behave similarly to 5-HT_{1B} autoreceptors by attenuating the release of 5-HT directly inhibiting the effect of SSRIs and SNRIs. This hypothesis was support by the work of Bortolozzi and Artigas where these authors demonstrate, using microdialysis technique, that the 5-HT release is modulated by α_2 -adrenoceptors in NA neurons [11].

In agreement with the study of Schreiber et al. that demonstrated implication of 5-HT_{2A} receptor subtype in the anxiolytic-like effect of paroxetine [54], we have recently demonstrated an interaction between ADs and 5-HT₂ ligands in the FPT [46]. In this previous study, co-administrations of 5-HT₂ agonists with paroxetine and venlafaxine led to an increased effect in the FPT. DOI, a 5-HT_{2A} receptor agonist, increased the effect of both ADs. RO 60-0175, a 5-HT_{2C} receptor agonist, and BW 723C86, a 5-HT_{2B} receptor agonist, significantly potentiated the anxiolytic-like effect of paroxetine, but failed to alter the response of venlafaxine in FPT. The co-administration of 5-HT₂ antagonists blocked the anti-punishment effect of both drugs. SR 46349B (a 5-HT_{2A} receptor antagonist) blocked the anti-punishment effect of paroxetine and venlafaxine, while SB 206553 (a 5-HT_{2B} receptor antagonist) antagonized only

the anxiolytic-like effect of venlafaxine. RS 10-0175 (a 5-HT_{2C} receptor antagonist) failed to alter the effect of both ADs. These results indicated an implication of 5-HT_{2A/2B} receptors in mechanism of action of SSRI and SNRI in the FPT. SSRIs and SNRIs might indirectly or directly activate post-synaptic 5-HT₂ receptors, by enhancing serotonin release. A post-synaptic mechanism of α_2 -adrenoceptor agonists cannot be excluded. The activation of post-synaptic α_2 -adrenoceptor present on the same neurons that the 5-HT₂ receptors, in structures like hippocampus [65], might interfere with the anxiolytic-like effect of SSRIs and SNRIs in the FPT.

However, the modulating effect of α_2 -adrenoceptor agonists, including the clonidine and the guanabenz on SSRIs and SNRIs anxiolytic activity might also involve other neuronal systems. Several studies suggested that serotonin facilitates GABA release in cortex via 5-HT_{2A} receptors [1,21].

All hypotheses fit with a prior inactivation of 5-HT system by α_2 -adrenoceptor as no interaction was seen when α_2 -adrenoceptor agonists were administered after the ADs.

In conclusion, these results demonstrate that the administration of α_2 -adrenoceptor agonists can prevent the anxiolytic-like effects of ADs in the FPT. Further experiments are needed in order to further investigate the exact anatomic relation between α_2 -adrenoceptor and the anxiolytic-like effect of SSRIs and SNRIs in the FPT model in mice. The inter-regulation between α_2 -adrenoceptor and 5-HT₂ receptor needs to be evaluate by using drugs acting directly on 5-HT₂ receptors.

References

- [1] Abi-Saab WM, Bubser M, Roth RH, Deutch AY. 5-HT₂ receptor regulation of extracellular GABA levels in the prefrontal cortex. *Neuropsychopharmacology* 1999;20:92–6.
- [2] Adell A, Artigas F. Regulation of the release of 5-hydroxytryptamine in the median raphe nucleus of the rat by catecholaminergic afferents. *Eur J Neurosci* 1999;11:2305–11.
- [3] Allgulander C, Mangano R, Zhang J, Dahl AA, Lepola U, Sjodin I, et al. Efficacy of Venlafaxine ER in patients with social anxiety disorder: a double-blind, placebo-controlled, parallel-group comparison with paroxetine. *Hum Psychopharmacol* 2004;19:387–96.
- [4] Amargos-Bosch M, Adell A, Bortolozzi A, Artigas F. Stimulation of alpha1-adrenoceptors in the rat medial prefrontal cortex increases the local in vivo 5-hydroxytryptamine release: reversal by antipsychotic drugs. *J Neurochem* 2003;87:831–42.
- [5] Aron C, Simon P, Larousse C, Boissier JR. Evaluation of a rapid technique for detecting minor tranquilizers. *Neuropharmacology* 1971;10:459–69.
- [6] Bagdy G, Graf M, Anheuer ZE, Modos EA, Kantor S. Anxiety-like effects induced by acute fluoxetine, sertraline or m-CPP treatment are reversed by pretreatment with the 5-HT_{2C} receptor antagonist SB-242084 but not the 5-HT_{1A} receptor antagonist WAY-100635. *Int J Neuropsychopharmacol* 2001;4:399–408.
- [7] Bandoh T, Hayashi M, Ino K, Takada S, Ushizawa Z, Hoshi K. Acute effect of milnacipran on the relationship between the locus coeruleus noradrenergic and dorsal raphe serotonergic neuronal transmitters. *Eur Neuropsychopharmacol* 2004;14:471–8.
- [8] Belzung C, Berton F. Further pharmacological validation of the BALB/c neophobia in the free exploratory paradigm as an animal model of trait anxiety. *Behav Pharmacol* 1997;8:541–8.
- [9] Beyer CE, Boikess S, Luo B, Dawson LA. Comparison of the effects of antidepressants in norepinephrine and serotonin concentrations in the rat frontal cortex: an in-vivo microdialysis study. *J Psychopharmacol* 2002;16(4):297–304.
- [10] Boissier JR, Simon P. Action of caffeine on the spontaneous motility of the mouse. *Arch Int Pharmacodyn Ther* 1965;158:212–21.
- [11] Bortolozzi A, Artigas F. Control of 5-hydroxytryptamine release in the dorsal raphe nucleus by the noradrenergic system in rat brain. Role of α_2 -adrenoceptors. *Neuropsychopharmacol* 2003;28:421–34.
- [12] Borsini F, Podhorna J, Marazziti D. Do animal models of anxiety predict anxiolytic-like effects of antidepressants? *Psychopharmacology (Berlin)* 2002;163:121–41.
- [13] Bourin M, Colombel MC, Malinge M, Bradwejn J. Clonidine as a sensitizing agent in the forced swimming test for revealing antidepressant activity. *J Psychiatry Neurosci* 1991;16:199–203.
- [14] Bourin M, Hascoët M, Mansouri B, Colombel MC, Bradwejn J. Comparison of behavioral effects after single and repeated administrations of four benzodiazepines in three mice behavioral models. *J Psychiatry Neurosci* 1992;17:72–7.
- [15] Bourin M, Hascoët M, Colombel MC, Redrobe JP, Baker GB. Differential effects of clonidine, lithium and quinine in the forced swimming test in mice for antidepressants: possible roles of serotonergic systems. *Eur Neuropsychopharmacol* 1996;6:231–6.
- [16] Bourin M. Use of paroxetine for the treatment of depression and anxiety disorders in the elderly: A review. *Hum Psychopharmacol Clin Exp* 2003;18:185–90.
- [17] Bourin M, Massé F, Dailly E, Hascoët M. Mechanism of action of milnacipran in anxiety in the four-plate test in mice. *Pharmacol Biochem Behav* 2005;81:645–56.
- [18] Cecchi M, Khoshbouei H, Javors M, Morilak DA. Modulatory effects of norepinephrine in the lateral bed nucleus of the stria terminalis on behavioral and neuroendocrine responses to acute stress. *Neuroscience* 2002;112:13–21.
- [19] Clenet F, De Vos A, Bourin M. Involvement of 5-HT_{2C} receptors in the anti-immobility effects of antidepressants in the forced swimming test in mice. *Eur Neuropsychopharmacol* 2001;11:145–52.
- [20] Cole JC, Burroughs GJ, Laverty CR, Sheriff NC, Sparham EA, Rodgers RJ. Anxiolytic-like effects of yohimbine in the murine plus-maze: strain independence and evidence against α_2 -adrenoceptor mediation. *Psychopharmacology (Berlin)* 1995;118:425–36.
- [21] Cozzi NV, Nichols DE. 5-HT_{2A} receptor antagonists inhibit potassium-stimulated gamma-aminobutyric acid release in rat frontal cortex. *Eur J Pharmacol* 1996;309:25–31.
- [22] Cryan JF, O'Leary OF, Jin SH, Friedland JC, Ouyang M, Hirsch BR, et al. Norepinephrine-deficient mice lack responses to antidepressant drugs, including selective serotonin reuptake inhibitors. *Proc Natl Acad Sci USA* 2004;101:8186–91.
- [23] David DJ, Bourin M, Jego G, Przybylski C, Jolliet P, Gardier AM. Effects of acute treatment with paroxetine, citalopram and venlafaxine in vivo on noradrenaline and serotonin outflow: a microdialysis study in Swiss mice. *Br J Pharmacol* 2003;140:1128–36.
- [24] Dekeyne A, Denorme B, Monneyron S, Millan MJ. Citalopram reduces social interaction in rats by activation of serotonin 5-HT_{2C} receptors. *Neuropharmacology* 2000;39:1114–7.
- [25] Dennis T, L'Heureux R, Carter C, Scatton B. Presynaptic alpha-2 adrenoceptors play a major role in the effects of idazoxan on cortical noradrenaline release (as measured by in vivo dialysis) in the rat. *J Pharmacol Exp Ther* 1987;241:642–9.
- [26] Fish EW, Faccidomo S, Gupta S, Miczek KA. Anxiolytic-like effects of escitalopram, citalopram, and R-citalopram in maternally separated mouse pups. *J Pharmacol Exp Ther* 2004;308:474–80.
- [27] Fontana DJ, Schefke DM, Commissaris RL. Acute versus chronic clonidine treatment effects on conflict behavior in the rat. *Behav Pharmacol* 1989;1:201–8.

- [28] French N. Alpha 2-adrenoceptors and I2 sites in the mammalian central nervous system. *Pharmacol Ther* 1995;68:175–208.
- [29] Galvez R, Mesches MH, McGaugh JL. Norepinephrine release in the amygdala in response to footshock stimulation. *Neurobiol Learn Mem* 1996;66:253–7.
- [30] Griebel G, Moreau JL, Jenck F, Misslin R, Martin JR. Acute and chronic treatment with 5-HT reuptake inhibitors differentially modulate emotional responses in anxiety models in rodents. *Psychopharmacology (Berlin)* 1994;113:463–70.
- [31] Haddjeri N, Blier P, de Montigny C. Effect of the alpha-2 adrenoceptor antagonist mirtazapine on the 5-hydroxytryptamine system in the rat brain. *J Pharmacol Exp Ther* 1996;277:861–71.
- [32] Hajos-Korcsok E, McTavish SF, Sharp T. Effect of a selective 5-hydroxytryptamine reuptake inhibitor on brain extracellular noradrenaline: microdialysis studies using paroxetine. *Eur J Pharmacol* 2000;407:101–7.
- [33] Handley SL, Mithani S. Effects of alpha-adrenoceptor agonists and antagonists in a maze-exploration model of ‘fear’-motivated behaviour. *Naumyn Schmiedebergs Arch Pharmacol* 1984;327:1–5.
- [34] Hascoet M, Bourin M, Colombel MC, Fiocco AJ, Baker GB. Anxiolytic-like effects of antidepressants after acute administration in a four-plate test in mice. *Pharmacol Biochem Behav* 2000;65:339–44.
- [35] Hashimoto S, Inoue T, Koyama T. Serotonin reuptake inhibitors reduce conditioned fear stress-induced freezing behavior in rats. *Psychopharmacology (Berlin)* 1996;123:182–6.
- [36] Inoue T, Hashimoto S, Tsuchiya K, Izumi T, Ohmori T, Koyama T. Effect of citalopram, a selective serotonin reuptake inhibitor, on the acquisition of conditioned freezing. *Eur J Pharmacol* 1996;311:1–6.
- [37] La Marca S, Dunn RW. The alpha-2 antagonists idazoxan and rauwolfscine but not yohimbine or piperoxan are anxiolytic in the Vogel lick-shock conflict paradigm following intravenous administration. *Life Sci* 1994;54:PL179–84.
- [38] Lightowler S, Kennett GA, Williamson IJ, Blackburn TP, Tulloch IF. Anxiolytic-like effect of paroxetine in a rat social interaction test. *Pharmacol Biochem Behav* 1994;49:281–5.
- [39] Lopez-Rubalcava C, Fernandez-Guasti A. Noradrenaline-serotonin interactions in the anxiolytic effects of 5-HT_{1A} agonists. *Behav Pharmacol* 1994;5:42–51.
- [40] Malinge M, Bourin M, Colombel MC, Larousse C. Additive effects of clonidine and antidepressant drugs in the mouse forced-swimming test. *Psychopharmacology (Berlin)* 1988;96:104–9.
- [41] Mateo Y, Ruiz-Ortega JA, Pineda J, Ugedo L, Meana JJ. Inhibition of 5-hydroxytryptamine reuptake by the antidepressant citalopram in the locus coeruleus modulates the rat brain noradrenergic transmission in vivo. *Neuropharmacology* 2000;39:2036–43.
- [42] Matto V, Harro J, Allikmets L. The effects of cholecystokinin A and B receptor antagonists, devazepide and L 365260, on citalopram-induced decrease of exploratory behaviour in rat. *J Physiol Pharmacol* 1996;47:661–9.
- [43] Millan MJ. The neurobiology and control of anxious states. *Prog Neurobiol* 2003;70:83–244.
- [44] Millan MJ, Lejeune F, Gobert A, Brocco M, Auclair A, Bosc C, et al. S18616, a highly potent spiroimidazole agonist at alpha(2)-adrenoceptors. II. Influence on monoaminergic transmission, motor function, and anxiety in comparison with dexmedetomidine and clonidine. *J Pharmacol Exp Ther* 2000;295:1206–22.
- [45] Miyamoto J, Tsuji M, Takeda H, Ohzeki M, Nawa H, Matsumiya T. Characterization of the anxiolytic-like effects of fluvoxamine, milnacipran and risperidone in mice using the conditioned fear stress paradigm. *Eur J Pharmacol* 2004;504:97–103.
- [46] Nic Dhonnchadha BA, Ripoll N, Clenet F, Hascoet M, Bourin M. Implication of 5-HT₂ receptor subtypes in the mechanism of action of antidepressants in the four plates test. *Psychopharmacology (Berlin)* 2005;179:418–29.
- [47] Nutt D. Anxiety and depression: individual entities or two sides of same coin? *Int J Psychiatry Clin Pract* 2004;8:19–24.
- [48] Piacentini MF, Clinckers R, Meeusen R, Sarre S, Ebinger G, Michotte Y. Effects of venlafaxine on extracellular 5-HT, dopamine and noradrenaline in the hippocampus and on peripheral hormone concentrations in the rat in vivo. *Life Sci* 2003;73:2433–42.
- [49] Quirarte GL, Galvez R, Roozendaal B, McGaugh JL. Norepinephrine release in the amygdala in response to footshock and opioid peptidergic drugs. *Brain Res* 1998;808:134–40.
- [50] Redrobe JP, Bourin M. Effects of pretreatment with clonidine, lithium and quinine on the activities of antidepressant drugs in the mouse tail suspension test. *Fundam Clin Pharmacol* 1997;11:381–6.
- [51] Redrobe JP, Bourin M. Clonidine potentiates the effects of 5-HT_{1A}, 5-HT_{1B} and 5-HT_{2A/2C} antagonists and 8-OH-DPAT in the mouse forced swimming test. *Eur Neuropsychopharmacol* 1998;8:169–73.
- [52] Sajdyk TJ, Katner JS, Shekhar A. Monoamines in the dorsomedial hypothalamus of rats following exposure to different tests of ‘anxiety’. *Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry* 1997;21:193–209.
- [53] Sanchez C, Hyttel J. Comparison of the effects of antidepressants and their metabolites on reuptake of biogenic amines and on receptor binding. *Cell Mol Neurobiol* 1999;19:467–89.
- [54] Schreiber R, Melon C, De Vry J. The role of 5-HT receptor subtypes in the anxiolytic effects of selective serotonin reuptake inhibitors in the rat ultrasonic vocalization test. *Psychopharmacology (Berlin)* 1998;135:383–91.
- [55] Sevy S, Papadimitriou GN, Surmont DW, Goldman S, Mendlewicz J. Noradrenergic function in generalized anxiety disorder, major depressive disorder, and healthy subjects. *Biol Psychiatry* 1989;25:141–52.
- [56] Sheehan D, Dunbar GC, Fuell DL. The effect of paroxetine on anxiety and agitation associated with depression. *Psychopharmacol Bull* 1992;28:139–43.
- [57] Shishkina GT, Kalinina TS, Sourina NY, Dygalo NN. Effects of antisense to the (alpha)_{2A}-adrenoceptors administered into the region of the locus coeruleus on behaviors in plus-maze and sexual behavior tests in sham-operated and castrated male rats. *J Neurosci* 2001;21:726–31.
- [58] Shishkina GT, Kalinina TS, Sourina NY, Saharov DG, Kobzev VF, Dygalo NN. Effects of antisense oligodeoxynucleotide to the alpha_{2A}-adrenoceptors on the plasma corticosterone level and on elevated plus-maze behavior in rats. *Psychoneuroendocrinology* 2002;27:593–601.
- [59] Skrebuhova T, Allikmets L, Matto V. [3H]-ketanserin binding and elevated plus-maze behavior after chronic antidepressant treatment in DSP-4 and p-CPA pretreated rats: evidence for partial involvement of 5-HT receptors. *Meth Find Exp Clin Pharmacol* 1999;21:483–90.
- [60] Soderpalm A, Blomqvist O, Soderpalm B. The yohimbine-induced anticonflict effect in the rat. Part I. Involvement of noradrenergic, serotonergic and endozepinergic(?) mechanisms. *J Neural Transm Gen Sect* 1995;100:175–89.
- [61] Svensson TH, Bunney BS, Aghajanian GK. Inhibition of both noradrenergic and serotonergic neurons in brain by the alpha-adrenergic agonist clonidine. *Brain Res* 1975;92:291–306.
- [62] Tanaka T, Yokoo H, Mizoguchi K, Yoshida M, Tsuda A, Tanaka M. Noradrenaline release in the rat amygdala is increased by stress: studies with intracerebral microdialysis. *Brain Res* 1991;544:174–6.
- [63] Varia I, Rauscher F. Treatment of generalized anxiety disorder with citalopram. *Int Clin Psychopharmacol* 2002;17:103–7.
- [64] Venault P, Jacquot F, Save E, Sara S, Chapouthier G. Anxiogenic-like effects of yohimbine and idazoxan in two behavioral situations in mice. *Life Sci* 1993;52:639–45.
- [65] Vizi ES, Kiss JP. Neurochemistry and pharmacology of the major hippocampal transmitter systems: synaptic and nonsynaptic interactions. *Hippocampus* 1998;8:566–607.
- [66] Weikop P, Kehr J, Scheel-Kruger J. The role of alpha₁- and alpha₂-adrenoreceptors on venlafaxine-induced elevation of extra-

- cellular serotonin, noradrenaline and dopamine levels in the rat prefrontal cortex and hippocampus. *J Psychopharmacol* 2004;18:395–403.
- [67] Wright IK, Heaton M, Upton N, Marsden CA. Comparison of acute and chronic treatment of various serotonergic agents with those of diazepam and idazoxan in the rat elevated X-maze. *Psychopharmacology (Berlin)* 1992;107:405–14.
- [68] Zarrindast MR, Homayoun H, Babaie A, Etmiani A, Gharib B. Involvement of adrenergic and cholinergic systems in nicotine-induced anxiogenesis in mice. *Eur J Pharmacol* 2000;407:145–58.

3.2.2 DISCUSSION DE L'ETUDE 2

L'administration aiguë de clonidine et de guanabenz n'entraîne aucun changement du nombre de passages punis comparé au groupe contrôle où les souris n'ont reçu que de l'eau distillée. Pourtant la littérature rapporte des effets de type anxiolytique pour ces deux agonistes des récepteurs α_2 noradrénergiques dans certains modèles animaux d'anxiété tels que le test de conflit chez le rat, le labyrinthe en croix surélevé et le test d'enfouissement défensif chez la souris (Fontana et al. 1989; Handley et Mithani 1984; Lopez-Rubalcava et Fernandez-Guasti 1994; Millan et al. 2000).

Les résultats de notre étude montrent que l'administration des agonistes des récepteurs α_2 noradrénergiques 15 min après l'administration des antidépresseurs n'a aucun effet sur l'activité de type anxiolytique des ADs dans le FPT. A l'opposé, l'administration d'agonistes des récepteurs α_2 noradrénergiques (clonidine et guanabenz) 15 min avant l'administration des ADs (paroxétine, citalopram, milnacipran et venlafaxine), supprime l'augmentation du nombre de passages punis normalement induite par les ADs dans le FPT. Ces résultats prouvent la nécessité d'un blocage des récepteurs α_2 noradrénergiques préalablement à l'administration des ADs pour obtenir l'inhibition de leurs effets dans le FPT. Il faut donc que les agonistes des récepteurs α_2 noradrénergiques exercent d'abord leur effet. L'étude de l'effet de la co-administration des molécules sur l'activité locomotrice des souris montre que l'effet observé n'est pas corrélé à une diminution de l'activité locomotrice.

Ces résultats montrent que l'implication des récepteurs α_2 noradrénergiques est importante dans le mécanisme d'action des ADs dans le FPT. Les récepteurs α_2 noradrénergiques peuvent agir de trois façons différentes selon leur localisation. Certains ADs augmentent la concentration synaptique de NA par le blocage du transporteur spécifique de la NA (Beyer et al. 2002; David et al. 2003; Piacentini et al. 2003). Les récepteurs α_2 noradrénergiques agissent sur les neurones noradrénergiques issus du locus coeruleus grâce à leur présence au niveau des terminaisons axonales et inhibent la libération de NA de ces neurones (Dennis et al. 1987). Les effets des IRSSs et IRSNs sur la libération de 5-HT dans de nombreuses structures cérébrales ont également été très étudiés et montrent que ces molécules augmentent la libération synaptique de 5-HT (Bandoh et al. 2004; Beyer et al. 2002; Dazzi et al. 2005; Piacentini et al. 2003). Les agonistes α_2 noradrénergiques peuvent activer les récepteurs α_2 noradrénergiques présents au niveau des terminaisons axonales des neurones 5-HT qui

agissent comme les récepteurs 5-HT_{1B} en diminuant la libération de 5-HT (Bortolozzi et Artigas 2003). Ces effets auraient donc pour conséquence d'inhiber la libération de 5-HT et/ou de NA, ce qui empêcherait l'effet de type anxiolytique des ADs de s'exprimer puisque l'étude précédente démontrait que l'intégrité des deux systèmes semble être obligatoire pour garder l'effet des ADs dans le FPT.

Une troisième hypothèse peut être suggérée. Une précédente étude a démontré l'implication des récepteurs 5-HT₂ dans les mécanismes neurobiologiques qui induisent l'effet des ADs dans le FPT. Il semble que des récepteurs α_2 noradrénergiques et 5-HT₂ soient co-localisés sur certains types de neurones dans différentes structures (ex: hippocampe) (Vizi et Kiss 1998). L'activation des récepteurs α_2 noradrénergiques peut inhiber les effets des récepteurs 5-HT₂ au niveau post-synaptique.

Cette étude nous prouve que les récepteurs α_2 noradrénergiques interviennent dans le mécanisme d'action des ADs dans le FPT. Malheureusement cette étude ne nous permet pas de définir précisément la localisation des récepteurs impliqués dans cet effet.

3.3 Etude 3 :

Etude du système noradrénergique sur l'effet de type anxiolytique du DOI (un agoniste des récepteurs 5-HT_{2A/2C}) dans le FPT.

3.3.1 **Etude 3a** :

Effect of noradrenergic system on the anxiolytic-like effect of DOI (5-HT_{2A/2C} agonists) in the four-plate test. Massé Fabienne, Hascoët Martine, Dailly Eric, Bourin Michel. Psychopharmacol. 2006, 183:p. 471-281;

3.3.1.1 OBJECTIF DE L'ETUDE 3a

Différentes études menées dans le laboratoire ont montré une forte implication des récepteurs 5-HT₂ dans les modèles d'anxiété utilisés (FPT et EPM). Dans le FPT, l'administration aiguë de DOI (un agoniste des récepteurs 5-HT_{2A/2C}) et de BW723C86 (un agoniste des récepteurs 5-HT_{2B}) entraîne une augmentation du nombre de passages punis reçus par les souris (Nic Dhonnchadha et al. 2003a). L'effet de DOI semble médié par les récepteurs 5-HT_{2A} car le SR46349B (un antagoniste des récepteurs 5-HT_{2A}) inhibe l'effet du DOI alors que ni le RS 10-2221 (un antagoniste sélectif des récepteurs 5-HT_{2C}) ni le SB206553 (un antagoniste des récepteurs 5-HT_{2B}) ne modifie cet effet (Nic Dhonnchadha et al. 2003b). De plus, les récepteurs 5-HT₂ semblent également être impliqués dans le mécanisme neurobiologique induisant un effet de type anxiolytique de la paroxétine et de la venlafaxine observé dans le FPT. Le DOI potentialise l'effet anti-punition de la paroxétine et de la venlafaxine alors que le SR46349B inhibe cet effet (Nic Dhonnchadha et al. 2005).

Le système NA est également impliqué dans les mécanismes neurobiologiques de l'anxiété. De nombreuses études comportementales menées chez le rat et la souris ont montré des effets très controversés concernant les ligands α noradrénergiques (Cecchi et al. 2002a; Cecchi et al. 2002b; de Angelis 1995; Handley et Mithani 1984; Johnston et File 1989; Morrow et al. 2004). La déplétion du système 5-HT et la lésion des neurones NA issus du locus coeruleus inhibent l'effet des ADs dans le FPT. De plus, la co-administration d'agonistes des récepteurs α_2 noradrénergiques avec les ADs inhibe également leurs effets dans le même test (Masse et al. 2005). Une balance entre les systèmes 5-HT et NA semble être essentielle pour obtenir une activité de type anxiolytique dans le FPT.

Dans cette étude, nous avons observé l'effet du DOI après une déplétion du système 5-HT et une lésion des neurones NA issus du locus coeruleus par administration de *p*-CPA et de DSP-4 respectivement. Afin de vérifier l'effet du DSP-4 et du *p*-CPA, les concentrations de dopamine (DA), NA et 5-HT sont dosées dans quatre structures cérébrales (l'hypothalamus, l'hippocampe, le striatum et le cortex).

Puis nous avons co-administré des ligands du système NA (i.p. 45 min avant le test) avec le DOI (i.p. 30 min avant le test). Les ligands du système NA utilisés dans cette étude sont la clonidine et le guanabenz (deux agonistes des récepteurs α_2 noradrénergiques), la guanfacine (un agoniste spécifique des récepteurs α_{2A} noradrénergiques), l'idazoxan (un antagoniste des récepteurs α_2 noradrénergiques), l'adrafnil (un agoniste des récepteurs α_1 noradrénergiques)

et la prazosine (un antagoniste des récepteurs α_1 noradrénergiques). Les doses des ligands du système NA ont été déterminées au préalable pour que les doses utilisées dans cette étude n'aient aucun effet dans le FPT. En parallèle, l'étude de l'effet des molécules sur l'activité locomotrice est réalisée afin de vérifier que l'administration de ces molécules n'entraîne pas d'effet trop sédatif ou trop psychostimulant aux doses utilisées dans le FPT.

Fabienne Massé · Martine Hascoët ·
Eric Dailly · Michel Bourin

Effect of noradrenergic system on the anxiolytic-like effect of DOI (5-HT_{2A/2C} agonists) in the four-plate test

Received: 17 June 2005 / Accepted: 21 September 2005 / Published online: 24 November 2005
© Springer-Verlag 2005

Abstract *Rationale:* Selective serotonin reuptake inhibitors and serotonin and noradrenaline reuptake inhibitors demonstrated an anxiolytic-like effect in the four-plate test (FPT). (+/-)-1-(2,5-Dimethoxy-4-iodophenyl)-2-aminopropane (DOI; a 5-HT_{2A} receptor agonist) also possessed strong anxiolytic-like effect in the same test. A 5-HT_{2A} mechanism seems to be implicated in the mechanism of action of both antidepressants and DOI in this test. On the other hand, the α -adrenergic ligands have also demonstrated an activity in other models of anxiety. A previous study demonstrated that the α_2 -adrenoceptor agonists abolished the anxiolytic-like effect of antidepressants. *Objectives:* The aim of the present study was to evaluate the role of noradrenergic system on the regulation of 5-HT₂ receptors implicated in the DOI anxiolytic-like activity in the FPT. *Methods:* First, the effect of noradrenergic and serotonergic lesions on DOI anxiolytic-like activity was studied in the FPT. Second, the effect of co-administration of α -adrenoceptor ligands and DOI was evaluated in the same test. *Results:* The noradrenergic and serotonergic lesions had no effect on DOI (1 mg/kg) anti-punishment activity in the FPT. Adrafinil 0.25 and 4 mg/kg (an α_1 -adrenoceptor agonist), prazosin 0.5 and 2 mg/kg (an α_1 -adrenoceptor antagonist) and idazoxan 1 and 4 mg/kg (an α_2 -adrenoceptor antagonist) did not modify the activity of DOI. Clonidine 0.06 mg/kg, guanabenz 0.125 and 0.5 mg/kg (two α_2 -adrenoceptor agonists) and guanfacine 0.06 and 0.125 mg/kg (a specific α_{2A} -adrenoceptor agonist) completely abolished DOI-induced increase in punished passages. *Conclusion:* These results indicate that the DOI seems to act on the 5-HT₂ receptors post-synaptically located. The effect of DOI is regulated by the α_2 -adrenoceptors.

Keywords Four-plate test · Mice · DOI · α_2 -Adrenoceptors · 5-HT₂ receptors

Introduction

The most likely therapeutic alternatives for benzodiazepines seem to be drugs that act directly on the serotonergic system. Pharmacological studies have implicated 5-HT₂ receptors in the mechanism of anxiety induced by different behavioural models of anxiety in mice and rat (Graeff et al. 1998; Onaivi et al. 1995; Rodgers et al. 1995; Schreiber et al. 1998; Scorza et al. 1996). In our laboratory, a previous study has demonstrated the anxiolytic-like effect of (+/-)-1-(2,5-dimethoxy-4-iodophenyl)-2-aminopropane (DOI; a 5-HT_{2A/2C} agonist) in two models of anxiety in mice: the elevated plus maze (EPM) and the four-plate test (FPT) (Nic Dhonnchadha et al. 2003a). Moreover, a complementary study has demonstrated that the selective 5-HT_{2A} receptor antagonist SR 46949B but not the selective 5-HT_{2C} receptor antagonist RS 10-2221 nor the selective 5-HT_{2B/2C} receptor antagonist SB 206553 antagonised the anxiolytic-like effect of DOI in the FPT and the EPM. The anxiolytic-like effect of DOI in the FPT seems to be so mediated through 5-HT_{2A} receptors (Nic Dhonnchadha et al. 2003b).

On the other hand, the perturbation of noradrenergic neurotransmission has also been implicated in the pathophysiology of anxiety disorders (Brunello et al. 2003; Silverstone 2004). The effects of α -adrenergic ligands had been extensively studied in animal models of anxiety. Cecchi et al. (2002a) observed that an α_1 -adrenoceptor antagonist (benoxathian), injected in the lateral bed nucleus of stria terminalis, reduced the effect of stress immobilization on the open-arm exploration of rat in the EPM. These results are in agreement with another study of the same researchers that demonstrated that benoxathian, injected bilaterally into the central nucleus of the amygdala in rat, blocked the reduction in social interaction time induced by immobilization stress (Cecchi et al. 2002b).

F. Massé · M. Hascoët ·
E. Dailly · M. Bourin (✉)
EA 3256, Neurobiologie de l'anxiété et de la dépression,
Faculté de Médecine,
BP 53508, 1 rue Gaston Veil,
44035 Nantes cedex 01, France
e-mail: michel.bourin@univ-nantes.fr
Tel.: +33-2-40412852
Fax: +33-2-40412856

... was conducted in parallel to avoid the use of psychostimulant doses. ... cage in order to reduce any neophobic response to the test-room environment.

on average
these animals
of 1 week
(20°C) and a
0 and 1900
: Mice were
located ran-
All experi-
ethical rules
iments with

ma, France)
[2-[(2,6-di-
rochloride]
lichloroben-
is, France),
lichloroben-

oxan hydro-
-2-imidazo-

énylméthyl)
ance)
chloride [1-
-(2-furanyl-
s, France)
oro-1-meth-
-one]]

oro-DL-phe-
BI, Sigma-

N-(2-chloro-
rochloride]

0 hours. All
e were kept
er injection
their hold-

Table 1 Effects of DSP-4 and p-CPA on the NA concentrations

| | Residual percentage | | | |
|----------|----------------------------|---------------------------|------------------------|----------------------|
| | Hypothalamus (ng/g±SEM) | Hippocampus (ng/g±SEM) | Striatum (ng/g±SEM) | Cortex (ng/g±SEM) |
| Controls | 2,598±117 | 409±23 | 308±37 | 331±20 |
| DSP-4 | 1,829±186 | 187±42 | 198±38 | 178±33 |
| | 70.6 p<0.05 | 45.7 p<0.05 | 64.1 p<0.05 | 53.8 p<0.05 |
| Controls | 2,648±118 | 318±34 | 191±27 | 402±13 |
| p-CPA | 2,343±283 | 246±26 | 169±42 | 401±34 |
| | 88.5 NS | 77.5 NS | 88.4 NS | 99.8 NS |

Results are expressed as means of NA concentrations nanogram per gram tissue±SEM. A Student's *t* test was used for statistical analysis between diazepam group and control group
NS Non-significant

Lesion of serotonergic system was carried out using p-CPA (300 mg/kg), administered i.p. 72, 48 and 24 h before the test (Artaiz et al. 1998; Dailly et al. 2005; Dursun and Handley 1993). DOI was administered 30 min before testing. Lesion of noradrenergic system was achieved using DSP-4 (50 mg/kg), administered i.p. 7 days before the test (Dailly et al. 2005; Yu et al. 1994). DOI was administered 30 min before testing. The extent of depletion was determined using high-performance liquid chromatography (HPLC) method by comparing concentration of noradrenaline (NA), serotonin (5-HT) and dopamine (DA) in control depleted group ($n=10$) and control non-depleted group ($n=10$).

All doses of noradrenergic ligands utilised in this study had no effect per se on the number of punished passages of mice in the FPT (results not shown). DOI (5-HT_{2A/2C} agonist) was utilised at two sub-active doses (0.06 and 0.125 mg/kg) or two active doses (1 and 2 mg/kg) in the FPT.

Psychopharmacological tests

Actimeter test (Boissier and Simon 1965)

The spontaneous activity of naive animals was recorded using a photoelectric actimeter (OSYS). This apparatus consists of transparent cages from which the animal's activity is measured by light beams connected to a photoelectric cell. The total number of horizontal cage crossings was recorded over a period of 10 min. The actimeter test was performed independently of FPT in order to examine the effect of drugs on spontaneous locomotor activity of mice.

Table 2 Effects of DSP-4 and p-CPA on the serotonin concentrations

| | Residual percentage | | | |
|----------|----------------------------|---------------------------|------------------------|----------------------|
| | Hypothalamus (ng/g±SEM) | Hippocampus (ng/g±SEM) | Striatum (ng/g±SEM) | Cortex (ng/g±SEM) |
| Controls | 1,028±62 | 599±33 | 549±31 | 500±30 |
| DSP-4 | 1,058±63 | 460±32 | 491±33 | 483±38% |
| | 102.9 NS | 76.7 p<0.05 | 89.5 NS | 96.6 NS |
| Controls | 979±54 | 349±50 | 483±63 | 483±18 |
| p-CPA | 107±44 | 44±13 | 197±23 | 88±17 |
| | 11 p<0.05 | 12.7 p<0.05 | 40.7 p<0.05 | 18.1 p<0.05 |

Results are expressed as means of serotonin concentrations nanogram per gram tissue±SEM. A Student's *t* test was used for statistical analysis between diazepam group and control group
NS Non-significant

Four-plate test (FPT) (Aron et al. 1971)

This apparatus (Bioseb, Chaville, France) consist of a cage (25×18×16 cm) floored by four identical rectangular plates (11×8 cm) separated from one another by a gap of 4 mm. The plates are connected to a device that can generate electric foot shocks (0.6 mA; 0.5 s). Following a 15-s habituation period, the animal is subjected to an electric shock when crossing (transition) from one plate to another, i.e. two legs on one plate and two legs on another. The number of punished crossings is calculated for a period of 60 s. An anxiolytic substance is capable of augmenting the number of punished passages.

Neurochemical assays

The method is adapted from the assay described by (Baker et al. 1987). Briefly, mice were killed by cervical dislocation without anaesthesia. The brain was rapidly removed from the cranium and dissected on a cooled aluminium apparatus. The brain sections (cortex, striatum, hippocampus, hypothalamus) were weighed and disrupted by sonication in 600 µl of an acid solution (8.8 mg of ascorbic acid and 122 mg of EDTA in 1,000 ml of perchloric acid 0.1 M). After sonication, the solution was centrifuged at 12,000×g for 10 min at +4°C. The supernatant was stored at -80°C before use. The concentrations of NA, 5-HT and DA were measured in the supernatant by HPLC with electrochemical detection [Decade amperometric detector (Leiden, the Netherlands) with an electrochemical Antec Leyden model VT-03 Flow cell (Zolterwoude, the Netherlands)]. The chromatographic conditions were (1) a C18 column (Nu-

SEM)
4
3
IS
7
5
NS

Sidak's test
treatment on
internal stan-
the control
studies, the
is compared
p-CPA or
a Student's
SS program

NA concen-
29% in the
>0.05) and
nificant de-
uctures fol-

e in 5-HT
(0.05). p-CPA



Treatment

Table 4 Effect of α_2 -adrenoceptor ligands, i.p. 45 min before the test and (b) 1

DOI, i.p. 30 min before the test [$F_{(1,36)}=0.552$; $p=0.462$]. Diazepam (1 mg/kg), used as positive control, significantly increased the number of shocks accepted by mice ($p<0.001$) (Fig. 1).

a. α_2 -Adrenoceptor

Vehicle
 Clonidine 0.03 Behavioural effects of DOI and noradrenergic ligands on locomotor activity of mice in the actimeter test
 Clonidine 0.06
 Vehicle
 Clonidine 0.03 There was no effect of adrafinil (0.25 and 4 mg/kg), idazoxan (1 and 4 mg/kg), guanfacine (0.06 mg/kg), guanabenz (0.125 mg/kg) and clonidine (0.03 mg/kg) on the spontaneous locomotor activity when administered alone.
 Clonidine 0.03 However, the administration of guanabenz (0.5 mg/kg), guanfacine (0.125 mg/kg), clonidine (0.06 mg/kg) and prazosin (0.5 and 2 mg/kg) reduced locomotor activity.
 Clonidine 0.06 The co-administration of clonidine (0.03 and 0.06 mg/kg), guanabenz (0.125 and 0.5 mg/kg) and guanfacine (0.06 and 0.125 mg/kg) with DOI (1 mg/kg) did not alter the locomotor activity of mice in the actimeter test after a post-hoc analysis ($p>0.05$) ($[F_{(5,54)}=5.653$; $p<0.001$], $[F_{(5,54)}=5.593$; $p<0.001$] and $[F_{(5,54)}=3.525$; $p=0.008$], respectively). The same results were obtained when clonidine, guanabenz and guanfacine were co-administered with DOI (2 mg/kg) after a post-hoc analysis ($p>0.05$) ($[F_{(5,54)}=7.230$; $p<0.001$], $[F_{(8,81)}=4.764$; $p=0.001$] and $[F_{(5,54)}=2.461$; $p=0.046$], respectively). The co-administration of idazoxan (1 and 2 mg/kg) with DOI (0.06 and 0.125 mg/kg) did not modify the locomotor activity of mice after a post-hoc analysis ($p>0.05$) ($[F_{(8,81)}=1.696$; $p=0.112$]. The co-administration of prazosin (0.5 and 2 mg/kg) and adrafinil (0.25 and 4 mg/kg) with DOI (1 mg/kg) did not modify the locomotor activity of mice after a post-hoc analysis ($p>0.05$) ($[F_{(5,54)}=6.665$; $p<0.001$] and $[F_{(5,54)}=1.620$; $p=0.170$], respectively). The same results were obtained when prazosin or adrafinil were co-administered with DOI (0.125 mg/kg) after a post-hoc analysis ($p>0.05$) ($[F_{(5,54)}=7.929$; $p<0.001$] and $[F_{(5,54)}=0.752$; $p=0.588$], respectively) (Table 4a,b).

b. Noradrenergic

Vehicle Behavioural effects of noradrenergic ligands on the anti-punishment action of DOI in the FPT
 Idazoxan 1
 Idazoxan 4 *Acute administration of adrafinil and DOI*
 Vehicle
 Vehicle DOI (1 mg/kg) increased the number of punishments accepted by mice in the FPT [$F_{(2,81)}=22.383$; $p<0.001$] in comparison with the control group after a post-hoc analysis ($p=0.002$). DOI (0.125 mg/kg) and adrafinil (0.25 and 4 mg/kg) did not modify the number of punished passages in this test after a post-hoc analysis ($p>0.05$) ($[F_{(2,81)}=89.081$; $p<0.001$] and $[F_{(2,81)}=0.681$; $p=0.509$], respectively). There was no interaction between two treatments [$F_{(4,81)}=1.211$; $p=0.313$]. The positive control diazepam (1 mg/kg) increased the number of punished passages ($p<0.001$ by Student's *t* test) (Table 5).

Acute administration of prazosin and DOI

DOI (1 mg/kg) increased the number of punishments accepted by mice in the FPT [$F_{(2,81)}=89.081$; $p<0.001$] in comparison with the control group after a post-hoc analysis ($p<0.001$). DOI (0.125 mg/kg) and prazosin (0.5 and 2 mg/kg) did not modify the number of punished passages in this test after a post-hoc analysis ($p>0.05$) ($[F_{(2,81)}=89.081$; $p<0.001$] and $[F_{(2,81)}=0.201$; $p=0.818$], respectively). There was no interaction between the two treatments [$F_{(4,81)}=2.365$; $p=0.06$]. The positive control diazepam (1 mg/kg) increased the number of punished passages ($p<0.001$ by Student's *t* test) (Table 5).

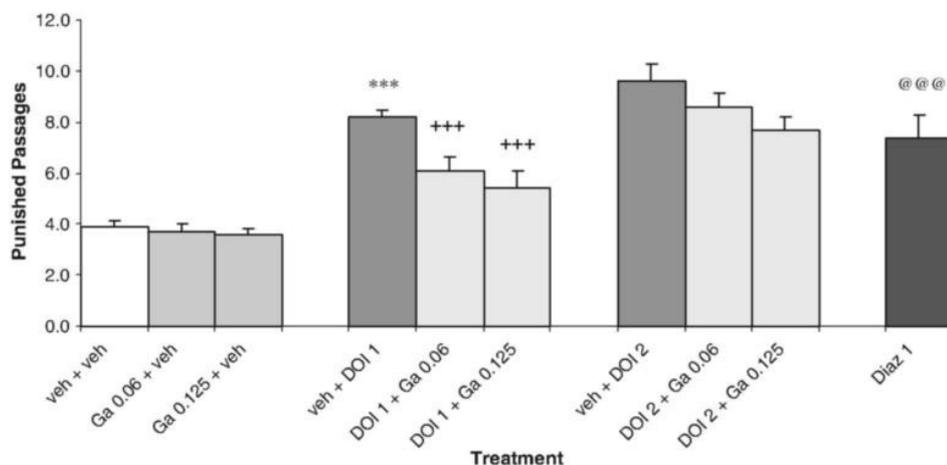
Table 5 Effects of co-administration of DOI, i.p. 30 min before the test, and α -adrenoceptor ligands, i.p. 45 min before the test in the FPT on the number of punishments accepted by mice in the FPT

| Pretreatment (mg/kg) | Treatment (mg/kg) | Number of punished passages |
|----------------------|-------------------|------------------------------|
| Vehicle | Vehicle | 4.2±0.1 |
| Idazoxan 1 | Vehicle | 3.80±0.2 |
| Idazoxan 4 | Vehicle | 3.90±0.2 |
| Vehicle | DOI 0.06 | 4.7±0.2 |
| Vehicle | DOI 0.125 | 5.1±0.2 |
| Idazoxan 1 | DOI 0.06 | 4.8±0.2 |
| Idazoxan 4 | DOI 0.06 | 4.20±0.2 |
| Idazoxan 1 | DOI 0.125 | 4.60±0.2 |
| Idazoxan 4 | DOI 0.125 | 4.70±0.3 |
| Vehicle | Diazepam 1 | 7.8±0.4 ^{(@)(@)(@)} |
| Vehicle | Vehicle | 5±0.4 |
| Adrafinil 0.25 | Vehicle | 5.4±0.2 |
| Adrafinil 4 | Vehicle | 5±0.3 |
| Vehicle | DOI 0.125 | 6±0.3 |
| Vehicle | DOI 1 | 7.5±0.5** |
| Adrafinil 0.25 | DOI 0.125 | 6.6±0.5 |
| Adrafinil 4 | DOI 0.125 | 5.3±0.4 |
| Adrafinil 0.25 | DOI 1 | 7.1±0.5* |
| Adrafinil 4 | DOI 1 | 7.6±0.5*** |
| Vehicle | Diazepam 1 | 9.2±0.7 ^{(@)(@)(@)} |
| Vehicle | Vehicle | 3.9±0.2 |
| Prazosin 0.5 | Vehicle | 4.1±0.3 |
| Prazosin 2 | Vehicle | 4.5±0.3 |
| Vehicle | DOI 0.125 | 5.4±0.4 |
| Vehicle | DOI 1 | 9±0.3*** |
| Prazosin 0.5 | DOI 0.125 | 5.9±0.3* |
| Prazosin 2 | DOI 0.125 | 5.6±0.3 |
| Prazosin 0.5 | DOI 1 | 7.8±0.6*** |
| Prazosin 2 | DOI 1 | 7.7±0.4*** |
| Vehicle | Diazepam 1 | 6.3±0.7 ^{(@)(@)(@)} |

The data are cited as means±SEM ($n=10$). Statistical analysis was performed by two-way ANOVA followed by a Sidak test (** $p<0.001$, ** $p<0.01$ and * $p<0.05$, vs control group). A student's *t* test was used for statistical analysis between diazepam group and control group (^{(@)(@)(@)} $p<0.001$)

Fig. 2 Effects of acute administration of clonidine (0.06 mg/kg), i.p. 30 min before the test, and DOI (1 and 2 mg/kg), i.p. 30 min before the test, on the number of punished passages accepted by mice in the FPT. The data are cited as means \pm SEM ($n=10$). Statistical analysis was performed by a two-way ANOVA followed by Sidak test (** $p<0.001$ vs control group and *** $p<0.001$ vs vehicle + DOI group). A Student's t test was used for statistical analysis between the diazepam group and control group (** $p<0.001$).

