

UNIVERSITÉ DE NANTES
FACULTÉ DE MÉDECINE

ÉCOLE DOCTORALE • CHIMIE BIOLOGIE

Année 2006

Le test-retest dans un modèle animal d'anxiété
chez la souris : sensibilisation, discrimination
dans le test des quatre-plaques

THÈSE DE DOCTORAT

Discipline : Médecine

Spécialité : Neuropsychopharmacologie

*Présentée
et soutenue publiquement par*

Nadège RIPOLL

Le 20 décembre 2005, devant le jury ci-dessous

Président *Mme FONTAINE-PERUS Josiane, Directeur de Recherche • CNRS, Nantes*
Rapporteurs *Mme THIÉBOT Marie-Hélène, Directeur de Recherche • Unité INSERM UMR 677, Paris*
 M. SPEDDING Michael, Directeur des Sciences Expérimentales • Servier, Suresnes
Examineur *Mme BELZUNG Catherine, Professeur de Pharmacologie • Université de Tours*

Directeurs de thèse : M. BOURIN Michel, Professeur de Pharmacologie • Université de Nantes
 Mme HASCOËT-LE CLÉACH Martine, Docteur en Pharmacologie, HDR, •
 Université de Nantes

ABREVIATIONS	5
I. INTRODUCTION ET PROBLEMATIQUE.....	7
II. LES MODELES ANIMAUX DE L'ANXIETE.....	11
III. SENSIBILISATION DES MODELES ANIMAUX DE L'ANXIETE	14
A. INDICES ÉTHOLOGIQUES	14
B. TEST-RETEST	17
1. <i>Protocole de test-retest dans des modèles d'anxiété différents.....</i>	17
2. <i>Protocole de test-retest dans un même modèle d'anxiété</i>	19
2.1. Comportement exploratoire basal	19
2.2. Phénomène de « tolérance » aux benzodiazépines (« one-trial tolerance »)....	22
2.3. Dépendance et indépendance	25
2.3.1. Matériaux constituant l'EPM	25
2.3.2. Rythme circadien et conditions d'éclairage	27
2.3.3. Manipulation de l'animal	28
2.3.4. Durée du test.....	30
2.3.5. Souche	31
2.3.6. Genre	32
2.3.7. Age	33
2.4. Tolérance aux benzodiazépines : hypothèses étiologiques	34
2.4.1. Locomotion	34
2.4.2. Altération de l'état émotionnel.....	35
2.4.3. Absence de motivations conflictuelles	36
2.4.4. Altération des sites récepteurs du complexe GABA _A	37
2.5. Influence du traitement.....	38
2.6. Aires cérébrales impliquées	42
2.7. Conclusion.....	45
IV. MATERIELS ET METHODES	46
A. ANIMAUX ET SUBSTANCES UTILISÉES.....	46
1. <i>Animaux.....</i>	46
2. <i>Substances employées</i>	46
3. <i>Préparations et mode d'administration</i>	48
B. LES MODÈLES ANIMAUX.....	48
1. <i>Procédure générale.....</i>	48
2. <i>Le test d'actimétrie (Boissier et Simon, 1965).....</i>	48
3. <i>Le test de la plaque chauffante (Jacob et al., 1974)</i>	49
4. <i>Le test des quatre-plaques (Aron et al., 1971 ; Boissier et al., 1968).....</i>	49
4.1. Description	49
4.2. Procédure de test-retest	50
C. DÉPLÉTIONS	51
1. <i>Réactifs et substances utilisés</i>	51
2. <i>Protocoles expérimentaux.....</i>	51
2.1. Déplétion en noradrénaline	51
2.2. Déplétion en sérotonine.....	52
2.3. Déplétion en dopamine.....	52
D. ANALYSES STATISTIQUES	53
1. <i>Actimétrie</i>	53
2. <i>Test de la plaque chauffante.....</i>	53
3. <i>Test des quatre-plaques.....</i>	53

3.1.	Effets propres	53
3.2.	Test-retest	54
3.2.1.	Sans interaction	54
3.2.2.	Avec interaction	54
V.	RESULTATS	55
A.	ETUDE 1 : LE TEST DES QUATRE-PLAQUES, UN MODÈLE D'ANXIÉTÉ OU D'ANALGÉSIE ?	55
1.	<i>Objectif de l'étude</i>	55
2.	<i>Résultats</i>	57
2.1.	Etude 1a	57
2.2.	Etude 1b	91
2.2.1.	Effet des ligands dopaminergiques dans le test d'actimétrie	91
2.2.1.1.	Effet du sulpiride sur l'activité locomotrice spontanée des souris	91
2.2.1.2.	Effet du quinpirole sur l'activité locomotrice spontanée des souris	92
2.2.1.3.	Effet du SCH 23390 sur l'activité locomotrice spontanée des souris	93
2.2.1.4.	Effet du SKF 38393 sur l'activité locomotrice spontanée des souris	94
2.2.2.	Effet des ligands noradrénergiques et dopaminergiques dans le test de la plaque chauffante	95
2.2.2.1.	Effet du guanabenz et de la clonidine	95
2.2.2.2.	Effet du quinpirole, du sulpiride, du SCH 23390 et du SKF 38393	96
2.2.3.	Effets comportementaux des ligands dopaminergiques dans le test des quatre-plaques	98
2.2.3.1.	Effet du SKF 38393	98
2.2.3.2.	Effet du SCH 23390	99
2.2.3.3.	Effet du quinpirole	100
2.2.3.4.	Effet du sulpiride	101
2.2.4.	Comparaison des effets des ligands noradrénergiques et dopaminergiques dans le test de la plaque chauffante et le test des quatre-plaques	102
2.3.	Synthèse des résultats des études 1a et 1b	103
B.	ETUDE 2 : IMPLICATION DES RÉCEPTEURS 5-HT ₂ DANS LES EFFETS DE TYPE ANXIOLYTIQUE DES ANTIDÉPRESSEURS DANS LE TEST DES QUATRE-PLAQUES	107
1.	<i>Objectif de l'étude</i>	108
2.	<i>Synthèse des résultats</i>	121
C.	ETUDE 3 : PROTOCOLE MODIFIÉ DU TEST DES QUATRE-PLAQUES ET DISCRIMINATION ENTRE LES SUBSTANCES ANXIOLYTIQUES	123
1.	<i>Objectif de l'étude</i>	124
2.	<i>Synthèse des résultats</i>	137
D.	ETUDE 4 : IMPLICATION DES RÉCEPTEURS 5-HT _{2A} DANS L'EFFET ANXIOLYTIQUE DU DOI CHEZ DES SOURIS RÉEXPOSÉES AU TEST DES QUATRE-PLAQUES	138
1.	<i>Objectif de l'étude</i>	139
2.	<i>Synthèse des résultats</i>	149
E.	ETUDE 5 : ETUDE DES LIGANDS DES RÉCEPTEURS 5-HT _{1A}	150
1.	<i>Objectif de l'étude</i>	150
2.	<i>Résultats</i>	153
2.1.	Effets propres	153
2.1.1.	Le 8-OH-DPAT	153
2.1.2.	La buspirone	154
2.1.3.	Le WAY 100635	155
2.2.	Interactions	156
2.2.1.	Le 8-OH-DPAT et le DOI	156