Fig. 4 Effects of acute administration of guanfacine (0.06 and 0.125 mg/kg), i.p. 45 min before the test, and DOI (1 and 2 mg/kg), i.p. 30 min before the test, on the number of punished passages accepted by mice in the FPT. The data are cited as means \pm SEM ($n=10$). Statistical analysis was performed by a two-way ANOVA followed by Sidak test (** $p<0.001$ vs control group and *** $p<0.001$ vs vehicle + DOI group). A Student's t test was used for statistical analysis between the diazepam group and control group (** $p<0.001$).



Acute administration

DOI (1 and 2 mg/kg) had no effect on the DOI (2 mg/kg) ($p>0.05$). The positive control diazepam (1 mg/kg) increased the number of punished passages ($p<0.001$ by Student's t test) (Fig. 4).

interaction between clonidine (0.06 mg/kg) and DOI (0.06 and 0.125 mg/kg) [$F_{(2,81)}=12.905$; $p<0.001$] and idazoxan (1 and 4 mg/kg) [$F_{(2,81)}=2.897$; $p=0.061$] did not modify the number of punished passages accepted by mice in the FPT after a post-hoc analysis ($p>0.05$). There was no interaction between the two treatments [$F_{(4,81)}=1.073$; $p>0.375$]. The positive control diazepam (1 mg/kg) increased the number of punished passages ($p<0.001$ by Student's t test) (Table 5).

Acute administration of idazoxan and DOI

Acute administration

Discussion

DOI (1 and 2 mg/kg) had no effect on the DOI (2 mg/kg) ($p>0.05$). The positive control diazepam (1 mg/kg) increased the number of punished passages ($p<0.001$ by Student's t test) (Fig. 4).

Fig. 3 Effects of acute administration of guanfacine (0.06 and 0.125 mg/kg), i.p. 45 min before the test, and DOI (1 and 2 mg/kg), i.p. 30 min before the test, on the number of punished passages accepted by mice in the FPT. The data are cited as means \pm SEM ($n=10$). Statistical analysis was performed by a two-way ANOVA followed by Sidak test (** $p<0.001$ vs control group and *** $p<0.001$ vs vehicle + DOI group). A Student's t test was used for statistical analysis between the diazepam group and control group (** $p<0.001$).

DOI (a 5-HT_{2A/2C} agonist) possessed strong anxiolytic-like effect in the FPT for doses of 0.5 to 4 mg/kg. Moreover, 5-HT_{2A} receptors are predominantly involved in the anxiety-reducing effects of DOI in the FPT as the anti-punishment action of DOI was abolished by prior treatment with the selective 5-HT_{2A} receptor antagonist SR 46949B but not by the selective 5-HT_{2C} receptor antagonist RS 10-2221 nor by the selective 5-HT_{2B/2C} receptor antagonist SB 206553 (Nidhanna et al. 2003b). Whether the anxiolytic-like effect of DOI is due to direct effect on serotonin or on other systems via 5-HT_{2A} receptors remains to be elucidated. The presence of 5-HT_{2A} receptors in different structures of the brain (e.g. cortex, hippocampus and hypothalamus) has already been demonstrated (Hamada et al. 1998; Miner et al. 2003; Pazos et al. 1985; Xu and Pandey 2000). Many studies had demonstrated that the systemic administration of 5-HT₂ receptor agonist decrease the firing rate of noradrenergic neurons in locus coeruleus but that local administration had no effect (Done and Sharp 1992; Gorea and Adrien 1988; Rasmussen and Aghajanian 1986).

Haddjeri et al. (1997) observed a suppressant effect of the 5-HT_{1A} receptor antagonist WAY 100635 on the spontaneous firing activity of locus coeruleus noradrenergic neurons. The authors observed that the selective 5-HT₂ receptor antagonist ritanserin prevented the suppressive effect of WAY 100635. A post-synaptic 5-HT_{2A} receptor appeared to mediate this effect of WAY 100635 on noradrenergic neurons. However, Chiang and Aston-Jones (1993) demonstrated that the inhibitory effect of a systemic administration of 5-HT₂ agonist DOI on the locus coeruleus discharge is indirect. The administration of DOI cause tonic activation of a GABAergic input to the locus coeruleus (Chiang and Aston-Jones 1993). The number of 5-HT₂ receptors in the raphe is very weak (Lopez-Gimenez et al. 2001), but a 5-HT₂ receptor agonist is able to stimulate the 5-HT release by an activation of 5-HT₂ receptors present on the cortical pyramidal neurons projecting to the dorsal raphe nucleus (Bortolozzi et al. 2003; Marek and Aghajanian 1999).

In order to understand the role of 5-HT₂ receptors in the decrease in the anxiety-like effect in the FPT, a lesion of noradrenergic and serotonergic system had been induced by systemic administration of DSP-4 and p-CPA. DSP-4 significantly induced a decrease in the NA concentration in the four studied structures, with the more important decrease in the cortex and hippocampus of mice. Precedent studies have demonstrated that the DSP-4 destroys noradrenergic axon terminals from the locus coeruleus but not those from non-locus coeruleus neurons (Fritschy and Grzanna 1989; 1991). The cortex and the hippocampus are two structures rich in noradrenergic axon terminals from the locus coeruleus. However, the striatum and the hypothalamus possess very few noradrenergic axon terminals from the locus coeruleus. In these structures, we observed a decrease in 29 and 36% of the NA concentration in the hypothalamus and the striatum, respectively, that agree with many studies that demonstrated a weak decrease in the NA concentration in these structures (Cryan et al. 2002; Dailly et al. 2005; Prieto and Giralt 2001). A weak decrease in the 5-HT concentration was observed in the hippocampus after

administration of DSP-4. The DA concentration was not modified in the hypothalamus (Bhana et al. 2000; Stine et al. 2002). In the FPT, the α_2 -adrenoceptor antagonist mianserin (1 mg/kg) did not affect the release of 5-HT (Bhana et al. 1987). However, the α_2 -adrenoceptors are also present in the striatum (59% in the serotonergic neurons and exert an inhibitory effect on 5-HT release (Adell and Artigas 1999; Haddjeri et al. 1996; Numazawa et al. 1995). The α_2 -adrenoceptors are also demonstrated expressed and act on the dopaminergic and GABAergic neurons (39–54%) in the striatum (Cathala et al. 2002). Moreover, the noradrenergic neurons did not seem to be used by DOI implicated in for the anxiolytic-like effect. Then, the present study suggests that the activation of α_2 -adrenoceptors interferes with the effect of DOI, as was already hypothesized for the antidepressants' mechanism of action (Massé et al. 2005).

A regulation of α_2 -adrenoceptor on the 5-HT_{2A} receptors has already been demonstrated in the head-twitch behaviour induced by 5-MeO-DMT, a 5-HT₂ agonist. Indeed, this effect was suppressed by a pretreatment with ketanserin or clonidine. Moreover, the selective α_2 -adrenoceptor antagonist yohimbine prevents the effect of ketanserin and clonidine. The α_2 -adrenoceptor effect on the 5-HT₂-induced head-twitch behaviour has been suggested to be mediated by post-synaptic site of central noradrenergic nerve terminals (Matsumoto et al. 1997).

All these results suggested an implication of 5-HT₂ receptors and α_2 -adrenoceptor in the anxiety-like state induced by the FPT, but the localization of these implicated receptors is still unknown.

pram) and two

References

The next step is to study the role of α_2 -adrenoceptors in the anxiety-like effect of DSP-4. The α_1 -adrenoceptor antagonist prazosin (1 mg/kg) was administered and the results demonstrated that it did not affect the release of 5-HT (Bhana et al. 2000), but an α_1 -adrenoceptor antagonist including EP 37564 (1 mg/kg) did not affect the release of 5-HT (Bhana et al. 2003). The administration of 1 mg/kg of prazosin did not affect the release of 5-HT (Bhana et al. 2003). This increase in 5-HT release (Bortolozzi et al. 1998) is due to the activation of α_1 -adrenoceptors (Bourin et al. 1992). The activity of the α_2 -adrenoceptor antagonist mianserin (1 mg/kg) did not affect the release of 5-HT (Bhana et al. 1987). However, the α_2 -adrenoceptors are also present in the striatum (59% in the serotonergic neurons and exert an inhibitory effect on 5-HT release (Adell and Artigas 1999; Haddjeri et al. 1996; Numazawa et al. 1995). The α_2 -adrenoceptors are also demonstrated expressed and act on the dopaminergic and GABAergic neurons (39–54%) in the striatum (Cathala et al. 2002). Moreover, the noradrenergic neurons did not seem to be used by DOI implicated in for the anxiolytic-like effect. Then, the present study suggests that the activation of α_2 -adrenoceptors interferes with the effect of DOI, as was already hypothesized for the antidepressants' mechanism of action (Massé et al. 2005).

- Brunello N, Blier P, Judd LL, Mendlewicz J, Nelson CJ, Souery D, Zohar J, Racagni G (2003) Noradrenaline in mood and anxiety disorders: basic and clinical studies. *Int Clin Psychopharmacol* 18:191–202
- Cathala L, Guyon A, Eugene D, Paupardin-Tritsch D (2002) Alpha2-adrenoceptor activation increases a cationic conductance and spontaneous GABAergic synaptic activity in dopaminergic neurons of the rat substantia nigra. *Neuroscience* 115:1059–1065
- Cecchi M, Khoshbouei H, Javors M, Morilak DA (2002a) Modulatory effects of norepinephrine in the lateral bed nucleus of the stria terminalis on behavioral and neuroendocrine responses to acute stress. *Neuroscience* 112:13–21
- Cecchi M, Khoshbouei H, Morilak DA (2002b) Modulatory effects of norepinephrine, acting on alpha 1 receptors in the central nucleus of the amygdala, on behavioral and neuroendocrine responses to acute immobilization stress. *Neuropharmacology* 43:1139–1147
- Chiang C, Aston-Jones G (1993) A 5-hydroxytryptamine2 agonist augments gamma-aminobutyric acid and excitatory amino acid inputs to noradrenergic locus coeruleus neurons. *Neuroscience* 54:409–420
- Cryan JF, Page ME, Lucki I (2002) Noradrenergic lesions differentially alter the antidepressant-like effects of reboxetine in a modified forced swim test. *Eur J Pharmacol* 436:197–205
- Dailly E, Chenu F, Petit-Demouliere B, Bourin M (2005) Specificity and efficacy of noradrenaline, serotonin depletion in discrete brain areas of Swiss mice by neurotoxins. *J Neurosci Methods* (in press). DOI 10.1016/j.jneumeth.2005.06.008
- de Angelis L (1995) Effects of valproate and lorazepam on experimental anxiety: tolerance, withdrawal, and role of clonidine. *Pharmacol Biochem Behav* 52:329–333
- Dennis T, L'Heureux R, Carter C, Scatton B (1987) Presynaptic alpha-2 adrenoceptors play a major role in the effects of idazoxan on cortical noradrenaline release (as measured by in vivo dialysis) in the rat. *J Pharmacol Exp Ther* 241:642–649
- Done CJ, Sharp T (1992) Evidence that 5-HT2 receptor activation decreases noradrenaline release in rat hippocampus in vivo. *Br J Pharmacol* 107:240–245
- Dursun SM, Handley SL (1993) The effects of alpha 2-adrenoceptor antagonists on the inhibition of 1-(2,5-dimethoxy-4-iodophenyl)-2-aminopropane (DOI)-induced head shakes by 5-HT1A receptor agonists in the mouse. *Br J Pharmacol* 109:1046–1052
- French N (1995) Alpha 2-adrenoceptors and I2 sites in the mammalian central nervous system. *Pharmacol Ther* 68:175–208
- Fritschy JM, Grzanna R (1989) Immunohistochemical analysis of the neurotoxic effects of DSP-4 identifies two populations of noradrenergic axon terminals. *Neuroscience* 30:181–197
- Fritschy JM, Grzanna R (1991) Selective effects of DSP-4 on locus coeruleus axons: are there pharmacologically different types of noradrenergic axons in the central nervous system? *Prog Brain Res* 88:257–268
- Gobert A, Millan MJ (1999) Serotonin (5-HT)2A receptor activation enhances dialysate levels of dopamine and noradrenaline, but not 5-HT, in the frontal cortex of freely-moving rats. *Neuropharmacology* 38:315–317
- Gorea E, Adrien J (1988) Serotonergic regulation of noradrenergic coerulean neurons: electrophysiological evidence for the involvement of 5-HT2 receptors. *Eur J Pharmacol* 154:285–291
- Graeff FG, Netto CF, Zangrossi H Jr (1998) The elevated T-maze as an experimental model of anxiety. *Neurosci Biobehav Rev* 23:237–246
- Haddjeri N, Blier P, de Montigny C (1996) Effect of the alpha-2 adrenoceptor antagonist mirtazapine on the 5-hydroxytryptamine system in the rat brain. *J Pharmacol Exp Ther* 277:861–871
- Haddjeri N, de Montigny C, Blier P (1997) Modulation of the firing activity of noradrenergic neurones in the rat locus coeruleus by the 5-hydroxytryptamine system. *Br J Pharmacol* 120:865–875

- Hamada S, Senzaki K, Hamaguchi-Hamada K, Tabuchi K, Yamamoto H, Yamamoto T, Yoshikawa S, Okano H, Okado N (1998) Localization of 5-HT_{2A} receptor in rat cerebral cortex and olfactory system revealed by immunohistochemistry using two antibodies raised in rabbit and chicken. *Brain Res Mol Brain Res* 54:199–211
- Handley SL, Mithani S (1984) Effects of alpha-adrenoceptor agonists and antagonists in a maze-exploration model of 'fear'-motivated behaviour. *Naunyn Schmiedeberg's Arch Pharmacol* 327:1–5
- Hascoet M, Bourin M, Colombel MC, Fiocco AJ, Baker GB (2000) Anxiolytic-like effects of antidepressants after acute administration in a four-plate test in mice. *Pharmacol Biochem Behav* 65:339–344
- Johnston AL, File SE (1989) Yohimbine's anxiogenic action: evidence for noradrenergic and dopaminergic sites. *Pharmacol Biochem Behav* 32:151–156
- Khoshbouei H, Cecchi M, Dove S, Javors M, Morilak DA (2002) Behavioral reactivity to stress: amplification of stress-induced noradrenergic activation elicits a galanin-mediated anxiolytic effect in central amygdala. *Pharmacol Biochem Behav* 71:407–417
- La Marca S, Dunn RW (1994) The alpha-2 antagonists idazoxan and rauwolscine but not yohimbine or piperoxan are anxiolytic in the Vogel lick-shock conflict paradigm following intravenous administration. *Life Sci* 54:PL179–PL184
- Laprade N, Radja F, Reader TA, Soghomonian JJ (1996) Dopamine receptor agonists regulate levels of the serotonin 5-HT_{2A} receptor and its mRNA in a subpopulation of rat striatal neurons. *J Neurosci* 16:3727–3736
- Lopez-Gimenez JF, Vilaro MT, Palacios JM, Mengod G (2001) Mapping of 5-HT_{2A} receptors and their mRNA in monkey brain: [³H]MDL100,907 autoradiography and in situ hybridization studies. *J Comp Neurol* 429:571–589
- Marek GJ, Aghajanian GK (1999) 5-HT_{2A} receptor or alpha₁-adrenoceptor activation induces excitatory post-synaptic currents in layer V pyramidal cells of the medial prefrontal cortex. *Eur J Pharmacol* 367:197–206
- Massé F, Hascoet M, Bourin M (2005) The implication of alpha₂-adrenergic receptors in the mechanism of action of antidepressants in the four-plate test. *Behav Brain Res* 167:17–28
- Matsumoto K, Mizowaki M, Thongpraditchote S, Murakami Y, Watanabe H (1997) alpha₂-Adrenoceptor antagonists reverse the 5-HT₂ receptor antagonist suppression of head-twitch behavior in mice. *Pharmacol Biochem Behav* 56:417–422
- Millan MJ, Lejeune F, Gobert A, Brocco M, Auclair A, Bosc C, Rivet JM, Lacoste JM, Cordi A, Dekeyne A (2000) S18616, a highly potent spiroimidazole agonist at alpha₂(2)-adrenoceptors. II. Influence on monoaminergic transmission, motor function, and anxiety in comparison with dexmedetomidine and clonidine. *J Pharmacol Exp Ther* 295:1206–1222
- Miner LA, Backstrom JR, Sanders-Bush E, Sesack SR (2003) Ultrastructural localization of serotonin_{2A} receptors in the middle layers of the rat prelimbic prefrontal cortex. *Neuroscience* 116:107–117
- Morrow BA, George TP, Roth RH (2004) Noradrenergic alpha₂ agonists have anxiolytic-like actions on stress-related behavior and mesoprefrontal dopamine biochemistry. *Brain Res* 1027:173–178
- Nic Dhonnchadha BA, Bourin M, Hascoet M (2003a) Anxiolytic-like effects of 5-HT₂ ligands on three mouse models of anxiety. *Behav Brain Res* 140:203–214
- Nic Dhonnchadha BA, Hascoet M, Jolliet P, Bourin M (2003b) Evidence for a 5-HT_{2A} receptor mode of action in the anxiolytic-like properties of DOI in mice. *Behav Brain Res* 147:175–184
- Nic Dhonnchadha BA, Ripoll N, Clenet F, Hascoet M, Bourin M (2005) Implication of 5-HT₂ receptor subtypes in the mechanism of action of antidepressants in the four plates test. *Psychopharmacology (Berl)* 179:418–429
- Numazawa R, Yoshioka M, Matsumoto M, Togashi H, Kemmotsu O, Saito H (1995) Pharmacological characterization of alpha₂-adrenoceptor regulated serotonin release in the rat hippocampus. *Neurosci Lett* 192:161–164
- Onaivi ES, Bishop-Robinson C, Darmani NA, Sanders-Bush E (1995) Behavioral effects of (+/-)-1-(2,5-dimethoxy-4-iodophenyl)-2-aminopropane, (DOI) in the elevated plus-maze test. *Life Sci* 57:2455–2466
- Pazos A, Cortes R, Palacios JM (1985) Quantitative autoradiographic mapping of serotonin receptors in the rat brain. II. Serotonin-2 receptors. *Brain Res* 346:231–249
- Prieto M, Giralt MT (2001) Effects of N-(2-chloroethyl)-N-ethyl-2-bromobenzylamine (DSP4) on alpha₂-adrenoceptors which regulate the synthesis and release of noradrenaline in the rat brain. *Pharmacol Toxicol* 88:152–158
- Rasmussen K, Aghajanian GK (1986) Effect of hallucinogens on spontaneous and sensory-evoked locus coeruleus unit activity in the rat: reversal by selective 5-HT₂ antagonists. *Brain Res* 385:395–400
- Rodgers RJ, Johnson NJT, Norton SJ, Cole JC (1995) Effect of ritanserin and 1-(2,5-dimethoxy-4-iodophenyl)-2-aminopropane (DOI) in the murine elevated plus-maze test of anxiety: an ethopharmacological study. *J Psychopharmacol* 9:38–42
- Scheinin M, Lomasney JW, Hayden-Hixson DM, Schambra UB, Caron MG, Lefkowitz RJ, Fremeau RT Jr (1994) Distribution of alpha₂-adrenergic receptor subtype gene expression in rat brain. *Brain Res Mol Brain Res* 21:133–149
- Schreiber R, Melon C, De Vry J (1998) The role of 5-HT receptor subtypes in the anxiolytic effects of selective serotonin reuptake inhibitors in the rat ultrasonic vocalization test. *Psychopharmacology (Berl)* 135:383–391
- Scorza MC, Reyes-Parada M, Silveira R, Viola H, Medina JH, Viana MB, Zangrossi H, Jr, Graeff FG (1996) Behavioral effects of the putative anxiolytic (+/-)-1-(2,5-dimethoxy-4-ethylthiophenyl)-2-aminopropane (ALEPH-2) in rats and mice. *Pharmacol Biochem Behav* 54:355–361
- Silverstone PH (2004) Qualitative review of SNRIs in anxiety. *J Clin Psychiatry* 65 (suppl) 17:19–28
- Soderpalm B, Engel JA (1990) Alpha₁- and beta-adrenoceptor stimulation potentiate the anticonflict effect of a benzodiazepine. *J Neural Transm Gen Sect* 79:155–167
- Sokal DM, Giarola AS, Large CH (2005) Effects of GABA(B), 5-HT_{1A}, and 5-HT₂ receptor stimulation on activation and inhibition of the rat lateral amygdala following medial geniculate nucleus stimulation in vivo. *Brain Res* 1031:141–150
- Stine SM, Southwick SM, Petrakis IL, Kosten TR, Charney DS, Krystal JH (2002) Yohimbine-induced withdrawal and anxiety symptoms in opioid-dependent patients. *Biol Psychiatry* 51:642–651
- Uhlen S, Muceniece R, Rangel N, Tiger G, Wikberg JE (1995) Comparison of the binding activities of some drugs on alpha_{2A}, alpha_{2B} and alpha_{2C}-adrenoceptors and non-adrenergic imidazoline sites in the guinea pig. *Pharmacol Toxicol* 76:353–364
- Wamsley JK, Alburges ME, Hunt MA, Bylund DB (1992) Differential localization of alpha₂-adrenergic receptor subtypes in brain. *Pharmacol Biochem Behav* 41:267–273
- Xu T, Pandey SC (2000) Cellular localization of serotonin_{2A} (5HT_{2A}) receptors in the rat brain. *Brain Res Bull* 51:499–505
- Yu PH, Davis BA, Fang J, Boulton AA (1994) Neuroprotective effects of some monoamine oxidase-B inhibitors against DSP-4-induced noradrenaline depletion in the mouse hippocampus. *J Neurochem* 63:1820–1828
- Zarrindast MR, Homayoun H, Babaie A, Etminani A, Gharib B (2000) Involvement of adrenergic and cholinergic systems in nicotine-induced anxiogenesis in mice. *Eur J Pharmacol* 407:145–158

3.3.1.2 DISCUSSION DE L'ETUDE 3a

Dans cette étude, l'effet de type anxiolytique du DOI dans le FPT n'est pas inhibé par le prétraitement des animaux par le DSP-4 et le *p*-CPA. Le DSP-4 détruit les terminaisons axonales des neurones NA issus du locus coeruleus. Nos résultats montrent une diminution significative de NA dans les quatre structures étudiées (le cortex, l'hippocampe, l'hypothalamus et le striatum). La diminution est plus importante dans l'hippocampe et dans le cortex. Ces résultats sont en accord avec le fait que ces deux structures possèdent de nombreuses terminaisons axonales noradrénergiques issues du locus coeruleus. La faible diminution de la concentration en 5-HT observée dans l'hippocampe peut être due aux nombreuses interactions existantes entre le système NA et le système 5-HT. La concentration en dopamine (DA) dans ces structures n'est pas modifiée. L'administration de *p*-CPA induit une diminution significative de la concentration en 5-HT dans les quatre structures étudiées alors que les concentrations de NA et de DA ne sont pas modifiées suite à une administration de *p*-CPA. La déplétion du système 5-HT et la lésion du système NA dans notre étude ne modifient pas l'activité du DOI dans le FPT. L'activité de type anxiolytique induite par le DOI ne semble donc pas faire intervenir les neurones NA issus du locus coeruleus ainsi que les neurones 5-HT. Les récepteurs cibles du DOI ne seraient donc pas situés sur ces deux types de neurones. Les récepteurs 5-HT₂ peuvent être localisés sur d'autres types de neurones tels que les neurones GABA et dopaminergiques comme l'ont montré d'autres études (Brodie et Bunney 1996; Gobert et Millan 1999b; Sokal et al. 2005).

Les études d'interactions entre le DOI et des ligands spécifiques des récepteurs α noradrénergiques montrent que seuls les agonistes des récepteurs α_2 noradrénergiques modifient l'effet anxiolytique du DOI dans le FPT. Pourtant, Bortolozzi (2003) observe que l'augmentation de la libération de 5-HT dans le cortex préfrontal médian, induite par une injection de DOI, est inhibée par la co-perfusion de prazosine, un antagoniste des récepteurs α_1 noradrénergiques (Bortolozzi et al. 2003).

Dans notre étude, la clonidine et le guanabenz antagonisent l'effet du DOI. Nous avons utilisé, ici, le guanabenz car la clonidine possède également un effet antagoniste des récepteurs α_1 noradrénergiques à fortes doses (Silva et al. 1996). L'activité du guanabenz et l'absence d'activité de la prazosine démontrent bien un effet spécifique des récepteurs α_2 noradrénergiques. La guanfacine a aussi été utilisée car elle possède une haute affinité pour le sous type de récepteurs α_{2A} noradrénergiques et une faible affinité pour les récepteurs α_{2C} noradrénergiques (Uhlen et al. 1995). L'activité inhibitrice de l'administration de guanfacine

sur l'activité de type anxiolytique du DOI dans le FPT montre que les sous types de récepteurs α_{2A} noradrénergiques semblent être les récepteurs impliqués dans cet effet.

En conclusion cette étude confirme les résultats obtenus dans l'étude précédente qui montrent des relations importantes entre les systèmes NA et 5-HT. Le fait que l'antagoniste des récepteurs α_2 noradrénergiques ne potentialise pas l'effet du DOI et que les déplétions des systèmes NA et 5-HT n'annulent pas non plus l'effet du DOI semble montrer un effet régulateur des récepteurs α_{2A} noradrénergiques sur l'activité anxiolytique du DOI dans le FPT ainsi qu'un effet post-synaptique des récepteurs 5-HT_{2A} activé par le DOI.

3.3.2 Etude 3b :

Effet de la déplétion des systèmes NA et 5-HT sur la diminution de l'activité du DOI induite par la clonidine dans le FPT.

3.3.2.1 OBJECTIF DE L'ETUDE 3b

Dans l'étude 3a, la déplétion du système 5-HT et la lésion du système NA ne modifient pas l'effet de type anxiolytique du DOI dans le FPT. Ces résultats démontrent que, à l'inverse des IRSSs et des IRSNs, l'intégrité des systèmes NA et 5-HT n'est pas indispensable dans le mécanisme d'action du DOI dans le FPT. D'un autre côté, l'étude des interactions entre le DOI et les récepteurs α noradrénergiques montre que seuls les agonistes α_2 noradrénergiques possèdent un effet inhibiteur sur l'activité du DOI dans le FPT mais qu'un antagoniste spécifique de ces sous-types de récepteurs n'a aucun effet sur l'activité du DOI. Les récepteurs α_1 noradrénergiques ne semblent pas non plus avoir d'action sur l'activité du DOI dans le FPT.

Les agonistes des récepteurs α_2 noradrénergiques peuvent agir sur des récepteurs α_2 noradrénergiques à différents niveaux dans le cerveau. Des récepteurs α_2 noradrénergiques sont présents sur les neurones noradrénergiques et leur activation entraîne une diminution de la libération de NA (Dennis et al. 1987). Ils sont également présents sur les neurones sérotoninergiques et exercent un effet inhibiteur sur la libération de 5-HT (Numazawa et al. 1995). Mais ces récepteurs peuvent également agir au niveau post-synaptique et réguler la libération d'autres neurotransmetteurs tels que la dopamine et le GABA (Cathala et al. 2002). Le but de cette étude est d'essayer de localiser un peu plus précisément sur quel type de neurones agissent les agonistes α_2 noradrénergiques dans le FPT. Pour cela, nous avons co-administré du DOI avec de la clonidine chez des animaux dont le système NA et le système 5-HT ont été préalablement lésés et déplétés respectivement. La lésion des terminaisons axonales des neurones NA issus du locus coeruleus est réalisée par une injection unique de DSP-4 168h avant le début du test. La déplétion du système 5-HT est réalisée par l'injection répétée de *p*-CPA (72, 48 et 24h avant le test). La clonidine est injectée i.p. 45 min avant le test et le DOI i.p. 30 min avant le test.

La vérification de l'effet du *p*-CPA et du DSP-4 est réalisée par le dosage de la concentration en DA, NA et 5-HT dans l'hypothalamus, l'hippocampe, le striatum et le cortex.

3.3.2.2 RESULTATS DE L'ETUDE 3b

Effet de l'administration de DSP-4 sur l'inhibition de l'activité du DOI induite par la clonidine dans le FPT.

L'administration de DSP-4 ne modifie pas le nombre de passages punis acceptés par les souris témoins dans le test ($p > 0,05$) [$F_{(1, 72)} = 3,082$; $p = 0,083$].

L'administration de clonidine 45 min avant le début du test n'entraîne aucune modification du nombre de passages punis comparé au groupe contrôle ($p > 0,805$ après l'analyse à posteriori) [$F_{(2, 72)} = 31,562$; $p < 0,001$]. L'administration de DOI seul 30 min avant le début du test entraîne une augmentation significative du nombre de passages punis ($p < 0,001$) [$F_{(2, 72)} = 103,685$; $p < 0,001$]. L'analyse statistique démontre un effet significatif entre le prétraitement (clonidine) et le traitement (DOI) [$F_{(2, 72)} = 35,630$; $p < 0,001$]. La clonidine diminue l'effet anti-punition du DOI ($p < 0,001$). L'administration de DSP-4 ne modifie pas la diminution de l'activité anti-punition du DOI induite par la clonidine [$F_{(1, 72)} = 0,123$; $p = 0,727$]. L'administration de diazépam utilisé comme témoin positif augmente significativement le nombre de passages punis acceptés par les souris ($p < 0,001$).

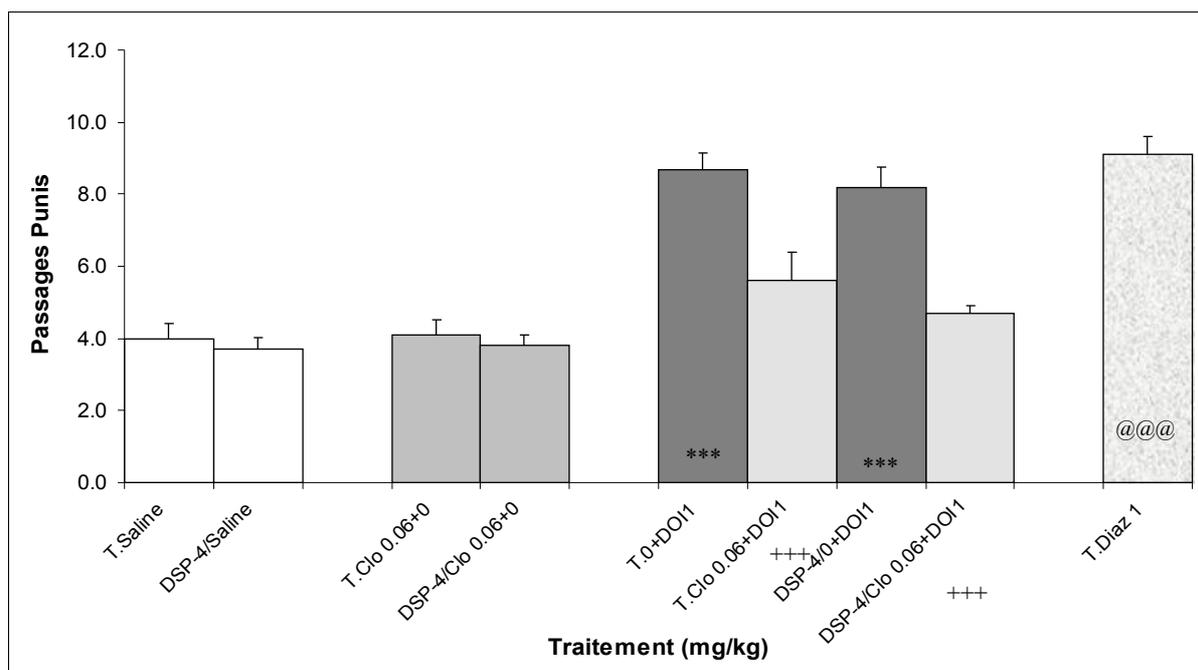


Figure 28 : Effet de l'administration de DSP-4 (i.p.168h avant le test) et de Clonidine (45 i.p. min) + DOI (i.p. 30min avant le test) sur le nombre de passages punis reçus par les souris dans le FPT.

Les résultats sont exprimés en moyenne (\pm ESM) du nombre de passages punis acceptés par les souris ($n=10$). L'analyse statistique est réalisée par une ANOVA à trois facteurs suivie d'un test de Sidak [*** ($p<0,001$) versus groupe contrôle et +++ ($p<0,001$) versus T. DOI]. Un test t de student est réalisé pour analyser l'effet du diazépam (@@@ $p<0,001$).

Effet de l'administration de p-CPA sur l'inhibition de l'activité du DOI induite par la clonidine dans le FPT.

L'administration de *p*-CPA ne modifie pas le nombre de passages punis acceptés par les souris dans le test ($p>0,05$) [$F_{(1, 72)} = 0,655$; $p= 0,421$]. L'administration de clonidine 45 min avant le début du test n'entraîne aucune modification du nombre de passages punis comparé au groupe contrôle ($p>0,669$ après l'analyse à posteriori) [$F_{(2, 72)} = 47,289$; $p<0,001$]. L'administration de DOI seul 30 min avant le début du test entraîne une augmentation

significative du nombre de passages punis ($p < 0,001$) [$F_{(2, 72)} = 183,641$; $p < 0,001$]. L'analyse statistique montre un effet significatif entre le prétraitement (clonidine) et le traitement (DOI) [$F_{(2, 72)} = 39,314$; $p < 0,001$]. La clonidine diminue l'effet anti-punition du DOI ($p < 0,001$). L'administration de *p*-CPA ne modifie pas la diminution de l'activité anti-punition du DOI induite par la clonidine [$F_{(1, 72)} = 0,0409$; $p = 0,840$]. L'administration de diazépam utilisé comme témoin positif augmente significativement le nombre de passages punis acceptés par les souris ($p < 0,001$).

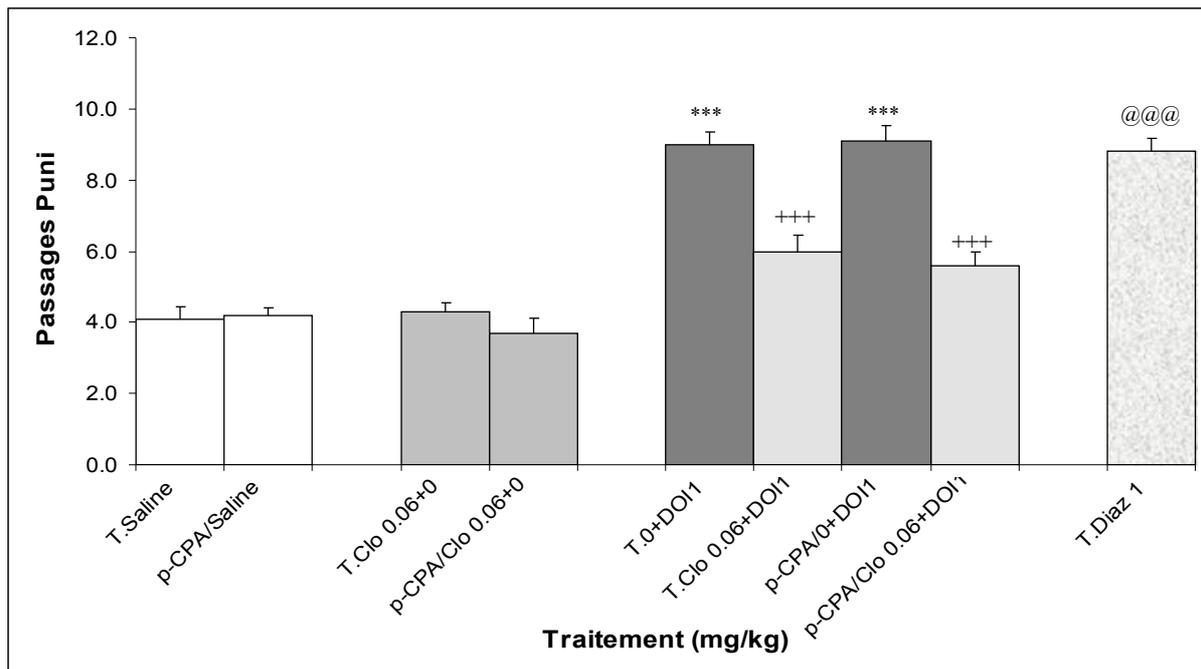


Figure 29 : Effet de l'administration de *p*-CPA (i.p.72, 48, 24h avant le test) et de Clonidine (45 i.p. min) + DOI (i.p. 30min avant le test) sur le nombre de passages punis reçus par les souris dans le FPT.

Les résultats sont exprimés en moyenne (\pm ESM) du nombre de passages punis acceptés par les souris ($n=10$). L'analyse statistique est réalisée par une ANOVA à trois facteurs suivie d'un test de Sidak [*** ($p < 0,001$) versus groupe contrôle et +++ ($p < 0,001$) versus T. DOI]. Un test *t* de Student est réalisé pour analyser l'effet du diazépam (@@@ $p < 0,001$).

Effet de l'administration de DSP-4 et de p-CPA sur les concentrations de NA, 5-HT et DA.

L'administration de DSP-4 induit une diminution significative de la concentration de NA dans l'hippocampe (93%), dans le striatum (49%) et dans le cortex (76%). L'administration de DSP-4 induit également une augmentation significative de la concentration en 5-HT dans l'hippocampe (36%), mais le DSP-4 n'entraîne aucune modification de la concentration en DA dans les quatre structures étudiées.

L'administration de p-CPA induit une diminution significative de la concentration en 5-HT dans l'hypothalamus (100%), dans l'hippocampe (100%), dans le striatum (91%) et dans le cortex (85%) mais également une diminution significative de la concentration en NA dans l'hypothalamus (18%) et dans le cortex (20%). Le p-CPA entraîne une diminution significative de la concentration en DA dans le cortex (33%).

| | Hypothalamus | Hippocampe | Striatum | Cortex |
|----------|-----------------------------|--------------------|---------------------|---------------------|
| | ng/g ± SEM | ng/g ± SEM | ng/g ± SEM | ng/g ± SEM |
| | <i>pourcentage résiduel</i> | | | |
| Contrôle | 2504 ± 121 | 540 ± 33 | 403 ± 65 | 331 ± 20 |
| DSP-4 | 2089 ± 54 | 40 ± 7 | 205 ± 33 | 178 ± 33 |
| | 83 NS | 7 p<0,05 | 51 p<0,05 | 24 p<0,05 |
| Contrôle | 2835 ± 140 | 397 ± 20 | 561 ± 62 | 379 ± 18 |
| p-CPA | 2328 ± 153 | 370 ± 43 | 543 ± 71 | 304 ± 17 |
| | 82 p<0,05 | 93 NS | 97 NS | 80 p<0,05 |

Tableau 18 : Effet de l'administration de DSP-4 et p-CPA sur la concentration de NA.

Les résultats sont exprimés en moyenne de concentration de NA (ng/g) ± ESM. Un test *t* de Student est utilisé pour l'analyse statistique entre le groupe traité et le groupe contrôle. NS: Non Significatif.

| | Hypothalamus | Hippocampe | Striatum | Cortex |
|-----------------------------|--------------------|----------------------|--------------------|---------------------|
| | ng/g ± SEM | ng/g ± SEM | ng/g ± SEM | ng/g ± SEM |
| <i>pourcentage résiduel</i> | | | | |
| Contrôle | 735 ± 22 | 388 ± 52 | 399 ± 32 | 407 ± 29 |
| DSP-4 | 726 ± 66 | 528 ± 24 | 374 ± 17 | 388 ± 24 |
| | 99 NS | 136 p<0,05 | 94 NS | 95 NS |
| Contrôle | 683 ± 51 | 381 ± 16 | 356 ± 28 | 374 ± 20 |
| p-CPA | 0 | 0 | 33 ± 12 | 55 ± 7 |
| | 0 p<0,05 | 0 p<0,05 | 9 p<0,05 | 15 p<0,05 |

Tableau 19 : Effet de l'administration de DSP-4 et p-CPA sur la concentration de 5-HT.

Les résultats sont exprimés en moyenne de concentration de 5-HT (ng/g) ± ESM. Un test *t* de Student est utilisé pour l'analyse statistique entre le groupe traité et le groupe contrôle. NS: Non Significatif.

| | Hypothalamus | Hippocampe | Striatum | Cortex |
|-----------------------------|--------------|------------|------------|---------------------|
| | ng/g ± SEM | ng/g ± SEM | ng/g ± SEM | ng/g ± SEM |
| <i>pourcentage résiduel</i> | | | | |
| Contrôle | 284 ± 20 | undetected | 3593 ± 248 | 494 ± 57 |
| DSP-4 | 340 ± 31 | undetected | 3599 ± 243 | 486 ± 70 |
| | 119 NS | | 99 NS | 98 NS |
| Contrôle | 276 ± 28 | undetected | 3705 ± 199 | 539 ± 51 |
| p-CPA | 235 ± 35 | undetected | 3416 ± 157 | 359 ± 29 |
| | 85 NS | | 92 NS | 67 p<0,05 |

Tableau 20 : Effet de l'administration de DSP-4 et p-CPA sur la concentration de DA.

Les résultats sont exprimés en moyenne de concentration de DA (ng/g) ± ESM. Un test *t* de Student est utilisé pour l'analyse statistique entre le groupe traité et le groupe contrôle. NS: Non Significatif.

3.3.2.3 DISCUSSION DE L'ETUDE 3b

Les résultats montrent que l'administration de *p*-CPA diminue significativement la concentration de 5-HT dans l'hypothalamus, l'hippocampe, le striatum et le cortex mais entraîne également une diminution significative de la concentration de DA dans le cortex et de la concentration de NA dans l'hypothalamus et le cortex. L'administration de DSP-4 diminue significativement la concentration de NA dans l'hippocampe, le striatum et le cortex mais augmente la concentration de 5-HT dans l'hippocampe. L'effet du DSP-4 sur la 5-HT et du *p*-CPA sur la NA et la DA sont probablement dus aux nombreuses inter-régulations qui existent entre ces trois neurotransmetteurs. Comme dans l'étude 3a, on observe que la diminution de NA est plus importante dans l'hippocampe et le cortex. Ces résultats correspondent aux données de la littérature qui montrent que ces deux structures sont riches en terminaisons axonales noradrénergiques issues du locus coeruleus (Prieto et Giralt 2001).

L'étude comportementale montre que les déplétions des systèmes NA et 5-HT ne modifient pas l'effet inhibiteur de la clonidine sur l'activité de type anxiolytique du DOI dans le FPT. Ces résultats démontrent que les récepteurs cibles activés par la clonidine dans notre étude ne sont pas localisés sur les neurones NA issus du locus coeruleus ni sur les neurones 5-HT, mais sur d'autres types de neurones. L'étude de la localisation des récepteurs α_2 noradrénergiques, par hybridation in situ ou par autoradiographie, montre que ce sous type de récepteurs est présent dans les mêmes structures cérébrales que les récepteurs 5-HT₂ tels que l'hippocampe, l'hypothalamus ou le cortex (French 1995; Scheinin et al. 1994; Wamsley et al. 1992). Il est donc possible que les récepteurs α_2 noradrénergiques impliqués dans notre étude soient co-localisés avec les récepteurs 5-HT_{2A} sur des neurones identiques. Malheureusement, ces résultats ne nous permettent pas de déterminer précisément pour le moment de quel type de neurones il s'agit.

3.4 Etude 4 :

Effet de différents ligands GABAergiques sur l'effet de type anxiolytique du DOI dans le FPT.

Effect of GABAergic ligands on the anxiolytic-like activity of DOI (a 5-HT_{2A/2C} agonist) in the four-plate test. Massé Fabienne, Martine Hascoët, Michel Bourin. Psychopharmacology (submitted)

3.4.1 OBJECTIF DE L'ETUDE 4

Le travail mené jusqu'à présent a permis d'étudier les interactions entre le système noradrénergique et sérotoninergique dans les mécanismes neurobiologiques impliqués dans le comportement des souris dans le FPT. Ces études ont mis en évidence les importantes relations qui existent entre ces deux systèmes dans le mécanisme d'action des IRSSs, des IRSNs et d'un agoniste 5-HT₂ (le DOI) dans le FPT ainsi que l'effet régulateurs des récepteurs α_2 -noradrenergiques sur l'activité de type anxiolytique de ces antidépresseurs et du DOI dans le FPT.

Les benzodiazépines sont les premiers anxiolytiques à avoir été découverts et restent encore le traitement de premier choix dans les troubles anxieux. Les modèles animaux d'anxiété ont été mis au point et validés par leur sensibilité aux benzodiazépines (Jones et al. 1994; Kulkarni et Sharma 1993; Stefanski et al. 1992). Le modèle utilisé dans cette étude s'est montré être sensible aux benzodiazépines dans plusieurs études (Bourin et al. 1992; Griebel et al. 2002; Jones et al. 1994; Klodzinska et al. 2004a).

Le récepteur GABA_A est un complexe macromoléculaire formé de cinq sous unités qui forment un canal chlore. Il existe 3 types de sous unités β , α , γ . La sous unité α possède un site de fixation aux benzodiazépines et aux barbituriques alors que la sous unité β possède le site de fixation du GABA.

L'effet de ligands spécifiques du récepteur GABA_A autres que les benzodiazépines dans différents modèles animaux a également été étudié. Le muscimol (un agonistes de récepteurs GABA_A) possède un effet de type anxiolytique dans le labyrinthe en croix surélevé chez la souris (Sasaki et al. 2002). L'autre sous-type de récepteur GABA, le sous-type GABA_B, a aussi été impliqué dans les mécanismes neurobiologiques induits par différents modèles animaux. L'administration d'un agoniste ou d'un modulateur positif des récepteurs GABA_B entraîne un effet de type anxiolytique dans le labyrinthe en zéro surélevé chez la souris et le labyrinthe en T surélevé chez le rat (Bueno et al. 2005; Cryan et al. 2004). De plus, les souris, dont le gène codant pour les récepteurs GABA_B est lésé, se sont avérées être plus anxieuses que les souris contrôles dans le test de la double enceinte illuminée (Mombereau et al. 2004a; Mombereau et al. 2005; Mombereau et al. 2004b).

D'un autre coté, certaines études de microdialyse et pharmacologique ont permis d'observer des liens entre le système GABA et 5-HT mais ces relations ne sont pas encore clairs (Abi-Saab et al. 1999; Forchetti et Meek 1981; Tao et al. 1996). Cependant, l'existence de

récepteurs GABA_A sur les neurones 5-HT ainsi que la présence de récepteurs 5-HT₂ sur les neurones GABA a été démontrées (Gao et al. 1993; Griffiths et Lovick 2002; Luttgen et al. 2004; Santana et al. 2004). Au vu de toutes ces données, il nous a semblé essentiel d'étudier les interactions qui peuvent exister entre le système GABA et le DOI dans notre modèle comportementale : le FPT.

Dans cette étude, nous avons donc co-administré le DOI avec différents ligands des récepteurs GABA_A et GABA_B dans le FPT afin d'étudier les relations existantes entre les récepteurs 5-HT₂ et le système GABA. Le DOI est administré 30 min avant le début du test et les ligands des récepteurs GABA_A et GABA_B sont administrés 45 min avant le début du test. Les ligands GABA utilisés sont l'alprazolam et le diazépam (deux agonistes des récepteurs aux benzodiazépines), le flumazénil (un antagoniste des récepteurs aux benzodiazépines), le muscimol (un agoniste des récepteurs GABA_A), la bicuculline et la picrotoxine (deux antagonistes des récepteurs GABA_A), le baclofen (un agoniste des récepteurs GABA_B) et le CGP 35348 (un antagoniste des récepteurs GABA_B). En parallèle une étude sur l'activité locomotrice est réalisée pour observer les effets de la co-administration de produits.

Effect of GABAergic ligands on the anxiolytic-like activity of DOI (a 5-HT_{2A/2C} agonist) in the four-plate test in mice

Fabienne Massé, Martine Hascoët, Michel Bourin (✉)

[Eur Neuropsychopharmacol.](#) 2006 Dec 27; [Epub ahead of print] [Link](#)

3.5 Effect of GABAergic ligands on the anxiolytic-like activity of DOI (a 5-HT_{2A/2C} agonist) in the four-plate test in mice.

- [Masse F](#), [Hascoet M](#), [Bourin M](#).

EA 3256 << Neurobiologie de l'anxiété et de la dépression >>, Faculté de Médecine, BP 53508, 1 rue Gaston Veil, F44035 Nantes cedex 01, France.

5-HTergic and GABAergic systems are involved in neurobiology of anxiety. Precedent studies have demonstrated that SSRIs possessed an anxiolytic-like effect in the four-plate test (FPT) at doses that did not modify spontaneous locomotor activity. This effect seems to be mediated through the activation of 5-HT_{2A} postsynaptic receptors. The purpose of the present study was to examine the implication of GABA system in the anxiolytic-like activity of DOI in the FPT. To achieve this, the co-administration of DOI (5-HT_{2A/2C} receptor agonists) with GABA(A) and GABA(B) receptor ligands was evaluated in the FPT. Alprazolam, diazepam and muscimol (for higher dose) potentiated the anxiolytic-like effect of DOI. Bicuculline, picrotoxin and baclofen inhibited the anxiolytic-like effect of DOI. Flumazenil and CGP 35348 had no effect on the anxiolytic-like activity of DOI. These results suggest that the GABA system seems to be strongly implicated in the anxiolytic-like activity of DOI in the FPT.

PMID: 17196374 [PubMed - as supplied by publisher]

Fabienne Massé . Martine Hascoët . Michel Bourin (✉)

EA 3256 « Neurobiologie de l'anxiété et de la dépression », Faculté de Médecine, BP 53508, 1 rue Gaston Veil, F44035 Nantes cedex 01, France

e-mail: michel.bourin@univ-nantes.fr

Phone: +33-2-40412852

Fax: +33-2-40412856

ABSTRACT

Rationale: Benzodiazepines (BZDs) remain the first choice drugs for the treatment of anxiety disorders but these compounds involve several side effects (withdrawal symptoms, physiological dependence and sedation). More recently the specific serotonin reuptake inhibitors (SSRIs) have proved their efficacy in the treatment of anxiety disorders in humans. Precedent studies have demonstrated that the SSRIs possessed an anxiolytic-like effect in the four-plate test (FPT). This effect seems to be mediated through the activation of 5-HT_{2A} postsynaptic receptors. *Objectives:* The purpose of the present study was to examine the effect of DOI and GABA ligands co-administration in the FPT. We have co-administered DOI (5-HT_{2A/2C} receptor agonists) with benzodiazepine receptor agonists (alprazolam and diazepam) and benzodiazepine receptor antagonist (flumazenil), GABA_A receptor agonist (muscimol), GABA_A receptor antagonists (bicuculline and picrotoxin), GABA_B receptor agonist (baclofen) and GABA_B receptor antagonist (CGP35348) in the FPT. *Methods:* The effect of co-administration of GABA_A and GABA_B receptor ligands and DOI was evaluated in the four-plate test. *Results:* Alprazolam (0.03 and 0.125 mg/kg) and diazepam (0.125 mg/kg) potentiated the anxiolytic-like effect of DOI (0.06 and 0.125 mg/kg). Muscimol (0.25 mg/kg) induced a significant anti-punishment activity when was co-administered with DOI (0.125 mg/kg). Bicuculline (1 and 8 mg/kg), picrotoxin (0.125 mg/kg) and baclofen (0.25 and 1 mg/kg) inhibited the anxiolytic-like effect of DOI (1 and 2 mg/kg) in the FPT. *Conclusion:* These results suggest that DOI seems to act on GABA system through 5-HT_{2A} receptors presents on GABA neurons.

1-INTRODUCTION

Although the physiopathology of anxiety disorders has not been elucidated, many evidences support the implication of the serotonin (5-HT) and GABA systems. Benzodiazepines (BZDs) remain the first choice drugs for the treatment of anxiety disorders but these compounds involve several side effects (withdrawal symptoms, physiological dependence and sedation). More recently the specific serotonin reuptake inhibitors (SSRIs) have proved their efficacy in the treatment of anxiety disorders in humans.

The animal's models of anxiety have been developed to be sensitive to the anxiolytic properties of BZDs (Jones et al. 1994; Kulkarni and Sharma 1993; Stefanski et al. 1992). The model used in this study is the four-plate test (FPT) in mice that has been developed by Aron et al 1971. The FPT is an animal model of anxiety in which an exploration of novel surrounding is suppressed by the delivery of mild electric foot shock contingent to quadrant crossing. This model has been demonstrated in several studies to be sensitive to BZDs. BZDs treatment involves an increased of the number of punished passages accepted by mice (Bourin et al. 1992; Griebel et al. 2002; Jones et al. 1994; Klodzinska et al. 2004). The study of the GABA system in the FPT is limited to the utilisation of BZDs. However the GABA system has been more widely studied in others behavioural models of anxiety by the utilisation of GABA_A and GABA_B ligands and others pharmacologic agents (Cryan and Kaupmann 2005; Dalvi and Rodgers 1996). Sasaki et al (2002) report an anxiolytic-like activity of the GABA_A agonist (muscimol) in the mouse EPM (Sasaki et al. 2002). On the other hand, GS39783 a new allosteric positive modulator at GABA_B receptors possessed anxiolytic-like activity in the elevated zero maze in mice (Cryan et al. 2004). An intra-dorsal periaqueductal grey treatment with a GABA_B receptor agonist, baclofen impaired escape in the elevated T maze in rats (Bueno et al. 2005). Several studies have demonstrated that mice deficient in glutamic acid decarboxylase gene, a key enzyme of GABA synthesis, exhibit increased anxiety-like

responses in the auditory-cued fear conditioning paradigm and the elevated zero maze (Kash et al. 1999; Stork et al. 2003). On the other hand, the GABA transaminase inhibitor valproic acid has been found to reduce anxiety in the elevated plus maze (EPM) in mice (Dalvi and Rodgers 1996). Moreover different studies using GABA_B knock out mice had demonstrated interesting results. Mombereau et al report that, in the light/dark box and the staircase test, GABA_{B(1)} -/- and GABA_{B(2)} -/- mice were more anxious than their wild-type (Mombereau et al. 2004a; Mombereau et al. 2005; Mombereau et al. 2004b).

A study carried out in our laboratory has demonstrated the anxiolytic-like activity of SSRIs and SNRIs in the FPT (Bourin et al. 1992; Hascoet et al. 2000). On the other hand, we had also demonstrated the anxiolytic-like activity of 5-HT₂ receptor agonists (BW 723C86, DOI and RO 60-0175) in two mouse models of anxiety the EPM and the FPT, but the 5-HT₂ receptor antagonists had no effect in these tests (Nic Dhonnchadha et al. 2003a). The anxiolytic-like effect of DOI was antagonized by SR 46349B (a specific 5-HT_{2A} receptor antagonist) in the FPT and the EPM (Nic Dhonnchadha et al. 2003a; Nic Dhonnchadha et al. 2003b). The 5-HT_{2A} receptors have been reported to be implicated in the anxiolytic-like mechanism of a SSRI paroxetine and a SNRI venlafaxine in the FPT (Nic Dhonnchadha et al. 2005).

During the last years, the research pushed us to think that the study of a neurotransmitter system is not enough to explain the anxious disorders, and that the possible interaction between different systems must be envisaged. Recent studies of our laboratory have observed a regulation of α_2 -adrenoceptors on the anxiolytic-like activity of DOI (5-HT_{2A/2C} agonist), two SSRIs (paroxetine and citalopram) and two SNRIs (venlafaxine and milnacipran) in the FPT (Masse et al. 2005; Masse et al. 2006). Many electrophysiological and pharmacological studies have observed links between the GABA system and the 5-HT system but inter-

relations of these two systems in anxiety are not clearly demonstrated (Abi-Saab et al. 1999; Forchetti and Meek 1981; Tao et al. 1996).

The purpose of the present study was to examine the effect of DOI and GABA ligands co-administration in the FPT. We have co-administered DOI (5-HT_{2A/2C} receptor agonists) with benzodiazepine receptor agonists (alprazolam and diazepam) and benzodiazepine receptor antagonist (flumazenil), GABA_A receptor agonist (muscimol), GABA_A receptor antagonists (bicuculline and picrotoxin), GABA_B receptor agonist (baclofen) and GABA_B receptor antagonist (CGP35348) in the FPT.

2-MATERIALS AND METHODS

Animals

Male Swiss mice (Janvier, France), weighting on average 20±2g, on the day of the study, were used. These animals were housed in groups of 18 for a minimum of 1 week prior to experiments, at a constant temperature (20°C) and a standard light cycle (lights on between 07:00 and 19:00 h). There was free access to food and water. Mice were used once for each experiment. Mice were allocated randomly to the treatment groups (n=10 or 12). All experiments were conducted in accordance with the ethical rules of the French Ministry of Agriculture for experiments with laboratory animals (No. 87.848).

Drugs

-5-HT₂ receptor agonist: DOI hydrochloride (Sigma, France) (a 5-HT_{2A/2C} receptor agonist)

-benzodiazepine ligands: alprazolam (Sigma, France), diazepam (Sigma, France), flumazenil (Tocris, France)

- GABA_A receptor ligands: muscimol (Sigma, France), picrotoxin (Sigma, France) and bicuculline (Sigma, France)

- GABA_B receptor ligands: baclofen (Sigma, France), CGP 35348 (Sigma, France)

Experimental design

Testing was performed between 09:00 and 13:00 hours. All tests were performed in a quiet room. The mice were kept in this room at least 1 h before the test. After injection (vehicle or treatment), the mice were placed in their holding cage in order to reduce any neophobic response to the test-room environment. The acute administration of GABA ligands was performed 45 min before the test and 30 min before the test for the acute administration of DOI.

Psychopharmacological tests

Actimeter test (Boissier and Simon 1965)

The spontaneous activity of naive animals was recorded using a photoelectric actimeter (OSYS). This apparatus consists of transparent cages from which the animal's activity is measured by light beams connected to a photoelectric cell. The total number of horizontal cage crossings was recorded over a period of 10 min. The actimeter test was performed independently of four-plate test in order to examine the effect of drugs on spontaneous locomotor activity of mice.

Four-Plate Test (FPT) (Aron et al. 1971)

This apparatus (Bioseb, Chaville, France) consist of a cage (25×18×16cm) floored by four identical rectangular plates (11×8 cm) separated from one another by a gap of 4 mm. The plates are connected to a device that can generate electric foot shocks (0.6 mA; 0.5 seconds, s). Following a 15 s habituation period, the animal is subjected to an electric shock when crossing (transition) from one plate to another i.e. two legs on one plate and two legs on

another. The number of punished crossings is calculated for a period of 60 s. An anxiolytic substance is capable of augmenting the number of punished passages accepted by mice.

Statistical analysis

Results were expressed as a mean of the number of counts (\pm SEM) in the actimeter test and the number of punished passages (\pm SEM) for the FPT. For interaction studies a two-way ANOVA (pre-treatment \times treatment) was employed. If the ANOVA showed a significant difference, a Sidak's test was performed to compare the effect of pre-treatment on treatment. The effect of diazepam, included as internal standard in the anxiety model, was compared to the control group via a student's *t* test ($p < 0.05$). All analyses were conducted using the SPSS program for IBM compatible computers.

3-RESULTS

3-1 Effect of the co-administration of DOI and GABA ligands on the spontaneous locomotor activity of mice.

The administration of DOI did not modify the locomotor activity of mice when administered alone excepted for one experiment where we observed that DOI 0.125 mg/kg increased significantly this activity [$F_{(2, 81)} = 5.997; p = 0.004$] ($p = 0.013$ for the *post-hoc* analysis).

There is no significant effect of alprazolam (0.03 and 0.125 mg/kg), diazepam (0.03 and 0.125 mg/kg) and flumazenil (1 and 8 mg/kg) on the locomotor activity of mice in comparison with the control group when administered alone. The co-administration of alprazolam (0.03 and 0.125 mg/kg), diazepam (0.03 and 0.125 mg/kg) and flumazenil (2 and 8 mg/kg) with DOI (0.06, 0.125 or 1 mg/kg) did not modify the locomotor activity in comparison with DOI alone. (Table 1)

There is no significant effect of muscimol (0.06 and 0.25 mg/kg), bicuculline (1 and 8 mg/kg), picrotoxin (0.125 and 0.5 mg/kg) and baclofen (0.25 mg/kg) on the locomotor

activity of mice in comparison with the control group when administered alone. The acute administration of baclofen (1 mg/kg) decreased significantly the locomotor activity of mice when administered alone in comparison with the control group [$F_{(2, 81)} = 14.641$; $p < 0.001$]. The co-administration of muscimol, bicuculline, picrotoxin and baclofen with DOI did not alter the locomotor activity of mice in comparison with DOI alone for all doses. (Table 2)

3-2 Effect of GABA ligands on the DOI action in the FPT

In all interaction studies, an acute administration of diazepam (1 mg/kg), included as internal control, significantly increased the number of punished passages accepted by mice in the FPT.

3-2-1 DOI and benzodiazepine system

DOI (1 mg/kg) increased the number of punished passages accepted by mice in this test ($p < 0.001$) [$F_{(1, 54)} = 144.753$; $p < 0.001$] and DOI (0.06 and 0.25 mg/kg) never increased this parameter ($p > 0.05$) [$F_{(2, 81)} = 12.947$; $p < 0.001$]. Alprazolam (0.03 and 0.125 mg/kg), diazepam (0.03 and 0.125 mg/kg) and flumazenil (2 and 8 mg/kg) did not significantly alter the number of punishment accepted by mice in comparison with the control group ($p > 0.05$ for the *post-hoc* analysis) [$F_{(2, 81)} = 65.913$; $p < 0.001$], [$F_{(2, 81)} = 12.947$; $p < 0.001$] and [$F_{(2, 54)} = 0.198$; $p = 0.821$] respectively.

The co-administration of alprazolam (0.03 and 0.125 mg/kg) and DOI (0.06 and 0.125 mg/kg) increased the number of punished passages accepted by mice ($p < 0.001$) [$F_{(4, 81)} = 7.366$; $p < 0.001$]. It existed an interaction between the pre-treatment (diazepam) and the treatment (DOI) [$F_{(4, 81)} = 4.538$; $p = 0.002$]. Diazepam (0.06 mg/kg) increased but not significantly the number of punished passages when co-administered with DOI (0.06 and 0.125 mg/kg) after a *post-hoc* analysis ($p > 0.05$). Diazepam (0.125 mg/kg) increased the number of punished passages when co-administered with DOI (0.06 mg/kg) ($p < 0.001$) and DOI (0.125 mg/kg) ($p = 0.001$). (Fig 1a and 1b)

The anti-punishment effect of DOI was maintained in the presence of flumazenil [$F_{(2, 54)} = 0.292$; $p = 0.748$]. (Table 3)

3-2-2 DOI and GABA_A receptors

3-2-2-1 Effects of muscimol in co-administration with the sub-active doses of DOI

DOI (0.06 and 0.125 mg/kg) and muscimol (0.06 and 0.25), when administered alone, did not modify the number of punished passages in comparison with the control group ($p > 0.05$ for a *post-hoc* analysis) [$F_{(2, 81)} = 8.666$; $p < 0.001$] and [$F_{(2, 81)} = 8.184$; $p < 0.001$]. Statistical analysis indicated an interaction between the pre-treatment (muscimol) and the treatment (DOI) [$F_{(4, 81)} = 2.658$; $p = 0.039$]. The co-administration of muscimol (0.06 and 0.25 mg/kg) with DOI (0.06 mg/kg) and muscimol (0.06 mg/kg) with DOI (0.125 mg/kg) did not alter the number of punished passages accepted by mice ($p > 0.05$ for a *post-hoc* analysis). Muscimol (0.25 mg/kg) induced a significant anti-punishment activity when was co-administered with DOI (0.125 mg/kg) ($p = 0.007$). (Table 4)

3-2-2-2 Effects of bicuculline on the anti-punishment action of DOI

DOI (1 and 2 mg/kg) significantly increased the number of punished passages accepted by mice ($p < 0.5$) [$F_{(2, 81)} = 38.213$; $p < 0.001$]. Bicuculline (1 and 8 mg/kg) did not modify the number of punished passages in comparison with the control group after a *post-hoc* analysis ($p > 0.5$) [$F_{(2, 81)} = 9.205$; $p < 0.001$]. There is a significant interaction between bicuculline and DOI when they were co-administered [$F_{(4, 81)} = 2.844$; $p = 0.029$]. Bicuculline decreased significantly the anti-punishment action of DOI (1mg/kg) at the dose of 1 mg/kg ($p = 0.022$) and DOI (2 mg/kg) at the dose of 8 mg/kg ($p = 0.006$). (Fig 2)

3-2-2-3 Effects of picrotoxin on the anti-punishment action of DOI

DOI (1 and 2 mg/kg) significantly increased the number of punished passages accepted by mice ($p < 0.5$) [$F_{(2, 81)} = 46.365$; $p < 0.001$]. Picrotoxin (0.125 and 0.5 mg/kg) did not modify the number of punished passages in comparison with the control group ($p > 0.05$ for a *post-hoc*

analysis) [$F_{(2, 81)} = 8.699$; $p < 0.001$]. No significant change was observed when picrotoxin (0.5 mg/kg) was co-administered with DOI (1 and 2 mg/kg) ($p > 0.05$). Picrotoxin (0.125 mg/kg) significantly decreased the anti-punishment action of DOI (1 and 2 mg/kg) ($p = 0.046$ and $p = 0.014$ respectively) [$F_{(4, 81)} = 2.751$; $p = 0.034$]. (Fig 3)

3-2-3 DOI and GABA_B receptor ligands

3-2-3-1 Effects of baclofen on the anti-punishment action of DOI

DOI (1 mg/kg) significantly increased the number of punished passages accepted by mice ($p < 0.05$) [$F_{(1, 54)} = 66.004$; $p < 0.001$] and baclofen (0.25 and 1 mg/kg) did not modify the number of punished passages in comparison with the control group ($p > 0.05$ for a *post-hoc* analysis) [$F_{(1, 54)} = 14.478$; $p < 0.001$]. Baclofen (0.25 and 1 mg/kg) significantly decreased the anti-punishment action of DOI (1 mg/kg) ($p < 0.001$) [$F_{(2, 54)} = 17.714$; $p < 0.001$]. DOI (2 mg/kg) significantly increased the number of punishments accepted by mice ($p < 0.05$) [$F_{(1, 54)} = 103.765$; $p < 0.001$] and baclofen (0.25 and 1 mg/kg) did not modify the number of punished passages in comparison with the control group ($p > 0.05$ for a *post-hoc* analysis) [$F_{(1, 54)} = 9.455$; $p < 0.001$]. Baclofen (0.25 and 1 mg/kg) significantly decreased the anti-punishment action of DOI (2 mg/kg) ($p = 0.016$ and $p < 0.001$) [$F_{(2, 54)} = 9.786$; $p < 0.001$]. (Fig 4a and 4b)

3-2-2-2 Effects of CGP35348 in co-administration with a sub-active dose of DOI

DOI (0.125 mg/kg) and CGP 35348 (200 mg/kg) did not modify the number of punished passages accepted by mice [$F_{(1, 36)} = 0.503$; $p = 0.483$] and [$F_{(1, 36)} = 0.126$; $p = 0.725$]. There is no significant interaction between CGP 35348 (200 mg/kg) and DOI (0.125 mg/kg) in the FPT [$F_{(1, 36)} < 0.001$; $p = 1.000$]. (Table 5)

DISCUSSION

The purpose of the present study was to analyse the activity of GABAergic ligands on the anxiolytic-like effect of DOI (a 5-HT_{2A/2C} agonist) in the FPT. In this study, subactive doses of

DOI were significantly potentiated by alprazolam and diazepam (two benzodiazepine receptor agonists) but flumazenil (a benzodiazepine receptor antagonist) did not modify its activity. Muscimol (a GABA_A receptor agonist) potentiated DOI while picrotoxin and bicuculline (two GABA_A receptor antagonists) inhibited the anxiolytic-like effect induced by DOI. The administration of baclofen (a GABA_B receptor agonist) induced an inhibitory effect on the anxiolytic-like activity of DOI in the FPT. However the CGP 35348 (a GABA_B receptor antagonist) did not modify the effect of DOI in this test. The study of the spontaneous locomotor activity demonstrated that there is no modification in comparison with control group when co-administered the GABA ligands and DOI. Thus, the effects obtained in the FPT are anxiety-like effects and not psychostimulant or sedative effects. In addition, a precedent study has demonstrated that there is no relation between anti-nociceptive effect in the hot-plate test and anxiolytic-like effect in the FPT in mice (Ripoll et al. 2006).

All these results indicated that the GABA_A system might be implicated in the anxiolytic-like mechanism of the DOI in the FPT although the blockage of benzodiazepine site of GABA_A receptors by flumazenil did not prevent the effect of DOI in the FPT.

The inter-relations that exist between the GABA system and 5-HT₂ receptors have been weakly studied. The co-localisation of 5-HT₂ receptors and GABA neurons have been demonstrated in different structures of the brain such as periaqueductal gray and prefrontal cortex (Griffiths and Lovick 2002; Santana et al. 2004; Stamp and Semba 1995). The presence of 5-HT₂ receptors has also been proved in others structures that are rich of GABA neurons like hippocampus and amygdala (Luttgen et al. 2004; Pompeiano et al. 1994). On the other hand, GABA_A and GABA_B complex receptors have been located on serotonergic neurons (Gao et al. 1993; Mennini et al. 1986; Varga et al. 2002; Wirtshafter and Sheppard 2001).

The use of methods such as local infusions or *in vitro* study has allowed a better characterisation of the inter-relations occurring between 5-HT₂ receptors and GABA system. Local infusion of DOI in prefrontal cortex increased cortical extracellular GABA levels and systemic DOI administration resulted in Fos protein expression in glutamic acid decarboxylase₆₇-immunoreactive inter-neurons of the prefrontal cortex (PFC). The authors of this study suggested that the activation of 5-HT₂ receptors stimulated GABAergic inter-neurons in the prefrontal cortex (Abi-Saab et al. 1999). Moreover, other studies have demonstrated the same activation of DOI on GABA neurons in other structures of the brain such as amygdala, locus coeruleus, hippocampus (Chiang and Aston-Jones 1993; Rainnie 1999; Shen and Andrade 1998). An electrophysiology study has observed that the administration of 5-HT_{2A} antagonists MDL 100.907 and ritanserin inhibited the spontaneous potassium-stimulated GABA release in rat prefrontal cortex (Cozzi and Nichols 1996). Whereas an *in vitro* study on rat slices demonstrated that the application of serotonin produced a reduction of postsynaptic GABA_A receptor currents in PFC pyramidal neurons. The serotonergic modulation of GABA-evoked currents was mimicked by 5-HT₂ agonist and blocked by 5-HT₂ antagonist. These results show that the activation of 5-HT₂ receptor in prefrontal cortex pyramidal neurons inhibits GABA_A currents (Feng et al. 2001).

On the other hand, the injection in rat median raphe nucleus of the GABA_A antagonists picrotoxin and bicuculline increased the 5-HT turnover in hippocampus while the GABA_A agonist muscimol decreased the 5-HT turnover (Forchetti and Meek 1981). A microdialysis study demonstrated that the infusion of a GABA_A receptor agonist muscimol and a GABA_B receptor agonist baclofen into the dorsal raphe nucleus (DRN) decreased 5-HT whereas a GABA_A receptor antagonist bicuculline increased 5-HT and a GABA_B receptor antagonist phaclofen had no effect on the 5-HT (Tao et al. 1996).

The results obtained in the present study did not seem to be in accordance with an activation of the GABA_A receptors in the raphe nucleus as the GABA_A agonist potentiated and did not inhibit the effect of DOI in the FPT. Moreover, we have demonstrated that the depletion of 5-HT neurons, using *p*-CPA, did not affect the anxiolytic-like effect of DOI (Masse et al. 2006). Then, the 5-HT neurons are not implicated in the mechanisms cascade inducing the anxiolytic-like effect of DOI in the FPT. One possible hypothesis of these results might implicate the activation of 5-HT₂ receptors present on the GABA neurons by DOI resulting in an increase of GABA release by this activation. This hypothesis might explain that flumazenil did not modify the DOI effect in the FPT while diazepam and alprazolam increased it.

The acute administration of GABA_B receptor agonist and antagonist per se did not modify the activity of mice in the FPT. These results are not in accordance with others behavioural studies that demonstrated an anxiolytic-like effect of a GABA_B receptor positive modulator (GS39783) in rat elevated plus maze and elevated zero maze in rats and mice (Cryan et al. 2004) and baclofen an GABA_B agonist in conflict behaviour of Geller-Seifter test, Vogel's conflict test in rat and on the ultrasonic calling of mouse pups (Ketelaars et al. 1988; Nastiti et al. 1991; Shephard et al. 1992). On the other hand, Andrews and File (1993) have observed that the anxiogenic response detected on rat withdrawn from chronic diazepam treatment was reversed by the GABA_B receptor agonist baclofen and others drugs reducing the 5-HT function such as buspirone a 5-HT_{1A} receptor agonist, zacopride a 5-HT₃ receptor antagonist and tianeptine which increase 5-HT uptake (Andrews and File 1993).

On the other hand, the results of the present study demonstrated that an agonist of GABA_B receptors reduced the anxiolytic-like effect of DOI in the FPT when an antagonist of GABA_B receptor did not modify it. The GABA_B receptors exert an inhibitory function in the central nervous system. The activation of these receptors involves a reduction of neuronal excitability

by increasing potassium conductance postsynaptically and reduces neurotransmitter release by inhibiting calcium conductance presynaptically (Kaupmann et al. 1998; Olpe et al. 1993; Otis et al. 1993; Pfrieger et al. 1994; Scholz and Miller 1991) resulting in an inhibitory effect of the GABA_B receptors on the GABA release. Moreover, the GABA_B receptors are expressed in abundance in the hippocampus where their activation induced an auto-inhibition of the GABA release (Nicoll 2004; Thompson and Gahwiler 1992; Wu and Saggau 1995). The expression of 5-HT₂ receptors is also important in this brain structure (Lopez-Gimenez et al. 2001; Pazos et al. 1985; Xu and Pandey 2000). At the sight of these data, we can suppose a competitive effect of 5-HT₂ and GABA_B receptors on the GABA release.

In conclusion, the present study demonstrated an important effect of GABA system in the DOI mechanism of action. The results obtained by the co-administration of DOI with GABA_A ligands did not seem implicated the raphe nucleus but rather a corticolimbic structure such as hippocampus, prefrontal cortex or amygdala. The effect of the co-administration of DOI with GABA_B ligands can be explained by a co-localization of 5-HT₂ and GABA_B receptors on GABA neurons.

REFERENCES

- Abi-Saab WM, Bubser M, Roth RH, Deutch AY (1999) 5-HT₂ receptor regulation of extracellular GABA levels in the prefrontal cortex. *Neuropsychopharmacology* 20: 92-96
- Andrews N, File SE (1993) Increased 5-HT release mediates the anxiogenic response during benzodiazepine withdrawal: a review of supporting neurochemical and behavioural evidence. *Psychopharmacology (Berl)* 112: 21-25
- Aron C, Simon P, Larousse C, Boissier JR (1971) Evaluation of a rapid technique for detecting minor tranquilizers. *Neuropharmacology* 10: 459-469

- Boissier JR, Simon P (1965) [Action of caffeine on the spontaneous motility of the mouse].
Arch Int Pharmacodyn Ther 158: 212-221
- Bourin M, Hascoet M, Mansouri B, Colombel MC, Bradwejn J (1992) Comparison of behavioral effects after single and repeated administrations of four benzodiazepines in three mice behavioral models. J Psychiatry Neurosci 17: 72-77
- Bueno CH, Zangrossi H, Jr., Nogueira RL, Soares VP, Viana MB (2005) Panicolytic-like effect induced by the stimulation of GABAA and GABAB receptors in the dorsal periaqueductal grey of rats. Eur J Pharmacol 516: 239-246
- Chiang C, Aston-Jones G (1993) A 5-hydroxytryptamine₂ agonist augments gamma-aminobutyric acid and excitatory amino acid inputs to noradrenergic locus coeruleus neurons. Neuroscience 54: 409-420
- Cozzi NV, Nichols DE (1996) 5-HT_{2A} receptor antagonists inhibit potassium-stimulated gamma-aminobutyric acid release in rat frontal cortex. Eur J Pharmacol 309: 25-31
- Cryan JF, Kaupmann K (2005) Don't worry 'B' happy!: a role for GABA(B) receptors in anxiety and depression. Trends Pharmacol Sci 26: 36-43
- Cryan JF, Kelly PH, Chaperon F, Gentsch C, Mombereau C, Lingenhoehl K, Froestl W, Bettler B, Kaupmann K, Spooren WP (2004) Behavioral characterization of the novel GABAB receptor-positive modulator GS39783 (N,N'-dicyclopentyl-2-methylsulfanyl-5-nitro-pyrimidine-4,6-diamine): anxiolytic-like activity without side effects associated with baclofen or benzodiazepines. J Pharmacol Exp Ther 310: 952-963
- Dalvi A, Rodgers RJ (1996) GABAergic influences on plus-maze behaviour in mice. Psychopharmacology (Berl) 128: 380-397
- Feng J, Cai X, Zhao J, Yan Z (2001) Serotonin receptors modulate GABA(A) receptor channels through activation of anchored protein kinase C in prefrontal cortical neurons. J Neurosci 21: 6502-6511

- Forchetti CM, Meek JL (1981) Evidence for a tonic GABAergic control of serotonin neurons in the median raphe nucleus. *Brain Res* 206: 208-212
- Gao B, Fritschy JM, Benke D, Mohler H (1993) Neuron-specific expression of GABA_A-receptor subtypes: differential association of the alpha 1- and alpha 3-subunits with serotonergic and GABAergic neurons. *Neuroscience* 54: 881-892
- Griebel G, Simiand J, Steinberg R, Jung M, Gully D, Roger P, Geslin M, Scatton B, Maffrand JP, Soubrie P (2002) 4-(2-Chloro-4-methoxy-5-methylphenyl)-N-[(1S)-2-cyclopropyl-1-(3-fluoro-4-methylphenyl)ethyl]5-methyl-N-(2-propynyl)-1,3-thiazol-2-amine hydrochloride (SSR125543A), a potent and selective corticotrophin-releasing factor(1) receptor antagonist. II. Characterization in rodent models of stress-related disorders. *J Pharmacol Exp Ther* 301: 333-345
- Griffiths JL, Lovick TA (2002) Co-localization of 5-HT 2A -receptor- and GABA-immunoreactivity in neurones in the periaqueductal grey matter of the rat. *Neurosci Lett* 326: 151-154
- Hascoet M, Bourin M, Colombel MC, Fiocco AJ, Baker GB (2000) Anxiolytic-like effects of antidepressants after acute administration in a four-plate test in mice. *Pharmacol Biochem Behav* 65: 339-344
- Jones GH, Schneider C, Schneider HH, Seidler J, Cole BJ, Stephens DN (1994) Comparison of several benzodiazepine receptor ligands in two models of anxiolytic activity in the mouse: an analysis based on fractional receptor occupancies. *Psychopharmacology (Berl)* 114: 191-199
- Kash SF, Tecott LH, Hodge C, Baekkeskov S (1999) Increased anxiety and altered responses to anxiolytics in mice deficient in the 65-kDa isoform of glutamic acid decarboxylase. *Proc Natl Acad Sci U S A* 96: 1698-1703

- Kaupmann K, Schuler V, Mosbacher J, Bischoff S, Bittiger H, Heid J, Froestl W, Leonhard S, Pfaff T, Karschin A, Bettler B (1998) Human gamma-aminobutyric acid type B receptors are differentially expressed and regulate inwardly rectifying K⁺ channels. *Proc Natl Acad Sci U S A* 95: 14991-14996
- Ketelaars CE, Bollen EL, Rigter H, Bruinvels J (1988) GABA-B receptor activation and conflict behaviour. *Life Sci* 42: 933-942
- Klodzinska A, Tatarczynska E, Chojnacka-Wojcik E, Nowak G, Cosford ND, Pilc A (2004) Anxiolytic-like effects of MTEP, a potent and selective mGlu5 receptor agonist does not involve GABA(A) signaling. *Neuropharmacology* 47: 342-350
- Kulkarni SK, Sharma K (1993) Alprazolam modifies animal behaviour on elevated plus-maze. *Indian J Exp Biol* 31: 908-911
- Lopez-Gimenez JF, Vilaro MT, Palacios JM, Mengod G (2001) Mapping of 5-HT_{2A} receptors and their mRNA in monkey brain: [³H]MDL100,907 autoradiography and in situ hybridization studies. *J Comp Neurol* 429: 571-589
- Luttgen M, Ove Ogren S, Meister B (2004) Chemical identity of 5-HT_{2A} receptor immunoreactive neurons of the rat septal complex and dorsal hippocampus. *Brain Res* 1010: 156-165
- Masse F, Hascoet M, Bourin M (2005) alpha₂-Adrenergic agonists antagonise the anxiolytic-like effect of antidepressants in the four-plate test in mice. *Behav Brain Res* 164: 17-28
- Masse F, Hascoet M, Dailly E, Bourin M (2006) Effect of noradrenergic system on the anxiolytic-like effect of DOI (5-HT_{2A/2C} agonists) in the four-plate test. *Psychopharmacology (Berl)* 183: 471-481
- Mennini T, Gobbi M, Romandini S (1986) Localization of GABA_A and GABA_B receptor subtypes on serotonergic neurons. *Brain Res* 371: 372-375

- Mombereau C, Kaupmann K, Froestl W, Sansig G, van der Putten H, Cryan JF (2004a) Genetic and pharmacological evidence of a role for GABA(B) receptors in the modulation of anxiety- and antidepressant-like behavior. *Neuropsychopharmacology* 29: 1050-1062
- Mombereau C, Kaupmann K, Gassmann M, Bettler B, van der Putten H, Cryan JF (2005) Altered anxiety and depression-related behaviour in mice lacking GABAB(2) receptor subunits. *Neuroreport* 16: 307-310
- Mombereau C, Kaupmann K, van der Putten H, Cryan JF (2004b) Altered response to benzodiazepine anxiolytics in mice lacking GABA B(1) receptors. *Eur J Pharmacol* 497: 119-120
- Nastiti K, Benton D, Brain PF (1991) The effects of compounds acting at the benzodiazepine receptor complex on the ultrasonic calling of mouse pups. *Behav Pharmacol* 2: 121-128
- Nic Dhonnchadha BA, Bourin M, Hascoet M (2003a) Anxiolytic-like effects of 5-HT2 ligands on three mouse models of anxiety. *Behav Brain Res* 140: 203-214
- Nic Dhonnchadha BA, Hascoet M, Jolliet P, Bourin M (2003b) Evidence for a 5-HT2A receptor mode of action in the anxiolytic-like properties of DOI in mice. *Behav Brain Res* 147: 175-184
- Nic Dhonnchadha BA, Ripoll N, Clenet F, Hascoet M, Bourin M (2005) Implication of 5-HT2 receptor subtypes in the mechanism of action of antidepressants in the four plates test. *Psychopharmacology (Berl)* 179: 418-429
- Nicoll RA (2004) My close encounter with GABA(B) receptors. *Biochem Pharmacol* 68: 1667-1674
- Olpe HR, Worner W, Ferrat T (1993) Stimulation parameters determine role of GABAB receptors in long-term potentiation. *Experientia* 49: 542-546

- Otis TS, De Koninck Y, Mody I (1993) Characterization of synaptically elicited GABAB responses using patch-clamp recordings in rat hippocampal slices. *J Physiol* 463: 391-407
- Pazos A, Cortes R, Palacios JM (1985) Quantitative autoradiographic mapping of serotonin receptors in the rat brain. II. Serotonin-2 receptors. *Brain Res* 346: 231-249
- Pfriefer FW, Gottmann K, Lux HD (1994) Kinetics of GABAB receptor-mediated inhibition of calcium currents and excitatory synaptic transmission in hippocampal neurons in vitro. *Neuron* 12: 97-107
- Pompeiano M, Palacios JM, Mengod G (1994) Distribution of the serotonin 5-HT₂ receptor family mRNAs: comparison between 5-HT_{2A} and 5-HT_{2C} receptors. *Brain Res Mol Brain Res* 23: 163-178
- Rainnie DG (1999) Serotonergic modulation of neurotransmission in the rat basolateral amygdala. *J Neurophysiol* 82: 69-85
- Ripoll N, Hascoet M, Bourin M (2006) The four-plates test: Anxiolytic or analgesic paradigm? *Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry* 30: 873-880
- Santana N, Bortolozzi A, Serrats J, Mengod G, Artigas F (2004) Expression of serotonin_{1A} and serotonin_{2A} receptors in pyramidal and GABAergic neurons of the rat prefrontal cortex. *Cereb Cortex* 14: 1100-1109
- Sasaki K, Fan LW, Tien LT, Ma T, Loh HH, Ho IK (2002) The interaction of morphine and gamma-aminobutyric acid (GABA)ergic systems in anxiolytic behavior: using mu-opioid receptor knockout mice. *Brain Res Bull* 57: 689-694
- Scholz KP, Miller RJ (1991) GABAB receptor-mediated inhibition of Ca²⁺ currents and synaptic transmission in cultured rat hippocampal neurones. *J Physiol* 444: 669-686
- Shen RY, Andrade R (1998) 5-Hydroxytryptamine₂ receptor facilitates GABAergic neurotransmission in rat hippocampus. *J Pharmacol Exp Ther* 285: 805-812

- Shephard RA, Wedlock P, Wilson NE (1992) Direct evidence for mediation of an anticonflict effect of baclofen by GABA_B receptors. *Pharmacol Biochem Behav* 41: 651-653
- Stamp JA, Semba K (1995) Extent of colocalization of serotonin and GABA in the neurons of the rat raphe nuclei. *Brain Res* 677: 39-49
- Stefanski R, Palejko W, Kostowski W, Plaznik A (1992) The comparison of benzodiazepine derivatives and serotonergic agonists and antagonists in two animal models of anxiety. *Neuropharmacology* 31: 1251-1258
- Stork O, Yamanaka H, Stork S, Kume N, Obata K (2003) Altered conditioned fear behavior in glutamate decarboxylase 65 null mutant mice. *Genes Brain Behav* 2: 65-70
- Tao R, Ma Z, Auerbach SB (1996) Differential regulation of 5-hydroxytryptamine release by GABA_A and GABA_B receptors in midbrain raphe nuclei and forebrain of rats. *Br J Pharmacol* 119: 1375-1384
- Thompson SM, Gahwiler BH (1992) Comparison of the actions of baclofen at pre- and postsynaptic receptors in the rat hippocampus in vitro. *J Physiol* 451: 329-345
- Varga V, Sik A, Freund TF, Kocsis B (2002) GABA(B) receptors in the median raphe nucleus: distribution and role in the serotonergic control of hippocampal activity. *Neuroscience* 109: 119-132
- Wirtshafter D, Sheppard AC (2001) Localization of GABA(B) receptors in midbrain monoamine containing neurons in the rat. *Brain Res Bull* 56: 1-5
- Wu LG, Saggau P (1995) GABA_B receptor-mediated presynaptic inhibition in guinea-pig hippocampus is caused by reduction of presynaptic Ca²⁺ influx. *J Physiol* 485 (Pt 3): 649-657
- Xu T, Pandey SC (2000) Cellular localization of serotonin(2A) (5HT(2A)) receptors in the rat brain. *Brain Res Bull* 51: 499-505

LEGENDS:

Fig.1 (a) Effects of acute administration of alprazolam (0.03 and 0.125 mg/kg), i.p. 45 min before the test, and DOI (0.06 and 0.125 mg/kg), i.p. 30 min before the test in the FPT. (b) Effects of acute administration of diazepam (0.03 and 0.125 mg/kg), i.p. 45 min before the test, and DOI (0.06 and 0.125 mg/kg), i.p. 30 min before the test in the FPT. These results are cited as mean \pm SEM (n=10). Statistical analysis was performed by a two-way ANOVA followed by a Sidak test ($^{+++}p < 0.001$ vs vehicle + DOI group). A Student's *t* test was used for statistical analysis between the diazepam group and control group ($^{@@@}p < 0.001$).

Fig.2 Effects of acute administration of bicuculline (1 and 8 mg/kg), i.p. 45 min before the test, and DOI (1 and 2 mg/kg), i.p. 30 min before the test in the FPT. These results are cited as mean \pm SEM (n=10). Statistical analysis was performed by a two-way ANOVA followed by a Sidak test ($^{***}p < 0.001$ vs control group and $^{+++}p < 0.001$ vs vehicle + DOI group). A Student's *t* test was used for statistical analysis between the diazepam group and control group ($^{@@@}p < 0.001$).

Fig.3 Effects of acute administration of picrotoxin (0.125 and 0.5 mg/kg), i.p. 45 min before the test, and DOI (1 and 2 mg/kg), i.p. 30 min before the test in the FPT. These results are cited as mean \pm SEM (n=10). Statistical analysis was performed by a two-way ANOVA followed by a Sidak test ($^{***}p < 0.001$ vs control group and $^{+++}p < 0.001$ vs vehicle + DOI group). A Student's *t* test was used for statistical analysis between the diazepam group and control group ($^{@@@}p < 0.001$).

Fig.4 (a) Effects of acute administration of baclofen (0.25 and 1 mg/kg), i.p. 45 min before the test, and DOI (1 mg/kg), i.p. 30 min before the test in the FPT. (b) Effects of acute administration of baclofen (0.25 and 1 mg/kg), i.p. 45 min before the test, and DOI (2 mg/kg), i.p. 30 min before the test in the FPT. These results are cited as mean \pm SEM (n=10). Statistical analysis was performed by a two-way ANOVA followed by a Sidak test ($^{***}p < 0.001$ vs control group and $^{+}p < 0.05$, $^{+++}p < 0.001$ vs vehicle + DOI group). A Student's *t* test was used for statistical analysis between the diazepam group and control group ($^{@@@}p < 0.001$).