2.2.2.	La buspirone et le DOI.....	157
2.2.3.	Le WAY 100635 et le DOI.....	159
3.	<i>Discussion</i>	161
F.	ETUDE 6 : INTERACTION DE LA CLONIDINE AVEC LE DOI.....	165
1.	<i>Objectifs de l'étude</i>	165
2.	<i>Résultats</i>	167
3.	<i>Discussion</i>	169
G.	ETUDE 7 : ETUDE DU SYSTÈME DOPAMINERGIQUE.....	172
1.	<i>Etude 7a : Effets propres des ligands dopaminergiques</i>	172
1.1.	Objectif de l'étude.....	172
1.2.	Résultats.....	175
1.2.1.	Test-retest dans le test des quatre-plaques.....	175
1.2.1.1.	Le sulpiride.....	175
1.2.1.2.	Le quinpirole.....	176
1.2.1.3.	Le SCH 23390.....	177
1.2.1.4.	Le SKF 38393.....	178
1.3.	Discussion.....	179
2.	<i>Etude 7b : Etude de l'interaction des ligands dopaminergiques avec le DOI</i>	183
2.1.	Objectif de l'étude.....	183
2.2.	Résultats.....	185
2.2.1.	Effets du sulpiride sur le DOI.....	185
2.2.2.	Effets du quinpirole sur le DOI.....	186
2.2.3.	Effets du SCH 23390 sur le DOI.....	188
2.2.4.	Effets du SKF 38393 sur le DOI.....	189
2.3.	Discussion.....	191
H.	ETUDE 8 : DÉPLÉTION EN NORADRÉNALINE, SÉROTONINE ET DOPAMINE.....	192
1.	<i>Objectif de l'étude</i>	192
2.	<i>Résultats</i>	194
2.1.	Déplétion en sérotonine et noradrénaline.....	194
2.2.	Déplétion en dopamine.....	195
3.	<i>Discussion</i>	198
VI.	DISCUSSION GENERALE ET CONCLUSION.....	200
VII.	REFERENCES.....	208

ABREVIATIONS

µl : microlitre

5-HT : 5-hydroxytryptamine, sérotonine

ADs : antidépresseurs

ANOVA : analyse globale de la variance

ATV : aire tegmentale ventrale

BO : bras ouverts

BF : bras fermés

BZDs : benzodiazépines

CDP : chlordiazépoxyde

CLHP : chromatographie liquide à haute performance

CPF : cortex préfrontal

DA : dopamine

DIP : plongeurs de la tête

dPAG : substance grise périaqueducule dorsale

dIPAG : substance grise périaqueducule dorso-latérale

EBF : nombre d'entrées dans les bras fermés

EBO : nombre d'entrées dans les bras ouverts

EPM : elevated plus-maze, test du labyrinthe en croix surélevé

FPT : test des quatre-plaques

GABA : acide gamma-amino butyrique

ICV : intra-cérébro-ventriculaire

IRSSs : inhibiteurs de la recapture de la sérotonine

IRSNs : inhibiteurs de la recapture de la sérotonine et de la noradrénaline

kg : kilogramme

MDZ : midazolam

mg : milligramme

NA : noradrénaline

NDR: noyau dorsal du raphé

NMR : noyau médian du raphé

PAG : substance grise périaqueducule

PTSD : stress post-traumatique

SEM : écart standard à la moyenne

SN : substance noire

SNC : système nerveux central

SAP : postures d'étirement

TBO : temps passé dans les bras ouverts

I. INTRODUCTION ET PROBLEMATIQUE

L'anxiété est une émotion normale ressentie face à une menace, qui permet d'engager une réponse comportementale appropriée pour s'y soustraire (fuite/évitement). Néanmoins, lorsque celle-ci est excessive, inadaptée et/ou persistante, elle devient alors pathologique. L'anxiété revêt diverses entités pathologiques ou troubles anxieux, tels que l'anxiété généralisée, le trouble panique, les phobies spécifiques, l'anxiété sociale, le stress post-traumatique (PTSD) et les troubles obsessionnels compulsifs, d'étiologie et de circonstance de survenue différentes (American Psychiatry Association, 2000). Il existe néanmoins une comorbidité entre ces différents syndromes. De nombreux modèles animaux de l'anxiété ont été développés, afin d'une part, d'étudier les mécanismes neuro-physiopathologiques impliqués dans l'anxiété et d'autre part, de prédire l'activité anxiolytique potentielle de molécules (Bourin, 1997). La validation de ces modèles a reposé sur la sensibilité de ces tests aux benzodiazépines (BZDs). Cependant, les effets thérapeutiques de ces molécules sont limités à certains troubles anxieux chez l'Homme, tels l'anxiété généralisée et les attaques de panique. De plus, les BZDs possèdent l'inconvénient d'entraîner des phénomènes d'abus et de dépendance. L'extension de l'utilisation des antidépresseurs (ADs) au traitement de nombreux troubles anxieux est l'une des avancées parmi les plus remarquables dans la thérapeutique en psychiatrie ces dix dernières années (Stahl, 2003 ; Vaswani *et al.*, 2003). Les antidépresseurs, tels que les inhibiteurs de la recapture de la sérotonine (IRSSs) et de la noradrénaline (IRSN) s'avèrent être des médicaments actifs dans le traitement de tous les troubles anxieux (Bourin et Baker, 1996). Deux d'entre eux, la paroxétine (Déroxat®), un IRSS et la venlafaxine (Effexor®), un IRSN, ont obtenu, en France, une autorisation de mise sur le marché : la première pour le traitement de l'anxiété généralisée, l'anxiété sociale et le trouble panique associé ou non à de l'agoraphobie et la seconde pour le traitement de l'anxiété généralisée. Chez l'Homme, ces deux spécialités sont préférées aux BZDs et sont prescrites en première intention pour ces troubles. Néanmoins, à l'heure actuelle, le mécanisme d'action des ADs n'a toujours pas été élucidé (Bourin *et al.*, 2002 ; Bourin et Lambert, 2002 ; Vaswani *et al.*, 2003). Même s'il est établi, que de par leur effet inhibiteur sur la recapture de la sérotonine (5-HT), les ADs provoquent une augmentation des concentrations en sérotonine (5-HT) activant de nombreux sous-types de récepteurs sérotoninergiques différents, l'identité