Tables 1: Effect of co-administration of benzodiazepine ligands; i.p 45 min before the test, and the DOI; 30 min before the test, in the actimeter test. All data are cited as means \pm SEM, (n=10). Statistical analysis was performed by two-way ANOVA followed by a Sidak test for comparisons.

| Treatment 1 mg/kg | Treatment 2 mg/kg | Horizontal activity (counts) |
|----------------------|----------------------|---------------------------------|
| Vehicle | Vehicle | 143.1 \pm 7.1 |
| Alpraz 0.03 | Vehicle | 134.9 \pm 10 |
| Alpraz 0.125 | Vehicle | 169.8 \pm 8.4 |
| Vehicle | DOI 0.06 | 143.9 \pm 5.7 |
| Alpraz 0.03 | DOI 0.06 | 154.6 \pm 8.5 |
| Alpraz 0.125 | DOI 0.06 | 180.0 \pm 10.3 |
| Vehicle | DOI 0.125 | 149.2 \pm 7.2 |
| Alpraz 0.03 | DOI 0.125 | 163.8 \pm 6.9 |
| Alpraz 0.125 | DOI 0.125 | 168.3 \pm 6.5 |
| Vehicle | Vehicle | 143.1 \pm 7.1 |
| Diaz 0.03 | Vehicle | 161.5 \pm 7.0 |
| Diaz 0.125 | Vehicle | 151.1 \pm 8.6 |
| Vehicle | DOI 0.06 | 143.9 \pm 5.7 |
| Diaz 0.03 | DOI 0.06 | 136.1 \pm 6.9 |
| Diaz 0.125 | DOI 0.06 | 145.2 \pm 7.1 |
| Vehicle | DOI 0.125 | 149.2 \pm 7.2 |
| Diaz 0.03 | DOI 0.125 | 137.8 \pm 4.4 |
| Diaz 0.125 | DOI 0.125 | 144.8 \pm 9.9 |
| Vehicle | Vehicle | 167.1 \pm 5.2 |
| Flumaz 2 | Vehicle | 166.7 \pm 14.6 |
| Flumaz 8 | Vehicle | 150.3 \pm 13.7 |
| Vehicle | DOI 1 | 171.7 \pm 6.8 |
| Flumaz 2 | DOI 1 | 135.9 \pm 8.4 |
| Flumaz 8 | DOI 1 | 151.5 \pm 9.1 |

Tables 2: Effect of co-administration of GABA ligands; i.p 45 min before the test, and the DOI; 30 min before the test, in the actimeter test. All data are cited as means \pm SEM, (n=10). Statistical analysis was performed by two-way ANOVA followed by a Sidak test for comparisons [* ($p<0.05$), *** ($p<0.001$), versus control group].

| Treatment 1 mg/kg | Treatment 2 mg/kg | Horizontal activity (counts) |
|----------------------|----------------------|--------------------------------------|
| Vehicle | Vehicle | 155.3 \pm 6.5 |
| Musci 0.06 | Vehicle | 141.6 \pm 6.0 |
| Musci 0.25 | Vehicle | 149.0 \pm 9.8 |
| Vehicle | DOI 0.06 | 147.5 \pm 10.4 |
| Musci 0.06 | DOI 0.06 | 147.9 \pm 9.5 |
| Musci 0.25 | DOI 0.06 | 128.1 \pm 6.1 |
| Vehicle | DOI 0.125 | 186.4 \pm 11.8 * |
| Musci 0.06 | DOI 0.125 | 157.1 \pm 8.9 |
| Musci 0.25 | DOI 0.125 | 151.4 \pm 6.0 |
| Vehicle | Vehicle | 120.2 \pm 5.9 |
| Bicu 1 | Vehicle | 116.9 \pm 6.0 |
| Bicu 8 | Vehicle | 128.8 \pm 7.1 |
| Vehicle | DOI 1 | 132.7 \pm 6.5 |
| Bicu 1 | DOI 1 | 122.1 \pm 6.4 |
| Bicu 8 | DOI 1 | 125.0 \pm 7.3 |
| Vehicle | DOI 2 | 133.1 \pm 9.0 |
| Bicu 1 | DOI 2 | 116.3 \pm 3.0 |
| Bicu 8 | DOI 2 | 116.7 \pm 5.3 |
| Vehicle | Vehicle | 120.2 \pm 5.9 |
| Picro 0.125 | Vehicle | 141.7 \pm 6.6 |
| Picro 0.5 | Vehicle | 113.0 \pm 8.4 |
| Vehicle | DOI 1 | 132.7 \pm 6.5 |
| Picro 0.125 | DOI 1 | 120.1 \pm 5.9 |
| Picro 0.5 | DOI 1 | 128.1 \pm 7.3 |
| Vehicle | DOI 2 | 133.1 \pm 9.0 |
| Picro 0.125 | DOI 2 | 107.2 \pm 5.0 |
| Picro 0.5 | DOI 2 | 122.8 \pm 6.9 |
| Vehicle | Vehicle | 125.4 \pm 4.9 |
| Baclo 0.25 | Vehicle | 114.1 \pm 6.6 |
| Baclo 1 | Vehicle | 84.7 \pm 8.0*** |
| Vehicle | DOI 1 | 127.5 \pm 3.0 |
| Baclo 0.25 | DOI 1 | 124.8 \pm 5.7 |
| Baclo 1 | DOI 1 | 116.4 \pm 6.9 |
| Vehicle | DOI 2 | 129.3 \pm 6.4 |
| Baclo 0.25 | DOI 2 | 126.6 \pm 5.4 |
| Baclo 1 | DOI 2 | 107.1 \pm 4.3 |

Tables 3: Effects of co-administration of flumazenil; i.p 45 min before the test, and DOI, i.p 30 min before the test, in the FPT. All data are cited as means \pm SEM, (n=10). Statistical analysis was performed by two-way ANOVA followed by a Sidak test for comparisons. A student's *t*-test was used for statistical analysis between diazepam group and control group: @@@ ($p < 0.001$).

| Treatment 1 mg/kg | Treatment 2 mg/kg | Number of punished passages |
|----------------------|----------------------|--------------------------------------|
| Vehicle | Vehicle | 4.2 \pm 0.33 |
| Vehicle | Diaz 1 | 8.5 \pm 0.67 @@@ |
| Flumazenil 2 | Vehicle | 4.1 \pm 0.31 |
| Flumazenil 8 | Vehicle | 4.1 \pm 0.18 |
| Vehicle | DOI 1 | 8.1 \pm 0.60 |
| Flumazenil 2 | DOI 1 | 8.6 \pm 0.34 |
| Flumazenil 8 | DOI 1 | 8.1 \pm 0.59 |

Tables 4: Effects of co-administration of muscimol; i.p 45 min before the test, and DOI, i.p 30 min before the test, in the FPT. All data are cited as means \pm SEM, (n=10). Statistical analysis was performed by two-way ANOVA followed by a Sidak test for comparisons [++ ($p < 0.01$), versus appropriate control group]. A student's t -test was used for statistical analysis between diazepam group and control group: @@@ ($p < 0.001$).

| Treatment 1 mg/kg | Treatment 2 mg/kg | Number of punished passages |
|----------------------|----------------------|--------------------------------------|
| Vehicle | Vehicle | 4.7 \pm 0.3 |
| Vehicle | Diaz 1 | 8.7 \pm 0.47 @@@ |
| Muscimol 0.06 | Vehicle | 4.2 \pm 0.29 |
| Muscimol 0.25 | Vehicle | 4.9 \pm 0.23 |
| Vehicle | DOI 0.06 | 4.1 \pm 0.38 |
| Muscimol 0.06 | DOI 0.06 | 5.6 \pm 0.43 |
| Muscimol 0.25 | DOI 0.06 | 5.8 \pm 0.51 |
| Vehicle | DOI 0.125 | 5.0 \pm 0.33 |
| Muscimol 0.06 | DOI 0.125 | 5.6 \pm 0.48 |
| Muscimol 0.25 | DOI 0.125 | 7.3 \pm 0.63++ |

Table 5: Effects of co-administration of CGP 35348; i.p 45 min before the test, and DOI, i.p 30 min before the test, in the FPT. All data are cited as means \pm SEM, (n=10). Statistical analysis was performed by two-way ANOVA followed by a Sidak test for comparisons. A student's *t*-test was used for statistical analysis between diazepam group and control group: @@@ ($p < 0.001$).

| Treatment 1 mg/kg | Treatment 2 mg/kg | Number of punished passages |
|----------------------|----------------------|--|
| Vehicle | Vehicle | 4.5 \pm 0.27 |
| Vehicle | Diaz 1 | 10.10 \pm 0.38 @@@ |
| CGP35348 200 | Vehicle | 4.60 \pm 0.22 |
| Vehicle | DOI 0.125 | 4.70 \pm 0.30 |
| CGP35348 200 | DOI 0.125 | 4.80 \pm 0.33 |

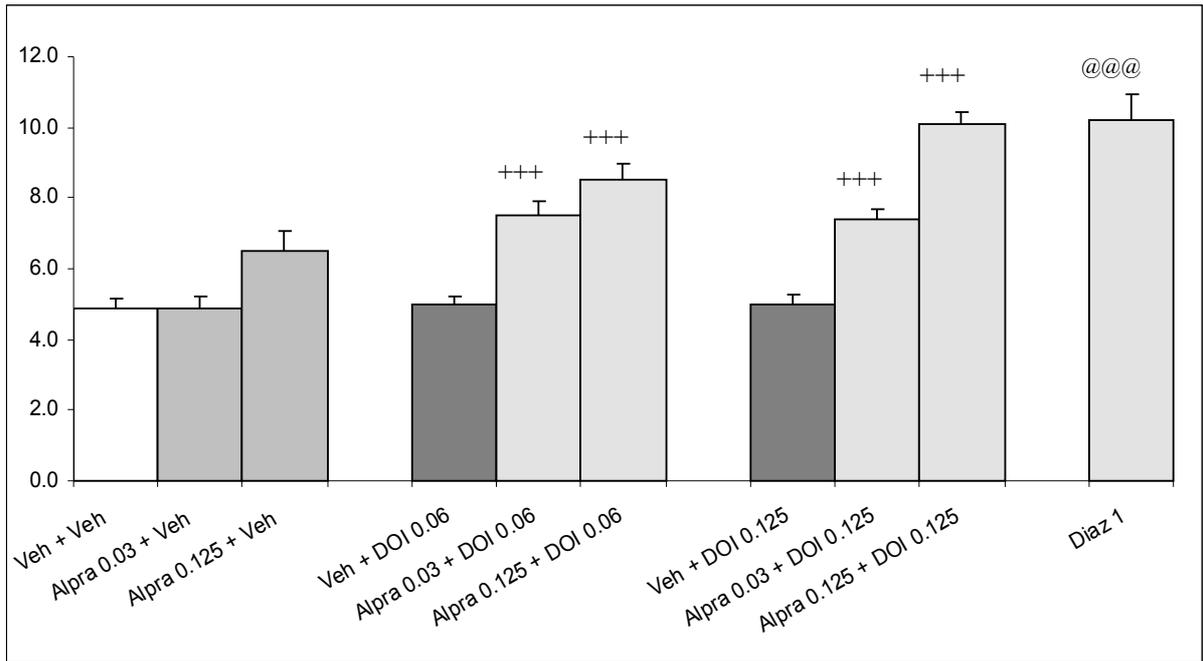


Figure 1a

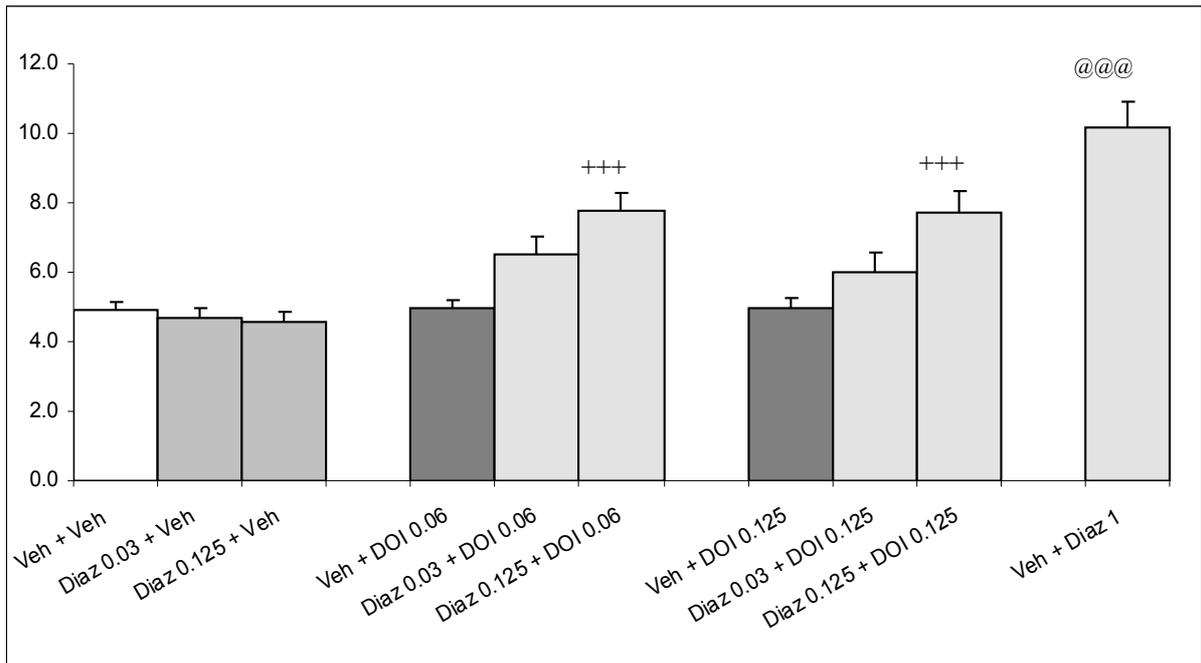


Figure 1b

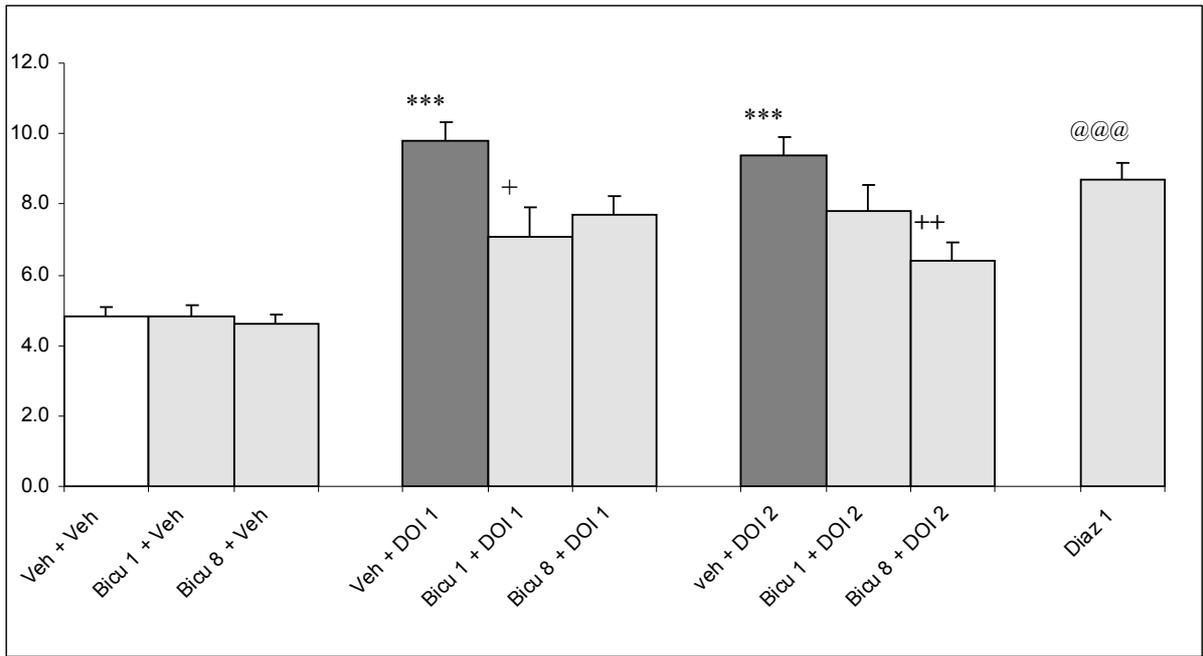


Figure 2

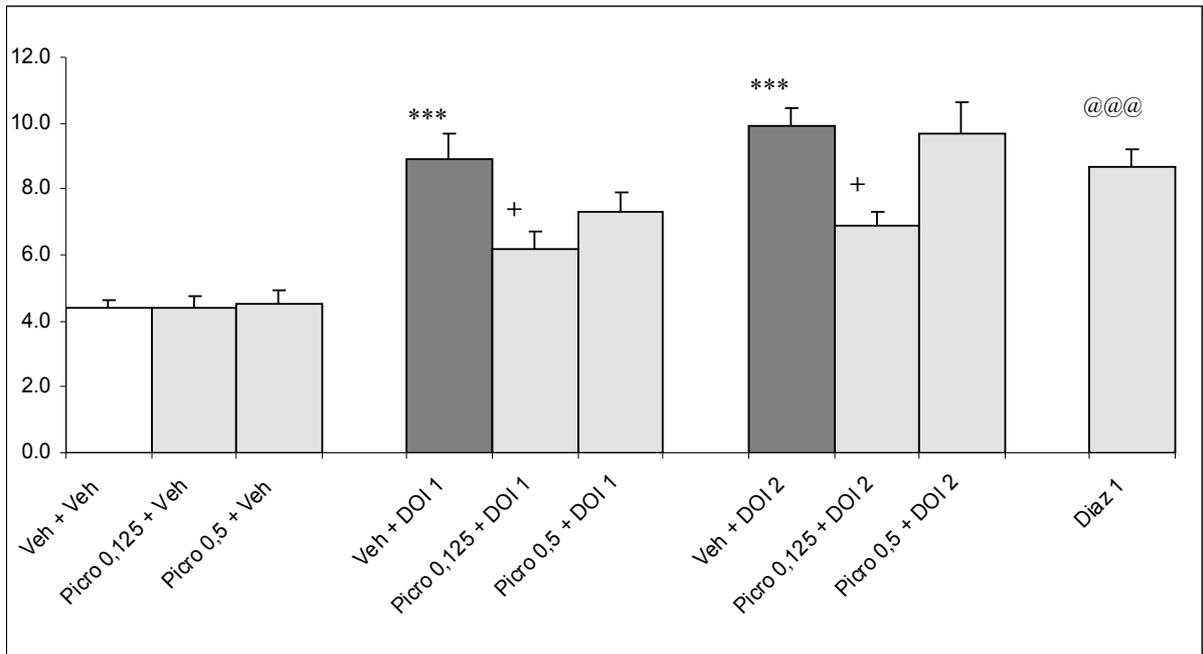


Figure 3

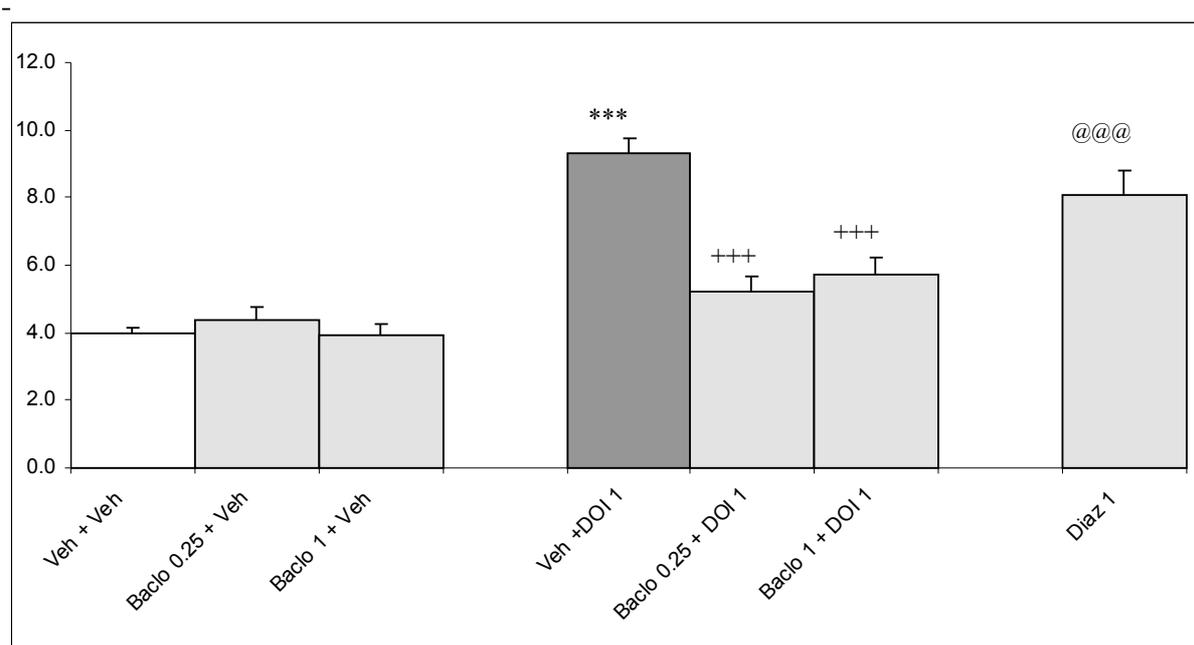


Figure 4a

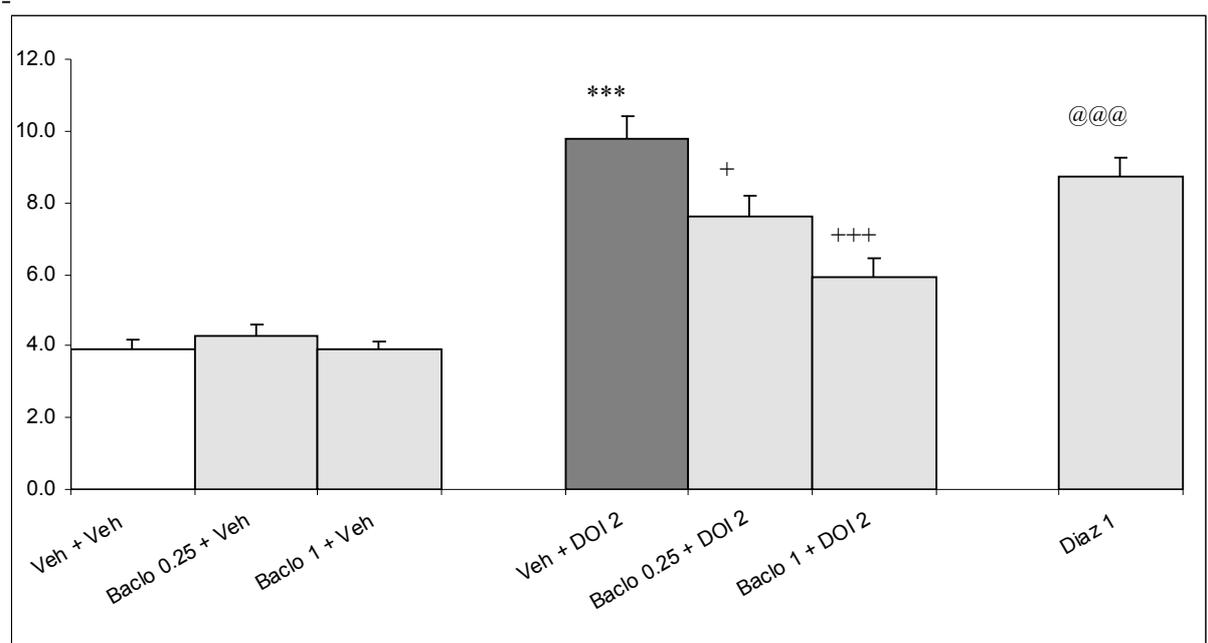


Figure 4b

3.5.1 DISCUSSION DE L'ÉTUDE 4

Les résultats de la présente étude montrent que des doses sub-actives de DOI (un agoniste des récepteurs 5-HT_{2A/2C}) sont potentialisées par des doses sub-actives d'alprazolam et de diazépam (deux agonistes du site benzodiazépinique des récepteurs GABA_A), mais le flumazénil (un antagoniste du site benzodiazépinique des récepteurs GABA_A) n'a aucune activité sur l'effet anti-punition du DOI dans le FPT. Le muscimol (un agoniste des récepteurs GABA_A) potentialise, à dose sub-active, l'activité anti-punition du DOI alors que la bicuculline et la picrotoxine (deux antagonistes des récepteurs GABA_A) inhibent l'augmentation du nombre de passages punis acceptés par les souris dans le FPT. Le baclofen (un agoniste des récepteurs GABA_B) inhibe l'activité anti-punition du DOI dans le FPT mais le CGP 35348 (un antagoniste des récepteurs GABA_B) n'a aucun effet sur cette activité du DOI.

L'étude de l'interaction de ces produits sur l'activité locomotrice des souris ne montre aucune modification de cette activité. Ces résultats prouvent que les effets obtenus dans le FPT sont purement liés à l'anxiété et pas à un effet psychostimulant ou sédatif des produits.

Les récepteurs GABA_A semblent donc participer à l'effet du DOI dans le FPT. Mais cet effet n'est pas spécifique au site BZD car l'activité de type anxiolytique du DOI n'est pas modifiée par l'administration de flumazénil. De plus les ligands GABAergiques (muscimol, picrotoxine et bicuculline) sont capables de modifier l'activité du DOI. Il ne s'agit pas donc pas d'une régulation par les BZDs mais par le GABA. Des interactions entre les récepteurs 5-HT₂ et le système GABA ont déjà été observées grâce à l'utilisation de techniques telles qu'une injection locale de DOI ainsi que des études *in vitro*. Le DOI injecté au niveau cortical augmente la concentration GABA extracellulaire et l'injection systémique de DOI augmente l'expression de la protéine Fos dans les neurones GABAergiques du cortex préfrontal. Les auteurs de cette étude suggèrent qu'une stimulation des récepteurs 5-HT₂ présents sur les neurones GABAergiques entraîne l'augmentation de la libération de GABA dans la fente synaptique au niveau du cortex préfrontal (Abi-Saab et al. 1999). Des résultats similaires ont été rapportés dans d'autres structures cérébrales l'amygdale, le locus coeruleus ainsi que l'hippocampe (Chiang et Aston-Jones 1993; Rainnie 1999; Shen et Andrade 1998). D'autres études *in vitro* ont obtenues des résultats opposés qui démontrent que l'administration d'agoniste 5-HT₂ diminue la libération de GABA dans le cortex préfrontal (Cozzi et Nichols 1996; Feng et al. 2001). L'hypothèse la plus vraisemblable dans la présente étude est que

l'effet du DOI observé passe par une activation des récepteurs 5-HT₂ présents sur des neurones GABAergique. Cette hypothèse permet également d'expliquer pourquoi l'administration de flumazénil n'a pas d'effet sur l'activité anti-punition du DOI puisque l'activation des récepteurs 5-HT₂ augmenterait la libération de GABA qui lui-même activerait des récepteurs GABA_A probablement post-synaptiques. Le flumazénil est un antagoniste du site aux BZDs dont le rôle est de moduler la conformation du complexe récepteur GABA_A. Il n'empêche donc pas la fixation et l'activité du GABA.

Dans la deuxième partie de l'étude, on peut observer que l'administration de baclofen préalable à celle de DOI inhibe l'effet du DOI dans le FPT. L'activation des récepteurs GABA_B peut entraîner soit la réduction de l'excitabilité neuronale par augmentation de la conductance des canaux potassiques situés au niveau post-synaptique, soit la réduction de la libération de GABA par inhibition de la conductance des canaux calciques au niveau pré-synaptique (Kaupmann et al. 1998; Olpe et al. 1993; Otis et al. 1993; Pfriederger et al. 1994; Scholz et Miller 1991). Dans notre étude il semble possible que les deux récepteurs agissent simultanément sur les mêmes neurones GABA et donc ont des effets antagonistes d'où l'effet inhibiteur du baclofen sur le DOI. D'autant plus que ces deux sous-types de récepteurs peuvent être localisés au niveau de la même structure dans le système nerveux central comme l'hippocampe (Lopez-Gimenez et al. 2001b; Nicoll 2004; Pazos et al. 1985; Thompson et Gahwiler 1992; Wu et Saggau 1995; Xu et Pandey 2000).

3.6 Etude 5 :

Dosage dans quatre structures cérébrales (hippocampe, hypothalamus, striatum et cortex) de différentes monoamines (5-HT, NA et DA) et du métabolite de la 5-HT (5-HIAA) avant et après le FPT.

3.6.1 OBJECTIF DE L'ETUDE 5

Le test comportemental utilisé durant ce travail de thèse, le FPT, est généralement classé dans les modèles animaux de peur conditionnée. Il est maintenant largement reconnu que l'exposition de souris au FPT entraîne chez l'animal un comportement assimilé à un état anxieux. Ce modèle est rapporté être sensible aux benzodiazépines qui sont les médicaments utilisés en première intention chez l'homme dans les troubles anxieux, et s'est avéré être également sensible aux ligands sérotoninergiques tel que les IRSSs, IRSNs (dont certains membres ont obtenu l'AMM dans l'anxiété) ainsi que les agonistes des récepteurs 5-HT₂ (Bourin et al. 1992; Hascoet et al. 2000; Nic Dhonnchadha et al. 2003a). De plus, au début de ce travail nous avons montré que la NA exerçait une activité dans les mécanismes d'action des IRSSs et IRSNs et que les récepteurs α_2 -noradrénergiques possédaient des effets régulateurs sur l'effet du DOI dans le FPT (Masse et al. 2005; Masse et al. 2006).

Les systèmes monoaminergiques (5-HT, NA et DA) ont largement été étudiés dans la neurobiologie de l'anxiété et de la peur. De nombreuses études d'analyse des concentrations tissulaires de ces neurotransmetteurs et de leurs métabolites dans diverses structures impliquées dans la médiation des réponses affectives utilisant des modèles animaux d'anxiété ont été publiées. Une exposition à des situations stressantes entraîne de multiples modifications dans les différents systèmes de neurotransmission (Belzung et al. 2001; Carvalho et al. 2005). Cependant les changements neurochimiques qui ont lieu lors d'une exposition dans le FPT n'ont pas encore été étudiés.

Dans cette étude, nous avons voulu rechercher les modifications neurochimiques chez des animaux soumis à un FPT. Dans ce but, les concentrations de 5-HT, NA et DA ont été évaluées dans quatre régions cérébrales (hypothalamus, hippocampe, striatum et cortex) avant et après une exposition au FPT. Ces quatre structures sont largement reconnues comme étant impliquées dans les mécanismes de régulation de la réponse au stress (Millan 2003). Le métabolite de la DA, l'HVA ainsi que celui de la 5-HT, le 5-HIAA ont permis après dosage de mesurer l'activité monoaminergique dans ces quatre structures mais notre technique ne nous permet pas de doser un métabolite de la NA. Le ratio HVA/DA ou « turnover » de la DA et le ratio 5-HIAA/5-HT ou « turnover » de la 5-HT ont été calculés afin de servir d'index de l'activité de la DA et de la 5-HT après exposition au FPT.

3.6.2 RESULTATS DE L'ETUDE 5

Concentrations de 5-HT dans les quatre structures étudiées

La concentration en 5-HT dans l'hypothalamus, le striatum et le cortex reste inchangée chez des souris qui ont été testées dans le FPT en comparaison avec des souris naïves non testées ($p>0,05$). La concentration de 5-HT dans l'hippocampe diminue significativement chez des souris testées dans le FPT en comparaison avec des souris naïves non testées dans le FPT ($p=0,036$).

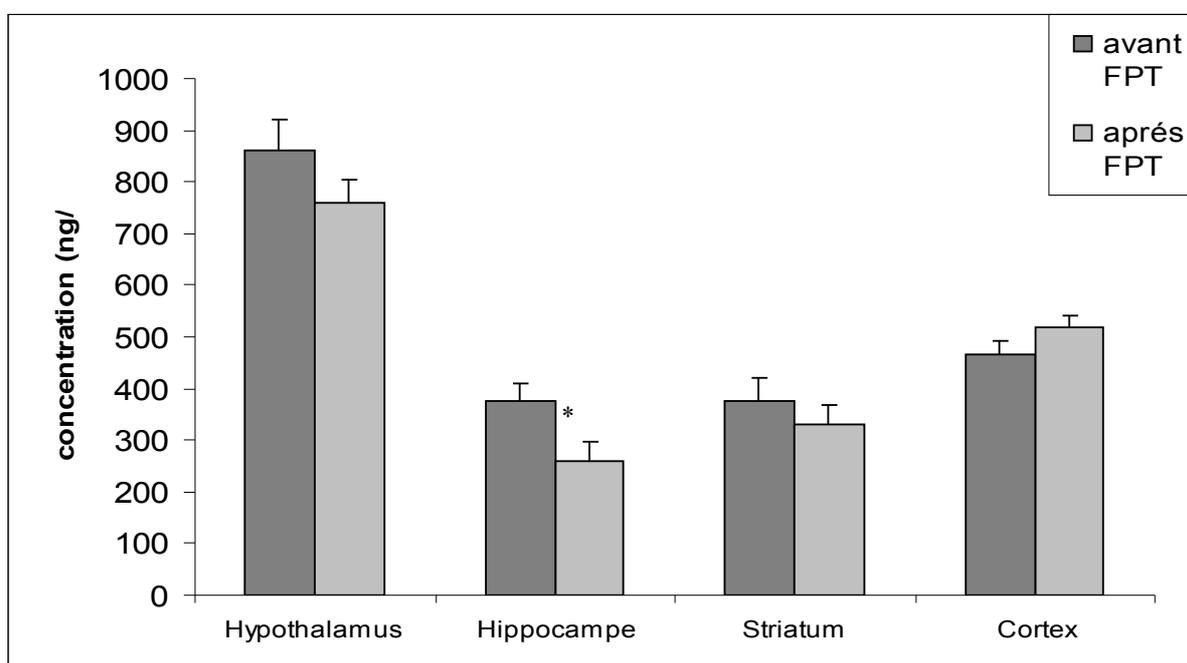


Figure 34 : Effet d'une exposition des animaux au FPT sur la concentration de 5-HT dans quatre structures cérébrales (hypothalamus, hippocampe, striatum et cortex).

Les résultats sont exprimés sous forme de moyenne \pm ESM (ng/g) avec $n=10$. L'analyse statistique est réalisée grâce à un test t de Student pour comparer les groupes deux à deux (* $p<0,05$).

Concentrations de 5-HIAA dans les quatre structures étudiées

La concentration de 5-HIAA dans l'hypothalamus et dans le cortex reste inchangée chez des souris qui ont été testées dans le FPT en comparaison avec des souris naïves non testées ($p>0,05$). La concentration de 5-HIAA dans l'hippocampe diminue significativement chez des souris testées dans le FPT en comparaison avec des souris naïves non testées dans le FPT ($p<0,001$). La concentration de 5-HIAA dans le striatum est fortement augmentée chez les souris ayant été testées dans le FPT ($p<0,001$).

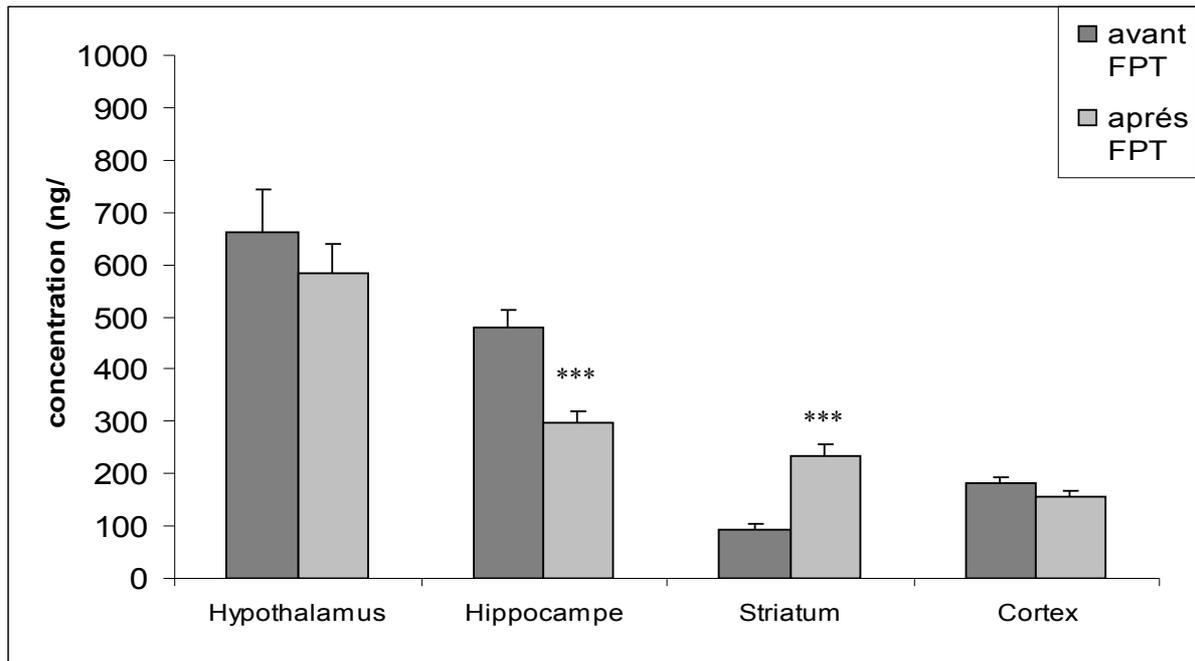


Figure 35 : Effet d'une exposition des animaux au FPT sur la concentration de 5-HIAA dans quatre structures cérébrales (hypothalamus, hippocampe, striatum et cortex).

Les résultats sont exprimés sous forme de moyenne \pm ESM (ng/g) avec $n=10$. L'analyse statistique est réalisée grâce à un test t de Student pour comparer les groupes deux à deux (** $p<0,01$, *** $p<0,001$).

Concentrations de NA dans les quatre structures étudiées

La concentration de NA dans l'hypothalamus, l'hippocampe et le striatum reste inchangée chez des souris qui ont été testées dans le FPT en comparaison avec des souris naïves non

testées ($p > 0,05$). La concentration de NA dans cortex est significativement augmentée chez des souris testées dans le FPT en comparaison avec des souris naïves non testées dans le FPT ($p = 0,014$).

| Concentration de NA (ng/g) | Hypothalamus | Hippocampe | Striatum | Cortex |
|----------------------------|--------------|------------|----------|------------------|
| Avant FPT | 3148 ± 142 | 465 ± 30 | 195 ± 25 | 324 ± 20 |
| Après FPT | 2803 ± 126 | 401 ± 29 | 237 ± 35 | 387 ± 9 |
| Analyse statistique | NS | NS | NS | p<0,05 |

Tableau 26 : Effet d'une exposition des souris au FPT sur la concentration de NA dans quatre structures cérébrales (hypothalamus, hippocampe, striatum et cortex).

Les résultats sont exprimés sous forme de moyenne ± ESM (ng/g) avec n=10. L'analyse statistique est réalisée grâce à un test *t* de Student pour comparer les groupes deux à deux (NS: non significatif).

Concentrations de DA dans les quatre structures étudiées

La concentration de DA dans l'hippocampe est trop faible pour être détectée par notre méthode de dosage. Dans le striatum et le cortex, la concentration de DA reste inchangée chez des souris qui ont été testées dans le FPT en comparaison avec des souris naïves non testées ($p>0,05$). La concentration de DA dans l'hypothalamus est significativement diminuée chez des souris exposées au FPT en comparaison avec des souris naïves non testées dans le FPT ($p<0,001$).

| Concentration de DA (ng/g) | Hypothalamus | Hippocampe | Striatum | Cortex |
|----------------------------|-------------------|--------------|------------|----------|
| Avant FPT | 380 ± 20 | Non détectée | 6392 ± 488 | 526 ± 31 |
| Après FPT | 267 ± 22 | Non détectée | 5701 ± 378 | 580 ± 44 |
| Analyse statistique | p<0,001 | - | NS | NS |

Tableau 27 : Effet d'une exposition des souris au FPT sur la concentration de DA dans quatre structures cérébrales (hypothalamus, hippocampe, striatum et cortex).

Les résultats sont exprimés sous forme de moyenne ± ESM (ng/g) avec n=10. L'analyse statistique est réalisée grâce à un test *t* de Student pour comparer les groupes deux à deux (NS: non significatif).

Concentrations de HVA dans les quatre structures étudiées

La concentration de HVA dans l'hippocampe et dans l'hypothalamus est trop faible pour être détectée par notre méthode de dosage. Dans le striatum et le cortex, la concentration de HVA reste inchangée chez des souris qui ont été testées dans le FPT en comparaison avec des souris naïves non testées ($p>0,05$).

| Concentration de HVA (ng/g) | Hypothalamus | Hippocampe | Striatum | Cortex |
|-----------------------------|--------------|--------------|------------|----------|
| Avant FPT | Non détectée | Non détectée | 1413 ± 152 | 108 ± 20 |
| Après FPT | Non détectée | Non détectée | 1402 ± 159 | 96 ± 20 |
| Analyse statistique | - | - | NS | NS |

Tableau 28 : Effet d'une exposition des souris au FPT sur la concentration de HVA dans quatre structures cérébrales (hypothalamus, hippocampe, striatum et cortex).

Les résultats sont exprimés sous forme de moyenne ± ESM (ng/g) avec n=10. L'analyse statistique est réalisée grâce à un test *t* de Student pour comparer les groupes deux à deux (NS: non significatif).

Mesure du « turnover » de la 5-HT et de la DA dans les quatre structures étudiées

Le ratio 5-HIAA/5-HT ou turnover 5-HTergique n'est pas modifié dans l'hippocampe et l'hypothalamus après un FPT. Ce ratio augmente significativement dans le striatum et diminue significativement dans le cortex après un FPT.

Le ratio HVA/DA ou turnover DAergique n'a pas pu être déterminé dans l'hypothalamus et dans l'hippocampe car la méthode de dosage n'a pas permis de quantifier le HVA dans ces deux structures. Dans le striatum et le cortex, le turnover DAergique n'est pas modifié après un FPT en comparaison avec des souris non testées.

| Turnover 5-HT | Hypothalamus | Hippocampe | Striatum | Cortex |
|---------------------|-----------------|-----------------|-------------------|-----------------|
| Avant FPT | 0,8404 ± 0,1341 | 1,4093 ± 0,1914 | 0,2484 ± 0,0162 | 0,4022 ± 0,0271 |
| Après FPT | 0,7896 ± 0,0869 | 1,3594 ± 0,2376 | 0,7401 ± 0,0668 | 0,3038 ± 0,0150 |
| Analyse statistique | NS | NS | p<0,001 | p=0,005 |

Tableau 29 : Turnover de la 5-HT avant et après un FPT dans quatre structures cérébrales (hypothalamus, hippocampe, striatum et cortex).

Les résultats sont exprimés sous forme de moyenne ± ESM avec n=10. L'analyse statistique est réalisée grâce à un test *t* de Student pour comparer les groupes deux à deux (NS: non significatif).

| Turnover DA | Hypothalamus | Hippocampe | Striatum | Cortex |
|---------------------|--------------|-------------|-----------------|-----------------|
| Avant FPT | non détecté | non détecté | 0,2218 ± 0,0077 | 0,2077 ± 0,0271 |
| Après FPT | non détecté | non détecté | 0,2459 ± 0,0087 | 0,1633 ± 0,0154 |
| Analyse statistique | - | - | NS | NS |

Tableau 30 : Turnover de la DA avant et après un FPT dans quatre structures cérébrales (hypothalamus, hippocampe, striatum et cortex).

Les résultats sont exprimés sous forme de moyenne ± ESM avec n=10. L'analyse statistique est réalisée grâce à un test *t* de Student pour comparer les groupes deux à deux (NS: non significatif).

3.6.3 DISCUSSION DE L'ETUDE 5

L'exposition des souris à un FPT entraîne des changements dans les concentrations des monoamines. La concentration de 5-HT est significativement diminuée dans l'hippocampe. Dans cette même structure, le métabolite de la 5-HT, le 5-HIAA, est également diminué significativement. La diminution simultanée de la concentration de 5-HT et de son métabolite font qu'il n'y a aucune modification du « turnover » de la 5-HT dans cette structure. Les changements observés dans l'hippocampe pour la 5-HT ne peuvent pas être attribués à une modification du métabolisme puisque le ratio 5-HIAA/5-HT n'est pas différent de celui des animaux non exposés au FPT. Les résultats observés dans la littérature concernant le dosage de 5-HT et de 5-HIAA dans l'hippocampe après un évènement stressant sont contradictoires. Certaines études montrent une augmentation de la 5-HT dans l'hippocampe après exposition de souris à un prédateur tel que le chat ou après une exposition de rats au labyrinthe en croix surélevé alors que d'autres ne montrent aucune modification (Beekman et al. 2005; Belzung et al. 2001; Rex et al. 2005). A l'inverse, une autre étude a permis d'observer une diminution de la 5-HT dans l'hippocampe après l'exposition de rats à un test du labyrinthe en croix surélevée (Carvalho et al. 2005). Les différences de résultats obtenus sont possiblement dues aux différences de méthodologies employées dans ces études (rats ou souris, dosage des neurotransmetteurs par des techniques d'HPLC ou de microdialyse).

D'autre part, le 5-HIAA est significativement augmenté dans le striatum d'où un ratio 5-HIAA/5-HT augmenté de façon significative dans cette structure. Ce ratio est par contre diminué dans le cortex et n'est pas modifié dans l'hypothalamus. L'augmentation de 5-HIAA dans le striatum rapportée dans notre étude, a aussi été observée sur des rats soumis à des conditions non familières de forte illumination (Ge et al. 1997) alors que Schwarting et al. 1998 montrent une faible concentration de 5-HT chez des animaux anxieux (Schwarting et al. 1998).

Pour la NA et la DA, seule une augmentation de la NA est observée dans le cortex et une diminution de la DA dans l'hypothalamus.

Ces résultats montrent qu'une simple exposition au FPT entraîne de nombreuses modifications neurobiologiques. Il ressort de cette étude que le système de neurotransmission le plus modifié semble être le système 5-HT et que l'hippocampe semble être également le siège de ces modifications.

3.7 Etude 6 :

Effet de l'injection locale de DOI dans trois structures cérébrales (hippocampe, amygdale et PAG) sur le FPT

3.7.1 OBJECTIF DE L'ETUDE 6

L'étude précédente a mis en évidence des modifications neurobiologiques suite à l'exposition des animaux au FPT parmi lesquelles on trouve une forte modification des concentrations en 5-HT et en 5-HIAA au niveau hippocampique. Il nous a paru intéressant à ce stade de ce travail d'étudier l'effet d'une injection locale de DOI dans trois structures cérébrales fortement impliquées dans les mécanismes anxieux.

La première structure étudiée est l'hippocampe. Cette structure est impliquée dans la peur conditionnée (Antoniadis et McDonald 2000; Gerlai 2001; Sanders et al. 2003). Des lésions de l'hippocampe aboutissent à des altérations du comportement moteur dans des conditions particulières comme la peur conditionnée (Young et al. 1994). De plus, de nombreuses études ont montrées un effet de type anxiolytique induit par une administration directe dans l'hippocampe de benzodiazépines comme le midazolam ou le diazépam dans le test de conflit de Vogel (Kataoka et al. 1991; Plaznik et al. 1994; Stefanski et al. 1993a). Les études étudiant l'effet de ligands 5-HT ont impliqué le plus souvent les récepteurs 5-HT_{1A}. La stimulation de ce sous-type de récepteur dans l'hippocampe entraîne un effet de type anxiolytique dans le test du labyrinthe en croix surélevé ainsi que dans le test de conflit de Vogel (Menard et Treit 1998; 1999; Przegalinski et al. 1994). Les antagonistes des récepteurs 5-HT₃ injectés au niveau hippocampique ont également montré des effets de type anxiolytique dans le test de conflit de Vogel (Stefanski et al. 1993b).

L'amygdale est également décrite comme une structure clé dans la médiation de la peur et de l'anxiété conditionnée (Davis 1992; Graeff et al. 1996; LeDoux 1993). Cette implication de l'amygdale est tirée de nombreuses données qui indiquent que la lésion de cette structure provoque des perturbations dans le développement et l'expression de comportements et d'indices neurochimiques de la peur conditionnée tels que l'activation adreno-corticale et le comportement d'immobilisation (Blanchard et Blanchard 1972; Goldstein et al. 1996) et que les stimuli (administration de chocs plantaires) qui induisent une peur conditionnée active l'amygdale (Campeau et al. 1991). De plus, les manipulations de l'amygdale ont été rapportées altérer le comportement dans certains modèles animaux développés pour mesurer l'anxiété (Graeff et al. 1993). Cette structure est une structure innervée par de nombreuses fibres 5-HT originaires du noyau du raphé dorsal (Azmitia et Segal 1978; Vertes 1991). La 5-HT semble être l'un des neuromédiateurs les plus importants de l'activité de l'amygdale.

L'injection de 5-HT dans l'amygdale induit des effets de type anxiogène dans différents modèles animaux (Higgins et al. 1991; Hodges et al. 1987).

La substance grise périaqueducule (PAG) fait partie d'un système neuronal organisé, responsable de la mise en place et du contrôle des réactions défensives, et par conséquent est impliquée dans les manifestations des états émotionnels aversifs comme la peur et l'anxiété (Bandler et Shipley 1994; Brandao et al. 2003; Graeff 1990; Lovick 1993). Chez l'homme la stimulation de la PAG dorsale produit des sensations similaires à la peur qui ressemble à l'expression symptomatique d'une attaque de panique (Amano et al. 1978; Nashold et al. 1969). Chez l'animal, la stimulation de cette structure produit une réponse émotionnelle aversive reflétée par des réactions de peur et de fuite accompagnées par des changements physiologiques caractéristiques du stress comme par exemple l'augmentation de la défécation (Schutz et al. 1985). Il existe des évidences expérimentales indiquant que la 5-HT est largement impliquée dans cette activité induite par la stimulation de la PAG (de Bortoli et al. 2006; de Paula Soares et Zangrossi 2004; Jacob et al. 2002; Jenck et al. 1989; Schutz et al. 1985). De Plus, la PAG et l'amygdale reçoivent des innervations sérotoninergiques provenant du raphé dorsal. Ces fibres nerveuses possèdent des varicosités qui établissent des contacts préférentiels avec les récepteurs 5-HT₂ (Mamounas et al. 1991) ce qui laisse à penser que l'activité sérotoninergique de ces structures passe majoritairement par l'activation des récepteurs 5-HT₂.

Le but de cette étude était donc d'observer l'effet du DOI après injection direct dans l'hippocampe, l'amygdale et la PAG grâce à l'utilisation de canules implantées 8 jours avant le test dans les structures en bilatérale. Le DOI est injecté juste avant le début du test dans les structures.

3.7.2 RESULTATS DE L'ETUDE 6

Effet de l'injection de DOI dans l'hippocampe sur le FPT

L'implantation d'un guide canule dans l'hippocampe des animaux ne modifie pas le nombre de passages punis acceptés par les souris en comparaison avec le groupe contrôle non opérés dans le FPT ($p>0,05$). L'administration de DOI dans l'hippocampe modifie de façon dose dépendante le comportement des souris exposées à un FPT comparé aux animaux contrôles opérés [$F_{(2,27)}= 10,359, p<0,001$]. L'administration directe dans l'hippocampe de DOI 1 μ g des animaux ne modifie pas le nombre de passages punis ($p>0,05$). L'administration de DOI 5 μ g dans l'hippocampe augmente significativement le nombre de passages punis acceptés par les souris ($p<0,001$). L'administration de diazépam i.p. 30min avant le début du test augmente significativement le nombre de passages punis dans le FPT ($p<0,001$).

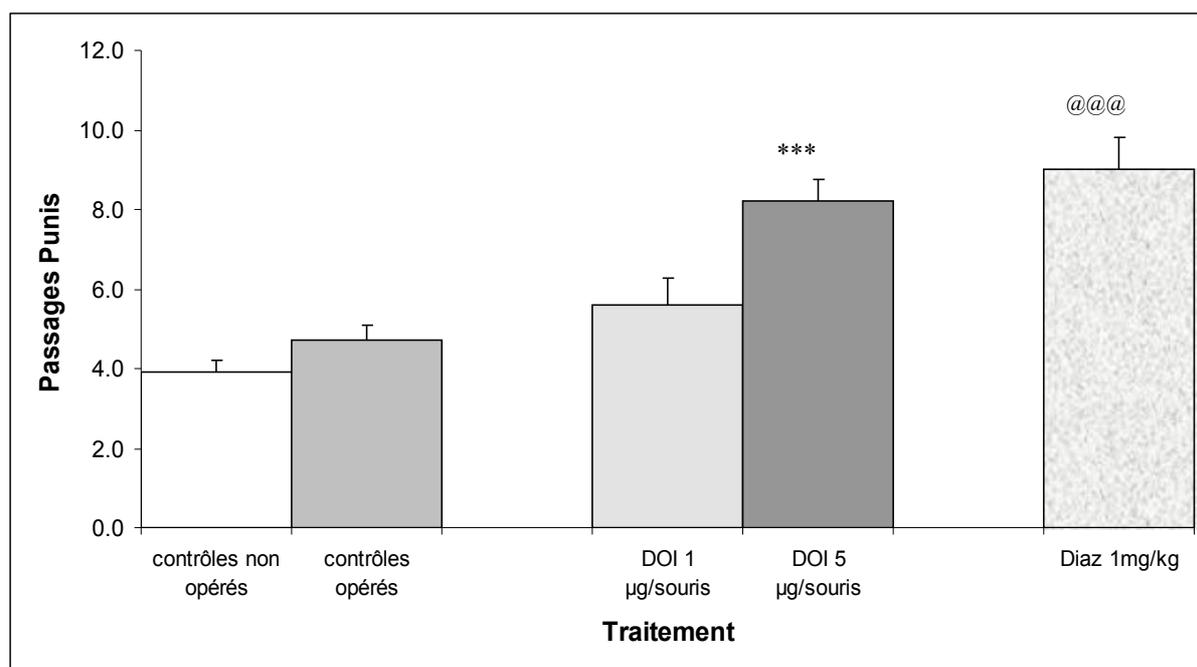


Figure 36 : Effet de l'administration intra-hippocampique de DOI dans le FPT.

Les résultats sont exprimés sous forme de moyenne \pm ESM avec $n=10$. L'analyse statistique est réalisée grâce à une ANOVA un facteur suivi par un test de Dunnett (** $p<0,001$) pour comparer les souris injectées au DOI et les souris opérées ayant reçu du liquide cérébro-spinal artificiel (aCSF). Pour comparer les contrôles opérés avec les contrôles non opérés et le témoin diazépam avec les contrôles non opérés un test t de Student est utilisé (@@@ $p<0,001$).

Effet de l'injection de DOI dans l'amygdale sur le FPT

L'implantation d'un guide canule dans l'amygdale des animaux n'a aucun effet sur le nombre de passages punis acceptés par les souris en comparaison avec le groupe contrôle non opérés ($p>0,05$). L'administration de DOI dans l'amygdale modifie significativement le comportement des souris exposées à un FPT comparé aux animaux contrôles opérés [$F_{(3, 36)}=3,533, p=0,025$]. L'administration de DOI 1 μ g et 2 μ g dans l'amygdale des animaux ne modifie pas le nombre de passages punis ($p>0,05$). L'administration de DOI 5 μ g dans l'amygdale diminue significativement le nombre de passages punis acceptés par les souris ($p=0,008$). L'administration de diazépam i.p. 30min avant le début du test augmente significativement le nombre de passages punis dans le FPT ($p<0,001$).

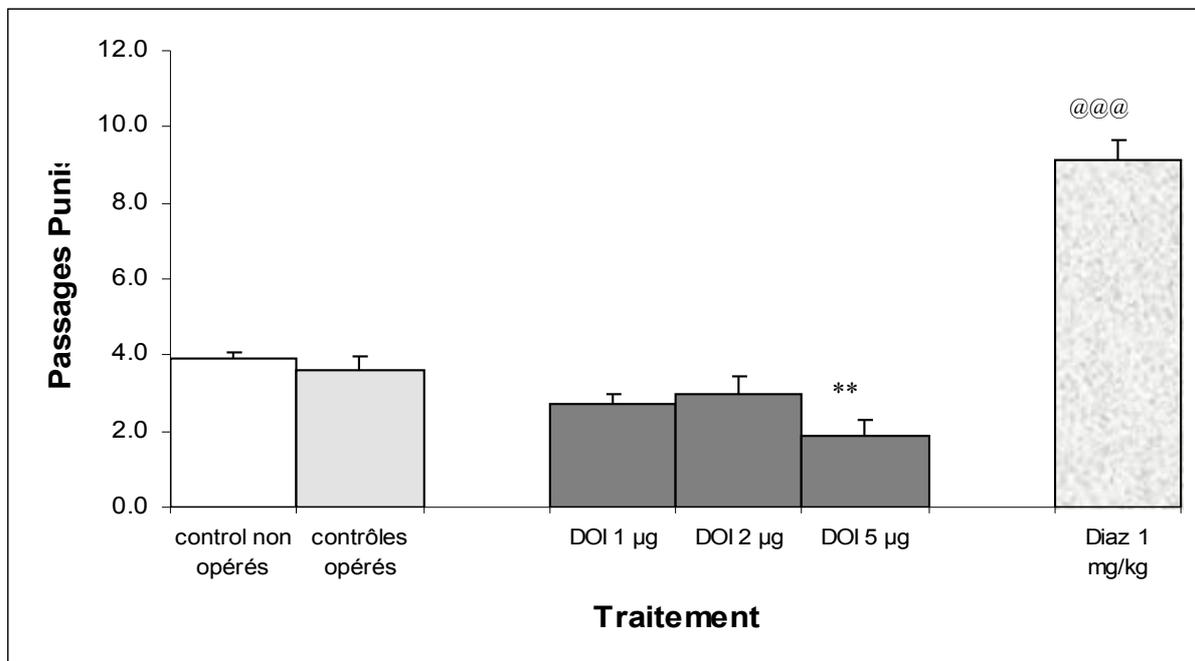


Figure 37 : Effet de l'administration intra-amygdale de DOI dans le FPT.

Les résultats sont exprimés sous forme de moyenne \pm ESM avec $n=10$. L'analyse statistique est réalisée grâce à une ANOVA un facteur suivi par un test de Dunnett (** $p<0,01$) pour comparer les souris injectées au DOI et les souris opérées ayant reçu de l'aCSF. Pour comparer les contrôles opérés avec les contrôles non opérés et le témoin diazépam avec les contrôles non opérés un test t de Student est utilisé (@@@ $p<0,001$).

Effet de l'injection de DOI dans la PAG sur le FPT

L'implantation d'un guide canule dans la PAG des animaux n'a aucun effet sur le nombre de passages punis acceptés par les souris quand il est comparé au groupe contrôle non opérés ($p>0,05$). L'administration de DOI dans la PAG modifie significativement le comportement des souris exposées à un FPT comparé aux animaux contrôles opérés [$F_{(3, 36)} = 7,367$; $p=0,001$]. L'administration de DOI 1 μ g et 2 μ g dans la PAG des animaux ne modifie pas le nombre de passages punis ($p>0,05$). L'administration de DOI 5 μ g dans la PAG diminue significativement le nombre de passages punis acceptés par les souris ($p=0,003$). L'administration de diazépam i.p. 30min avant le début du test augmente significativement le nombre de passages punis dans le FPT ($p<0,001$).

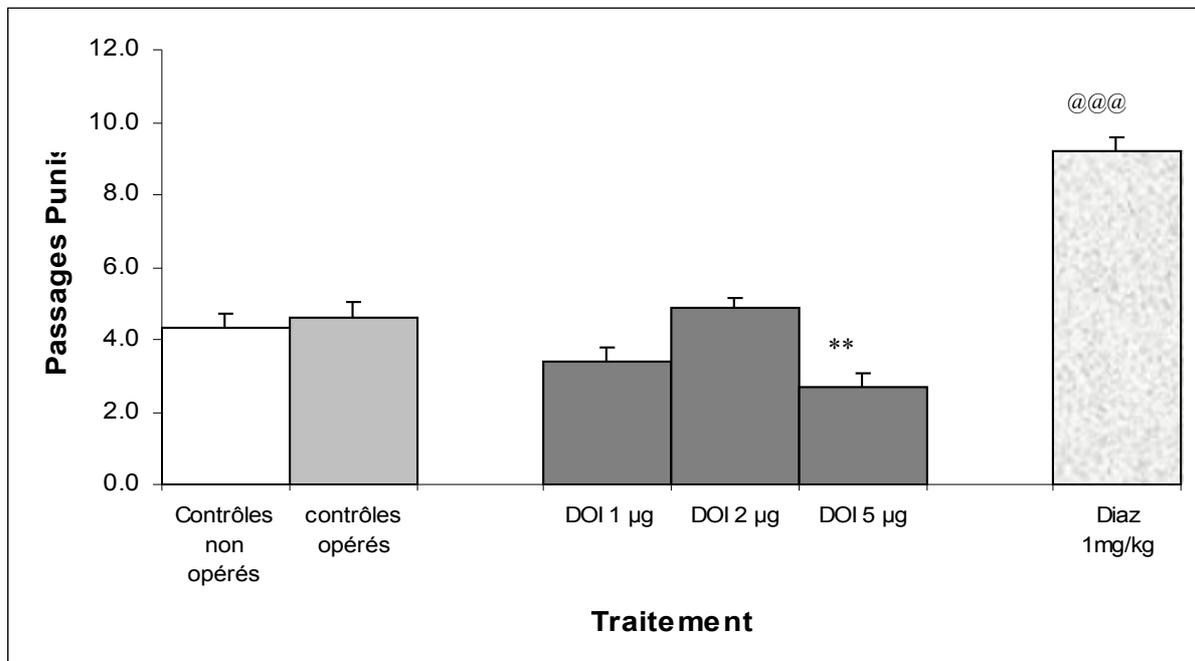


Figure 38 : Effet de l'administration intra-PAG de DOI dans le FPT.

Les résultats sont exprimés sous forme de moyenne \pm ESM avec $n=10$. L'analyse statistique est réalisée grâce à une ANOVA un facteur suivi par un test de Dunnett (** $p<0,01$). Pour comparer les contrôles opérés avec les

contrôles non opérés et le témoin diazépam avec les contrôles non opérés un test t de Student est utilisé ($p < 0,001$).

3.7.3 DISCUSSION DE L'ETUDE 6

Les résultats de cette étude démontrent que l'administration de DOI dans l'hippocampe entraîne une augmentation significative du nombre de passages punis acceptés par les souris alors que l'administration de DOI au niveau de l'amygdale et de la PAG diminue le nombre de passages punis dans le FPT.

L'hippocampe est une structure qui possède de nombreuses afférences 5-HT provenant des noyaux du raphé (McQuade et Sharp 1997; Moore et al. 1978; Seeman et al. 1980). Les modifications de la concentration de 5-HT dans cette structure montrent son importance dans les mécanismes neurobiologiques de l'anxiété (Beekman et al. 2005; Belzung et al. 2001; Carvalho et al. 2005; Rex et al. 2005). Une étude menée par Bannerman et al (2003) montre qu'une lésion de l'hippocampe ventral entraîne des modifications des comportements anxieux de rats dans certains modèles animaux d'anxiété, comme une diminution de l'immobilisation du rat après avoir reçu un choc électrique ainsi qu'une diminution du temps de latence à entrer dans le compartiment blanc du test de la double enceinte illuminée ce qui démontre un effet de type anxiolytique (Bannerman et al. 2003).

D'un autre côté, d'autres études n'ont trouvé aucun effet de la lésion de l'hippocampe sur le comportement des rats dans le labyrinthe en croix surélevé ni sur le temps passé dans le compartiment blanc dans la double enceinte illuminée (Dringenberg et al. 1998; Treit et Menard 1997). Une seule étude a montré l'effet d'une injection directe dans l'hippocampe d'un ligand 5-HT₂, le mCPP. Le mCPP, un agoniste non sélectif des récepteurs 5-HT₂ diminue le temps d'interaction sociale chez le rat et donc possède une activité de type anxiogène (Whitton et Curzon 1990). Ces résultats sont différents de ceux obtenus dans notre étude mais le ligand utilisé est également différent. Le DOI est un agoniste des récepteurs 5-HT_{2A/2C} dont l'activité dans le FPT serait due à l'activation sélective des récepteurs 5-HT_{2A} (Nic Dhonnchadha et al. 2003b). Le mCPP est un ligand non spécifique d'un des sous-types de récepteurs 5-HT₂ avec une affinité légèrement plus importante pour les récepteurs 5-HT_{2C}. Il est alors possible que l'effet obtenu dans l'étude de Whitton et Curzon soit dû à une activation d'autres sous-types de ces récepteurs qui peuvent être les récepteurs 5-HT_{2B} ou 5-HT_{2C}. De plus, le mCPP administré par voie i.p. n'entraîne aucune modification du comportement des souris dans le FPT et dans le labyrinthe en croix surélevé. A l'inverse le DOI qui, dans ces deux tests, possède une activité de type anxiolytique ce qui montrerait un mécanisme d'action de ces molécules différent (Nic Dhonnchadha et al. 2003a).

L'implication des récepteurs 5-HT₂ présents dans l'amygdale a largement été étudiée dans différents modèles d'anxiété. Une infusion locale de 5-HT dans l'amygdale augmente le comportement de type anxieux dans une version modifiée du test de Geller-Seifter et le même type d'administration d'un antagoniste des récepteurs 5-HT₂, le methysergide montre des propriétés de type anxiolytique dans ce même test (Hodges et al. 1987). De plus la microinjection d'un agoniste non sélectif des récepteurs 5-HT_{2C}, le m-CPP, et d'un agoniste sélectif des récepteurs 5-HT_{2C}, l'interleukine (IL)-639, dans l'amygdale augmente les comportements relatés comme anxieux dans l' « open field », un effet qui était atténué par la co-administration systémique d'un antagoniste des récepteurs 5-HT_{2C} (Campbell et Merchant 2003). Des résultats similaires ont été trouvés dans une autre étude où le MK-212, un agoniste sélectif des récepteurs 5-HT_{2C}, a démontré une activité de type anxiogène dans le même test qui était annulée par une microinjection de ritansérine (de Mello Cruz et al. 2005). A l'inverse, l'infusion dans l'amygdale de kétansérine, un antagoniste des récepteurs 5-HT₂, entraîne un effet de type anxiogène dans le labyrinthe en croix surélevé chez le rat (Zangrossi Junior et Graeff 1994). Ces résultats semblent donc majoritairement montrer que la stimulation des récepteurs 5-HT_{2C} dans l'amygdale induit une augmentation de l'anxiété. Nos résultats montrent qu'une injection directe de DOI dans l'amygdale induit un effet de type anxiogène dans le FPT. Le DOI est un agoniste non sélectif des récepteurs 5-HT_{2A} et 5-HT_{2C}, les données de la littérature semble suggérer que l'activité du DOI est similaire dans ces conditions à la stimulation des récepteurs 5-HT_{2C}. De plus, la comparaison de la quantité d'ARNm des récepteurs 5-HT₂ montre que les récepteurs 5-HT_{2C} sont le sous-type le plus présent dans l'amygdale (Pompeiano et al. 1994).

L'injection de DOI dans la PAG semble induire un effet similaire à celui observé lors d'une injection dans l'amygdale c'est-à-dire un effet de type anxiogène. Dans cette structure de nombreux effets contradictoires quant à l'activation des récepteurs 5-HT₂ ont été décrits. Certains antagonistes de ces récepteurs (ex: kétansérine) diminuent l'effet aversif induit par une stimulation de la PAG chez le rat, les auteurs de cette étude concluent que le blocage des récepteurs 5-HT₂ dans la PAG contribue à inhiber les systèmes aversifs intra-cérébraux (Jenck et al. 1989). Une autre étude réalisée dans le labyrinthe en T surélevé chez le rat montre que l'administration de 5-HT dans la PAG entraîne un effet de type anxiogène et que l'administration d'antagonistes des récepteurs 5-HT_{2A} et 5-HT_{2C} dans la PAG 10 min avant l'injection de la 5-HT dans la même structure prévient son effet. Dans cette étude, le paramètre caractéristique d'un effet anxiogène (temps de latence du rat à rentrer dans le bras ouvert de l'appareil) de ce test n'est pas modifié par le DOI, il semblerait possible que la dose

utilisée dans cette étude soit insuffisante pour l'obtention d'un effet (de Paula Soares et Zangrossi 2004). L'administration cérébrale de 5-HT augmente le seuil de stimulation électrique de la PAG capable d'induire un comportement d'échappement du rat et cet effet est bloqué par la kétansérine suggérant une implication des récepteurs 5-HT₂ (Schutz et al. 1985). Dans le même sens, le DOI induit une augmentation du seuil de stimulation électrique de la PAG nécessaire à l'apparition d'un comportement d'échappement ce qui indiquerait un effet de type anxiolytique de l'activation des récepteurs 5-HT₂ dans la PAG (Jacob et al. 2002). Ces résultats sont contradictoires avec nos résultats, mais ces contradictions peuvent être expliquées par les différences de méthodologie entre les études comme l'utilisation d'un modèle animal (stimulation électrique de la PAG) et un test comportemental. Le fait que ces études aient été menées sur des rats alors que notre étude est réalisée sur des souris peut aussi constituer une discordance des résultats.

Le mécanisme neurobiologique impliqué dans l'effet de type anxiolytique du DOI ferait donc intervenir de façon prépondérante l'hippocampe.

4 DISCUSSION GENERALE

L'objectif de ce travail est d'étudier les relations existantes entre le système 5-HT d'une part et les systèmes GABA et NA d'autre part dans le FPT, puis d'essayer de localiser au niveau des structures cérébrales les récepteurs 5-HT₂ impliqués dans l'effet anti-punition du DOI. Le but est d'essayer de déterminer le mécanisme neurobiologique impliqué dans le FPT à travers l'utilisation de certains ligands 5-HT (deux inhibiteurs spécifiques de la recapture de 5-HT, deux inhibiteurs mixtes de la 5-HT et de la NA et le DOI) possédant une activité de type anxiolytique dans ce test.

Les modèles animaux contribuent à la compréhension des mécanismes neurobiologiques impliqués dans l'anxiété et permettent la découverte de nouvelles molécules thérapeutiques. Dans notre laboratoire, deux modèles animaux d'anxiété sont principalement utilisés : le test des quatre plaques (FPT) et le test du labyrinthe en croix surélevé (EPM).

Le FPT est considéré comme un modèle de peur conditionnée basé sur la suppression du comportement exploratoire inné chez les souris par l'administration de chocs électriques. Ce modèle est peu utilisé dans les autres laboratoires mais les études menées dans notre laboratoire ont montré que ce test est reproductible et très robuste.

L'EPM est le modèle le plus couramment utilisé dans les études comportementales animales de l'anxiété. Il a été très largement validé chez la souris (Lister 1987; Wall et Messier 2001). L'EPM est considéré comme un test comportemental d'anxiété éthologique. Durant ces dernières années, certains groupes de travail ont complétés les paramètres mesurés dans l'EPM avec la prise en compte de paramètres dits éthologiques comme le nombre de redressements, de plongements de la tête et de postures d'étirement (Dalvi et Rodgers 1999; Fernandes et File 1996; Rodgers et Johnson 1995). Les études menées dans notre laboratoire sur ce test ont révélé que ce test est très sensible aux facteurs de variabilité tels que la souche de souris utilisée.

Comme la majeure partie des modèles comportementaux, la mise au point et la validation de ces deux modèles ont été essentiellement basées sur les propriétés pharmacologiques des BZDs. Le système GABA est le système qui a été le premier étudié dans les mécanismes neurobiologiques de l'anxiété, essentiellement grâce à la découverte des BZDs. Dans l'EPM, l'effet de type anxiolytique des BZDs est reproductible dans de nombreux laboratoires (Belzung et Agmo 1997; Clenet et al. 2004; Cole et Rodgers 1995; Corbett et al. 1991; Dalvi

et Rodgers 1996; Griebel et al. 2000; Guimaraes et al. 1990; Kulkarni et Sharma 1993; Kurt et al. 2000; Pellow et al. 1985; Rago et al. 1988; Wada et Fukuda 1991). De même, le FPT montre des effets des BZDs robustes et reproductibles (Bourin et al. 1992; Hascoet et al. 2000).

L'autre système de neurotransmission qui a une importance majeure dans les troubles anxieux, est le système 5-HT. Selon Iversen, une augmentation de la 5-HT au niveau central entraînerait une augmentation de l'anxiété, alors qu'une diminution de quantité de 5-HT montrerait une diminution de l'état anxieux (Iversen 1984). Cette hypothèse est soutenue par les effets de type anxiogène de la 5-HT quand elle est administrée directement dans l'amygdale, une région considérée comme fortement associée aux comportements induits par un stimulus aversif (Graeff et al. 1993). Mais l'efficacité plus récemment observée des IRSSs et IRSNs dans les troubles anxieux laisse à penser que l'intervention du système 5-HT n'est pas si simple.

Les premières études menées sur des ligands spécifiques de certains récepteurs 5-HT ont porté sur des molécules se fixant préférentiellement sur les récepteurs 5-HT_{1A} dont les deux plus étudiées ont été la buspirone et le 8 OH-DPAT. Le 8 OH-DPAT n'a montré aucune activité dans le FPT (Hascoet et al. 1997). Ces deux molécules ont révélé avoir des effets de type anxiolytique (Dunn et al. 1989; File et al. 1996; Kostowski et al. 1989) mais également de type anxiogène (Moser 1989; Moser et al. 1990; Treit et al. 1993) dans l'EPM de rat. Les études concernant le rôle des récepteurs 5-HT₃ dans l'EPM semblent également contradictoire puisque les antagonistes des récepteurs 5-HT₃ possèdent ou ne possèdent pas, selon les études, des effets anxiolytiques chez la souris ou chez le rat (Filip et al. 1992; Rodgers et al. 1995).

Ces différences de résultats sont sûrement dûes aux grands nombres de facteurs variants entre les laboratoires tels que le type d'animaux utilisés (rat ou souris), la souche de souris utilisées, le mode d'administration (chronique ou aigu), le matériel de construction de l'appareil (Hogg 1996).

Au vu de la variabilité des résultats dans ce modèle et compte tenu du fait que ce modèle ait été validé par sa sensibilité aux BZDs, on peut se demander si la mise en place de la mesure des paramètres éthologiques ne traduit pas une tentative de sensibilisation du modèle au système 5-HT.

Afin de limiter le nombre de divergences dans les résultats obtenus sur l'EPM, la comparaison de la sensibilité des deux tests à différents ligands ne sera faite que sur les résultats obtenus dans le laboratoire.

Dans notre laboratoire, de nombreuses études ont été menées en parallèle entre les deux tests et nous avons observé une sensibilité équivalente de ces tests pour un grand nombre de ligands. Les deux modèles se sont trouvés être sensibles aux deux BZDs utilisées dans le laboratoire, aux agonistes des récepteurs 5-HT₂, ainsi qu'à l'HG1 un antagoniste de la 5-HT moduline (Bourin et al. 1992; Clenet et al. 2004; Nic Dhonnchadha et al. 2003a). Les données obtenues dans le laboratoire publiées ou non sont récapitulées dans le tableau 27.

Par contre, les IRSSs et les IRSNs se sont montrés actifs dans le FPT mais pas dans l'EPM. Une administration aiguë de ces ligands entraîne une augmentation du nombre de passages punis dans le FPT alors que ces ligands administrés selon le même mode n'entraînent aucune modification des paramètres mesurés dans l'EPM (entrée dans les bras ouverts et dans les bras fermés, temps passé dans les bras ouverts et les bras fermés).

| Ligands | FPT (Doses actives) | EPM (Doses actives) | Références |
|---|-------------------------------|-------------------------------|--|
| Diazépam | + (1-8 mg/kg) | + (1-4 mg/kg) | Bourin et al., 1991 ; Hascoët et al., 2000 ; Données non publiées |
| Alprazolam | + (0.25-4 mg/kg) | + (0.25-1 mg/kg) | Bourin et al., 1991 ; Hascoët et al., 2000 ; Données non publiées |
| DOI (agoniste 5-HT _{2A/2C}) | + (0.5-4 mg/kg) | + (0.5-2 mg/kg) | Nic Dhonnchadha et al., 2003a |
| BW 723C86 (agoniste 5-HT _{2B}) | + (8, 16 mg/kg) | + (4-16 mg/kg) | Nic Dhonnchadha et al., 2003a |
| RO 60-0175 (agoniste 5-HT _{2C}) | 0 | + (4 mg/kg) | Nic Dhonnchadha et al., 2003a |
| HG1 (antagoniste 5-HT moduline) | + (8-64 mg/kg) | + (64 mg/kg) | Clenet et al., 2004 |
| IRSSs | + | 0 | Hascoët et al., 2000 ; Données non publiées |
| IRSNs | + | 0 | Hascoët et al., 2000 ; Données non publiées |
| 8 OH-DPAT | 0 | 0 | Hascoët et al., 1997 ; Clenet et al 2005 |

Tableau 31 : Comparaison des effets de différents ligands dans le FPT et dans l'EPM obtenus dans le laboratoire.

(+ : Activité de type anxiolytique ; 0 : non actif)

Une précédente étude a également démontré que le sous-type de récepteurs impliqué dans l'effet anti-punition du DOI dans le FPT et l'augmentation du nombre d'entrées et du temps passé dans les bras ouverts induite par l'administration de DOI dans l'EPM serait du dans les deux cas à la stimulation des récepteurs 5-HT_{2A} puisque seul un antagoniste de ces récepteurs est capable d'inhiber l'effet du DOI dans ces deux tests (Nic Dhonnchadha et al. 2003b).

Un autre parallèle peut être fait entre les deux tests puisque récemment un protocole de test-retest dans le FPT a été mis en place dans le laboratoire et démontre une perte d'effet des

BZDs lors du retest (Hascoet et al. 1997; Ripoll et al. 2005). La perte d'effet des BZDs a également été observée dans le protocole de test-retest dans l'EPM (File 2001; Holmes et Rodgers 1999).

Les résultats obtenus dans notre laboratoire montrent une forte sensibilité et reproductibilité des deux tests aux ligands GABAergiques alors que les résultats obtenus dans l'EPM sont beaucoup moins reproductibles pour les ligands 5-HTergiques. Le FPT est un modèle simple et rapide qui de plus possède une reproductibilité plus importante que l'EPM. C'est donc pour ces raisons que mon travail de thèse a été réalisé sur le FPT.

4.1 Effet d'une déplétion du système 5-HT et d'une lésion du système NA sur l'activité de type anxiolytique des ADs et du DOI dans le FPT

Une étude antérieure à mon travail de thèse a démontré que l'administration aiguë de certains antidépresseurs entraîne des modifications du comportement des animaux dans le FPT (Hascoet et al, 2000). Tous les IRSSs utilisés dans l'étude hormis la fluoxétine entraînent un effet de type anxiolytique dans le FPT, deux IRSNs (milnacipran et venlafaxine) possèdent également cet effet. A l'inverse, l'administration de désipramine (un IRN) entraîne une activité de type anxiogène. Les autres molécules étudiées, i.e. l'imipramine et la miansérine, n'ont aucune activité dans le FPT.

D'autres études ont montré que, les deux IRSNs possédant cette activité de type anxiolytique dans le FPT ont une activité prépondérante sur la recapture de 5-HT. La venlafaxine possède une affinité plus importante pour le transporteur impliqué dans la recapture de la 5-HT que pour celui impliqué dans celle de la NA (Bolden-Watson et Richelson 1993; Muth et al. 1986). Le milnacipran possède une capacité d'inhibition de la recapture de la 5-HT et de la NA à peu près similaire, mais quand on compare l'augmentation de la libération de 5-HT dans le cortex préfrontal médian induite par une administration de milnacipran ou d'imipramine (un autre IRSN), on observe que le milnacipran entraîne une plus forte augmentation de la libération de 5-HT que l'imipramine (Mochizuki et al. 2002). Cependant, dans une autre étude, les auteurs n'observent pas de modification de la concentration de 5-HT dans le cortex préfrontal de rat après administration de venlafaxine, de paroxétine, de fluoxétine ou de désipramine (Beyer et al. 2002). Ces résultats sont contradictoires avec de nombreuses autres études qui démontrent que l'administration unique d'IRSSs augmente la concentration corticale de 5-HT (Hajos-Korcsok et al. 2000; Jordan et al. 1994; Millan et al. 1999).

D'un autre coté, ces molécules possèdent également la capacité de modifier la libération de NA dans certaines structures cérébrales. Deux études ont démontré une augmentation de la libération de NA dans le cortex préfrontal de rat après injection de venlafaxine, de milnacipran et de paroxétine à forte dose (Beyer et al. 2002; Mochizuki et al. 2002). D'autres études ont observé des effets similaires sur la libération de NA dans l'hippocampe après injection intra péritonéale de venlafaxine et sous cutanée de paroxétine (Hajos-Korcsok et al. 2000; Piacentini et al. 2003)

L'ensemble de ces données semble non seulement impliquer le système 5-HT mais également le système NA. C'est au vu de ces résultats que nous nous sommes interrogés sur l'implication du système NA dans l'activité de type anxiolytique des ADs. Pour cela, nous avons tout d'abord étudié l'effet d'une déplétion du système 5-HT et d'une lésion des neurones NA issus du locus coeruleus sur quatre antidépresseurs ayant montré une activité de type anxiolytique dans le FPT (milnacipran, venlafaxine, paroxétine et citalopram). Nos résultats démontrent que la déplétion du système 5-HT inhibe complètement l'effet de type anxiolytique des quatre molécules étudiées. La lésion des neurones NA issus du locus coeruleus entraîne la perte complète de l'effet de la venlafaxine et du milnacipran dans le FPT, alors que cette lésion diminue significativement l'activité du citalopram et de la paroxétine sans que toutefois le nombre de passages punis acceptés par la souris ne reviennent au niveau des témoins dans le FPT.

Nos résultats permettent de voir que non seulement une déplétion du système 5-HT empêche l'activité de ces molécules mais aussi qu'une lésion du système NA a un effet similaire sur les IRSNs et un effet moindre sur les IRSSs. Il semble donc que ces molécules ont besoin de l'intégrité du système 5-HT mais également du système NA pour pouvoir induire leurs effets dans le FPT. Ceci démontre donc que, dans notre test d'anxiété, une libération de NA et de 5-HT est bien à l'origine de l'effet de type anxiolytique des antidépresseurs étudiés.

Les données de la littérature reliées à notre travail suggèrent que le système NA pourrait agir de façon indirecte en activant le système 5-HT. Certaines études ont montrées que le système NA peut activer la neurotransmission sérotoninergique. La stimulation de récepteurs α_1 -noradrénergiques situés au niveau des noyaux dorsal et médian du raphé augmente la libération de 5-HT dans ces deux noyaux et le blocage de ces récepteurs réduit la libération de 5-HT dans ces deux noyaux (Adell et Artigas 1999; Bortolozzi et Artigas 2003). Ces résultats suggèrent que la libération de NA endogène in vivo stimule la libération de la 5-HT dans les noyaux dorsal et médian à travers l'activation de récepteurs α_1 -noradrénergiques dont la

présence a été démontrée sur les corps cellulaires des neurones 5-HT (Baraban et Aghajanian 1980; Gallager et Aghajanian 1976). Dans l'étude 1a de ce travail, la co-administration de prazosine, un antagoniste de récepteurs α_1 -noradrénergiques, n'antagonise pas l'effet de type anxiolytique du milnacipran, ce qui contredirait cette hypothèse mais ces résultats peuvent être discutés au vu de la sélectivité du produit utilisé. La prazosine est connue pour son activité antagoniste des récepteurs α_1 -noradrénergiques mais possède également une activité antagoniste des récepteurs α_{2B} et α_{2C} -noradrénergiques (MacDonald et al. 1997). Les récepteurs α_2 -noradrénergiques sont présents au niveau des terminaisons axonales des neurones 5-HT et inhibent la libération de ce neurotransmetteur (French 1995). Le blocage des récepteurs α_2 -noradrénergiques par la prazosine pourrait s'opposer au blocage des récepteurs α_1 -noradrénergiques induit par cette même molécule, ce qui pourrait expliquer le manque d'effet de la prazosine sur l'activité de type anxiolytique du milnacipran dans le FPT.

Récemment nous avons montré que les agonistes des récepteurs 5-HT₂ possédaient une activité de type anxiolytique dans le FPT alors que les antagonistes n'avaient aucun effet dans ce test (Nic Dhonnchadha et al. 2003a). L'effet du DOI (un agoniste 5-HT_{2A/2C}), qui avait précédemment démontré son activité de type anxiolytique dans le FPT, semble médié par l'activation spécifique de récepteurs 5-HT_{2A} (Nic Dhonnchadha et al. 2003b). De plus, l'implication des récepteurs 5-HT₂ dans le mécanisme d'action des IRSSs et des IRSNs a été démontrée par une étude menée par Nic Dhonnchadha et al en 2005. Dans cette étude, on observe que la co-administration de doses subactives de DOI avec des doses subactives de paroxétine et de venlafaxine entraîne une augmentation significative du nombre de passages punis acceptés par la souris dans le FPT et qu'un antagoniste des récepteurs 5-HT_{2A} inhibe l'activité de la paroxétine et de la venlafaxine. Ces résultats semblent montrer que l'activation des récepteurs 5-HT_{2A} fait partie du mécanisme d'action impliqué dans l'effet de type anxiolytique des ADs (Nic Dhonnchadha et al. 2005).

Nous nous sommes donc intéressés à l'effet d'une déplétion du système 5-HT et d'une lésion des neurones NA issus du locus coeruleus sur l'activité de type anxiolytique du DOI dans le FPT. Certaines études ont montré que l'administration de DOI modifiait l'activité neuronale sérotoninergique. L'administration systémique de DOI inhibe la décharge des neurones sérotoninergiques dans le raphé dorsal de rat et diminue également la concentration extracellulaire de 5-HT dans le cortex frontal de rat (Garratt et al. 1991). D'autres études ont permis d'observer des résultats différents qui montrent que la libération de 5-HT dans le

cortex préfrontal médian de rat dosé par microdialyse est augmenté par l'injection locale de DOI dans cette même structure (Amargos-Bosch et al. 2003) alors que l'administration sous cutanée de DOI n'entraîne aucune modification de la libération de 5-HT dans la même structure (Gobert et Millan 1999b). Le DOI possède également la capacité de modifier l'activité neuronale noradrénergique. Deux études ont montré que le DOI avait des effets inhibiteurs sur la NA. Dans la première étude, les auteurs montrent que l'administration sous cutanée de DOI diminue significativement la libération de NA dans l'hippocampe de rat (Done et Sharp 1992). Dans la seconde étude, le DOI apparaît diminuer la fréquence de décharge des neurones NA du locus coeruleus de rat (Szabo et Blier 2001a). Ces données pouvaient nous faire supposer que l'activité de type anxiolytique du DOI dans le FPT était induite par sa capacité à modifier l'activité neuronale 5-HT ou NA.

Or, la déplétion du système 5-HT et la lésion des neurones NA issus du locus coeruleus ne modifient pas cette activité. Ces résultats montrent que l'effet du DOI dans le FPT n'est pas dû à une modification de l'activité neuronale noradrénergique ou sérotoninergique par de possibles boucles de régulations mais que son action passe par l'activation de récepteurs 5-HT₂ situés au niveau post-synaptique localisés sur d'autres types neuronaux.

4.2 Relations entre le système GABA et le système 5-HT dans le FPT

Les résultats exposés précédemment montrent que les récepteurs 5-HT₂ stimulés par le DOI dans le FPT ne sont ni présents sur les neurones noradrénergiques issus du locus coeruleus ni sur les neurones sérotoninergiques. De plus, une étude menée par Ripoll (2006) montre que le DOI garde toujours son effet dans le FPT chez des souris dont le système dopaminergique a été lésé par une administration de 6-OHDA (6-hydroxydopamine) (données non publiées).

Il nous a donc semblé essentiel de nous intéresser aux interactions qui pouvaient exister entre la stimulation des récepteurs 5-HT₂ induit par le DOI et l'activation ou l'inhibition des différents récepteurs du système GABA dans le FPT. Ce neurotransmetteur est le premier à avoir été impliqué dans les mécanismes neurobiologiques de l'anxiété, grâce à la découverte des effets anxiolytiques des BZDs chez l'homme. Nombre de ces molécules (tels que le diazépam et l'alprazolam) possèdent des activités de type anxiolytique dans le FPT (Bourin et al. 1992).

Nous avons donc examiné l'effet de différents ligands des récepteurs GABA_A et GABA_B et de leur co-administration avec le DOI dans le FPT.

Nos résultats montrent que seuls les agonistes des récepteurs aux BZDs (diazépam et alprazolam) ont une activité de type anxiolytique dans le FPT. L'administration aiguë d'agonistes et d'antagonistes des récepteurs GABA_A (le muscimol, la picrotoxine et la bicuculline) et GABA_B (le baclofen et le CGP 35348) ne modifie pas le comportement des animaux dans le FPT. Par contre, ces molécules ont la capacité de modifier l'activité de type anxiolytique du DOI dans le FPT. L'agoniste des récepteurs GABA_A, le muscimol, ainsi que les agonistes des récepteurs aux BZDs, le diazépam et l'alprazolam, administrés 15 min avant le DOI potentialisent l'activité du DOI dans le FPT. L'antagoniste des récepteurs aux BZDs, le flumazénil, administré également 15 min avant le DOI, ne modifie pas l'activité du DOI contrairement aux antagonistes des récepteurs GABA_A, la picrotoxine et la bicuculline, qui inhibent son activité. Cette différence peut s'expliquer par les différents lieux de fixation de ces molécules sur le récepteur GABA_A. La bicuculline est un antagoniste compétitif du GABA car elle se fixe sur le site de fixation du GABA, situé sur la sous-unité α du récepteur, et empêche l'ouverture du canal chlore induite dans des conditions normales par la fixation de GABA. La picrotoxine, de son côté, est un antagoniste non compétitif du GABA car elle se fixe à l'intérieur du canal chlore formé par le récepteur GABA_A et de ce fait la fixation de GABA sur le récepteur ne peut plus entraîner l'ouverture du canal. Le flumazénil est un antagoniste des BZDs qui se fixe sur le site aux BZDs localisé sur la sous-unité β du récepteur, il empêche la fixation d'agoniste des BZDs qui ont pour fonction de stabiliser le récepteur en conformation de haute affinité pour le GABA. Le blocage de ce site n'empêche pas l'ouverture du canal chlore, induite par la fixation de GABA. Ceci peut expliquer pourquoi les résultats obtenus sont différents quand on utilise un antagoniste du récepteur GABA_A (picrotoxine ou bicuculline) et un agoniste des BZDs (flumazénil).

Ces résultats sont à corréliser avec une autre étude réalisée dans notre laboratoire qui montre que la co-administration d'agonistes spécifiques des différents sous-types de récepteurs 5-HT₂ c'est-à-dire les récepteurs 5-HT_{2A,2B,2C} (le DOI, le BW723C86 et le RO 60-0175) avec deux agonistes des récepteurs aux BZDs (alprazolam et diazépam) potentialisent l'activité de type anxiolytique de ces derniers alors que les antagonistes des récepteurs 5-HT₂ n'ont aucune activité sur les effets de l'alprazolam et du diazépam dans le FPT (résultats soumis pour publication).

Nos résultats impliquent donc une forte corrélation entre les récepteurs 5-HT₂ et le système GABA. La plupart des études citées dans la littérature étudiant les relations existantes entre le

système GABA et les récepteurs 5-HT₂ ont été principalement réalisées dans deux structures cérébrales que sont l'hippocampe et le cortex préfrontal de rat. Ces études utilisent en grande majorité des techniques électrophysiologiques *in vivo* et *in vitro* et démontrent que la 5-HT augmentent l'activité neuronale GABAergique dans l'hippocampe et dans le cortex de rat via la stimulation des récepteurs 5-HT₂ (Abi-Saab et al. 1999; Chiang et Aston-Jones 1993; Gulyas et al. 1999; Katsurabayashi et al. 2003; Lee et al. 1999; Rainnie 1999; Shen et Andrade 1998).

L'hypothèse la plus probable au vu de nos résultats serait donc une activation des récepteurs 5-HT₂ présents sur les neurones GABA dans le cortex préfrontal ou dans l'hippocampe qui entraînerait une augmentation de la libération de GABA. Cette hypothèse expliquerait la potentialisation de l'effet du DOI avec les agonistes de récepteurs aux BZDs et de l'agoniste des récepteurs GABA_A, mais aussi, l'effet inhibiteur des antagonistes des récepteurs GABA_A. D'un autre côté, cette hypothèse expliquerait également pourquoi l'administration de flumazénil, un antagoniste des récepteurs aux BZDs ne modifie pas l'effet anti-punition du DOI. L'activation des récepteurs 5-HT₂ par l'administration de DOI augmenterait la libération de GABA. Cette augmentation de GABA dans la fente synaptique irait activer les récepteurs GABA_A post-synaptiques et le flumazénil ne pourrait donc pas empêcher l'augmentation de la fréquence d'ouverture du canal induite par la fixation de molécule de GABA, d'où le manque d'effet du flumazénil.