du ou des sous-types de récepteur(s) impliqué(s) dans leurs effets anxiolytiques n'a pas été déterminée. Par ailleurs, d'autres molécules ont vu le jour, telle la buspirone. Un modèle animal d'anxiété prédictif suppose donc qu'il puisse révéler l'effet de type anxiolytique, non seulement des BZDs mais également de molécules non benzodiazépiniques cliniquement efficaces (Borsini *et al.*, 2002). L'émergence de ces nouveaux traitements a conduit les comportementalistes à étudier ces molécules dans les différents modèles animaux d'anxiété. Les nombreux travaux réalisés à cet effet ont rapporté des résultats contradictoires dans la plupart des modèles, et notamment dans ceux les plus utilisés dans le domaine de la psychopharmacologie, révélant une validité prédictive médiocre pour ces « nouvelles » substances (Borsini *et al.*, 2002). Le bien-fondé de ces modèles, basés en partie sur la validité prédictive, s'est ainsi trouvé remis en question. Le challenge a donc été pour les comportementalistes de sensibiliser ces modèles. Contrairement à de nombreux modèles d'anxiété, le test des quatre-plaques (FPT), un modèle de punition, est sensible à de nombreux ADs en aigu (Hascoët *et al.*, 2000a). Par ailleurs des travaux préliminaires dans notre laboratoire ont montré que l'activation des récepteurs de sous-type 5-HT_{2A} et 5-HT_{2B} se traduisait par un effet de type anxiolytique dans le FPT (Nic Dhonnchadha *et al.*, 2003a). Cette sensibilité du FPT pour de nombreuses substances benzodiazépiniques ou non a justifié notre choix pour ce modèle. Ces différentes observations nous ont conduit tout d'abord à étudier l'effet de deux ADs de mécanisme d'action différent, la paroxétine et la venlafaxine dans le FPT, afin de confirmer nos premiers résultats. Nous nous sommes ensuite intéressés à l'implication éventuelle des récepteurs de type 5-HT₂ dans le mécanisme d'action de ces substances. Néanmoins, avant d'entreprendre ce travail, nous avons vérifié que le modèle du FPT n'était pas également un modèle de nociception, afin d'éviter des faux positifs liés à des propriétés autres qu'anxiolytiques. Pour cela nous avons comparé l'effet obtenu avec de nombreuses molécules possédant des mécanismes d'action très divers dans un modèle de nociception, le test de la plaque chauffante, à celui observé avec ces mêmes substances dans le FPT.

De nombreuses équipes de recherche ont tenté de sensibiliser les modèles animaux d'anxiété, afin d'harmoniser les résultats entre les différents laboratoires et d'améliorer la réponse des animaux aux substances anxiolytiques. Les premières modifications envisagées ont été l'incorporation d'indices éthologiques. La seconde idée a été d'imposer un stress au préalable à l'animal (procédure de test-retest). Cependant, la répétition de l'exposition de l'animal à un même modèle entraîne une modification comportementale et pharmacologique de leur réponse (File, 2001 ; Hascoët *et al.*, 1997 ; Holmes et Rodgers, 1999). Sur le plan

comportemental, la simple confrontation des rongeurs à un modèle d'anxiété produit une tolérance aux BZDs, lors d'un 2^{ème} test, similaire à celle observée lors de l'administration chronique de BZDs (File *et al.*, 1990b). Le comportement différent des souris naïves (non pré-testées) et des souris pré-testées dans l'EPM, comme dans d'autres modèles animaux d'anxiété semble donc traduire deux formes distinctes d'anxiété (File, 2001 ; Holmes et Rodgers, 1998). Le protocole de « test-retest » pourrait constituer un modèle d'étude à part entière, indépendant et spécifique, et permettre ainsi l'exploration d'une anxiété de nature différente. L'avantage économique du test-retest a également séduit les chercheurs. En effet, le nombre d'animaux nécessaire à la réalisation d'études comportementales est très élevé. Cela devient un réel problème, tant au niveau de la production que du coût, pour les équipes travaillant sur des animaux transgéniques ou KO. L'état des lieux de la littérature est décevant. Les hypothèses étiologiques avancées pour expliquer ces modifications comportementales et pharmacologiques sont hasardeuses et ne s'appuient pas sur des preuves tangibles.

Les mécanismes physiopathologiques de l'anxiété sont variés et complexes. De nombreuses régions cérébrales sont impliquées. Hormis le système GABAergique et sérotoninergique, d'autres systèmes de neurotransmission, tels que les systèmes noradrénergique et dopaminergique, jouent un rôle important dans les troubles anxieux. De plus, des interactions complexes existent entre ces différents systèmes. Malgré de nombreux progrès réalisés dans le domaine des neurosciences, aucune thérapie révolutionnaire a émergé en Psychiatrie ces dix dernières années (Spedding *et al.*, 2005). L'utilisation d'anciennes molécules a bloqué la recherche de nouvelles molécules. La biologie moléculaire a permis d'apporter certaines précisions sur les mécanismes neuronaux sous-tendant les troubles anxieux (Holmes, 2001). « Les modèles génétiques [animaux KO (Knockout) dont un gène est déficient et animaux transgéniques] constituent un outil de criblage de molécules, mais également de contrôle de la qualité des hypothèses faites à priori sur la signification des phénomènes physiopathologiques observés » (Bourin, 1995). Il est évident que des mutations d'un gène spécifique entraînant un gain ou une perte de fonctions s'expriment par des altérations du comportement relatif à l'anxiété et peuvent avoir une implication directe dans la découverte de nouvelles thérapies pour les troubles anxieux (Rodgers *et al.*, 2002). Néanmoins, le comportement de ces animaux dépend de paramètres environnementaux et expérimentaux. De plus, des phénomènes de compensation liés à la plasticité cérébrale ont été observés chez ces animaux et biaisent l'interprétation du comportementaliste. De plus, il existe certaines difficultés d'interprétation imputables au fond génétique hétérogène des

animaux mutants (Holmes, 2001). En revanche, les procédures de test-retest dans un même modèle pourraient constituer un outil pour mettre en évidence des altérations génétiques dans deux types d'anxiété (File, 2001).