Dans cette même étude, nous avons étudié l'effet de différents ligands des récepteurs GABA_B sur l'activité de type anxiolytique du DOI dans le FPT. Nos résultats montrent que l'agoniste des récepteurs GABA_B utilisé dans cette étude, inhibe l'effet anti-punition du DOI dans le FPT alors que l'administration d'un antagoniste de ces récepteurs ne modifie pas cet effet du DOI. Les autorécepteurs GABA_B agissent sur la libération de GABA comme un système de rétrocontrôle négatif et donc entraînent, lors de leur activation, une diminution de la libération de GABA (Langer 1997; Zarrindast et al. 2001). Une explication de nos résultats serait que le DOI et le baclofen auraient des effets opposés sur les neurones GABA. Le DOI activerait les récepteurs 5-HT₂ entraînant une augmentation de la libération de GABA, alors que le baclofen activerait les récepteurs GABA_B entraînant une diminution de la libération de GABA. Dans notre étude, le baclofen est administré 15 min avant le DOI, il est donc possible que le baclofen diminue la libération de GABA, ce qui empêcherait ensuite l'augmentation de la libération de GABA induite par le DOI, d'où une inhibition de l'activité de type anxiolytique du DOI dans le FPT.

Tous ces résultats tendent à valider notre hypothèse d'une activation des récepteurs 5-HT₂ localisés sur des neurones GABA par le DOI.

4.3 Effet des récepteurs α_2 -noradrénergiques sur l'activité de type anxiolytique des ADs et du DOI dans le FPT

Les agonistes des récepteurs α_2 -noradrénergiques sont connus pour leur activité dans les modèles animaux de l'anxiété. La clonidine et le guanabenz ont montré une activité de type anxiolytique dans le test de Vogel ainsi que dans le test du labyrinthe en croix surélevée et le test d'interactions sociales chez le rat (Handley et Mithani 1984; Millan et al. 2000; Zarrindast et al. 2000). De plus, ces récepteurs sont des récepteurs inhibiteurs qui, lorsqu'ils sont activés, inhibent la libération de NA et de 5-HT (Adell et Artigas 1999; Dennis et al. 1987; Haddjeri et al. 1996; Svensson et al. 1975).

Dans un premier temps, nous nous sommes intéressés à l'effet de l'administration d'agonistes des récepteurs α_2 -noradrénergiques, la clonidine, le guanabenz et la guanfacine, dans notre test. Nos résultats montrent que ces agonistes ne modifient pas le comportement des animaux dans le FPT. Ensuite, nous avons observé l'effet de ces agonistes en co-administration avec les ADs. Les agonistes des récepteurs α_2 -noradrénergiques utilisés (clonidine et guanabenz) antagonisent l'effet de type anxiolytique induit par l'administration aiguë d'ADs dans le FPT uniquement si ces agonistes sont administrés 15 min avant l'administration de ADs. Ces résultats montrent que les récepteurs α_2 -noradrénergiques doivent être activés préalablement pour bloquer l'effet des ADs dans le FPT.

Nous avons ensuite observé l'effet de ces agonistes sur l'activité de type anxiolytique du DOI dans notre test. Les résultats obtenus montrent un effet des agonistes des récepteurs α_2 -noradrénergiques sur l'effet du DOI identique à celui obtenu sur l'activité des ADs dans le FPT. Matsumoto et al (1997) suggère que l'activation des récepteurs α_2 -noradrénergiques entraîne des changements conformationnels des récepteurs 5-HT₂ qui diminueraient la capacité de stimulation des agonistes des récepteurs 5-HT₂ au niveau post-synaptique (Matsumoto et al. 1997).

De plus, l'utilisation d'un agoniste sélectif des récepteurs α_{2A} -noradrénergiques semble indiquer que l'effet inhibiteur de ces agonistes est induit par l'activation spécifique des récepteurs α_{2A} -noradrénergiques.

Le manque d'effet d'une lésion du système NA sur l'activité de type anxiolytique du DOI ainsi que l'effet inhibiteur des agonistes des récepteurs α_{2A} -noradrénergiques laissent à penser que les récepteurs activés dans ce cas sont des hétérorécepteurs post-synaptiques. L'étape suivante de mon travail était donc de confirmer ou d'infirmer cette hypothèse par une déplétion du système 5-HT et une lésion du système NA. Les résultats indiquent que la déplétion du système 5-HT et la lésion du système NA ne modifient pas l'activité inhibitrice de la clonidine sur l'effet de type anxiolytique du DOI dans le FPT.

Il semble donc que les récepteurs α_{2A} -noradrénergiques agissent sur l'activité de type anxiolytique du DOI comme des régulateurs négatifs et que ces récepteurs sont localisés sur des types de neurones différents des neurones 5-HT et des neurones NA issus du locus coeruleus.

Les observations de Wang et al (1998) montrent qu'un agoniste des récepteurs α_2 -noradrénergiques, la clonidine, inhibe le potentiel post-synaptique inhibiteur des neurones supraoptiques de rat induit par la stimulation des récepteurs GABA_A. Cet effet serait la résultante d'une stimulation directe des récepteurs α_2 -noradrénergiques présents sur les neurones GABA qui inhiberait la libération de GABA (Wang et al. 1998). De plus, la présence de ces récepteurs est prouvée sur les neurones GABA des aires préoptiques de rat (Modirrousta et al. 2004). Ces résultats confirmeraient l'hypothèse d'une co-localisation des récepteurs α_2 -noradrénergiques avec les récepteurs 5-HT₂ sur des neurones GABA.

4.4 Localisation structurelle des récepteurs cibles impliqués dans l'effet du DOI

A ce stade de mon travail, les résultats semblent montrer une activité du DOI dans le FPT via l'activation des récepteurs 5-HT₂ localisés sur des neurones GABAergiques. Il nous a paru intéressant ensuite de rechercher la localisation structurelle de ces récepteurs.

Dans un premier temps, nous avons étudié les modifications des concentrations monoaminergiques dans différentes structures cérébrales chez des souris exposées à un FPT. La technique de dissection utilisée dans le laboratoire permet d'isoler quatre structures spécifiques l'hypothalamus, l'hippocampe, le striatum et le cortex. Nous avons observé une diminution significative du taux de 5-HT et de 5-HIAA dans l'hippocampe accompagnée par une augmentation du « turnover » de la 5-HT dans le striatum sans modification du taux de 5-HT et une diminution du « turnover » de la 5-HT dans le cortex. Ces résultats démontrent que

la libération de 5-HT est réduite dans l'hippocampe après une exposition des animaux au FPT. Dans le striatum, nous avons observé une augmentation du métabolisme de dégradation de la 5-HT alors que dans le cortex ce métabolisme est réduit. La NA est augmentée au niveau du cortex et nous avons observé une diminution de la dopamine dans l'hypothalamus. Malheureusement nous n'avons pas pu observer les modifications possibles des concentrations de métabolites de ces deux neurotransmetteurs car notre méthode ne nous a pas permis de doser le métabolite de la NA et car le taux de HVA est en dessous de notre seuil de détection dans l'hypothalamus.

Ces résultats montrent que l'hippocampe semble être le siège des modifications du système 5-HT intervenant après un FPT.

La technique de dissection des structures utilisées dans le laboratoire ne nous a pas permis d'observer les modifications de concentration des monoamines dans des structures fortement impliquées dans les troubles anxieux comme l'amygdale et la substance grise périaqueducale (PAG). Nous avons donc décidé d'étudier l'effet d'une injection locale de DOI dans trois structures précises qui sont : l'hippocampe, l'amygdale et la PAG.

Nos résultats montrent que l'administration locale de DOI dans l'hippocampe entraîne un effet de type anxiolytique dans le FPT alors que l'injection locale de DOI dans l'amygdale et la PAG entraîne des effets de type anxiogène.

Depuis longtemps, il est établi que l'hippocampe est impliqué dans les mécanismes de certaines formes de mémoire (Scoville et Milner 1957). Cependant, il est devenu clair que l'hippocampe joue également un rôle dans les mécanismes neurobiologiques de l'anxiété. La théorie de Gray en 1982 est basée sur les similarités qui peuvent exister entre l'effet de l'administration de molécules anxiolytiques et celui d'une lésion de l'hippocampe, mais également, sur le fait que les molécules anxiolytiques produisent des changements caractéristiques de l'activité électrique de l'hippocampe (Gray 1982). Depuis cette théorie, de nombreuses études ont montré l'implication de l'hippocampe dans la circuiterie neuronale de la peur conditionnée puisque des lésions de l'hippocampe peuvent abolir la peur conditionnée (Kim et Fanselow 1992; Maren et al. 1997; Young et al. 1994). Bannerman et al (2004) proposent une régionalisation de l'hippocampe et émettent l'hypothèse que la partie dorsale de l'hippocampe serait plus liée aux processus de mémoire alors que la partie ventrale serait liée aux processus d'anxiété (Bannerman et al. 2004). Une lésion de l'hippocampe ventrale entraîne des effets comportementaux identiques à ceux induits par les benzodiazépines provoquant une réduction de l'anxiété. Les rats qui ont un hippocampe ventral lésé montrent une réduction de l'hyponéophagie correspondant à une prise alimentaire plus rapide dans un

environnement non familial (Bannerman et al. 2002; Bannerman et al. 2003), une augmentation des interactions sociales (Bannerman et al. 2002), une réduction du temps de latence d'entrer dans le compartiment blanc et éclairé dans le test de la double enceinte illuminée et une augmentation du temps passé dans la partie la plus anxiogène dans une version modifiée du labyrinthe en croix surélevé (Bannerman et al. 2002; Kjelstrup et al. 2002). Ces résultats montrent que l'hippocampe ne semble pas seulement impliqué dans les mécanismes neurobiologiques de la peur conditionnée car les résultats cités précédemment ont tous été obtenus dans des modèles animaux de l'anxiété non conditionnés et éthologiques.

D'autres études ont également étudié l'amygdale dans les mécanismes de peur et semblent définir cette structure comme étant le centre d'un système de défense impliqué dans l'expression et l'acquisition de la peur conditionnée (Davis 1992; Kapp et al. 1984). Les études impliquant des lésions de l'amygdale ont également démontrées qu'une amygdaléctomie bloque les vocalises ultrasoniques produites par les rats dans des situations de peur (Goldstein et al. 1996) mais aussi l'immobilisation induite par un stress chez le rat (Blanchard et Blanchard 1972; Goldstein et al. 1996; Roozendaal et al. 1991). La lésion de l'amygdale provoquerait donc une diminution de l'anxiété chez les animaux.

Il est connu que des informations sensibles et auditives arrivent aux noyaux latéral et basolatéral de l'amygdale directement du thalamus ou par des connections indirectes à travers le cortex (LeDoux 1992). Ces deux noyaux de l'amygdale envoient des projections vers le noyau central de l'amygdale qui lui-même projette vers la PAG (Hopkins et Holstege 1978). Cette aire en retour possède des projections dirigées vers les noyaux *ambiguus* et *retroambiguus*, sites de localisation des motoneurones laryngés, pharyngés et respiratoires de façon directe ou indirecte (Holstege 1989; Jurgens et Pratt 1979; Yajima et al. 1982). La stimulation électrique de la PAG entraîne l'apparition de vocalises ultrasoniques chez le rat anesthésié (Yajima et al. 1980). Fanselow suggère que la fonction de l'amygdale serait de synthétiser l'arrivée des différents stimuli venant de l'environnement et de signaler à la PAG le degré de danger qu'ils représentent pour l'organisme. La PAG a la charge d'organiser et de commander le comportement et les réactions défensives appropriés (Fanselow 1991). Dans le même sens, Deakin et Graeff propose une théorie de l'anxiété impliquant l'amygdale et la PAG (Deakin et Graeff 1991). L'amygdale serait chargée de la peur conditionnée et de l'anxiété anticipatoire. Un dysfonctionnement de ce système entraînerait un état anxieux qui chez l'homme est connu comme étant le désordre anxieux généralisé. D'un autre côté, la PAG aurait la charge d'organiser la réponse à des stimuli aversifs non conditionnés comme

l'asphyxie ou des stimuli entraînant une peur innée. Chez l'homme, cette dysfonction correspondrait aux troubles paniques.

Finalement, l'amygdalectomie aurait un effet direct sur un nombre limité de systèmes responsables du stress qui interagit secondairement avec d'autres systèmes pour engendrer les réactions de défense appropriées (Goldstein et al. 1996).

Des relations existent également entre l'hippocampe et l'amygdale. L'aire ventrale de l'hippocampe projette vers les noyaux basolatéral et basomédian de l'amygdale (Pitkanen et al. 1997) mais il existe également des projections du noyau basal de l'amygdale vers différentes zones de l'hippocampe (Pikkarainen et al. 1999). Ces projections semblent être induites dans le conditionnement contextuel.

L'amygdale et la PAG sont deux structures fortement innervées par des fibres sérotoninergiques provenant du noyau dorsal du raphé. Dans l'amygdale, la 5-HT a montré des effets de types anxiogènes qui sont dûs à l'activation des récepteurs 5-HT₂ puisque que l'administration d'agonistes de ces récepteurs provoque des effets similaires à ceux de la 5-HT. De plus, les antagonistes de ces récepteurs entraînent un effet de type anxiolytique ou annule l'effet des agonistes dans l'«open field» ainsi que le test de Geller-Seifter chez le rat (Campbell et Merchant 2003; de Mello Cruz et al. 2005; Hodges et al. 1987). Nos résultats semblent en accord avec ces données mais aussi avec le fait qu'une amygdalectomie entraîne un effet de type anxiolytique.

L'effet obtenu dans notre étude, après injection locale de DOI dans la PAG, semble cohérent avec certains résultats obtenus dans une autre étude qui observe que l'effet aversif induit par une stimulation électrique de la PAG est diminué par des antagonistes des récepteurs 5-HT₂ (Jenck et al. 1989). Dans le même sens, de Paula Soares et Zangrossi ont observé un effet de type anxiogène d'une injection locale de 5-HT dans le labyrinthe en T surélevé chez le rat qui est inhibé par une administration préalable d'antagonistes des récepteurs 5-HT_{2A/2C} dans la PAG (de Paula Soares et Zangrossi 2004).

Ces deux structures semblent impliquées dans les mécanismes de mise en place des réponses défensives. Il paraît donc logique que la stimulation de récepteurs excitateurs que sont les récepteurs 5-HT₂ dans ces structures entraîne des effets de type anxiogène. De plus l'étude de la littérature semble impliquer très étroitement ces deux structures et l'effet anxiolytique des benzodiazépines.

A l'opposé des résultats précédents, le DOI injecté dans l'hippocampe entraîne un effet de type anxiolytique dans le FPT. Ces résultats sont en opposition avec l'unique étude qui a consisté à injecter du mCPP dans l'hippocampe et qui démontre un effet de type anxiogène dans le test d'interaction sociale chez le rat (Whitton et Curzon 1990). Le mCPP est un agoniste des récepteurs 5-HT₂ qui possède une affinité plus importante pour les récepteurs 5-HT_{2C}. Les résultats obtenus dans le FPT ont montré que l'effet du DOI administré par voie i.p. est médié par la stimulation des récepteurs 5-HT_{2A} (Nic Dhonnchadha et al. 2003b) ce qui expliquerait la différence des effets obtenue dans notre étude et dans l'étude de Whitton et Curzon. De plus, le mCPP n'a aucun effet dans le FPT (Nic Dhonnchadha et al. 2003a) ce qui implique un mécanisme d'action du DOI différent du mCPP dans le FPT

Nos résultats semblent indiquer que le DOI agirait quand il est administré par voie intrapéritonéale, par une stimulation de récepteurs 5-HT₂ présents au niveau de l'hippocampe.

Certaines études ont montré que les récepteurs 5-HT_{2A} et 5-HT_{2C} sont exprimés dans cette structure et que ces récepteurs sont fonctionnels (Baxter et al. 1995; Pompeiano et al. 1994; Xu et Pandey 2000). De plus, il a été prouvé que les terminaisons axonales sérotoninergiques présentes dans l'hippocampe forment des synapses avec des interneurons GABAergiques (Freund et al. 1990). Des études électrophysiologiques ont observé que la stimulation des récepteurs 5-HT₂ présents dans l'hippocampe induit une augmentation de la fréquence du potentiel post-synaptique inhibiteur GABAergique (Ropert et Guy 1991; Shen et Andrade 1998). Une autre étude a également démontré que la 5-HT dépolarise les interneurons GABAergiques de l'hippocampe via l'activation d'un courant entrant et que cette dépolarisation est mimée par le DOI alors qu'elle est inhibée par l'application d'un antagoniste des récepteurs 5-HT₂ la ritansérine (Lee et al. 1999). Ces données semblent concordantes avec nos résultats, puisque dans l'étude 4, on peut observer une inhibition de l'effet de type anxiolytique du DOI dans le FPT après l'administration préalable d'antagoniste des récepteurs GABA_A.

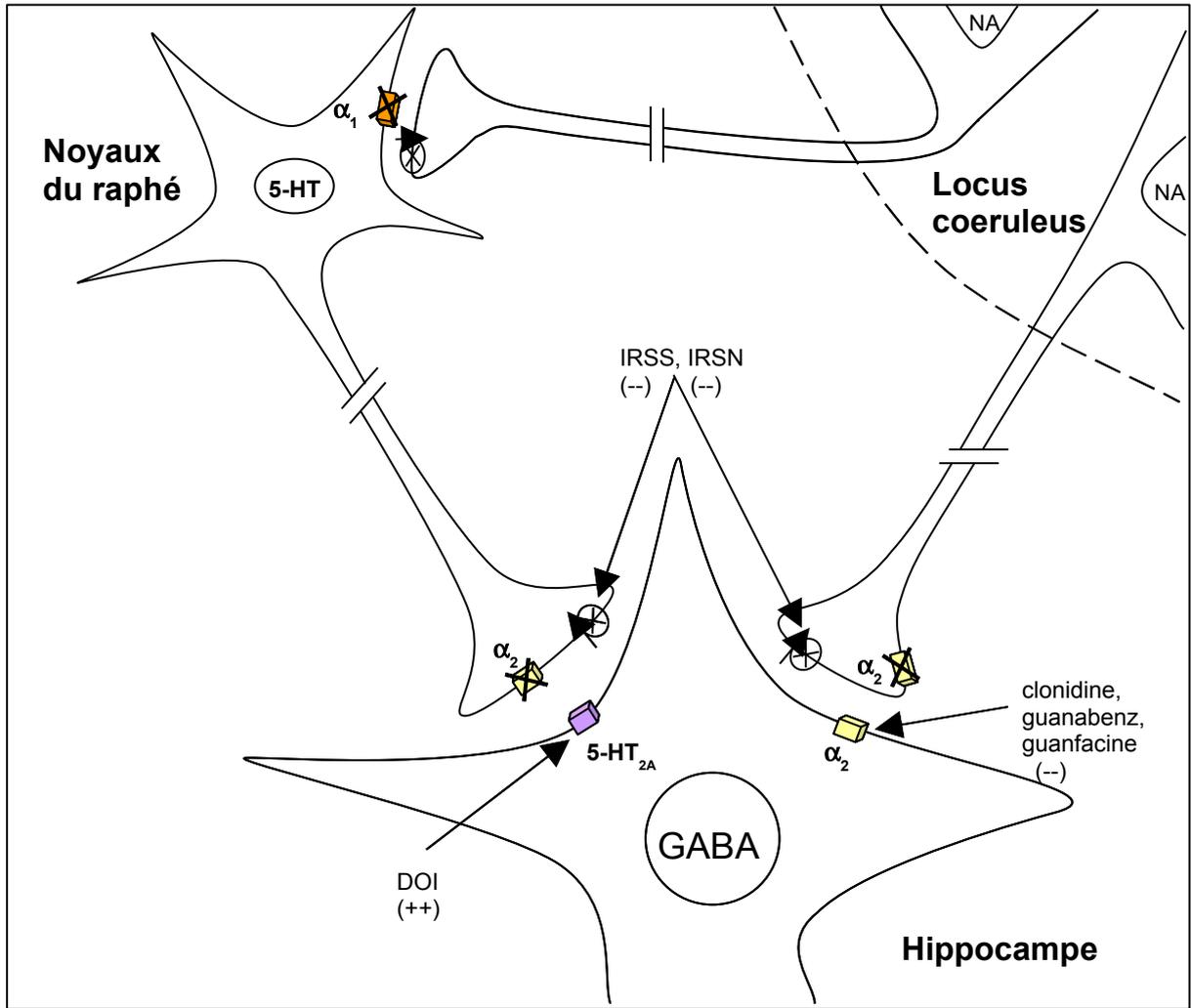


Figure 39 : Schéma Récapitulatif des hypothèses

Récepteurs

⊗
Transporteurs

5 CONCLUSION

Grâce à ce travail, nous avons tenté de comprendre les mécanismes neurobiologiques qui sont mis en oeuvre dans le FPT après une administration de DOI pour induire un effet de type anxiolytique.

A la fin de ce travail, nous pouvons émettre l'hypothèse que l'effet de type anxiolytique du DOI dans le FPT, quand il est administré par voie intra-péritonéale, est induit par l'activation de récepteurs 5-HT_{2A} présents au niveau de l'hippocampe sur des neurones GABAergiques et que la noradrénaline agirait seulement comme un régulateur de cet effet par l'activation de récepteurs α_2 -noradrénergiques post-synaptiques co-localisés sur ces neurones.

De plus, les injections localisées de DOI semblent montrer que le FPT répond à la théorie d'Iversen puisque une augmentation de 5-HT qui stimulerait les récepteurs 5-HT₂ entraînerait des effets de type anxiogènes. De plus, ces résultats valident encore un peu plus notre modèle. Afin de confirmer l'effet du DOI sur les neurones GABAergiques, il aurait été intéressant de mettre en place des études électrophysiologiques pour observer l'effet local du DOI sur les neurones GABAergiques de l'hippocampe.

Il serait également intéressant par la suite d'essayer de déterminer le site d'action des benzodiazépines actives dans le FPT par d'autres injections localisées ou par des lésions de certaines structures.

6 REFERENCES

- Abellan MT, Adell A, Honrubia MA, Mengod G, Artigas F. GABAB-RI receptors in serotonergic neurons: effects of baclofen on 5-HT output in rat brain. *Neuroreport*, 2000, 11: p. 941-5
- Abi-Saab WM, Bubser M, Roth RH, Deutch AY. 5-HT₂ receptor regulation of extracellular GABA levels in the prefrontal cortex. *Neuropsychopharmacology*, 1999, 20: p. 92-6
- Abramowski D, Rigo M, Duc D, Hoyer D, Staufenbiel M. Localization of the 5-hydroxytryptamine_{2C} receptor protein in human and rat brain using specific antisera. *Neuropharmacology*, 1995, 34: p. 1635-45
- Adell A, Artigas F. Regulation of the release of 5-hydroxytryptamine in the median raphe nucleus of the rat by catecholaminergic afferents. *Eur J Neurosci*, 1999, 11: p. 2305-11
- Adolphs R, Tranel D, Damasio H, Damasio A. Impaired recognition of emotion in facial expressions following bilateral damage to the human amygdala. *Nature*, 1994, 372: p. 669-72
- Aggleton JP. A description of intra-amygdaloid connections in old world monkeys. *Exp Brain Res*, 1985, 57: p. 390-9
- Aggleton JP. The contribution of the amygdala to normal and abnormal emotional states. *Trends Neurosci*, 1993, 16: p. 328-33
- Allgulander C, Mangano R, Zhang J, Dahl AA, Lepola U, Sjodin I, Emilien G. Efficacy of Venlafaxine ER in patients with social anxiety disorder: a double-blind, placebo-controlled, parallel-group comparison with paroxetine. *Hum Psychopharmacol*, 2004, 19: p. 387-96
- Allgulander C, Nilsson B. A prospective study of 86 new patients with social anxiety disorder. *Acta Psychiatr Scand*, 2001, 103: p. 447-52
- Amano K, Tanikawa T, Iseki H, Kawabatake H, Notani M, Kawamura H, Kitamura K. Single neuron analysis of the human midbrain tegmentum. Rostral mesencephalic reticulotomy for pain relief. *Appl Neurophysiol*, 1978, 41: p. 66-78
- Amaral DG. The primate amygdala and the neurobiology of social behavior: implications for understanding social anxiety. *Biol Psychiatry*, 2002, 51: p. 11-7
- Amargos-Bosch M, Adell A, Bortolozzi A, Artigas F. Stimulation of alpha₁-adrenoceptors in the rat medial prefrontal cortex increases the local in vivo 5-hydroxytryptamine release: reversal by antipsychotic drugs. *J Neurochem*, 2003, 87: p. 831-42

- Amargos-Bosch M, Bortolozzi A, Puig MV, Serrats J, Adell A, Celada P, Toth M, Mengod G, Artigas F. Co-expression and in vivo interaction of serotonin1A and serotonin2A receptors in pyramidal neurons of prefrontal cortex. *Cereb Cortex*, 2004, 14: p. 281-99
- Antoniadis EA, McDonald RJ. Amygdala, hippocampus and discriminative fear conditioning to context. *Behav Brain Res*, 2000, 108: p. 1-19
- Aron C, Simon P, Larousse C, Boissier JR. Evaluation of a rapid technique for detecting minor tranquilizers. *Neuropharmacology*, 1971, 10: p. 459-69
- Azmitia EC, Segal M. An autoradiographic analysis of the differential ascending projections of the dorsal and median raphe nuclei in the rat. *J Comp Neurol*, 1978, 179: p. 641-67
- Bale TL, Contarino A, Smith GW, Chan R, Gold LH, Sawchenko PE, Koob GF, Vale WW, Lee KF. Mice deficient for corticotropin-releasing hormone receptor-2 display anxiety-like behaviour and are hypersensitive to stress. *Nat Genet*, 2000, 24: p. 410-4
- Bandler R, Carrive P. Integrated defence reaction elicited by excitatory amino acid microinjection in the midbrain periaqueductal grey region of the unrestrained cat. *Brain Res*, 1988, 439: p. 95-106
- Bandler R, Depaulis A. Elicitation of intraspecific defence reactions in the rat from midbrain periaqueductal grey by microinjection of kainic acid, without neurotoxic effects. *Neurosci Lett*, 1988, 88: p. 291-6
- Bandler R, Shipley MT. Columnar organization in the midbrain periaqueductal gray: modules for emotional expression? *Trends Neurosci*, 1994, 17: p. 379-89
- Bandoh T, Hayashi M, Ino K, Takada S, Ushizawa Z, Hoshi K. Acute effect of milnacipran on the relationship between the locus coeruleus noradrenergic and dorsal raphe serotonergic neuronal transmitters. *European Neuropsychopharmacology*, 2004, 14: p. 471-78
- Bannerman DM, Deacon RM, Offen S, Friswell J, Grubb M, Rawlins JN. Double dissociation of function within the hippocampus: spatial memory and hyponeophagia. *Behav Neurosci*, 2002, 116: p. 884-901
- Bannerman DM, Grubb M, Deacon RM, Yee BK, Feldon J, Rawlins JN. Ventral hippocampal lesions affect anxiety but not spatial learning. *Behav Brain Res*, 2003, 139: p. 197-213
- Bannerman DM, Rawlins JN, McHugh SB, Deacon RM, Yee BK, Bast T, Zhang WN, Pothuizen HH, Feldon J. Regional dissociations within the hippocampus--memory and anxiety. *Neurosci Biobehav Rev*, 2004, 28: p. 273-83
- Baraban JM, Aghajanian GK. Suppression of firing activity of 5-HT neurons in the dorsal raphe by alpha-adrenoceptor antagonists. *Neuropharmacology*, 1980, 19: p. 355-63

- Barbaresi P, Gazzanelli G, Malatesta M. GABA transporter-1 (GAT-1) immunoreactivity in the cat periaqueductal gray matter. *Neurosci Lett*, 1998, 250: p. 123-6
- Barr GA, Gibbons JL, Bridger WH. Inhibition of rat predatory aggression by acute and chronic D- and L-amphetamine. *Brain Res*, 1977, 124: p. 565-70
- Baxter G, Kennett G, Blaney F, Blackburn T. 5-HT₂ receptor subtypes: a family re-united? *Trends Pharmacol Sci*, 1995, 16: p. 105-10
- Beck SG, Birnstiel S, Choi KC, Pouliot WA. Fluoxetine selectively alters 5-hydroxytryptamine_{1A} and gamma-aminobutyric acid_B receptor-mediated hyperpolarization in area CA1, but not area CA3, hippocampal pyramidal cells. *J Pharmacol Exp Ther*, 1997, 281: p. 115-22
- Beekman M, Flachskamm C, Linthorst AC. Effects of exposure to a predator on behaviour and serotonergic neurotransmission in different brain regions of C57bl/6N mice. *Eur J Neurosci*, 2005, 21: p. 2825-36
- Behbehani MM. Functional characteristics of the midbrain periaqueductal gray. *Prog Neurobiol*, 1995, 46: p. 575-605
- Behbehani MM, Jiang MR, Chandler SD, Ennis M. The effect of GABA and its antagonists on midbrain periaqueductal gray neurons in the rat. *Pain*, 1990, 40: p. 195-204
- Behbehani MM, Liu H, Jiang M, Pun RY, Shipley MT. Activation of serotonin_{1A} receptors inhibits midbrain periaqueductal gray neurons of the rat. *Brain Res*, 1993, 612: p. 56-60
- Belzung C, Agmo A. Naloxone potentiates the effects of subeffective doses of anxiolytic agents in mice. *Eur J Pharmacol*, 1997, 323: p. 133-6
- Belzung C, Berton F. Further pharmacological validation of the BALB/c neophobia in the free exploratory paradigm as an animal model of trait anxiety. *Behav Pharmacol*, 1997, 8: p. 541-8
- Belzung C, El Hage W, Moindrot N, Griebel G. Behavioral and neurochemical changes following predatory stress in mice. *Neuropharmacology*, 2001, 41: p. 400-8
- Belzung C, Griebel G. Measuring normal and pathological anxiety-like behaviour in mice: a review. *Behav Brain Res*, 2001, 125: p. 141-9
- Berridge CW, Waterhouse BD. The locus coeruleus-noradrenergic system: modulation of behavioral state and state-dependent cognitive processes. *Brain Res Brain Res Rev*, 2003, 42: p. 33-84

- Bertoglio LJ, Zangrossi H, Jr. Involvement of dorsolateral periaqueductal gray cholecystokinin-2 receptors in the regulation of a panic-related behavior in rats. *Brain Res*, 2005, 1059: p. 46-51
- Beyer CE, Boikess S, Luo B, Dawson LA. Comparison of the effects of antidepressants on norepinephrine and serotonin concentrations in the rat frontal cortex: an in-vivo microdialysis study. *J Psychopharmacol*, 2002, 16: p. 297-304
- Bhagwagar Z, Wylezinska M, Taylor M, Jezard P, Matthews PM, Cowen PJ. Increased brain GABA concentrations following acute administration of a selective serotonin reuptake inhibitor. *Am J Psychiatry*, 2004, 161: p. 368-70
- Bianchi C, Rodi D, Marino S, Beani L, Siniscalchi A. Dual effects of 5-HT₄ receptor activation on GABA release from guinea pig hippocampal slices. *Neuroreport*, 2002, 13: p. 2177-80
- Blanchard DC, Blanchard RJ. Innate and conditioned reactions to threat in rats with amygdaloid lesions. *J Comp Physiol Psychol*, 1972, 81: p. 281-90
- Blier P. The pharmacology of putative early-onset antidepressant strategies. *Eur Neuropsychopharmacol*, 2003, 13: p. 57-66
- Bobker DH. A slow excitatory postsynaptic potential mediated by 5-HT₂ receptors in nucleus prepositus hypoglossi. *J Neurosci*, 1994, 14: p. 2428-34
- Boissier JR, Simon P. [Action of caffeine on the spontaneous motility of the mouse]. *Arch Int Pharmacodyn Ther*, 1965, 158: p. 212-21
- Boissier JR, Simon P, Aron C. A new method for rapid screening of minor tranquilizers in mice. *Eur J Pharmacol*, 1968, 4: p. 145-51
- Bolden-Watson C, Richelson E. Blockade by newly-developed antidepressants of biogenic amine uptake into rat brain synaptosomes. *Life Sci*, 1993, 52: p. 1023-9
- Bonaventure P, Guo H, Tian B, Liu X, Bittner A, Roland B, Salunga R, Ma XJ, Kamme F, Meurers B, Bakker M, Jurzak M, Leysen JE, Erlander MG. Nuclei and subnuclei gene expression profiling in mammalian brain. *Brain Res*, 2002, 943: p. 38-47
- Boothman LJ, Sharp T. A role for midbrain raphe gamma aminobutyric acid neurons in 5-hydroxytryptamine feedback control. *Neuroreport*, 2005, 16: p. 891-6
- Borsini F, Podhorna J, Marazziti D. Do animal models of anxiety predict anxiolytic-like effects of antidepressants? *Psychopharmacology (Berl)*, 2002, 163: p. 121-41
- Bortolozzi A, Amargos-Bosch M, Adell A, Diaz-Mataix L, Serrats J, Pons S, Artigas F. In vivo modulation of 5-hydroxytryptamine release in mouse prefrontal cortex by local

- 5-HT(2A) receptors: effect of antipsychotic drugs. *Eur J Neurosci*, 2003, 18: p. 1235-46
- Bortolozzi A, Artigas F. Control of 5-hydroxytryptamine release in the dorsal raphe nucleus by the noradrenergic system in rat brain. Role of alpha-adrenoceptors. *Neuropsychopharmacology*, 2003, 28: p. 421-34
- Bourin M. Use of paroxetine for the treatment of depression and anxiety disorders in the elderly: a review. *Hum Psychopharmacol*, 2003, 18: p. 185-90
- Bourin M, Colombel MC, Malinge M, Bradwejn J. Clonidine as a sensitizing agent in the forced swimming test for revealing antidepressant activity. *J Psychiatry Neurosci*, 1991, 16: p. 199-203
- Bourin M, Hascoet M, Colombel MC, Redrobe JP, Baker GB. Differential effects of clonidine, lithium and quinine in the forced swimming test in mice for antidepressants: possible roles of serotonergic systems. *Eur Neuropsychopharmacol*, 1996, 6: p. 231-6
- Bourin M, Hascoet M, Mansouri B, Colombel MC, Bradwejn J. Comparison of behavioral effects after single and repeated administrations of four benzodiazepines in three mice behavioral models. *J Psychiatry Neurosci*, 1992, 17: p. 72-7
- Bourin M, Masse F, Dailly E, Hascoet M. Anxiolytic-like effect of milnacipran in the four-plate test in mice: mechanism of action. *Pharmacol Biochem Behav*, 2005, 81: p. 645-56
- Brandao ML, Troncoso AC, de Souza Silva MA, Huston JP. The relevance of neuronal substrates of defense in the midbrain tectum to anxiety and stress: empirical and conceptual considerations. *Eur J Pharmacol*, 2003, 463: p. 225-33
- Bremner JD, Randall P, Scott TM, Bronen RA, Seibyl JP, Southwick SM, Delaney RC, McCarthy G, Charney DS, Innis RB. MRI-based measurement of hippocampal volume in patients with combat-related posttraumatic stress disorder. *Am J Psychiatry*, 1995, 152: p. 973-81
- Briley M. Specific serotonin and noradrenaline reuptake inhibitors (SNRIs). A review of their pharmacology, clinical efficacy and tolerability. *Hum Psychopharmacol*, 1998, 13: p. 99-111
- Broderick PA. Alprazolam, diazepam, yohimbine, clonidine: in vivo CA1 hippocampal norepinephrine and serotonin release profiles under chloral hydrate anesthesia. *Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry*, 1997, 21: p. 1117-40

- Brodie MS, Bunney EB. Serotonin potentiates dopamine inhibition of ventral tegmental area neurons in vitro. *J Neurophysiol*, 1996, 76: p. 2077-82
- Bueno CH, Zangrossi H, Jr., Nogueira RL, Soares VP, Viana MB. Panicolytic-like effect induced by the stimulation of GABAA and GABAB receptors in the dorsal periaqueductal grey of rats. *Eur J Pharmacol*, 2005, 516: p. 239-46
- Burman KJ, Ige AO, White JH, Marshall FH, Pangalos MN, Emson PC, Minson JB, Llewellyn-Smith IJ. GABAB receptor subunits, R1 and R2, in brainstem catecholamine and serotonin neurons. *Brain Res*, 2003, 970: p. 35-46
- Burnet PW, Eastwood SL, Lacey K, Harrison PJ. The distribution of 5-HT1A and 5-HT2A receptor mRNA in human brain. *Brain Res*, 1995, 676: p. 157-68
- Burwell RD, Witter MP, Amaral DG. Perirhinal and postrhinal cortices of the rat: a review of the neuroanatomical literature and comparison with findings from the monkey brain. *Hippocampus*, 1995, 5: p. 390-408
- Bymaster FP, Zhang W, Carter PA, Shaw J, Chernet E, Phebus L, Wong DT, Perry KW. Fluoxetine, but not other selective serotonin uptake inhibitors, increases norepinephrine and dopamine extracellular levels in prefrontal cortex. *Psychopharmacology (Berl)*, 2002, 160: p. 353-61
- Cai X, Flores-Hernandez J, Feng J, Yan Z. Activity-dependent bidirectional regulation of GABA(A) receptor channels by the 5-HT(4) receptor-mediated signalling in rat prefrontal cortical pyramidal neurons. *J Physiol*, 2002, 540: p. 743-59
- Campbell BM, Merchant KM. Serotonin 2C receptors within the basolateral amygdala induce acute fear-like responses in an open-field environment. *Brain Res*, 2003, 993: p. 1-9
- Campeau S, Hayward MD, Hope BT, Rosen JB, Nestler EJ, Davis M. Induction of the c-fos proto-oncogene in rat amygdala during unconditioned and conditioned fear. *Brain Res*, 1991, 565: p. 349-52
- Canteras NS, Swanson LW. Projections of the ventral subiculum to the amygdala, septum, and hypothalamus: a PHAL anterograde tract-tracing study in the rat. *J Comp Neurol*, 1992, 324: p. 180-94
- Cao BJ, Rodgers RJ. Influence of 5-HT1A receptor antagonism on plus-maze behaviour in mice. I. Pindolol enantiomers and pindobind 5-HT1A. *Pharmacol Biochem Behav*, 1997, 58: p. 583-91
- Carlsen J. Immunocytochemical localization of glutamate decarboxylase in the rat basolateral amygdaloid nucleus, with special reference to GABAergic innervation of amygdalostriatal projection neurons. *J Comp Neurol*, 1988, 273: p. 513-26

- Carvalho MC, Albrechet-Souza L, Masson S, Brandao ML. Changes in the biogenic amine content of the prefrontal cortex, amygdala, dorsal hippocampus, and nucleus accumbens of rats submitted to single and repeated sessions of the elevated plus-maze test. *Braz J Med Biol Res*, 2005, 38: p. 1857-66
- Cathala L, Guyon A, Eugene D, Paupardin-Tritsch D. Alpha2-adrenoceptor activation increases a cationic conductance and spontaneous GABAergic synaptic activity in dopaminergic neurones of the rat substantia nigra. *Neuroscience*, 2002, 115: p. 1059-65
- Caudarella M, Durkin T, Galey D, Jeantet Y, Jaffard R. The effect of diazepam on hippocampal EEG in relation to behavior. *Brain Res*, 1987, 435: p. 202-12
- Cecchi M, Khoshbouei H, Javors M, Morilak DA. Modulatory effects of norepinephrine in the lateral bed nucleus of the stria terminalis on behavioral and neuroendocrine responses to acute stress. *Neuroscience*, 2002a, 112: p. 13-21
- Cecchi M, Khoshbouei H, Morilak DA. Modulatory effects of norepinephrine, acting on alpha 1 receptors in the central nucleus of the amygdala, on behavioral and neuroendocrine responses to acute immobilization stress. *Neuropharmacology*, 2002b, 43: p. 1139-47
- Ceulemans DL, Hoppenbrouwers ML, Gelders YG, Reyntjens AJ. The influence of ritanserin, a serotonin antagonist, in anxiety disorders: a double-blind placebo-controlled study versus lorazepam. *Pharmacopsychiatry*, 1985, 18: p. 303-5
- Charney DS, Heninger GR. Abnormal regulation of noradrenergic function in panic disorders. Effects of clonidine in healthy subjects and patients with agoraphobia and panic disorder. *Arch Gen Psychiatry*, 1986, 43: p. 1042-54
- Chenu F, Dailly E, Bourin M. Effect of antidepressant drugs on 6-OHDA-treated mice in the FST. *Eur Neuropsychopharmacol*, 2006: p.
- Chiang C, Aston-Jones G. A 5-hydroxytryptamine₂ agonist augments gamma-aminobutyric acid and excitatory amino acid inputs to noradrenergic locus coeruleus neurons. *Neuroscience*, 1993, 54: p. 409-20
- Choi DS, Maroteaux L. Immunohistochemical localisation of the serotonin 5-HT_{2B} receptor in mouse gut, cardiovascular system, and brain. *FEBS Lett*, 1996, 391: p. 45-51
- Chojnacka-Wojcik E, Klodzinska A, Tatarczynska E. The anxiolytic-like effect of 5-HT_{1B} receptor ligands in rats: a possible mechanism of action. *J Pharm Pharmacol*, 2005, 57: p. 253-7

- Clement HW, Gemsa D, Wesemann W. The effect of adrenergic drugs on serotonin metabolism in the nucleus raphe dorsalis of the rat, studied by in vivo voltammetry. *Eur J Pharmacol*, 1992, 217: p. 43-8
- Clemett DA, Punhani T, Duxon MS, Blackburn TP, Fone KC. Immunohistochemical localisation of the 5-HT_{2C} receptor protein in the rat CNS. *Neuropharmacology*, 2000, 39: p. 123-32
- Clenet F, Hascoet M, Fillion G, Galons H, Bourin M. Anxiolytic profile of HG1, a 5-HT-moduline antagonist, in three mouse models of anxiety. *Eur Neuropsychopharmacol*, 2004, 14: p. 449-56
- Cole JC, Burroughs GJ, Laverty CR, Sheriff NC, Sparham EA, Rodgers RJ. Anxiolytic-like effects of yohimbine in the murine plus-maze: strain independence and evidence against alpha 2-adrenoceptor mediation. *Psychopharmacology (Berl)*, 1995, 118: p. 425-36
- Cole JC, Rodgers RJ. Ethological comparison of the effects of diazepam and acute/chronic imipramine on the behaviour of mice in the elevated plus-maze. *Pharmacol Biochem Behav*, 1995, 52: p. 473-8
- Commons KG, Milner TA. Ultrastructural relationships between leu-enkephalin- and GABA-containing neurons differ within the hippocampal formation. *Brain Res*, 1996, 724: p. 1-15
- Corbett R, Fielding S, Cornfeldt M, Dunn RW. GABA-mimetic agents display anxiolytic-like effects in the social interaction and elevated plus maze procedures. *Psychopharmacology (Berl)*, 1991, 104: p. 312-6
- Cornea-Hebert V, Riad M, Wu C, Singh SK, Descarries L. Cellular and subcellular distribution of the serotonin 5-HT_{2A} receptor in the central nervous system of adult rat. *J Comp Neurol*, 1999, 409: p. 187-209
- Costall B, Jones BJ, Kelly ME, Naylor RJ, Tomkins DM. Exploration of mice in a black and white test box: validation as a model of anxiety. *Pharmacol Biochem Behav*, 1989, 32: p. 777-85
- Coste SC, Kesterson RA, Heldwein KA, Stevens SL, Heard AD, Hollis JH, Murray SE, Hill JK, Pantely GA, Hohimer AR, Hatton DC, Phillips TJ, Finn DA, Low MJ, Rittenberg MB, Stenzel P, Stenzel-Poore MP. Abnormal adaptations to stress and impaired cardiovascular function in mice lacking corticotropin-releasing hormone receptor-2. *Nat Genet*, 2000, 24: p. 403-9

- Cozzi NV, Nichols DE. 5-HT_{2A} receptor antagonists inhibit potassium-stimulated gamma-aminobutyric acid release in rat frontal cortex. *Eur J Pharmacol*, 1996, 309: p. 25-31
- Crespi F, Buda M, McRae-Degueurce A, Pujol JF. Alteration of tyrosine hydroxylase activity in the locus coeruleus after administration of p-chlorophenylalanine. *Brain Res*, 1980, 191: p. 501-9
- Cryan JF, Kelly PH, Chaperon F, Gentsch C, Mombereau C, Lingenhoehl K, Froestl W, Bettler B, Kaupmann K, Spooren WP. Behavioral characterization of the novel GABAB receptor-positive modulator GS39783 (N,N'-dicyclopentyl-2-methylsulfanyl-5-nitro-pyrimidine-4,6-diamine): anxiolytic-like activity without side effects associated with baclofen or benzodiazepines. *J Pharmacol Exp Ther*, 2004, 310: p. 952-63
- Dalvi A, Rodgers RJ. GABAergic influences on plus-maze behaviour in mice. *Psychopharmacology (Berl)*, 1996, 128: p. 380-97
- Dalvi A, Rodgers RJ. Behavioral effects of diazepam in the murine plus-maze: flumazenil antagonism of enhanced head dipping but not the disinhibition of open-arm avoidance. *Pharmacol Biochem Behav*, 1999, 62: p. 727-34
- David DJ, Bourin M, Jegou G, Przybylski C, Jolliet P, Gardier AM. Effects of acute treatment with paroxetine, citalopram and venlafaxine in vivo on noradrenaline and serotonin outflow: a microdialysis study in Swiss mice. *Br J Pharmacol*, 2003, 140: p. 1128-36
- Davis M. The role of the amygdala in fear and anxiety. *Annu Rev Neurosci*, 1992, 15: p. 353-75
- Davis M. Neurobiology of fear responses: the role of the amygdala. *J Neuropsychiatry Clin Neurosci*, 1997, 9: p. 382-402
- Dazzi L, Seu E, Cherchi G, Biggio G. Chronic administration of the SSRI fluvoxamine markedly and selectively reduces the sensitivity of cortical serotonergic neurons to footshock stress. *Eur Neuropsychopharmacol*, 2005, 15: p. 283-90
- de Angelis L. Effects of valproate and lorazepam on experimental anxiety: tolerance, withdrawal, and role of clonidine. *Pharmacol Biochem Behav*, 1995, 52: p. 329-33
- de Bortoli VC, Nogueira RL, Zangrossi H, Jr. Effects of fluoxetine and buspirone on the panicolytic-like response induced by the activation of 5-HT_{1A} and 5-HT_{2A} receptors in the rat dorsal periaqueductal gray. *Psychopharmacology (Berl)*, 2006, 183: p. 422-8
- de Mello Cruz AP, Pinheiro G, Alves SH, Ferreira G, Mendes M, Faria L, Macedo CE, Motta V, Landeira-Fernandez J. Behavioral effects of systemically administered MK-212 are