Notre problématique est donc à l'aide du modèle des quatre-plaques, d'évaluer si une procédure de test-retest est capable de mettre en évidence des différences d'activité entre les substances, rapportées anxiolytiques chez des souris (de souche Swiss) naïves, et comprendre les mécanismes impliqués dans la modification comportementale et pharmacologique observée chez les animaux soumis au protocole de « test-retest » dans le FPT.

La première partie de ce travail a donc consisté à étudier la fonction des récepteurs aux BZDs et ce, afin de confirmer la perte d'efficacité des BZDs lors d'un re-test, d'étudier le phénomène d'acquisition ou d'apprentissage lors du « test-retest » et la modification éventuelle des récepteurs aux BZDs induite par une première session. Nous avons ensuite étudié l'implication de la mémoire dans le protocole « test-retest ». Puis, nous nous sommes intéressés aux effets de molécules non-BZDs possédant des propriétés anxiolytiques. Nous avons ensuite évalué la participation du système noradrénergique, sérotoninergique et dopaminergique dans le modèle d'étude du « test-retest ». Enfin, nous nous sommes intéressés à l'influence d'une déplétion en 5-HT, ainsi que celle d'une lésion des systèmes noradrénergique et dopaminergique sur le comportement des souris lors d'un « test-retest » dans le FPT.

II. LES MODELES ANIMAUX DE L'ANXIETE

Les modèles animaux ont été développés dans une espèce dans le but d'étudier un ou des symptôme(s) existant chez une autre espèce (McKinney, 1984). Un modèle animal peut être considéré comme une simulation expérimentale dans laquelle un système simple modélise un système plus complexe et représente ainsi un outil d'exploration et de compréhension. Le bien-fondé de ces modèles repose sur des bases phylogéniques communes partagées par les comportements humains et animaux. Cette modélisation des symptômes et des comportements humains par les modèles animaux implique donc une démarche anthropomorphique. Néanmoins, dans le domaine de la psychiatrie, les modèles animaux de l'anxiété représentent un outil précieux pour la recherche pré-clinique et permettent une meilleure compréhension des mécanismes physiopathologiques impliqués dans les troubles anxieux.

Un modèle animal idéal doit refléter la pathologie humaine, être prédictif et explicatif, c'est-à-dire posséder (Willner, 1984) :

- une "validité créative" (« Face validity ») : elle implique que le modèle est capable d'induire un comportement chez l'animal similaire à l'état psychopathologique retrouvé chez l'Homme,
- une "validité prédictive" (« Predictive validity ») : elle implique que le modèle est sensible aux seules substances utilisées dans la thérapie des symptômes humains,
- une "validité théorique" (« Construct validity ») : elle implique que les modèles animaux reflètent les mécanismes neurochimiques sous-jacents de la pathologie humaine.

Néanmoins, les modèles animaux sont basés sur un compromis réductionniste. En effet, aucun test ne possède à la fois un fort potentiel prédictif et explicatif.

Trois grands groupes de modèles co-existent :

- les modèles homologues (validité théorique), dans lesquels « l'identité de causalité avec la pathologie est visée »
- modèles isomorphes (validité créative) qui traduisent une symptomatologie similaire à celle retrouvée chez l'Homme,

- les modèles prédictifs ou corrélationnistes (validité prédictive) qui permettent de « repérer et de caractériser l'activité d'un groupe de substances sur une affection donnée ».

Toutefois, la classification dans l'un ou l'autre type de modèle n'est pas si simple. La plupart des modèles animaux de l'anxiété permettent d'une part, l'étude des mécanismes physiopathologiques et d'autre part la prédiction des réponses pharmacologiques de molécules (Vermetten et Bremner, 2002). En revanche, les modèles homologues (validité créative) sont relativement utopiques puisque les connaissances actuelles sur les facteurs étiologiques des maladies mentales sont relativement limitées (Porsolt, 1989).

Les différents modèles animaux d'anxiété se répartissent en 2 groupes : les modèles « d'anxiété trait », modélisant un état d'anxiété à long terme et persistante, innée ou non, tels que les modèles génétiques (souris transgéniques, knock-out), les modèles basés sur une exposition chronique à des stimuli induisant la peur et les modèles utilisant des souches de rongeurs présentant un niveau d'anxiété élevé ou faible. Le 2^{ème} groupe représente les modèles « d'anxiété état » modélisant un état d'anxiété aiguë (Table 1). Ce type d'anxiété survient en réponse à un stress et dépend de la façon dont le stress est perçu par l'animal (Belzung et Griebel, 2001). Ce groupe comprend les modèles de peur conditionnée (apprise, événements stressants et douloureux) et les modèles de peur non conditionnée basés sur des stress éthologiques. Ces derniers impliquent des réactions spontanées ou naturelles de l'animal, telles que la fuite et l'évitement, en réponse à des stimuli stressants (Table 1).

Réponse conditionnée	Réponse non conditionnée
Test de Geller-Seifter Test de conflit de Vogel Le test des quatre-plaques Réponse émotionnelle conditionnée Test de l'aversion de la tâche conditionnée Test de peur potentialisée (conditionnée) par un stimulus auditif Test d'évitement passif/actif	Le test du labyrinthe en croix surélevé Le test de la double enceinte éclairée/sombre Le test d'interaction sociale Le test du champ ouvert Test de vocalisation ultrasonique Batterie de tests peur/anxiété Test de l'escalier Test de la planche à trous Test de confrontation à un prédateur Le test de l'enfouissement défensif

Table 1 : Classification des principaux modèles animaux de l'anxiété

L'anxiété est un syndrome complexe impliquant certainement divers systèmes de neurotransmission. Même si les modèles animaux de l'anxiété sont incapables de modéliser tous les aspects de la symptomatologie anxieuse humaine, ils restent néanmoins des outils d'étude indispensables.

Une des avancées majeures de ces dix dernières années en psychiatrie est certainement l'extension de l'utilisation des ADs dans les troubles anxieux. Néanmoins, la validation des modèles animaux d'anxiété a été basée sur la sensibilité de ces tests aux BZDs. De nombreux travaux ont donc étudié l'effet des ADs dans les modèles animaux de l'anxiété. Les résultats de ces travaux sont contradictoires, rapportant des effets anxiolytiques, anxiogènes ou bien aucun effet selon les études (Borsini *et al.*, 2002). Il ressort de ces études que les modèles les plus utilisés en recherche pré-clinique, tels que le test du labyrinthe en croix surélevé (« elevated plus-maze », EPM) et le test de la double enceinte éclairée/sombre, possèdent une mauvaise validité prédictive (Borsini *et al.*, 2002). Un des objectifs majeurs pour de nombreuses équipes est donc de sensibiliser ces modèles animaux.

Dans ce travail, notre choix s'est porté sur le test des quatre-plaques (FPT) (Aron *et al.*, 1971 ; Boissier *et al.*, 1968). Ce modèle de punition est basé sur la suppression du comportement exploratoire (inné) de la Souris par l'administration d'un choc électrique plantaire de faible intensité. Même si le FPT reste très peu employé par les laboratoires, il est de plus en plus utilisé, pour la détection de l'effet anxiolytique potentiel de nouveaux médicaments (Griebel *et al.*, 2002 ; Tatarczynska *et al.*, 2001 ; Wesolowska *et al.*, 2003). Ce modèle présente l'avantage d'être un test simple et rapide, permettant la détection de molécules anxiolytiques et anxiogènes. Contrairement à de nombreux modèles d'anxiété, le FPT possède une très bonne validité prédictive pour les molécules benzodiazépiniques ou non (Bourin *et al.*, 1992 ; Hascoët et Bourin, 1997 ; Hascoët *et al.*, 2000a ; Hascoët *et al.*, 1997 ; Hascoët *et al.*, 2000b ; Masse *et al.*, 2005 ; Nic Dhonnchadha *et al.*, 2003a). De plus, ce modèle semble moins sensible aux facteurs environnementaux. L'inconvénient du FPT est probablement le principe même du test, c'est à dire l'administration d'un choc électrique. Théoriquement, le choc n'est pas douloureux mais désagréable. Néanmoins, un doute peut subsister concernant l'effet obtenu après l'administration d'une substance anxiolytique dans le FPT. A savoir cet effet ne serait-il pas dû à une altération de la sensibilité à la douleur ? Avant d'entreprendre toute étude dans le FPT, nous avons donc décidé de réévaluer ce modèle en étudiant parallèlement l'effet de diverses molécules dans le FPT et dans le modèle de la plaque chauffante, un modèle de nociception.

III.SENSIBILISATION DES MODELES ANIMAUX DE L'ANXIETE

La validité prédictive des modèles animaux d'anxiété les plus employés en recherche pré-clinique, tels que l'EPM et le test de la double enceinte éclairée/sombre, semble relativement limitée aux BZDs (Borsini *et al.*, 2002). En effet, en ce qui concerne la sensibilité de ces modèles aux molécules anxiolytiques non benzodiazépiniques, tels que les ADs ou les ligands des récepteurs 5-HT_{1A}, les résultats rapportés par les différents laboratoires sont contradictoires et révèlent une mauvaise validité prédictive (Borsini *et al.*, 2002). Afin d'harmoniser les résultats entre les laboratoires et d'améliorer la réponse des animaux aux différentes substances anxiolytiques, de nombreuses équipes ont essayé de sensibiliser les modèles animaux d'anxiété. Les premières modifications envisagées ont été d'incorporer des indices éthologiques. La seconde idée a été d'imposer au préalable un stress à l'animal (procédure de test-retest).

A. Indices éthologiques

De nombreux auteurs suggèrent que la sensibilité et la validité des modèles animaux, notamment celles de l'EPM peuvent être améliorées en étudiant en détail les différents aspects du comportement des rongeurs (Falter *et al.*, 1992 ; Moser, 1989 ; Rodgers et Johnson, 1995). L'EPM est un modèle éthologique d'anxiété. Il est constitué de deux bras ouverts (BO) et de deux bras munis de murs (bras fermés, BF), reliés par une plateforme. Le labyrinthe est surélevé par rapport au sol (26 cm). Ce test est basé sur l'aversion naturelle des rongeurs pour les espaces ouverts et élevés (Treit *et al.*, 1993a). Les composantes classiques du comportement, permettant d'évaluer l'effet anxiolytique potentiel d'une substance, sont le nombre d'entrées dans les BO (EBO), le temps passé dans les BO (TBO) et le pourcentage d'entrées dans les BO par rapport au nombre d'entrées totales [dans les BO et dans les BF] (Cruz *et al.*, 1994 ; Handley et Mithani, 1984 ; Lee et Rodgers, 1990 ; Lister, 1987 ; Moser, 1989 ; Pellow *et al.*, 1985 ; Rodgers et Johnson, 1995). L'activité locomotrice spontanée serait révélée par le nombre d'entrées totales et/ou par le nombre d'entrées dans les BF (EBF)