- prevented by ritanserin microinfusion into the basolateral amygdala of rats exposed to the elevated plus-maze. *Psychopharmacology (Berl)*, 2005, 182: p. 345-54
- de Paula Soares V, Zangrossi H, Jr. Involvement of 5-HT_{1A} and 5-HT₂ receptors of the dorsal periaqueductal gray in the regulation of the defensive behaviors generated by the elevated T-maze. *Brain Res Bull*, 2004, 64: p. 181-8
- Deakin JF. 5-HT receptor subtypes in depression: Archer T, Bevan P, Cools A (eds), 1989, Behavioral pharmacology of 5-HT. Hillsdale, NJ ; Lawrence Erlbaum Associates, p. 179-204
- Deakin JF, Graeff FG. 5-HT and mechanisms of defence. *J Psychopharmacol*, 1991, 5: p. 305-315
- Den Boer JA, Westenberg HG. Serotonin function in panic disorder: a double blind placebo controlled study with fluvoxamine and ritanserin. *Psychopharmacology (Berl)*, 1990, 102: p. 85-94
- Dennis T, Beauchemin V, Lavoie N. Antidepressant-induced modulation of GABA_A receptors and beta-adrenoceptors but not GABA_B receptors in the frontal cortex of olfactory bulbectomised rats. *Eur J Pharmacol*, 1994, 262: p. 143-8
- Dennis T, L'Heureux R, Carter C, Scatton B. Presynaptic alpha-2 adrenoceptors play a major role in the effects of idazoxan on cortical noradrenaline release (as measured by in vivo dialysis) in the rat. *J Pharmacol Exp Ther*, 1987, 241: p. 642-9
- Denys D, van der Wee N, van Megen HJ, Westenberg HG. A double blind comparison of venlafaxine and paroxetine in obsessive-compulsive disorder. *J Clin Psychopharmacol*, 2003, 23: p. 568-75
- Done CJ, Sharp T. Evidence that 5-HT₂ receptor activation decreases noradrenaline release in rat hippocampus in vivo. *Br J Pharmacol*, 1992, 107: p. 240-5
- Dringenberg HC, Kornelsen RA, Pacelli R, Petersen K, Vanderwolf CH. Effects of amygdaloid lesions, hippocampal lesions, and buspirone on black-white exploration and food carrying in rats. *Behav Brain Res*, 1998, 96: p. 161-72
- Dunn RW, Corbett R, Fielding S. Effects of 5-HT_{1A} receptor agonists and NMDA receptor antagonists in the social interaction test and the elevated plus maze. *Eur J Pharmacol*, 1989, 169: p. 1-10
- Duxon MS, Beckett SR, Baxter GS, Blackburn T, Fone KC. Intra-amygdala injection of the 5-HT_{2B} receptor agonist BW 723C86 produces anxiolysis on the elevated plus-maze in the rat. *Br J Pharmacol*, 1995, 116: p. 331P

- Duxon MS, Flanigan TP, Reavley AC, Baxter GS, Blackburn TP, Fone KC. Evidence for expression of the 5-hydroxytryptamine-2B receptor protein in the rat central nervous system. *Neuroscience*, 1997a, 76: p. 323-9
- Duxon MS, Kennett GA, Lightowler S, Blackburn TP, Fone KC. Activation of 5-HT_{2B} receptors in the medial amygdala causes anxiolysis in the social interaction test in the rat. *Neuropharmacology*, 1997b, 36: p. 601-8
- Emery NJ, Capitanio JP, Mason WA, Machado CJ, Mendoza SP, Amaral DG. The effects of bilateral lesions of the amygdala on dyadic social interactions in rhesus monkeys (*Macaca mulatta*). *Behav Neurosci*, 2001, 115: p. 515-44
- Fanselow MS. The midbrain periaqueductal gray as a coordinator of action in response to fear and anxiety. New York: Depaulis A, Bandler R (eds), 1991, *The Midbrain Periaqueductal Grey Matter: Functional, Anatomical and Immunohistochemical Organization*. Plenum, p. 151-173
- Feng J, Cai X, Zhao J, Yan Z. Serotonin receptors modulate GABA(A) receptor channels through activation of anchored protein kinase C in prefrontal cortical neurons. *J Neurosci*, 2001, 21: p. 6502-11
- Fernandes C, File SE. The influence of open arm ledges and maze experience in the elevated plus-maze. *Pharmacol Biochem Behav*, 1996, 54: p. 31-40
- Fernandez-Guasti A, Lopez-Rubalcava C. Modification of the anxiolytic action of 5-HT_{1A} compounds by GABA-benzodiazepine agents in rats. *Pharmacol Biochem Behav*, 1998, 60: p. 27-32
- Figgitt DP, McClellan KJ. Fluvoxamine. An updated review of its use in the management of adults with anxiety disorders. *Drugs*, 2000, 60: p. 925-54
- File SE. Factors controlling measures of anxiety and responses to novelty in the mouse. *Behav Brain Res*, 2001, 125: p. 151-7
- File SE, Andrews N, Wu PY, Zharkovsky A, Zangrossi H, Jr. Modification of chlordiazepoxide's behavioural and neurochemical effects by handling and plus-maze experience. *Eur J Pharmacol*, 1992, 218: p. 9-14
- File SE, Gonzalez LE, Andrews N. Comparative study of pre- and postsynaptic 5-HT_{1A} receptor modulation of anxiety in two ethological animal tests. *J Neurosci*, 1996, 16: p. 4810-5
- Filip M, Baran L, Siwanowicz J, Chojnacka-Wojcik E, Przegalinski E. The anxiolytic-like effects of 5-hydroxytryptamine₃ (5-HT₃) receptor antagonists. *Pol J Pharmacol Pharm*, 1992, 44: p. 261-9

- Fiske E, Gronli J, Bjorvatn B, Ursin R, Portas CM. The effect of GABA(A) antagonist bicuculline on dorsal raphe nucleus and frontal cortex extracellular serotonin: a window on SWS and REM sleep modulation. *Pharmacol Biochem Behav*, 2006, 83: p. 314-21
- Flugge G. Alterations in the central nervous alpha 2-adrenoceptor system under chronic psychosocial stress. *Neuroscience*, 1996, 75: p. 187-96
- Flugge G, Ahrens O, Fuchs E. Monoamine receptors in the prefrontal cortex of *Tupaia belangeri* during chronic psychosocial stress. *Cell Tissue Res*, 1997, 288: p. 1-10
- Fontana DJ, Schefke DM, Commissaris RL. Acute versus chronic clonidine treatment effects on conflict behavior in the rat. *Behav Pharmacol*, 1989, 1: p. 201-208
- Fontani G, Carli G. Hippocampal electrical activity and behavior in the rabbit. *Arch Ital Biol*, 1997, 135: p. 49-71
- Forchetti CM, Meek JL. Evidence for a tonic GABAergic control of serotonin neurons in the median raphe nucleus. *Brain Res*, 1981, 206: p. 208-12
- Forutan F, Estalji S, Beu M, Nikolaus S, Hamacher K, Coenen HH, Vosberg H, Muller-Gartner HW, Larisch R. Distribution of 5HT_{2A} receptors in the human brain: comparison of data in vivo and post mortem. *Nuklearmedizin*, 2002, 41: p. 197-201
- Fox RJ, Sorenson CA. Bilateral lesions of the amygdala attenuate analgesia induced by diverse environmental challenges. *Brain Res*, 1994, 648: p. 215-21
- Frankhuijzen AL, Wardeh G, Hogenboom F, Mulder AH. Alpha 2-adrenoceptor mediated inhibition of the release of radiolabelled 5-hydroxytryptamine and noradrenaline from slices of the dorsal region of the rat brain. *Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol*, 1988, 337: p. 255-60
- French N. Alpha 2-adrenoceptors and I₂ sites in the mammalian central nervous system. *Pharmacol Ther*, 1995, 68: p. 175-208
- Freund TF, Gulyas AI, Acsady L, Gorcs T, Toth K. Serotonergic control of the hippocampus via local inhibitory interneurons. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 1990, 87: p. 8501-5
- Fritschy JM, Grzanna R. Immunohistochemical analysis of the neurotoxic effects of DSP-4 identifies two populations of noradrenergic axon terminals. *Neuroscience*, 1989, 30: p. 181-97
- Fritschy JM, Grzanna R. Selective effects of DSP-4 on locus coeruleus axons: are there pharmacologically different types of noradrenergic axons in the central nervous system? *Prog Brain Res*, 1991, 88: p. 257-68

- Gallager DW, Aghajanian GK. Effect of antipsychotic drugs on the firing of dorsal raphe cells. I. Role of adrenergic system. *Eur J Pharmacol*, 1976, 39: p. 341-55
- Galvez R, Mesches MH, McGaugh JL. Norepinephrine release in the amygdala in response to footshock stimulation. *Neurobiol Learn Mem*, 1996, 66: p. 253-7
- Gao B, Fritschy JM, Benke D, Mohler H. Neuron-specific expression of GABAA-receptor subtypes: differential association of the alpha 1- and alpha 3-subunits with serotonergic and GABAergic neurons. *Neuroscience*, 1993, 54: p. 881-92
- Garcia-Alcocer G, Segura LC, Garcia Pena M, Martinez-Torres A, Miledi R. Ontogenetic distribution of 5-HT_{2C}, 5-HT_{5A}, and 5-HT₇ receptors in the rat hippocampus. *Gene Expr*, 2006, 13: p. 53-7
- Garratt JC, Kidd EJ, Wright IK, Marsden CA. Inhibition of 5-hydroxytryptamine neuronal activity by the 5-HT agonist, DOI. *Eur J Pharmacol*, 1991, 199: p. 349-55
- Ge J, Barnes NM, Costall B, Naylor RJ. Effect of aversive stimulation on 5-hydroxytryptamine and dopamine metabolism in the rat brain. *Pharmacol Biochem Behav*, 1997, 58: p. 775-83
- Gerlai R. Behavioral tests of hippocampal function: simple paradigms complex problems. *Behav Brain Res*, 2001, 125: p. 269-77
- Geurts FJ, De Schutter E, Timmermans JP. Localization of 5-HT_{2A}, 5-HT₃, 5-HT_{5A} and 5-HT₇ receptor-like immunoreactivity in the rat cerebellum. *J Chem Neuroanat*, 2002, 24: p. 65-74
- Gobert A, Millan MJ. Modulation of dialysate levels of dopamine, noradrenaline, and serotonin (5-HT) in the frontal cortex of freely-moving rats by (-)-pindolol alone and in association with 5-HT reuptake inhibitors: comparative roles of beta-adrenergic, 5-HT_{1A}, and 5-HT_{1B} receptors. *Neuropsychopharmacology*, 1999a, 21: p. 268-84
- Gobert A, Millan MJ. Serotonin (5-HT)_{2A} receptor activation enhances dialysate levels of dopamine and noradrenaline, but not 5-HT, in the frontal cortex of freely-moving rats. *Neuropharmacology*, 1999b, 38: p. 315-7
- Goldstein LE, Rasmusson AM, Bunney BS, Roth RH. Role of the amygdala in the coordination of behavioral, neuroendocrine, and prefrontal cortical monoamine responses to psychological stress in the rat. *J Neurosci*, 1996, 16: p. 4787-98
- Gonzalez LE, Andrews N, File SE. 5-HT_{1A} and benzodiazepine receptors in the basolateral amygdala modulate anxiety in the social interaction test, but not in the elevated plus-maze. *Brain Res*, 1996, 732: p. 145-53

- Gorea E, Adrien J. Serotonergic regulation of noradrenergic coerulean neurons: electrophysiological evidence for the involvement of 5-HT₂ receptors. *Eur J Pharmacol*, 1988, 154: p. 285-91
- Gorea E, Davenne D, Lanfumey L, Chastanet M, Adrien J. Regulation of noradrenergic coerulean neuronal firing mediated by 5-HT₂ receptors: involvement of the prepositus hypoglossal nucleus. *Neuropharmacology*, 1991, 30: p. 1309-18
- Graeff FG. Brain defense systems of anxiety. Amsterdam: Burrows GD, Noyes Jr. RM (eds), 1990, *Handbook of Anxiety, The Neurobiology of Anxiety*. Elsevier Science Publishers, p. 307-354
- Graeff FG. Neurotransmitters in the dorsal periaqueductal gray and animal models of panic anxiety. London: Briley M, File SE (eds), 1991, *New concepts in anxiety*. Macmillan Press, p. 288-312
- Graeff FG. Neuroanatomy and neurotransmitter regulation of defensive behaviors and related emotions in mammals. *Braz J Med Biol Res*, 1994, 27: p. 811-29
- Graeff FG. Serotonin, the periaqueductal gray and panic. *Neurosci Biobehav Rev*, 2004, 28: p. 239-59
- Graeff FG, Brandao ML, Audi EA, Milani H. Role of GABA in the anti-aversive action of anxiolytics. *Adv Biochem Psychopharmacol*, 1986a, 42: p. 79-86
- Graeff FG, Brandao ML, Audi EA, Schutz MT. Modulation of the brain aversive system by GABAergic and serotonergic mechanisms. *Behav Brain Res*, 1986b, 21: p. 65-72
- Graeff FG, Guimaraes FS, De Andrade TG, Deakin JF. Role of 5-HT in stress, anxiety, and depression. *Pharmacol Biochem Behav*, 1996, 54: p. 129-41
- Graeff FG, Silveira MC, Nogueira RL, Audi EA, Oliveira RM. Role of the amygdala and periaqueductal gray in anxiety and panic. *Behav Brain Res*, 1993, 58: p. 123-31
- Gray A. *The Neuropsychology of anxiety: an enquiry into the functions of the septo-hippocampal system*. Oxford. Oxford University Press, 1982.
- Gray JA, Green AR. GABA_B-receptor mediated inhibition of potassium-evoked release of endogenous 5-hydroxytryptamine from mouse frontal cortex. *Br J Pharmacol*, 1987, 91: p. 517-22
- Gray JA, McNaughton N, James DT, Kelly PH. Effect of minor tranquillisers on hippocampal theta rhythm mimicked by depletion of forebrain noradrenaline. *Nature*, 1975, 258: p. 424-5

- Gray TS, Carney ME, Magnuson DJ. Direct projections from the central amygdaloid nucleus to the hypothalamic paraventricular nucleus: possible role in stress-induced adrenocorticotropin release. *Neuroendocrinology*, 1989, 50: p. 433-46
- Gray TS, Magnuson DJ. Neuropeptide neuronal efferents from the bed nucleus of the stria terminalis and central amygdaloid nucleus to the dorsal vagal complex in the rat. *J Comp Neurol*, 1987, 262: p. 365-74
- Green S, Vale AL. Role of amygdaloid nuclei in the anxiolytic effects of benzodiazepines in rats. *Behav Pharmacol*, 1992, 3: p. 261-264
- Griebel G, Belzung C, Misslin R, Vogel E. The free-exploratory paradigm: an effective method for measuring neophobic behaviour in mice and testing potential neophobia-reducing drugs. *Behav Pharmacol*, 1993, 4: p. 637-644
- Griebel G, Belzung C, Perrault G, Sanger DJ. Differences in anxiety-related behaviours and in sensitivity to diazepam in inbred and outbred strains of mice. *Psychopharmacology (Berl)*, 2000, 148: p. 164-70
- Griebel G, Simiand J, Steinberg R, Jung M, Gully D, Roger P, Geslin M, Scatton B, Maffrand JP, Soubrie P. 4-(2-Chloro-4-methoxy-5-methylphenyl)-N-[(1S)-2-cyclopropyl-1-(3-fluoro-4-methylphenyl)ethyl]5-methyl-N-(2-propynyl)-1, 3-thiazol-2-amine hydrochloride (SSR125543A), a potent and selective corticotrophin-releasing factor(1) receptor antagonist. II. Characterization in rodent models of stress-related disorders. *J Pharmacol Exp Ther*, 2002, 301: p. 333-45
- Griffiths JL, Lovick TA. Co-localization of 5-HT 2A -receptor- and GABA-immunoreactivity in neurones in the periaqueductal grey matter of the rat. *Neurosci Lett*, 2002, 326: p. 151-4
- Guimaraes FS, Chiaretti TM, Graeff FG, Zuardi AW. Antianxiety effect of cannabidiol in the elevated plus-maze. *Psychopharmacology (Berl)*, 1990, 100: p. 558-9
- Gulyas AI, Acsady L, Freund TF. Structural basis of the cholinergic and serotonergic modulation of GABAergic neurons in the hippocampus. *Neurochem Int*, 1999, 34: p. 359-72
- Haddjeri N, Blier P, de Montigny C. Effect of the alpha-2 adrenoceptor antagonist mirtazapine on the 5-hydroxytryptamine system in the rat brain. *J Pharmacol Exp Ther*, 1996, 277: p. 861-71
- Haddjeri N, Blier P, de Montigny C. Effects of long-term treatment with the alpha 2-adrenoceptor antagonist mirtazapine on 5-HT neurotransmission. *Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol*, 1997a, 355: p. 20-9

- Haddjeri N, de Montigny C, Blier P. Modulation of the firing activity of noradrenergic neurones in the rat locus coeruleus by the 5-hydroxytryptamine system. *Br J Pharmacol*, 1997b, 120: p. 865-75
- Hajos-Korcsok E, McQuade R, Sharp T. Influence of 5-HT_{1A} receptors on central noradrenergic activity: microdialysis studies using (+/-)-MDL 73005EF and its enantiomers. *Neuropharmacology*, 1999, 38: p. 299-306
- Hajos-Korcsok E, McTavish SF, Sharp T. Effect of a selective 5-hydroxytryptamine reuptake inhibitor on brain extracellular noradrenaline: microdialysis studies using paroxetine. *Eur J Pharmacol*, 2000, 407: p. 101-7
- Hajos-Korcsok E, Robinson DD, Yu JH, Fitch CS, Walker E, Merchant KM. Rapid habituation of hippocampal serotonin and norepinephrine release and anxiety-related behaviors, but not plasma corticosterone levels, to repeated footshock stress in rats. *Pharmacol Biochem Behav*, 2003, 74: p. 609-16
- Hall H, Farde L, Halldin C, Lundkvist C, Sedvall G. Autoradiographic localization of 5-HT_{2A} receptors in the human brain using [(3)H]M100907 and [(11)C]M100907. *Synapse*, 2000, 38: p. 421-31
- Hamada S, Senzaki K, Hamaguchi-Hamada K, Tabuchi K, Yamamoto H, Yamamoto T, Yoshikawa S, Okano H, Okado N. Localization of 5-HT_{2A} receptor in rat cerebral cortex and olfactory system revealed by immunohistochemistry using two antibodies raised in rabbit and chicken. *Brain Res Mol Brain Res*, 1998, 54: p. 199-211
- Handley SL, Mithani S. Effects of alpha-adrenoceptor agonists and antagonists in a maze-exploration model of 'fear'-motivated behaviour. *Naunyn Schmiedeberg's Arch Pharmacol*, 1984, 327: p. 1-5
- Hascoet M, Bourin M, Colombel MC, Fiocco AJ, Baker GB. Anxiolytic-like effects of antidepressants after acute administration in a four-plate test in mice. *Pharmacol Biochem Behav*, 2000, 65: p. 339-44
- Hascoet M, Bourin M, Couetoux du Tertre A. Influence of prior experience on mice behavior using the four-plate test. *Pharmacol Biochem Behav*, 1997, 58: p. 1131-8
- Heinrichs SC, Min H, Tamraz S, Carmouche M, Boehme SA, Vale WW. Anti-sexual and anxiogenic behavioral consequences of corticotropin-releasing factor overexpression are centrally mediated. *Psychoneuroendocrinology*, 1997, 22: p. 215-24
- Heisler LK, Chu HM, Brennan TJ, Danao JA, Bajwa P, Parsons LH, Tecott LH. Elevated anxiety and antidepressant-like responses in serotonin 5-HT_{1A} receptor mutant mice. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 1998, 95: p. 15049-54

- Higgins GA, Jones BJ, Oakley NR, Tyers MB. Evidence that the amygdala is involved in the disinhibitory effects of 5-HT₃ receptor antagonists. *Psychopharmacology (Berl)*, 1991, 104: p. 545-51
- Hodges H, Green S, Glenn B. Evidence that the amygdala is involved in benzodiazepine and serotonergic effects on punished responding but not on discrimination. *Psychopharmacology (Berl)*, 1987, 92: p. 491-504
- Hoffman BJ, Mezey E. Distribution of serotonin 5-HT_{1C} receptor mRNA in adult rat brain. *FEBS Lett*, 1989, 247: p. 453-62
- Hogg S. A review of the validity and variability of the elevated plus-maze as an animal model of anxiety. *Pharmacol Biochem Behav*, 1996, 54: p. 21-30
- Holmes A, Rodgers RJ. Influence of spatial and temporal manipulations on the anxiolytic efficacy of chlordiazepoxide in mice previously exposed to the elevated plus-maze. *Neurosci Biobehav Rev*, 1999, 23: p. 971-80
- Holstege G. Anatomical study of the final common pathway for vocalization in the cat. *J Comp Neurol*, 1989, 284: p. 242-52
- Homanics GE, Harrison NL, Quinlan JJ, Krasowski MD, Rick CE, de Blas AL, Mehta AK, Kist F, Mihalek RM, Aul JJ, Firestone LL. Normal electrophysiological and behavioral responses to ethanol in mice lacking the long splice variant of the gamma₂ subunit of the gamma-aminobutyrate type A receptor. *Neuropharmacology*, 1999, 38: p. 253-65
- Hopkins DA, Holstege G. Amygdaloid projections to the mesencephalon, pons and medulla oblongata in the cat. *Exp Brain Res*, 1978, 32: p. 529-47
- Hopwood SE, Stamford JA. Noradrenergic modulation of serotonin release in rat dorsal and median raphe nuclei via alpha(1) and alpha(2A) adrenoceptors. *Neuropharmacology*, 2001, 41: p. 433-42
- Hoyer D, Pazos A, Probst A, Palacios JM. Serotonin receptors in the human brain. II. Characterization and autoradiographic localization of 5-HT_{1C} and 5-HT₂ recognition sites. *Brain Res*, 1986, 376: p. 97-107
- Hughes ZA, Stanford SC. Increased noradrenaline efflux induced by local infusion of fluoxetine in the rat frontal cortex. *Eur J Pharmacol*, 1996, 317: p. 83-90
- Hughes ZA, Stanford SC. Evidence from microdialysis and synaptosomal studies of rat cortex for noradrenaline uptake sites with different sensitivities to SSRIs. *Br J Pharmacol*, 1998, 124: p. 1141-8

- Inui A, Okita M, Nakajima M, Momose K, Ueno N, Teranishi A, Miura M, Hirose Y, Sano K, Sato M, Watanabe M, Sakai T, Watanabe T, Ishida K, Silver J, Baba S, Kasuga M. Anxiety-like behavior in transgenic mice with brain expression of neuropeptide Y. *Proc Assoc Am Physicians*, 1998, 110: p. 171-82
- Iversen SD. 5-HT and anxiety. *Neuropharmacology*, 1984, 23: p. 1553-60
- Jackisch R, Haaf A, Jeltsch H, Lazarus C, Kelche C, Cassel JC. Modulation of 5-hydroxytryptamine release in hippocampal slices of rats: effects of fimbria-fornix lesions on 5-HT_{1B}-autoreceptor and alpha₂-heteroreceptor function. *Brain Res Bull*, 1999, 48: p. 49-59
- Jacob CA, Cabral AH, Almeida LP, Magierek V, Ramos PL, Zanoveli JM, Landeira-Fernandez J, Zangrossi H, Nogueira RL. Chronic imipramine enhances 5-HT(1A) and 5-HT(2) receptors-mediated inhibition of panic-like behavior in the rat dorsal periaqueductal gray. *Pharmacol Biochem Behav*, 2002, 72: p. 761-6
- Jakab RL, Goldman-Rakic PS. 5-Hydroxytryptamine_{2A} serotonin receptors in the primate cerebral cortex: possible site of action of hallucinogenic and antipsychotic drugs in pyramidal cell apical dendrites. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 1998, 95: p. 735-40
- Jenck F, Broekkamp CL, Van Delft AM. Effects of serotonin receptor antagonists on PAG stimulation induced aversion: different contributions of 5HT₁, 5HT₂ and 5HT₃ receptors. *Psychopharmacology (Berl)*, 1989, 97: p. 489-95
- Johnston AL, File SE. Yohimbine's anxiogenic action: evidence for noradrenergic and dopaminergic sites. *Pharmacol Biochem Behav*, 1989, 32: p. 151-6
- Jolas T, Schreiber R, Laporte AM, Chastanet M, De Vry J, Glaser T, Adrien J, Hamon M. Are postsynaptic 5-HT_{1A} receptors involved in the anxiolytic effects of 5-HT_{1A} receptor agonists and in their inhibitory effects on the firing of serotonergic neurons in the rat? *J Pharmacol Exp Ther*, 1995, 272: p. 920-9
- Jones GH, Schneider C, Schneider HH, Seidler J, Cole BJ, Stephens DN. Comparison of several benzodiazepine receptor ligands in two models of anxiolytic activity in the mouse: an analysis based on fractional receptor occupancies. *Psychopharmacology (Berl)*, 1994, 114: p. 191-9
- Jordan S, Kramer GL, Zukas PK, Moeller M, Petty F. In vivo biogenic amine efflux in medial prefrontal cortex with imipramine, fluoxetine, and fluvoxamine. *Synapse*, 1994, 18: p. 294-7

- Judge SJ, Gartside SE. Firing of 5-HT neurones in the dorsal and median raphe nucleus in vitro shows differential alpha1-adrenoceptor and 5-HT1A receptor modulation. *Neurochem Int*, 2006, 48: p. 100-7
- Judge SJ, Young RL, Gartside SE. GABA(A) receptor modulation of 5-HT neuronal firing in the median raphe nucleus: Implications for the action of anxiolytics. *Eur Neuropsychopharmacol*, 2006: p.
- Jurgens U, Pratt R. Role of the periaqueductal grey in vocal expression of emotion. *Brain Res*, 1979, 167: p. 367-78
- Kapp BS, Pascoe JP, Bixler MA. The amygdala systems approach to its contribution to aversive conditioning. New York: Butters N, Squire LS (eds), 1984, *The neuropsychology of memory*. Guilford Press, p. 473-488
- Kash SF, Tecott LH, Hodge C, Baekkeskov S. Increased anxiety and altered responses to anxiolytics in mice deficient in the 65-kDa isoform of glutamic acid decarboxylase. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 1999, 96: p. 1698-703
- Kataoka Y, Shibata K, Miyazaki A, Inoue Y, Tominaga K, Koizumi S, Ueki S, Niwa M. Involvement of the dorsal hippocampus in mediation of the antianxiety action of tandospirone, a 5-hydroxytryptamine1A agonistic anxiolytic. *Neuropharmacology*, 1991, 30: p. 475-80
- Katsurabayashi S, Kubota H, Tokutomi N, Akaike N. A distinct distribution of functional presynaptic 5-HT receptor subtypes on GABAergic nerve terminals projecting to single hippocampal CA1 pyramidal neurons. *Neuropharmacology*, 2003, 44: p. 1022-30
- Kaupmann K, Schuler V, Mosbacher J, Bischoff S, Bittiger H, Heid J, Froestl W, Leonhard S, Pfaff T, Karschin A, Bettler B. Human gamma-aminobutyric acid type B receptors are differentially expressed and regulate inwardly rectifying K⁺ channels. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 1998, 95: p. 14991-6
- Kaura V, Ingram CD, Gartside SE, Young AH, Judge SJ. The progesterone metabolite allopregnanolone potentiates GABA(A) receptor-mediated inhibition of 5-HT neuronal activity. *Eur Neuropsychopharmacol*, 2006: p.
- Kent JM, Coplan JD, Gorman JM. Clinical utility of the selective serotonin reuptake inhibitors in the spectrum of anxiety. *Biol Psychiatry*, 1998, 44: p. 812-24
- Kidman A. Neurochemical and cognitive aspects of anxiety disorders. *Prog Neurobiol*, 1989, 32: p. 391-402

- Kim JJ, Fanselow MS. Modality-specific retrograde amnesia of fear. *Science*, 1992, 256: p. 675-7
- Kishimoto K, Koyama S, Akaike N. Presynaptic modulation of synaptic gamma-aminobutyric acid transmission by tandospirone in rat basolateral amygdala. *Eur J Pharmacol*, 2000a, 407: p. 257-65
- Kishimoto K, Koyama S, Akaike N. Synergistic mu-opioid and 5-HT_{1A} presynaptic inhibition of GABA release in rat periaqueductal gray neurons. *Neuropharmacology*, 2001, 41: p. 529-38
- Kishimoto T, Radulovic J, Radulovic M, Lin CR, Schrick C, Hooshmand F, Hermanson O, Rosenfeld MG, Spiess J. Deletion of *crhr2* reveals an anxiolytic role for corticotropin-releasing hormone receptor-2. *Nat Genet*, 2000b, 24: p. 415-9
- Kjelstrup KG, Tuvnes FA, Steffenach HA, Murison R, Moser EI, Moser MB. Reduced fear expression after lesions of the ventral hippocampus. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2002, 99: p. 10825-30
- Klodzinska A, Chojnacka-Wojcik E, Palucha A, Branski P, Popik P, Pilc A. Potential anti-anxiety, anti-addictive effects of LY 354740, a selective group II glutamate metabotropic receptors agonist in animal models. *Neuropharmacology*, 1999, 38: p. 1831-9
- Klodzinska A, Tatarczynska E, Chojnacka-Wojcik E, Nowak G, Cosford ND, Pilc A. Anxiolytic-like effects of MTEP, a potent and selective mGlu₅ receptor agonist does not involve GABA(A) signaling. *Neuropharmacology*, 2004a, 47: p. 342-50
- Klodzinska A, Tatarczynska E, Stachowicz K, Chojnacka-Wojcik E. The anxiolytic-like activity of AIDA (1-aminoindan-1,5-dicarboxylic acid), an mGlu₁ receptor antagonist. *J Physiol Pharmacol*, 2004b, 55: p. 113-26
- Kluver H, Bucy PC. Preliminary analysis of functions of the temporal lobes in monkeys. *Archives of Neurology and Psychiatry*, 1939, 42: p. 979-1000
- Kostowski W, Plaznik A, Stefanski R. Intra-hippocampal buspirone in animal models of anxiety. *Eur J Pharmacol*, 1989, 168: p. 393-6
- Koyama S, Matsumoto N, Murakami N, Kubo C, Nabekura J, Akaike N. Role of presynaptic 5-HT_{1A} and 5-HT₃ receptors in modulation of synaptic GABA transmission in dissociated rat basolateral amygdala neurons. *Life Sci*, 2002, 72: p. 375-87
- Krettek JE, Price JL. Amygdaloid projections to subcortical structures within the basal forebrain and brainstem in the rat and cat. *J Comp Neurol*, 1978, 178: p. 225-54

- Kromer Vogt LJ, Hyman BT, Van Hoesen GW, Damasio AR. Pathological alterations in the amygdala in Alzheimer's disease. *Neuroscience*, 1990, 37: p. 377-85
- Kulkarni SK, Sharma K. Alprazolam modifies animal behaviour on elevated plus-maze. *Indian J Exp Biol*, 1993, 31: p. 908-11
- Kursar JD, Nelson DL, Wainscott DB, Baez M. Molecular cloning, functional expression, and mRNA tissue distribution of the human 5-hydroxytryptamine_{2B} receptor. *Mol Pharmacol*, 1994, 46: p. 227-34
- Kurt M, Arik AC, Celik S. The effects of sertraline and fluoxetine on anxiety in the elevated plus-maze test in mice. *J Basic Clin Physiol Pharmacol*, 2000, 11: p. 173-80
- La Marca S, Dunn RW. The alpha-2 antagonists idazoxan and rauwolscine but not yohimbine or piperoxan are anxiolytic in the Vogel lick-shock conflict paradigm following intravenous administration. *Life Sci*, 1994, 54: p. PL179-84
- Langer SZ. 25 years since the discovery of presynaptic receptors: present knowledge and future perspectives. *Trends Pharmacol Sci*, 1997, 18: p. 95-9
- Lechin F, van der Dijs B, Hernandez-Adrian G. Dorsal raphe vs. median raphe serotonergic antagonism. Anatomical, physiological, behavioral, neuroendocrinological, neuropharmacological and clinical evidences: Relevance for neuropharmacological therapy. *Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry*, 2006, 30: p. 565-585
- Lecrubier Y, Judge R. Long-term evaluation of paroxetine, clomipramine and placebo in panic disorder. Collaborative Paroxetine Panic Study Investigators. *Acta Psychiatr Scand*, 1997, 95: p. 153-60
- LeDoux JE. Brain mechanisms of emotion and emotional learning. *Curr Opin Neurobiol*, 1992, 2: p. 191-7
- LeDoux JE. Emotional memory: in search of systems and synapses. *Ann N Y Acad Sci*, 1993, 702: p. 149-57
- LeDoux JE. Emotion: clues from the brain. *Annu Rev Psychol*, 1995, 46: p. 209-35
- LeDoux JE. *The Emotional Brain*. New York. Simon and Schuster, 1996.
- LeDoux JE, Iwata J, Cicchetti P, Reis DJ. Different projections of the central amygdaloid nucleus mediate autonomic and behavioral correlates of conditioned fear. *J Neurosci*, 1988, 8: p. 2517-29
- Lee K, Dixon AK, Pinnock RD. Serotonin depolarizes hippocampal interneurons in the rat stratum oriens by interaction with 5HT₂ receptors. *Neurosci Lett*, 1999, 270: p. 56-8

- Lepola U, Bergtholdt B, St Lambert J, Davy KL, Ruggiero L. Controlled-release paroxetine in the treatment of patients with social anxiety disorder. *J Clin Psychiatry*, 2004, 65: p. 222-9
- Lister RG. The use of a plus-maze to measure anxiety in the mouse. *Psychopharmacology (Berl)*, 1987, 92: p. 180-5
- Lister RG. Ethologically-based animal models of anxiety disorders. *Pharmacol Ther*, 1990, 46: p. 321-40
- Liu H, Chandler S, Beitz AJ, Shipley MT, Behbehani MM. Characterization of the effect of cholecystokinin (CCK) on neurons in the periaqueductal gray of the rat: immunocytochemical and in vivo and in vitro electrophysiological studies. *Brain Res*, 1994, 642: p. 83-94
- Liu R, Jolas T, Aghajanian G. Serotonin 5-HT(2) receptors activate local GABA inhibitory inputs to serotonergic neurons of the dorsal raphe nucleus. *Brain Res*, 2000, 873: p. 34-45
- Lloyd KG, Morselli PL, Depoortere H, Fournier V, Zivkovic B, Scatton B, Broekkamp C, Worms P, Bartholini G. The potential use of GABA agonists in psychiatric disorders: evidence from studies with progabide in animal models and clinical trials. *Pharmacol Biochem Behav*, 1983, 18: p. 957-66
- Longo VG, Massotti M, DeMedici D, Valerio A. Modifications of brain electrical activity after activation of the benzodiazepine receptor types in rats and rabbits. *Pharmacol Biochem Behav*, 1988, 29: p. 785-90
- Lopez-Gimenez JF, Mengod G, Palacios JM, Vilaro MT. Regional distribution and cellular localization of 5-HT_{2C} receptor mRNA in monkey brain: comparison with [³H]mesulergine binding sites and choline acetyltransferase mRNA. *Synapse*, 2001a, 42: p. 12-26
- Lopez-Gimenez JF, Vilaro MT, Palacios JM, Mengod G. Mapping of 5-HT_{2A} receptors and their mRNA in monkey brain: [³H]MDL100,907 autoradiography and in situ hybridization studies. *J Comp Neurol*, 2001b, 429: p. 571-89
- Lopez-Rubalcava C, Fernandez-Guasti A. Noradrenaline-serotonin interactions in the anxiolytic effects of 5-HT(1A) agonists. *Behav Pharmacol*, 1994, 5: p. 42-51
- Lopez-Rubalcava C, Saldivar A, Fernandez-Guasti A. Interaction of GABA and serotonin in the anxiolytic action of diazepam and serotonergic anxiolytics. *Pharmacol Biochem Behav*, 1992, 43: p. 433-40

- Lovick TA. The periaqueductal gray-rostral medulla connection in the defence reaction: efferent pathways and descending control mechanisms. *Behav Brain Res*, 1993, 58: p. 19-25
- Luparini MR, Garrone B, Pazzagli M, Pinza M, Pepeu G. A cortical GABA-5HT interaction in the mechanism of action of the antidepressant trazodone. *Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry*, 2004, 28: p. 1117-27
- Luttgen M, Ove Ogren S, Meister B. Chemical identity of 5-HT_{2A} receptor immunoreactive neurons of the rat septal complex and dorsal hippocampus. *Brain Res*, 2004, 1010: p. 156-65
- MacDonald E, Kobilka BK, Scheinin M. Gene targeting--homing in on alpha 2-adrenoceptor-subtype function. *Trends Pharmacol Sci*, 1997, 18: p. 211-9
- Mamounas LA, Mullen CA, O'Hearn E, Molliver ME. Dual serotonergic projections to forebrain in the rat: morphologically distinct 5-HT axon terminals exhibit differential vulnerability to neurotoxic amphetamine derivatives. *J Comp Neurol*, 1991, 314: p. 558-86
- Marazziti D, Rossi A, Giannaccini G, Zavaglia KM, Dell'Osso L, Lucacchini A, Cassano GB. Distribution and characterization of [³H]mesulergine binding in human brain postmortem. *Eur Neuropsychopharmacol*, 1999, 10: p. 21-6
- Maren S, Aharonov G, Fanselow MS. Neurotoxic lesions of the dorsal hippocampus and Pavlovian fear conditioning in rats. *Behav Brain Res*, 1997, 88: p. 261-74
- Maren S, Fanselow MS. Synaptic plasticity in the basolateral amygdala induced by hippocampal formation stimulation in vivo. *J Neurosci*, 1995, 15: p. 7548-64
- Marrosu F, Mereu G, Giorgi O, Corda MG. The benzodiazepine recognition site inverse agonists Ro 15-4513 and FG 7142 both antagonize the EEG effects of ethanol in the rat. *Life Sci*, 1988, 43: p. 2151-8
- Martin JV, Edwards E, Johnson JO, Henn FA. Monoamine receptors in an animal model of affective disorder. *J Neurochem*, 1990, 55: p. 1142-8
- Masse F, Hascoet M, Bourin M. alpha₂-Adrenergic agonists antagonise the anxiolytic-like effect of antidepressants in the four-plate test in mice. *Behav Brain Res*, 2005, 164: p. 17-28
- Masse F, Hascoet M, Dailly E, Bourin M. Effect of noradrenergic system on the anxiolytic-like effect of DOI (5-HT_{2A/2C} agonists) in the four-plate test. *Psychopharmacology (Berl)*, 2006, 183: p. 471-481

- Mateo Y, Ruiz-Ortega JA, Pineda J, Ugedo L, Meana JJ. Inhibition of 5-hydroxytryptamine reuptake by the antidepressant citalopram in the locus coeruleus modulates the rat brain noradrenergic transmission in vivo. *Neuropharmacology*, 2000, 39: p. 2036-43
- Matsumoto K, Mizowaki M, Thongpraditchote S, Murakami Y, Watanabe H. α -2-Adrenoceptor antagonists reverse the 5-HT₂ receptor antagonist suppression of head-twitch behavior in mice. *Pharmacol Biochem Behav*, 1997, 56: p. 417-22
- Matsumoto M, Yoshioka M, Togashi H, Tochiwara M, Ikeda T, Saito H. Modulation of norepinephrine release by serotonergic receptors in the rat hippocampus as measured by in vivo microdialysis. *J Pharmacol Exp Ther*, 1995, 272: p. 1044-51
- McCall RB, Aghajanian GK. Serotonergic facilitation of facial motoneuron excitation. *Brain Res*, 1979, 169: p. 11-27
- McDonald AJ, Augustine JR. Localization of GABA-like immunoreactivity in the monkey amygdala. *Neuroscience*, 1993, 52: p. 281-94
- McEwen BS, Magarinos AM. Stress effects on morphology and function of the hippocampus. *Ann N Y Acad Sci*, 1997, 821: p. 271-84
- McKinney WT. Animal models of depression: an overview. *Psychiatr Dev*, 1984, 2: p. 77-96
- McNaughton N, Coop CF. Neurochemically dissimilar anxiolytic drugs have common effects on hippocampal rhythmic slow activity. *Neuropharmacology*, 1991, 30: p. 855-63
- McNaughton N, Gray JA. Anxiolytic action on the behavioural inhibition system implies multiple types of arousal contribute to anxiety. *J Affect Disord*, 2000, 61: p. 161-76
- McNaughton N, James DT, Stewart J, Gray A, Vallero I, Drenowski A. Septal driving of the hippocampal theta rhythm as a function of frequency in the rat. *Neuroscience*, 1977, 2: p. 1019
- McNaughton N, Morris RG. Chlordiazepoxide, an anxiolytic benzodiazepine, impairs place navigation in rats. *Behav Brain Res*, 1987, 24: p. 39-46
- McNaughton N, Morris RG. Buspirone produces a dose-related impairment in spatial navigation. *Pharmacol Biochem Behav*, 1992, 43: p. 167-71
- McQuade R, Sharp T. Functional mapping of dorsal and median raphe 5-hydroxytryptamine pathways in forebrain of the rat using microdialysis. *J Neurochem*, 1997, 69: p. 791-6
- McRae-Degueurce A, Berod A, Mermet A, Keller A, Chouvet G, Joh TH, Pujol JF. Alterations in tyrosine hydroxylase activity elicited by raphe nuclei lesions in the rat locus coeruleus: evidence for the involvement of serotonin afferents. *Brain Res*, 1982, 235: p. 285-301

- Menard J, Treit D. The septum and the hippocampus differentially mediate anxiolytic effects of R(+)-8-OH-DPAT. *Behav Pharmacol*, 1998, 9: p. 93-101
- Menard J, Treit D. Effects of centrally administered anxiolytic compounds in animal models of anxiety. *Neurosci Biobehav Rev*, 1999, 23: p. 591-613
- Meyer DK, Holland A, Lais A, Szabo B. Effects of p-chloroamphetamine on release of [3H]gamma-aminobutyric acid from slices of rat caudate-putamen. *Eur J Pharmacol*, 1991, 196: p. 189-95
- Mijnster MJ, Raimundo AG, Koskuba K, Klop H, Docter GJ, Groenewegen HJ, Voorn P. Regional and cellular distribution of serotonin 5-hydroxytryptamine_{2a} receptor mRNA in the nucleus accumbens, olfactory tubercle, and caudate putamen of the rat. *J Comp Neurol*, 1997, 389: p. 1-11
- Milani H, Graeff FG. GABA-benzodiazepine modulation of aversion in the medial hypothalamus of the rat. *Pharmacol Biochem Behav*, 1987, 28: p. 21-7
- Millan MJ. The neurobiology and control of anxious states. *Prog Neurobiol*, 2003, 70: p. 83-244
- Millan MJ, Gobert A, Girardon S, Dekeyne A. Citalopram elicits a discriminative stimulus in rats at a dose selectively increasing extracellular levels of serotonin vs. dopamine and noradrenaline. *Eur J Pharmacol*, 1999, 364: p. 147-50
- Millan MJ, Lejeune F, Gobert A, Brocco M, Auclair A, Bosc C, Rivet JM, Lacoste JM, Cordi A, Dekeyne A. S18616, a highly potent spiroimidazoline agonist at alpha(2)-adrenoceptors: II. Influence on monoaminergic transmission, motor function, and anxiety in comparison with dexmedetomidine and clonidine. *J Pharmacol Exp Ther*, 2000, 295: p. 1206-22
- Misslin R. The defense system of fear: behavior and neurocircuitry. *Neurophysiol Clin*, 2003, 33: p. 55-66
- Miyamoto J, Tsuji M, Takeda H, Ohzeki M, Nawa H, Matsumiya T. Characterization of the anxiolytic-like effects of fluvoxamine, milnacipran and risperidone in mice using the conditioned fear stress paradigm. *Eur J Pharmacol*, 2004, 504: p. 97-103
- Mochizuki D, Tsujita R, Yamada S, Kawasaki K, Otsuka Y, Hashimoto S, Hattori T, Kitamura Y, Miki N. Neurochemical and behavioural characterization of milnacipran, a serotonin and noradrenaline reuptake inhibitor in rats. *Psychopharmacology (Berl)*, 2002, 162: p. 323-32