(Cruz *et al.*, 1994 ; Lister, 1987). L'observation du comportement des rongeurs dans l'EPM a permis de révéler d'autres éléments comportementaux et posturaux spécifiques d'un comportement d'évaluation du risque et de défense (Augustsson et Meyerson, 2004). Ces éléments, qualifiés de variables éthologiques, regroupent entre autres les postures d'étirement (SAP) protégées (qui ont lieu sur les BF et/ou sur la plateforme centrale) et non protégées (qui ont lieu dans les BO), les plonges de la tête (DIP) protégés et non protégés, le toilettage, les reniflements, et les retours dans les BF. Les SAP non protégés, qui sont des mouvements d'élongation se faisant des BO vers les sections sécurisées de l'EPM avant d'entrer dans celles-ci. Les SAP, considérés comme un indice d'évaluation du risque, fournissent des informations confirmant, identifiant et localisant un danger (Blanchard et Blanchard, 1989 ; Kaesermann, 1986 ; Molewijk *et al.*, 1995). Les retours dans les BF, sous-entendu lorsque l'animal s'apprête à quitter les BF, représentent un indice d'anxiété (Rodgers et Cole, 1994 ; Rodgers et Johnson, 1995). Les DIP non protégés sont considérés comme un indice relatif à un état non anxieux (Cruz *et al.*, 1994 ; Pellow *et al.*, 1985). Le toilettage est un indice traduisant un « déplacement d'activité » (Espejo, 1997a). En effet l'animal s'affaire à son toilettage au lieu d'explorer le modèle. Le comportement anxieux de l'animal revêt donc différentes facettes. L'intégration des indices éthologiques aux variables classiques permet une meilleure caractérisation de la complexité du comportement anxieux des rongeurs (Rodgers et Cole, 1994).

Les indices classiques et éthologiques ont fait l'objet d'analyses factorielles (Espejo, 1997a ; Rodgers et Johnson, 1995 ; Wall et Messier, 2000a). L'analyse factorielle permet de paramétrer le comportement de l'animal sous forme de facteurs : tel que le facteur « anxiété » et le facteur « activité locomotrice ». Ces techniques ont été utilisées d'une part, afin d'identifier le facteur auquel se rapporte tel ou tel indice, éthologique ou classique, mesuré lors de l'expérimentation, et d'autre part pour évaluer si différents modèles animaux mesurent les mêmes types d'anxiété (Fernandes et File, 1996 ; Lister, 1987 ; Trullas et Skolnick, 1993). Plusieurs schémas de modélisation ont été rapportés. En effet des modèles à 2 (facteurs 1 et 2) (Fernandes et File, 1996 ; Lister, 1987 ; Rodgers et Johnson, 1995 ; Wall et Messier, 2000a), 3 (facteurs 1, 2 et 3) (File, 1993 ; Rodgers et Johnson, 1995 ; Trullas et Skolnick, 1993), 4 (facteur 1, 2, 3 et 4) (Cruz *et al.*, 1994 ; Espejo, 1997a ; Fernandes et File, 1996) et 6 (facteur 1, 2, 3 et 4) (Holmes et Rodgers, 1998 ; Rodgers et Johnson, 1995) ; composantes distinctes ont été décrits dans la littérature. D'une manière générale, le facteur 1 représente le facteur « anxiété » et inclut selon les études les entrées dans les BO, le temps passé dans les BO, le ratio des entrées dans les BO par rapport aux entrées totales, le nombre d'entrées totales, le

ratio du temps passé dans les BO par rapport au temps total passé dans les bras, les SAP protégés et les DIP protégés ou non. Le facteur 2 représente l'activité locomotrice des rongeurs et comprend selon les études les entrées dans les BF, le nombre total des entrées, les reniflements et les redressements. Dans les représentations plus complexes à 3, 4 et 6 composantes, certains indices comportementaux, inclus dans le facteur 1 et/ou 2 dans les modèles à 2 composantes, sont reliés à des facteurs distincts du facteur « anxiété » et « activité locomotrice ». Les modèles comportant plus de 2 ou 3 composantes sont relativement instables (Wall et Messier, 2000a). Par ailleurs, dans les différentes représentations factorielles, certains indices ne se rapportent pas à 1 seul facteur mais peuvent être corrélés à différents facteurs. Par exemple, dans le modèle à 2 composantes de Rodgers et Johnson (1995) chez des souris DBA/2, les entrées dans les BO sont reliées aux facteurs 1 et 2. De plus, les analyses factorielles descriptives ont révélé des différences entre les souches. Par exemple, dans la représentation à 6 composantes de Rodgers, les SAP sont reliées au facteur 2 (« activité locomotrice ») pour les souris de la souche Swiss-Webster (Holmes et Rodgers, 1998), alors qu'elles sont corrélées à un autre facteur appelé facteur « d'évaluation du risque » pour la souche de souris DBA/2 (Rodgers et Johnson, 1995).

Différentes études pharmacologiques réalisées pour la plupart dans l'EPM ont montré que la prise en compte de ces indices éthologiques permettait d'augmenter la sensibilité de ce modèle aux substances anxiogènes et aux molécules anxiolytiques, et notamment celles possédant un mécanisme d'action distinct de celui des BZDs (Cole et Rodgers, 1993 ; Cruz *et al.*, 1994 ; Rodgers *et al.*, 1997a). Par exemple, l'effet anxiolytique des ligands des récepteurs 5-HT_{1A}, non décelé avec la méthode d'évaluation conventionnelle, a pu être mis en évidence dans l'EPM grâce à l'analyse des indices éthologiques (Rodgers *et al.*, 1997a). De plus, l'analyse des indices éthologiques et conventionnels permet une discrimination entre des molécules d'une même classe et entre des substances de classes pharmacologiques différentes (Belzung et Griebel, 2001). Par exemple, Cole et Rodgers (1993) ont montré que la prise en compte des facteurs éthologiques permettait une discrimination entre le chlordiazépoxyde (CDP) et le brétazénil, un agoniste partiel des récepteurs aux BZD.

B. Test-retest

L'exposition d'un animal à un stimulus stressant (expérimental ou environnemental) augmente les réactions de peur lorsque ces animaux sont ensuite confrontés à un modèle d'anxiété. Il a été suggéré que le taux basal d'anxiété d'un animal influence la capacité d'une molécule anxiolytique à faciliter l'activité d'exploration. De nombreuses équipes ont donc eu l'idée de sensibiliser les modèles d'anxiété en soumettant au préalable les animaux à un stress (procédures de test-retest) en pensant augmenter parallèlement, l'anxiété de l'animal et la réponse aux diverses molécules anxiolytiques (File, 1990a). L'examen de la littérature distingue deux protocoles de « test-retest » : ceux réalisés en utilisant deux modèles différents et ceux employant le même modèle.

1. Protocole de test-retest dans des modèles d'anxiété différents

L'examen de la littérature rapporte une multitude de protocoles expérimentaux différents variant notamment sur la nature du stress imposé à l'animal avant de le confronter à un modèle d'anxiété (modèles d'anxiété, d'activité locomotrice et de dépression) (Nico *et al.*, 2005). Les résultats qui en ressortent sont variés. Les modèles animaux d'anxiété les plus étudiés ont concerné ceux basés sur l'exploration, tels que l'EPM et le test de la double enceinte éclairée. Dans l'EPM, de nombreux travaux ont montré que l'exposition préalable à un stimulus stressant entraînait une diminution du comportement exploratoire des rongeurs dans ce modèle par rapport aux rongeurs non stressés au préalable. Cette sensibilisation de l'anxiété a été observée avec des stimuli de nature très différente, tels qu'un isolement (Strauss *et al.*, 2003), une période de contrainte (Calvo *et al.*, 1998 ; Martijena *et al.*, 1997), l'exposition à un environnement inconnu (Andreatini *et al.*, 2001), la stimulation électrique du colliculus inférieur (Pandossio *et al.*, 2000) et la confrontation à un prédateur ou à son odeur (Adamec *et al.*, 2005). Des résultats similaires ont été observés dans d'autres modèles tels que le test de la double enceinte éclairée et le test d'interactions sociales (Adamec *et al.*, 2005 ; Hebb *et al.*, 2004 ; Rodgers et Shepherd, 1993). Hebb *et al.* (2004) ont montré par exemple que des souris (CD-1) exposées à l'odeur d'un prédateur (TMT : 2,5-dihydro-2,4,5-triméthyléthiazoline) présentaient une augmentation du « freezing » et passaient moins de temps dans le compartiment éclairé du test de la double enceinte par rapport aux souris

témoins, traduisant ainsi une accentuation du comportement anxieux. Une première expérience de stress semble donc sensibiliser les mécanismes de défense en réponse à de nouveaux stimuli aversifs. Cette sensibilisation de l'animal, précédemment exposé à un stress a été documenté par des variables hormonales, neurochimiques et immunologiques (Antelman *et al.*, 1990 ; Irwin *et al.*, 1986). Toutefois, la sensibilisation du comportement anxieux des animaux n'a pas été observée par tous les auteurs. Lister (1987) a montré par exemple que l'exposition au préalable de souris (NIH Swiss) à un openfield (champ ouvert) augmentait leur comportement exploratoire dans l'EPM. De plus, une autre étude a observé que l'exposition au préalable de souris (DBA/2) à une nouvelle cage ou à un congénère non agressif ne modifiait pas leur comportement dans l'EPM (Rodgers et Cole, 1993a).

Par ailleurs, l'influence d'un stress, imposé au préalable, sur le comportement des rongeurs dans l'EPM semble varier selon la souche. En effet, Rodgers et Cole (1993b) ont montré que les souris de la souche DBA/2 ayant été confrontées au préalable au test du champ ouvert étaient plus anxieuses que leurs congénères non stressées dans l'EPM, alors que dans les mêmes conditions expérimentales, le comportement anxieux des souris de la souche T1 ou Swiss-NIH était atténué.

Concernant la sensibilisation de la réponse des animaux aux effets des substances anxiolytiques, les résultats sont relativement variés. Rodgers et Shepherd (1993) ont montré par exemple qu'une exposition à l'EPM entraînait une perte de l'effet de type anxiolytique du diazépam (injecté quotidiennement pendant 8 jours, aux doses de 2 et 4 mg/kg) chez des souris DBA/2 soumises au test de la double enceinte éclairée. Néanmoins, même si les auteurs observent une diminution du temps passé par les souris témoins (qui ont reçu le véhicule) dans le compartiment illuminé, inhérente à l'exposition dans l'EPM, ils ne mettent pas en évidence d'altération du nombre total de transitions et de redressements, suggérant qu'un pré-test dans l'EPM réduit l'anxiété des animaux dans le test de la double enceinte éclairée, masquant ainsi l'activité du diazépam. Par contre, Sanchez (1997) a montré qu'un stress appliqué juste avant le test de la double enceinte éclairée augmentait la sensibilité de la réponse aux molécules anxiolytiques, et donc la robustesse du modèle. Néanmoins la nature même du stress précédant le test est un élément critique dans la réponse. En effet, soumettre les souris au test de la suspension caudale, supprime l'exploration des compartiments du modèle de la double enceinte éclairée et potentialise l'effet anxiolytique du diazépam et de l'eltoprazine. De même, Sanchez (1997) observe une suppression de l'activité comportementale générale lorsque les souris ont été précédemment confrontées au test de la

nage forcée. Toutefois, le diazépam augmente de façon significative le comportement exploratoire dans les deux compartiments. De plus, l'administration de chocs sur la queue de l'animal avant le test réduit l'exploration du compartiment sombre mais n'affecte pas celle du compartiment éclairé. Sanchez (1997) a également observé que des stress chroniques (élevage en surpopulation) entraînaient une élévation des redressements et des déplacements horizontaux dans le compartiment éclairé traduisant une réponse de type anxiolytique chez des souris témoins. Des stress de nature différente semblent donc affecter le comportement exploratoire et la réponse pharmacologique différemment, sensibilisant l'activité des substances anxiolytiques dans certains cas et la masquant dans d'autres cas (Rodgers et Shepherd, 1993 ; Sanchez et Meier, 1997).

Les résultats rapportés par les différentes études relatives au « test-retest » dans des modèles animaux différents sont variés et difficiles à interpréter. Les procédures expérimentales influencent la réponse de l'animal. Etant donné la multitude des protocoles expérimentaux les différentes données sont difficilement comparables entre elles.