- Modirrousta M, Mainville L, Jones BE. Gabaergic neurons with alpha2-adrenergic receptors in basal forebrain and preoptic area express c-Fos during sleep. *Neuroscience*, 2004, 129: p. 803-10
- Molineaux SM, Jessell TM, Axel R, Julius D. 5-HT1c receptor is a prominent serotonin receptor subtype in the central nervous system. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 1989, 86: p. 6793-7
- Mombereau C, Kaupmann K, Froestl W, Sansig G, van der Putten H, Cryan JF. Genetic and pharmacological evidence of a role for GABA(B) receptors in the modulation of anxiety- and antidepressant-like behavior. *Neuropsychopharmacology*, 2004a, 29: p. 1050-62
- Mombereau C, Kaupmann K, Gassmann M, Bettler B, van der Putten H, Cryan JF. Altered anxiety and depression-related behaviour in mice lacking GABAB(2) receptor subunits. *Neuroreport*, 2005, 16: p. 307-10
- Mombereau C, Kaupmann K, van der Putten H, Cryan JF. Altered response to benzodiazepine anxiolytics in mice lacking GABA B(1) receptors. *Eur J Pharmacol*, 2004b, 497: p. 119-20
- Money EA, Kirk RC, McNaughton N. Alzheimer's dementia produces a loss of discrimination but no increase in rate of memory decay in delayed matching to sample. *Neuropsychologia*, 1992, 30: p. 133-43
- Mongeau R, Blier P, de Montigny C. In vivo electrophysiological evidence for tonic activation by endogenous noradrenaline of alpha 2-adrenoceptors on 5-hydroxytryptamine terminals in the rat hippocampus. *Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol*, 1993, 347: p. 266-72
- Mongeau R, De Montigny C, Blier P. Activation of 5-HT3 receptors enhances the electrically evoked release of [3H]noradrenaline in rat brain limbic structures. *Eur J Pharmacol*, 1994, 256: p. 269-79
- Moore RY, Halaris AE, Jones BE. Serotonin neurons of the midbrain raphe: ascending projections. *J Comp Neurol*, 1978, 180: p. 417-38
- Moret C, Briley M. Effects of milnacipran and pindolol on extracellular noradrenaline and serotonin levels in guinea pig hypothalamus. *J Neurochem*, 1997, 69: p. 815-22
- Moret C, Charveron M, Finberg JP, Couzinier JP, Briley M. Biochemical profile of midalcipran (F 2207), 1-phenyl-1-diethyl-aminocarbonyl-2-aminomethyl-cyclopropane (Z) hydrochloride, a potential fourth generation antidepressant drug. *Neuropharmacology*, 1985, 24: p. 1211-9

- Morrow BA, George TP, Roth RH. Noradrenergic alpha-2 agonists have anxiolytic-like actions on stress-related behavior and mesoprefrontal dopamine biochemistry. *Brain Res*, 2004, 1027: p. 173-8
- Moser PC. An evaluation of the elevated plus-maze test using the novel anxiolytic buspirone. *Psychopharmacology (Berl)*, 1989, 99: p. 48-53
- Moser PC, Tricklebank MD, Middlemiss DN, Mir AK, Hibert MF, Fozard JR. Characterization of MDL 73005EF as a 5-HT_{1A} selective ligand and its effects in animal models of anxiety: comparison with buspirone, 8-OH-DPAT and diazepam. *Br J Pharmacol*, 1990, 99: p. 343-9
- Muth EA, Haskins JT, Moyer JA, Husbands GE, Nielsen ST, Sigg EB. Antidepressant biochemical profile of the novel bicyclic compound Wy-45,030, an ethyl cyclohexanol derivative. *Biochem Pharmacol*, 1986, 35: p. 4493-7
- Nashold BS, Jr., Wilson WP, Slaughter DG. Sensations evoked by stimulation in the midbrain of man. *J Neurosurg*, 1969, 30: p. 14-24
- Netto CF, Guimaraes FS. Anxiogenic effect of cholecystokinin in the dorsal periaqueductal gray. *Neuropsychopharmacology*, 2004, 29: p. 101-7
- Nic Dhonnchadha BA, Bourin M, Hascoet M. Anxiolytic-like effects of 5-HT₂ ligands on three mouse models of anxiety. *Behav Brain Res*, 2003a, 140: p. 203-14
- Nic Dhonnchadha BA, Hascoet M, Jolliet P, Bourin M. Evidence for a 5-HT_{2A} receptor mode of action in the anxiolytic-like properties of DOI in mice. *Behav Brain Res*, 2003b, 147: p. 175-84
- Nic Dhonnchadha BA, Ripoll N, Clenet F, Hascoet M, Bourin M. Implication of 5-HT₂ receptor subtypes in the mechanism of action of antidepressants in the four plates test. *Psychopharmacology (Berl)*, 2005, 179: p. 418-29
- Nicholas AP, Hokfelt T, Pieribone VA. The distribution and significance of CNS adrenoceptors examined with in situ hybridization. *Trends Pharmacol Sci*, 1996, 17: p. 245-55
- Nicoll RA. My close encounter with GABA(B) receptors. *Biochem Pharmacol*, 2004, 68: p. 1667-74
- Nogueira RL, Graeff FG. Role of 5-HT receptor subtypes in the modulation of dorsal periaqueductal gray generated aversion. *Pharmacol Biochem Behav*, 1995, 52: p. 1-6
- Nukina I, Glavin GB, LaBella FS. Acute cold-restraint stress affects alpha 2-adrenoceptors in specific brain regions of the rat. *Brain Res*, 1987, 401: p. 30-3

- Numazawa R, Yoshioka M, Matsumoto M, Togashi H, Kemmotsu O, Saito H. Pharmacological characterization of alpha 2-adrenoceptor regulated serotonin release in the rat hippocampus. *Neurosci Lett*, 1995, 192: p. 161-4
- Ohman A. Fear and anxiety as emotional phenomena: Clinical, Phenomenological, evolutionnary perspectives, and information-processing mechanisms. New York: Lewis M, Haviland JM (eds), 1992, *Handbook of the Emotions*. Guilford, p. 511-536
- Olpe HR, Worner W, Ferrat T. Stimulation parameters determine role of GABAB receptors in long-term potentiation. *Experientia*, 1993, 49: p. 542-6
- Ongini E, Barzaghi C, Marzanatti M. Intrinsic and antagonistic effects of beta-carboline FG 7142 on behavioral and EEG actions of benzodiazepines and pentobarbital in cats. *Eur J Pharmacol*, 1983, 95: p. 125-9
- Otis TS, De Koninck Y, Mody I. Characterization of synaptically elicited GABAB responses using patch-clamp recordings in rat hippocampal slices. *J Physiol*, 1993, 463: p. 391-407
- Parks CL, Robinson PS, Sibille E, Shenk T, Toth M. Increased anxiety of mice lacking the serotonin1A receptor. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 1998, 95: p. 10734-9
- Pasqualetti M, Ori M, Castagna M, Marazziti D, Cassano GB, Nardi I. Distribution and cellular localization of the serotonin type 2C receptor messenger RNA in human brain. *Neuroscience*, 1999, 92: p. 601-11
- Pazos A, Cortes R, Palacios JM. Quantitative autoradiographic mapping of serotonin receptors in the rat brain. II. Serotonin-2 receptors. *Brain Res*, 1985, 346: p. 231-49
- Pellow S, Chopin P, File SE, Briley M. Validation of open:closed arm entries in an elevated plus-maze as a measure of anxiety in the rat. *J Neurosci Methods*, 1985, 14: p. 149-67
- Pesold C, Treit D. The central and basolateral amygdala differentially mediate the anxiolytic effects of benzodiazepines. *Brain Res*, 1995, 671: p. 213-21
- Petersen EN, Braestrup C, Scheel-Kruger J. Evidence that the anticonflict effect of midazolam in amygdala is mediated by the specific benzodiazepine receptors. *Neurosci Lett*, 1985, 53: p. 285-8
- Pfriefer FW, Gottmann K, Lux HD. Kinetics of GABAB receptor-mediated inhibition of calcium currents and excitatory synaptic transmission in hippocampal neurons in vitro. *Neuron*, 1994, 12: p. 97-107
- Piacentini MF, Clinckers R, Meeusen R, Sarre S, Ebinger G, Michotte Y. Effects of venlafaxine on extracellular 5-HT, dopamine and noradrenaline in the hippocampus

- and on peripheral hormone concentrations in the rat in vivo. *Life Sci*, 2003, 73: p. 2433-42
- Piccinelli M, Pini S, Bellantuono C, Wilkinson G. Efficacy of drug treatment in obsessive-compulsive disorder. A meta-analytic review. *Br J Psychiatry*, 1995, 166: p. 424-43
- Piguet P, Galvan M. Transient and long-lasting actions of 5-HT on rat dentate gyrus neurones in vitro. *J Physiol*, 1994, 481 (Pt 3): p. 629-39
- Pikkarainen M, Ronkko S, Savander V, Insausti R, Pitkanen A. Projections from the lateral, basal, and accessory basal nuclei of the amygdala to the hippocampal formation in rat. *J Comp Neurol*, 1999, 403: p. 229-60
- Pilc A, Nowak G. GABAergic hypotheses of anxiety and depression: focus on GABA-B receptors. *Drugs Today (Barc)*, 2005, 41: p. 755-66
- Pinna G, Costa E, Guidotti A. Changes in brain testosterone and allopregnanolone biosynthesis elicit aggressive behavior. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2005, 102: p. 2135-40
- Pitkanen A, Savander V, LeDoux JE. Organization of intra-amygdaloid circuitries in the rat: an emerging framework for understanding functions of the amygdala. *Trends Neurosci*, 1997, 20: p. 517-23
- Pitkanen A, Stefanacci L, Farb CR, Go GG, LeDoux JE, Amaral DG. Intrinsic connections of the rat amygdaloid complex: projections originating in the lateral nucleus. *J Comp Neurol*, 1995, 356: p. 288-310
- Plaznik A, Jessa M, Bidzinski A, Nazar M. The effect of serotonin depletion and intra-hippocampal midazolam on rat behavior in the Vogel conflict test. *Eur J Pharmacol*, 1994, 257: p. 293-6
- Pompeiano M, Palacios JM, Mengod G. Distribution of the serotonin 5-HT₂ receptor family mRNAs: comparison between 5-HT_{2A} and 5-HT_{2C} receptors. *Brain Res Mol Brain Res*, 1994, 23: p. 163-78
- Pratt GD, Bowery NG. Repeated administration of desipramine and a GABAB receptor antagonist, CGP 36742, discretely up-regulates GABAB receptor binding sites in rat frontal cortex. *Br J Pharmacol*, 1993, 110: p. 724-35
- Price JL, Amaral DG. An autoradiographic study of the projections of the central nucleus of the monkey amygdala. *J Neurosci*, 1981, 1: p. 1242-59
- Prieto M, Giralt MT. Effects of N-(2-chloroethyl)-N-ethyl-2-bromobenzylamine (DSP4) on alpha₂-adrenoceptors which regulate the synthesis and release of noradrenaline in the rat brain. *Pharmacol Toxicol*, 2001, 88: p. 152-8

- Przegalinski E, Tatarczynska E, Klodzinska A, Chojnacka-Wojcik E. The role of postsynaptic 5-HT_{1A} receptors in the anticonflict effect of ipsapirone. *Neuropharmacology*, 1994, 33: p. 1109-15
- Pudovkina OL, Kawahara Y, de Vries J, Westerink BH. The release of noradrenaline in the locus coeruleus and prefrontal cortex studied with dual-probe microdialysis. *Brain Res*, 2001, 906: p. 38-45
- Puig MV, Santana N, Celada P, Mengod G, Artigas F. In vivo excitation of GABA interneurons in the medial prefrontal cortex through 5-HT₃ receptors. *Cereb Cortex*, 2004, 14: p. 1365-75
- Puozzo C, Leonard BE. Pharmacokinetics of milnacipran in comparison with other antidepressants. *Int Clin Psychopharmacol*, 1996, 11 Suppl 4: p. 15-27
- Quirarte GL, Galvez R, Roozendaal B, McGaugh JL. Norepinephrine release in the amygdala in response to footshock and opioid peptidergic drugs. *Brain Res*, 1998, 808: p. 134-40
- Rago L, Kiiivet RA, Harro J, Pold M. Behavioral differences in an elevated plus-maze: correlation between anxiety and decreased number of GABA and benzodiazepine receptors in mouse cerebral cortex. *Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol*, 1988, 337: p. 675-8
- Rainbow TC, Parsons B, Wolfe BB. Quantitative autoradiography of beta 1- and beta 2-adrenergic receptors in rat brain. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 1984, 81: p. 1585-9
- Rainnie DG. Serotonergic modulation of neurotransmission in the rat basolateral amygdala. *J Neurophysiol*, 1999, 82: p. 69-85
- Ramboz S, Oosting R, Amara DA, Kung HF, Blier P, Mendelsohn M, Mann JJ, Brunner D, Hen R. Serotonin receptor 1A knockout: an animal model of anxiety-related disorder. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 1998, 95: p. 14476-81
- Rasmussen K, Jacobs BL. Single unit activity of locus coeruleus neurons in the freely moving cat. II. Conditioning and pharmacologic studies. *Brain Res*, 1986, 371: p. 335-44
- Reader TA, Briere R, Grondin L, Ferron A. Effects of p-chlorophenylalanine on cortical monoamines and on the activity of noradrenergic neurons. *Neurochem Res*, 1986, 11: p. 1025-35
- Redmond DE, Jr. The possible role of locus coeruleus noradrenergic activity in anxiety-panic. *Clin Neuropharmacol*, 1986, 9 Suppl 4: p. 40-2
- Redmond DE, Jr., Huang YH. Current concepts. II. New evidence for a locus coeruleus-norepinephrine connection with anxiety. *Life Sci*, 1979, 25: p. 2149-62

- Redmond DE, Jr., Huang YH, Snyder DR, Maas JW. Behavioral effects of stimulation of the nucleus locus coeruleus in the stump-tailed monkey *Macaca arctoides*. *Brain Res*, 1976, 116: p. 502-10
- Rex A, Voigt JP, Fink H. Anxiety but not arousal increases 5-hydroxytryptamine release in the rat ventral hippocampus in vivo. *Eur J Neurosci*, 2005, 22: p. 1185-9
- Ripoll N, Hascoet M, Bourin M. The four-plates test: Anxiolytic or analgesic paradigm? *Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry*, 2006: p.
- Ripoll N, Nic Dhonnchadha BA, Seville V, Bourin M, Hascoet M. The four-plates test-retest paradigm to discriminate anxiolytic effects. *Psychopharmacology (Berl)*, 2005, 180: p. 73-83
- Roberts C, Thomas DR, Bate ST, Kew JN. GABAergic modulation of 5-HT₇ receptor-mediated effects on 5-HT efflux in the guinea-pig dorsal raphe nucleus. *Neuropharmacology*, 2004, 46: p. 935-41
- Rodgers RJ, Cole JC, Tredwell JM. Profile of action of 5-HT₃ receptor antagonists, ondansetron and WAY 100289, in the elevated plus-maze test of anxiety of mice. *Psychopharmacology (Berl)*, 1995, 117: p. 306-12
- Rodgers RJ, Johnson NJ. Factor analysis of spatiotemporal and ethological measures in the murine elevated plus-maze test of anxiety. *Pharmacol Biochem Behav*, 1995, 52: p. 297-303
- Roozendaal B, Koolhaas JM, Bohus B. Attenuated cardiovascular, neuroendocrine, and behavioral responses after a single footshock in central amygdaloid lesioned male rats. *Physiol Behav*, 1991, 50: p. 771-5
- Ropert N, Guy N. Serotonin facilitates GABAergic transmission in the CA1 region of rat hippocampus in vitro. *J Physiol*, 1991, 441: p. 121-36
- Rosel P, Arranz B, Urretavizcaya M, Oros M, San L, Vallejo J, Navarro MA. Different distributions of the 5-HT reuptake complex and the postsynaptic 5-HT_{2A} receptors in Brodmann areas and brain hemispheres. *Psychiatry Res*, 2002, 111: p. 105-15
- Roth BL, Berry SA, Kroeze WK, Willins DL, Kristiansen K. Serotonin 5-HT_{2A} receptors: molecular biology and mechanisms of regulation. *Crit Rev Neurobiol*, 1998, 12: p. 319-38
- Ruat M, Traiffort E, Leurs R, Tardivel-Lacombe J, Diaz J, Arrang JM, Schwartz JC. Molecular cloning, characterization, and localization of a high-affinity serotonin receptor (5-HT₇) activating cAMP formation. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 1993, 90: p. 8547-51

- Russo AS, Guimaraes FS, De Aguiar JC, Graeff FG. Role of benzodiazepine receptors located in the dorsal periaqueductal grey of rats in anxiety. *Psychopharmacology (Berl)*, 1993, 110: p. 198-202
- Saavedra JM, Grobecker H, Zivin J. Catecholamines in the raphe nuclei of the rat. *Brain Res*, 1976, 114: p. 337-45
- Sajdyk TJ, Katner JS, Shekhar A. Monoamines in the dorsomedial hypothalamus of rats following exposure to different tests of "anxiety". *Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry*, 1997, 21: p. 193-209
- Saldivar-Gonzalez JA, Posadas-Andrews A, Rodriguez R, Gomez C, Hernandez-Manjarrez ME, Ortiz-Leon S, Martinez-Pineda A, Gomez-Laguna D, Salgado V, Manjarrez J, Alvarado R. Effect of electrical stimulation of the baso-lateral amygdala nucleus on defensive burying shock probe test and elevated plus maze in rats. *Life Sci*, 2003, 72: p. 819-29
- Salome N, Viltart O, Darnaudery M, Salchner P, Singewald N, Landgraf R, Sequeira H, Wigger A. Reliability of high and low anxiety-related behaviour: influence of laboratory environment and multifactorial analysis. *Behav Brain Res*, 2002, 136: p. 227-37
- Sambunaris A, Hesselink JK, Pinder R, Panagides J, Stahl SM. Development of new antidepressants. *J Clin Psychiatry*, 1997, 58 Suppl 6: p. 40-53
- Sanacora G, Mason GF, Rothman DL, Krystal JH. Increased occipital cortex GABA concentrations in depressed patients after therapy with selective serotonin reuptake inhibitors. *Am J Psychiatry*, 2002, 159: p. 663-5
- Sanchez C. Stress-induced vocalisation in adult animals. A valid model of anxiety? *Eur J Pharmacol*, 2003, 463: p. 133-43
- Sanden N, Thorlin T, Blomstrand F, Persson PA, Hansson E. 5-Hydroxytryptamine_{2B} receptors stimulate Ca²⁺ increases in cultured astrocytes from three different brain regions. *Neurochem Int*, 2000, 36: p. 427-34
- Sanders MJ, Wiltgen BJ, Fanselow MS. The place of the hippocampus in fear conditioning. *Eur J Pharmacol*, 2003, 463: p. 217-23
- Sanders SK, Shekhar A. Regulation of anxiety by GABA_A receptors in the rat amygdala. *Pharmacol Biochem Behav*, 1995, 52: p. 701-6
- Sandford JJ, Argyropoulos SV, Nutt DJ. The psychobiology of anxiolytic drugs. Part 1: Basic neurobiology. *Pharmacol Ther*, 2000, 88: p. 197-212

- Santana N, Bortolozzi A, Serrats J, Mengod G, Artigas F. Expression of serotonin1A and serotonin2A receptors in pyramidal and GABAergic neurons of the rat prefrontal cortex. *Cereb Cortex*, 2004, 14: p. 1100-9
- Sasaki K, Fan LW, Tien LT, Ma T, Loh HH, Ho IK. The interaction of morphine and gamma-aminobutyric acid (GABA)ergic systems in anxiolytic behavior: using mu-opioid receptor knockout mice. *Brain Res Bull*, 2002, 57: p. 689-94
- Savander V, Go CG, LeDoux JE, Pitkanen A. Intrinsic connections of the rat amygdaloid complex: projections originating in the basal nucleus. *J Comp Neurol*, 1995, 361: p. 345-68
- Scheel-Kruger J, Petersen EN. Anticonflict effect of the benzodiazepines mediated by a GABAergic mechanism in the amygdala. *Eur J Pharmacol*, 1982, 82: p. 115-6
- Scheinin M, Lomasney JW, Hayden-Hixson DM, Schambra UB, Caron MG, Lefkowitz RJ, Fremeau RT, Jr. Distribution of alpha 2-adrenergic receptor subtype gene expression in rat brain. *Brain Res Mol Brain Res*, 1994, 21: p. 133-49
- Schlicker E, Classen K, Gothert M. GABAB receptor-mediated inhibition of serotonin release in the rat brain. *Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol*, 1984, 326: p. 99-105
- Scholz KP, Miller RJ. GABAB receptor-mediated inhibition of Ca²⁺ currents and synaptic transmission in cultured rat hippocampal neurones. *J Physiol*, 1991, 444: p. 669-86
- Schreiber R, De Vry J. Neuronal circuits involved in the anxiolytic effects of the 5-HT1A receptor agonists 8-OH-DPAT ipsapirone and buspirone in the rat. *Eur J Pharmacol*, 1993, 249: p. 341-51
- Schreiber R, Melon C, De Vry J. The role of 5-HT receptor subtypes in the anxiolytic effects of selective serotonin reuptake inhibitors in the rat ultrasonic vocalization test. *Psychopharmacology (Berl)*, 1998, 135: p. 383-91
- Schutz MT, de Aguiar JC, Graeff FG. Anti-aversive role of serotonin in the dorsal periaqueductal grey matter. *Psychopharmacology (Berl)*, 1985, 85: p. 340-5
- Schwaber JS, Kapp BS, Higgins GA, Rapp PR. Amygdaloid basal forebrain direct connections with the nucleus of the solitary tract and the dorsal motor nucleus. *J Neurosci*, 1982, 2: p. 1424-1438
- Schwartz RK, Thiel CM, Muller CP, Huston JP. Relationship between anxiety and serotonin in the ventral striatum. *Neuroreport*, 1998, 9: p. 1025-9
- Scoville WB, Milner B. Loss of recent memory after bilateral hippocampal lesions. *J Neurol Neurosurg Psychiatry*, 1957, 20: p. 11-21

- Seeman P, Westman K, Coscina D, Warsh JJ. Serotonin receptors in hippocampus and frontal cortex. *Eur J Pharmacol*, 1980, 66: p. 179-91
- Serradeil-Le Gal C, Wagnon J, Simiand J, Griebel G, Lacour C, Guillon G, Barberis C, Brossard G, Soubrie P, Nisato D, Pascal M, Pruss R, Scatton B, Maffrand JP, Le Fur G. Characterization of (2S,4R)-1-[5-chloro-1-[(2,4-dimethoxyphenyl)sulfonyl]-3-(2-methoxy-phenyl)-2-oxo-2,3-dihydro-1H-indol-3-yl]-4-hydroxy-N,N-dimethyl-2-pyrrolidine carboxamide (SSR149415), a selective and orally active vasopressin V1b receptor antagonist. *J Pharmacol Exp Ther*, 2002, 300: p. 1122-30
- Serrats J, Mengod G, Cortes R. Expression of serotonin 5-HT_{2C} receptors in GABAergic cells of the anterior raphe nuclei. *J Chem Neuroanat*, 2005, 29: p. 83-91
- Sevy S, Papadimitriou GN, Surmont DW, Goldman S, Mendlewicz J. Noradrenergic function in generalized anxiety disorder, major depressive disorder, and healthy subjects. *Biol Psychiatry*, 1989, 25: p. 141-52
- Shaikh MB, Siegel A. GABA-mediated regulation of feline aggression elicited from midbrain periaqueductal gray. *Brain Res*, 1990, 507: p. 51-6
- Sharma A, Punhani T, Fone KC. Distribution of the 5-hydroxytryptamine_{2C} receptor protein in adult rat brain and spinal cord determined using a receptor-directed antibody: effect of 5,7-dihydroxytryptamine. *Synapse*, 1997, 27: p. 45-56
- Shen RY, Andrade R. 5-Hydroxytryptamine₂ receptor facilitates GABAergic neurotransmission in rat hippocampus. *J Pharmacol Exp Ther*, 1998, 285: p. 805-12
- Shibata K, Kataoka Y, Gomita Y, Ueki S. Localization of the site of the anticonflict action of benzodiazepines in the amygdaloid nucleus of rats. *Brain Res*, 1982, 234: p. 442-6
- Shibata K, Kataoka Y, Yamashita K, Ueki S. An important role of the central amygdaloid nucleus and mammillary body in the mediation of conflict behavior in rats. *Brain Res*, 1986, 372: p. 159-62
- Shinkai K, Yoshimura R, Toyohira Y, Ueno S, Tsutsui M, Nakamura J, Yanagihara N. Effect of prolonged exposure to milnacipran on norepinephrine transporter in cultured bovine adrenal medullary cells. *Biochem Pharmacol*, 2005, 70: p. 1389-97
- Sibille E, Pavlides C, Benke D, Toth M. Genetic inactivation of the Serotonin(1A) receptor in mice results in downregulation of major GABA(A) receptor alpha subunits, reduction of GABA(A) receptor binding, and benzodiazepine-resistant anxiety. *J Neurosci*, 2000, 20: p. 2758-65

- Silva EG, Feres T, Vianna LM, Okuyama P, Paiva TB. Dual effect of clonidine on mesenteric artery adrenoceptors: agonistic (alpha-2) and antagonistic (alpha-1). *J Pharmacol Exp Ther*, 1996, 277: p. 872-6
- Sloviter RS, Nilaver G. Immunocytochemical localization of GABA-, cholecystokinin-, vasoactive intestinal polypeptide-, and somatostatin-like immunoreactivity in the area dentata and hippocampus of the rat. *J Comp Neurol*, 1987, 256: p. 42-60
- Smith ME. Bilateral hippocampal volume reduction in adults with post-traumatic stress disorder: a meta-analysis of structural MRI studies. *Hippocampus*, 2005, 15: p. 798-807
- Soderpalm B, Andersson G, Enerback C, Engel JA. In vivo administration of the 5-HT_{1A} receptor agonist 8-OH-DPAT interferes with brain GABA(A)/benzodiazepine receptor complexes. *Neuropharmacology*, 1997, 36: p. 1071-7
- Soderpalm B, Engel JA. Alpha 1- and beta-adrenoceptor stimulation potentiate the anticonflict effect of a benzodiazepine. *J Neural Transm Gen Sect*, 1990, 79: p. 155-67
- Soderpalm B, Engel JA. Involvement of the GABAA/benzodiazepine chloride ionophore receptor complex in the 5,7-DHT Induced anticonflict effect. *Life Sci*, 1991, 49: p. 139-53
- Sokal DM, Giarola AS, Large CH. Effects of GABA(B), 5-HT(1A), and 5-HT(2) receptor stimulation on activation and inhibition of the rat lateral amygdala following medial geniculate nucleus stimulation in vivo. *Brain Res*, 2005, 1031: p. 141-50
- Stanford SC. Central adrenoceptors in response and adaptation to stress. Oxford: Marsden CA, Heal DJ (eds), 1990, *The Pharmacology of Noradrenaline in the Central Nervous System*. Oxford Univ. Press, p. 379-422
- Stefanski R, Palejko W, Bidzinski A, Kostowski W, Plaznik A. Serotonergic innervation of the hippocampus and nucleus accumbens septi and the anxiolytic-like action of midazolam and 5-HT_{1A} receptor agonists. *Neuropharmacology*, 1993a, 32: p. 977-85
- Stefanski R, Palejko W, Bidzinski A, Kostowski W, Plaznik A. Serotonergic innervation of the hippocampus and nucleus accumbens septi and the anxiolytic-like action of the 5-HT₃ receptor antagonists. *Neuropharmacology*, 1993b, 32: p. 987-93
- Stefanski R, Palejko W, Kostowski W, Plaznik A. The comparison of benzodiazepine derivatives and serotonergic agonists and antagonists in two animal models of anxiety. *Neuropharmacology*, 1992, 31: p. 1251-8

- Stenzel-Poore MP, Duncan JE, Rittenberg MB, Bakke AC, Heinrichs SC. CRH overproduction in transgenic mice: behavioral and immune system modulation. *Ann N Y Acad Sci*, 1996, 780: p. 36-48
- Stine SM, Southwick SM, Petrakis IL, Kosten TR, Charney DS, Krystal JH. Yohimbine-induced withdrawal and anxiety symptoms in opioid-dependent patients. *Biol Psychiatry*, 2002, 51: p. 642-51
- Stork O, Ji FY, Obata K. Reduction of extracellular GABA in the mouse amygdala during and following confrontation with a conditioned fear stimulus. *Neurosci Lett*, 2002, 327: p. 138-42
- Stork O, Yamanaka H, Stork S, Kume N, Obata K. Altered conditioned fear behavior in glutamate decarboxylase 65 null mutant mice. *Genes Brain Behav*, 2003, 2: p. 65-70
- Suwabe A, Kubota M, Niwa M, Kobayashi K, Kanba S. Effect of a 5-HT(1A) receptor agonist, flesinoxan, on the extracellular noradrenaline level in the hippocampus and on the locomotor activity of rats. *Brain Res*, 2000, 858: p. 393-401
- Suzuki M, Matsuda T, Asano S, Somboonthum P, Takuma K, Baba A. Increase of noradrenaline release in the hypothalamus of freely moving rat by postsynaptic 5-hydroxytryptamine 1A receptor activation. *Br J Pharmacol*, 1995, 115: p. 703-11
- Svensson TH, Bunney BS, Aghajanian GK. Inhibition of both noradrenergic and serotonergic neurons in brain by the alpha-adrenergic agonist clonidine. *Brain Res*, 1975, 92: p. 291-306
- Szabo ST, Blier P. Functional and pharmacological characterization of the modulatory role of serotonin on the firing activity of locus coeruleus norepinephrine neurons. *Brain Res*, 2001a, 922: p. 9-20
- Szabo ST, Blier P. Serotonin (1A) receptor ligands act on norepinephrine neuron firing through excitatory amino acid and GABA(A) receptors: a microiontophoretic study in the rat locus coeruleus. *Synapse*, 2001b, 42: p. 203-12
- Szabo ST, Blier P. Effects of serotonin (5-hydroxytryptamine, 5-HT) reuptake inhibition plus 5-HT(2A) receptor antagonism on the firing activity of norepinephrine neurons. *J Pharmacol Exp Ther*, 2002, 302: p. 983-91
- Takao K, Nagatani T, Kasahara K, Hashimoto S. Role of the central serotonergic system in the anticonflict effect of d-AP159. *Pharmacol Biochem Behav*, 1992, 43: p. 503-8
- Takeuchi Y, Matsushima S, Matsushima R, Hopkins DA. Direct amygdaloid projections to the dorsal motor nucleus of the vagus nerve: a light and electron microscopic study in the rat. *Brain Res*, 1983, 280: p. 143-7

- Takeuchi Y, McLean JH, Hopkins DA. Reciprocal connections between the amygdala and parabrachial nuclei: ultrastructural demonstration by degeneration and axonal transport of horseradish peroxidase in the cat. *Brain Res*, 1982, 239: p. 583-8
- Tan S, Kirk RC, Abraham WC, McNaughton N. Effects of the NMDA antagonists CPP and MK-801 on delayed conditional discrimination. *Psychopharmacology (Berl)*, 1989, 98: p. 556-60
- Tan S, Kirk RC, Abraham WC, McNaughton N. Chlordiazepoxide reduces discriminability but not rate of forgetting in delayed conditional discrimination. *Psychopharmacology (Berl)*, 1990, 101: p. 550-4
- Tanaka M, Yoshida M, Emoto H, Ishii H. Noradrenaline systems in the hypothalamus, amygdala and locus coeruleus are involved in the provocation of anxiety: basic studies. *Eur J Pharmacol*, 2000, 405: p. 397-406
- Tanaka T, Yokoo H, Mizoguchi K, Yoshida M, Tsuda A, Tanaka M. Noradrenaline release in the rat amygdala is increased by stress: studies with intracerebral microdialysis. *Brain Res*, 1991, 544: p. 174-6
- Tao R, Ma Z, Auerbach SB. Differential regulation of 5-hydroxytryptamine release by GABAA and GABAB receptors in midbrain raphe nuclei and forebrain of rats. *Br J Pharmacol*, 1996, 119: p. 1375-84
- Tatarczynska E, Klodzinska A, Chojnacka-Wojcik E, Palucha A, Gasparini F, Kuhn R, Pilc A. Potential anxiolytic- and antidepressant-like effects of MPEP, a potent, selective and systemically active mGlu5 receptor antagonist. *Br J Pharmacol*, 2001, 132: p. 1423-30
- Tejani-Butt SM, Pare WP, Yang J. Effect of repeated novel stressors on depressive behavior and brain norepinephrine receptor system in Sprague-Dawley and Wistar Kyoto (WKY) rats. *Brain Res*, 1994, 649: p. 27-35
- Thomas SR, Lewis ME, Iversen SD. Correlation of [3H]diazepam binding density with anxiolytic locus in the amygdaloid complex of the rat. *Brain Res*, 1985, 342: p. 85-90
- Thompson SM, Gahwiler BH. Comparison of the actions of baclofen at pre- and postsynaptic receptors in the rat hippocampus in vitro. *J Physiol*, 1992, 451: p. 329-45
- To ZP, Bonhaus DW, Eglen RM, Jakeman LB. Characterization and distribution of putative 5-HT₇ receptors in guinea-pig brain. *Br J Pharmacol*, 1995, 115: p. 107-16
- Treit D, Menard J. Dissociations among the anxiolytic effects of septal, hippocampal, and amygdaloid lesions. *Behav Neurosci*, 1997, 111: p. 653-8

- Treit D, Robinson A, Rotzinger S, Pesold C. Anxiolytic effects of serotonergic interventions in the shock-probe burying test and the elevated plus-maze test. *Behav Brain Res*, 1993, 54: p. 23-34
- Turner TJ, Mokler DJ, Luebke JI. Calcium influx through presynaptic 5-HT₃ receptors facilitates GABA release in the hippocampus: in vitro slice and synaptosome studies. *Neuroscience*, 2004, 129: p. 703-18
- Uhde TW, Boulenger JP, Post RM, Siever LJ, Vittone BJ, Jimerson DC, Roy-Byrne PP. Fear and anxiety: relationship to noradrenergic function. *Psychopathology*, 1984, 17 Suppl 3: p. 8-23
- Uhlen S, Muceniece R, Rangel N, Tiger G, Wikberg JE. Comparison of the binding activities of some drugs on alpha 2A, alpha 2B and alpha 2C-adrenoceptors and non-adrenergic imidazoline sites in the guinea pig. *Pharmacol Toxicol*, 1995, 76: p. 353-64
- Valentino RJ, Aston-Jones G. Physiological and anatomical determinants of locus coeruleus discharge. New York: Bloom FE, Kupfer DJ (eds), 1996, *Psychopharmacology: the Fourth Generation of Progress*. Raven Press
- Varga V, Sik A, Freund TF, Kocsis B. GABA(B) receptors in the median raphe nucleus: distribution and role in the serotonergic control of hippocampal activity. *Neuroscience*, 2002, 109: p. 119-32
- Varia I, Rauscher F. Treatment of generalized anxiety disorder with citalopram. *Int Clin Psychopharmacol*, 2002, 17: p. 103-7
- Veening JG, Swanson LW, Sawchenko PE. The organization of projections from the central nucleus of the amygdala to brainstem sites involved in central autonomic regulation: a combined retrograde transport-immunohistochemical study. *Brain Res*, 1984, 303: p. 337-57
- Venault P, Jacquot F, Save E, Sara S, Chapouthier G. Anxiogenic-like effects of yohimbine and idazoxan in two behavioral situations in mice. *Life Sci*, 1993, 52: p. 639-45
- Vermetten E, Bremner JD. Circuits and systems in stress. I. Preclinical studies. *Depress Anxiety*, 2002, 15: p. 126-47
- Vertes RP. A PHA-L analysis of ascending projections of the dorsal raphe nucleus in the rat. *J Comp Neurol*, 1991, 313: p. 643-68
- Vizi ES, Kiss JP. Neurochemistry and pharmacology of the major hippocampal transmitter systems: synaptic and nonsynaptic interactions. *Hippocampus*, 1998, 8: p. 566-607

- Wada T, Fukuda N. Effects of DN-2327, a new anxiolytic, diazepam and buspirone on exploratory activity of the rat in an elevated plus-maze. *Psychopharmacology (Berl)*, 1991, 104: p. 444-50
- Walker DL, Toufexis DJ, Davis M. Role of the bed nucleus of the stria terminalis versus the amygdala in fear, stress, and anxiety. *Eur J Pharmacol*, 2003, 463: p. 199-216
- Wall PM, Messier C. Methodological and conceptual issues in the use of the elevated plus-maze as a psychological measurement instrument of animal anxiety-like behavior. *Neurosci Biobehav Rev*, 2001, 25: p. 275-86
- Wamsley JK, Alburges ME, Hunt MA, Bylund DB. Differential localization of alpha 2-adrenergic receptor subtypes in brain. *Pharmacol Biochem Behav*, 1992, 41: p. 267-73
- Wang YF, Shibuya I, Kabashima N, Setiadji VS, Isse T, Ueta Y, Yamashita H. Inhibition of spontaneous inhibitory postsynaptic currents (IPSC) by noradrenaline in rat supraoptic neurons through presynaptic alpha2-adrenoceptors. *Brain Res*, 1998, 807: p. 61-9
- Ward BO, Stephens DN. Sensitisation of withdrawal signs following repeated withdrawal from a benzodiazepine: differences between measures of anxiety and seizure sensitivity. *Psychopharmacology (Berl)*, 1998, 135: p. 342-52
- Weikop P, Kehr J, Scheel-Kruger J. The role of alpha1- and alpha2-adrenoreceptors on venlafaxine-induced elevation of extracellular serotonin, noradrenaline and dopamine levels in the rat prefrontal cortex and hippocampus. *J Psychopharmacol*, 2004, 18: p. 395-403
- Wesolowska A, Paluchowska MH, Golembiowska K, Chojnacka-Wojcik E. Pharmacological characterization of MP349, a novel 5-HT1A-receptor antagonist with anxiolytic-like activity, in mice and rats. *J Pharm Pharmacol*, 2003, 55: p. 533-43
- White SR, Neuman RS. Facilitation of spinal motoneurone excitability by 5-hydroxytryptamine and noradrenaline. *Brain Res*, 1980, 188: p. 119-27
- Whitton P, Curzon G. Anxiogenic-like effect of infusing 1-(3-chlorophenyl) piperazine (mCPP) into the hippocampus. *Psychopharmacology (Berl)*, 1990, 100: p. 138-40
- Willins DL, Deutch AY, Roth BL. Serotonin 5-HT2A receptors are expressed on pyramidal cells and interneurons in the rat cortex. *Synapse*, 1997, 27: p. 79-82
- Willner P. The validity of animal models of depression. *Psychopharmacology (Berl)*, 1984, 83: p. 1-16
- Wright IK, Heaton M, Upton N, Marsden CA. Comparison of acute and chronic treatment of various serotonergic agents with those of diazepam and idazoxan in the rat elevated X-maze. *Psychopharmacology (Berl)*, 1992, 107: p. 405-14

- Wu C, Yoder EJ, Shih J, Chen K, Dias P, Shi L, Ji XD, Wei J, Conner JM, Kumar S, Ellisman MH, Singh SK. Development and characterization of monoclonal antibodies specific to the serotonin 5-HT_{2A} receptor. *J Histochem Cytochem*, 1998, 46: p. 811-24
- Wu LG, Saggau P. GABAB receptor-mediated presynaptic inhibition in guinea-pig hippocampus is caused by reduction of presynaptic Ca²⁺ influx. *J Physiol*, 1995, 485 (Pt 3): p. 649-57
- Xu T, Pandey SC. Cellular localization of serotonin(2A) (5HT(2A)) receptors in the rat brain. *Brain Res Bull*, 2000, 51: p. 499-505
- Yajima Y, Hayashi Y, Yoshii N. The midbrain central gray substance as a highly sensitive neural structure for the production of ultrasonic vocalization in the rat. *Brain Res*, 1980, 198: p. 446-52
- Yajima Y, Hayashi Y, Yoshii N. Ambiguous motoneurons discharging closely associated with ultrasonic vocalization in rats. *Brain Res*, 1982, 238: p. 445-50
- Yamadera H, Kato M, Ueno T, Tsukahara Y, Okuma T. Pharmacology-EEG mapping of diazepam effects using different references and absolute and relative power. *Pharmacopsychiatry*, 1993, 26: p. 254-8
- Yamamoto J. Relationship between hippocampal theta-wave frequency and emotional behaviors in rabbits produced with stresses or psychotropic drugs. *Jpn J Pharmacol*, 1998, 76: p. 125-7
- Yan QS, Yan SE. Serotonin-1B receptor-mediated inhibition of [(3)H]GABA release from rat ventral tegmental area slices. *J Neurochem*, 2001, 79: p. 914-22
- Ye JH, Hunt T, Wu WH, McArdle JJ. Ondansetron modulates GABA(A) current of rat central nervous system neurons. *Eur J Pharmacol*, 1997, 337: p. 87-94
- Young SL, Bohenek DL, Fanselow MS. NMDA processes mediate anterograde amnesia of contextual fear conditioning induced by hippocampal damage: immunization against amnesia by context preexposure. *Behav Neurosci*, 1994, 108: p. 19-29
- Zangrossi Junior H, Graeff FG. Behavioral effects of intra-amygdala injections of GABA and 5-HT acting drugs in the elevated plus-maze. *Braz J Med Biol Res*, 1994, 27: p. 2453-6
- Zanoveli JM, Netto CF, Guimaraes FS, Zangrossi H, Jr. Systemic and intra-dorsal periaqueductal gray injections of cholecystinin sulfated octapeptide (CCK-8s) induce a panic-like response in rats submitted to the elevated T-maze. *Peptides*, 2004, 25: p. 1935-41

- Zarrindast M, Rostami P, Sadeghi-Hariri M. GABA(A) but not GABA(B) receptor stimulation induces antianxiety profile in rats. *Pharmacol Biochem Behav*, 2001, 69: p. 9-15
- Zarrindast MR, Homayoun H, Babaie A, Etminani A, Gharib B. Involvement of adrenergic and cholinergic systems in nicotine-induced anxiogenesis in mice. *Eur J Pharmacol*, 2000, 407: p. 145-58
- Zea-Ponce Y, Kegeles LS, Guo N, Raskin L, Bakthavachalam V, Laruelle M. Pharmacokinetics and brain distribution in non human primate of R(-)[123I]DOI, A 5HT(2A/2C) serotonin agonist. *Nucl Med Biol*, 2002, 29: p. 575-83
- Zhong P, Yan Z. Chronic antidepressant treatment alters serotonergic regulation of GABA transmission in prefrontal cortical pyramidal neurons. *Neuroscience*, 2004, 129: p. 65-73

RÔLE DES SYSTÈMES NORADRÉNERGIQUE ET GABAERGIQUE DANS L'ACTIVITE DE TYPE ANXIOLYTIQUE LIEE AUX RECEPTEURS 5-HT₂ DANS LE TEST DES QUATRE PLAQUES CHEZ LA SOURIS.

Cette thèse explore, dans un premier temps, le rôle du système noradrénergique dans l'effet de type anxiolytique des antidépresseurs, inhibiteur spécifique de la recapture de sérotonine (IRSS) et inhibiteur mixte de la recapture de sérotonine et de noradrénaline (IRSN), ainsi que du DOI (un agoniste 5-HT_{2A/2C}) dans le test des quatre plaques (FPT) chez la Souris. Les récepteurs α_2 -noradrénergiques jouent le rôle de régulateur sur l'effet des IRSSs, des IRSNs et du DOI dans le FPT mais les récepteurs α_1 -noradrénergiques n'interviennent pas sur l'activité de ces molécules. L'inhibition de la synthèse de 5-HT ainsi que la lésion des neurones NA issus du locus coeruleus ne modifient pas l'activité du DOI dans le FPT. Le rôle du système GABAergique dans l'effet du DOI est aussi étudié. L'effet de type anxiolytique du DOI est inhibé par la co-administration d'antagonistes des récepteurs GABA_A et d'un agoniste des récepteurs GABA_B dans notre test comportemental. Son effet est également potentialisé par des agonistes du complexe récepteur GABA_A. Ces résultats suggèrent que la cible du DOI serait le sous type de récepteurs 5-HT_{2A} présent sur les neurones GABA. L'exposition des souris au FPT entraîne une diminution de la 5-HT et de son métabolite le 5-HIAA dans l'hippocampe. L'administration locale de DOI dans l'hippocampe entraîne un effet de type anxiolytique alors que l'administration de DOI au niveau de la PAG et de l'amygdale entraîne un effet de type anxiogène dans le FPT. Ces résultats suggèrent donc que le DOI agirait au niveau des récepteurs 5-HT_{2A} localisés dans l'hippocampe.

Mots clés : Test des quatre plaques, récepteurs 5-HT₂, GABA, noradrénaline, hippocampe, souris

ROLE OF NORADRENERGIC AND GABAERGIC SYSTEMS IN THE ANXIOLYTIC-LIKE ACTIVITY LINKED TO 5-HT₂ RECEPTORS IN THE FOUR-PLATE TEST IN MICE

On a first time, this thesis explored the role of noradrenergic system in the anxiolytic-like effect of antidepressants, selective serotonin reuptake inhibitors (SSRIs), serotonin and noradrenaline reuptake inhibitors (SNRIs) and DOI (a 5-HT_{2A/2C} agonist) in the four-plate test (FPT) in mice. The α_2 -adrenoceptors play the role of regulators on the effect of SSRIs, SNRIs and DOI in the FPT but α_1 -adrenoceptors had no effect on the activity of these molecules. The inhibition of 5-HT synthesis and lesion of locus coeruleus NA neurons did not modify the activity of DOI in the FPT. The effect of GABA system on DOI activity in the FPT is also studied. The anxiolytic-like effect is inhibited by the co-administration of GABA_A receptor antagonists and a GABA_B receptor agonist in our behavioural model. Moreover, the effect of DOI is potentiated by GABA_A complex receptor agonists. These results suggest that the target of DOI would be the 5-HT_{2A} receptor sub-type present on GABA neurons. The mice exposure to FPT involves a decrease of 5-HT and 5-HIAA in the hippocampus. The local administration of DOI in hippocampus induces an anxiolytic-like effect in FPT while the DOI injected in PAG and amygdala has an anxiogenic-like effect in the FPT. These results suggest that the DOI would act on the 5-HT_{2A} receptors localized in the hippocampus.

Keywords: Four-plate test, 5-HT₂ receptors, GABA, noradrenaline, hippocampus, mice