2. Protocole de test-retest dans un même modèle d'anxiété

2.1. Comportement exploratoire basal

La grande majorité des études ont mis en évidence une élévation des indices comportementaux de l'anxiété chez les rongeurs réexposés à un modèle d'anxiété. Ce comportement anxieux a été rapporté aussi bien chez le Rat et la Souris dans divers modèles d'anxiété, tels que l'EPM (Almeida *et al.*, 1993 ; Calzavara *et al.*, 2005 ; Dal-Col *et al.*, 2003 ; Fernandes et File, 1996 ; Gonzalez et File, 1997 ; Lee et Rodgers, 1990 ; Rodgers *et al.*, 1997b ; Rodgers *et al.*, 1996 ; Rodgers *et al.*, 1992 ; Rodgers et Shepherd, 1993 ; Treit *et al.*, 1993a), le test des quatre-plaques (FPT) (Hascoët *et al.*, 1997), le test « elevated zero-maze » chez la souris (Cook *et al.*, 2002) et le test de l'exposition à un prédateur (McGregor et Dielenberg, 1999). L'augmentation de l'anxiété a été observée pour un intervalle de temps, séparant les sessions de test, allant de 24h à 2 semaines dans l'EPM (File *et al.*, 1990b) et de 24h à 42 jours dans le FPT (Hascoët *et al.*, 1997). Quelques travaux réalisés dans l'EPM (File, 1990b ; File *et al.*, 1990b ; Lister, 1987 ; Pellow *et al.*, 1985) et dans le test de la double

enceinte éclairée (Artaiz *et al.*, 1998 ; Holmes *et al.*, 2001) rapportent néanmoins un comportement exploratoire basal stable entre deux sessions de test.

Le comportement des rongeurs lors de plusieurs sessions de test dans l'EPM a fait l'objet d'études approfondies (Espejo, 1997a ; Holmes et Rodgers, 1998). Lors d'un premier test dans l'EPM, le comportement exploratoire du Rat (Rosa *et al.*, 2000) et de la Souris (Holmes et Rodgers, 1998 ; Rodgers *et al.*, 1996) se caractérise par une aversion progressive pour les BO et une préférence pour les BF, indiquant que le comportement à la fin du test est différent de celui du début du test. L'aversion pour les BO est attribuée à la capacité de ces bras à induire un comportement de peur (Pellow *et al.*, 1985) et est liée à l'incapacité de l'animal à engager un comportement « thigmotaxic » dans les espaces ouverts (Cardenas *et al.*, 2001 ; Treit *et al.*, 1993a). L'analyse minute par minute du comportement des rongeurs dans l'EPM a révélé l'existence d'une nette modification du comportement temps-dépendant lors du 1^{er} test (Holmes et Rodgers, 1998 ; Rodgers *et al.*, 1996). Lors de la première minute de test, les animaux ne semblent pas faire de distinction entre les bras ouverts et les bras fermés, le temps passé et le nombre d'entrées dans les bras ouverts et fermés étant similaires (Holmes et Rodgers, 1998 ; Rodgers *et al.*, 1996). Lors de cette première minute d'exploration, les animaux passent la plus grande partie de leur temps (60% environ) sur la plateforme centrale et présentent entre autres un taux élevé de plongeon de la tête, de SAP, de reniflements et d'explorations réalisées avec le corps entier (Holmes et Rodgers, 1998). Au cours de la seconde minute de test, le temps passé par les rongeurs sur la plateforme centrale diminue, alors que le temps passé dans les BF augmente. Ces modifications du comportement exploratoire s'accompagnent entre autres d'une augmentation du nombre d'entrées dans les BF et des redressements, d'une légère augmentation des entrées dans les BO et du pourcentage de SAP protégés ainsi que d'une diminution du pourcentage d'entrées dans les BO, des plongeon de la tête, des SAP et des reniflements (Holmes et Rodgers, 1998). Néanmoins, Dal-Col *et al.* (2003) révèle que le pourcentage de temps passé dans les BO décroît significativement chez les souris, seulement à partir de la troisième minute de test.

A partir de la troisième minute et ce jusqu'à la fin du test (5 minutes), le comportement des animaux se caractérise par une diminution des entrées dans les BO, du pourcentage d'entrées dans les BO et du temps passé dans les BO traduisant une aversion substantielle pour les bras ouverts (Rodgers *et al.*, 1996). En revanche, les entrées dans les BF restent élevées. Le temps passé dans les bras fermés et les redressements augmentent alors que le temps passé sur la plateforme centrale, les plongeon de la tête et les SAP diminuent. Le pourcentage de SAP

protégés est le seul index qui présente un profil bi-phasique lors de la première exploration de l'EPM. En effet, il augmente entre la 2^{ème} et la 3^{ème} minute de test et diminue entre la 4^{ème} et 5^{ème} minute (Holmes et Rodgers, 1998).

Le comportement observé lors de la dernière minute du premier test est maintenu, voire accentué lors des tests ultérieurs (Holmes et Rodgers, 1998). L'analyse descriptive des indices comportementaux de l'anxiété, classiques et éthologiques, révèle une diminution progressive du pourcentage de temps passé dans la plateforme centrale, du nombre d'entrées et du pourcentage d'entrées dans les BO, ainsi que des SAP et des DIP non protégés au fur et à mesure des tests et indépendamment de l'intervalle entre les tests, quotidien (Espejo, 1997a ; Holmes et Rodgers, 1998) ou hebdomadaire (Espejo, 1997a). Parallèlement le nombre de retours dans les BF, le pourcentage de temps passé dans les BF et le pourcentage de DIP protégés étaient augmentés (Espejo, 1997a ; Holmes et Rodgers, 1998). Quelques différences émergent de ces études d'analyse du comportement lors de plusieurs sessions de tests. Par exemple, dans l'étude d'Espejo (1997a), le pourcentage de temps passé dans les BO est resté inchangé lorsque les tests sont quotidiens et diminué lorsqu'ils sont hebdomadaires. En revanche, Holmes et Rodgers (1998) ont observé une diminution du pourcentage de temps passé dans les BO chez des souris (Swiss-Webster) soumises, 24 heures auparavant, à l'EPM. De plus cet indice est resté stable entre le deuxième et le troisième test. Globalement, ces études révèlent une modification du comportement exploratoire des rongeurs entre un premier test dans l'EPM et les autres. Etant donné que certains facteurs restent stables ou bien augmentent dans l'EPM lors d'un re-test, la modification comportementale ne peut pas être simplement attribuée à une suppression générale du comportement (Fernandes et File, 1996). L'expérience de l'EPM semble plutôt entraîner une modification qualitative de la réponse émotionnelle, se traduisant par une augmentation de l'anxiété.

Il a été suggéré que l'anxiété observée dans un premier test et celle observée dans un second test puissent être de nature différente. La peur des espaces ouverts constitue probablement le facteur aversif du premier test (Treit *et al.*, 1993a). Lors d'un second test, les rongeurs présenteraient plutôt une aversion pour les BO surélevés (File, 1993). Cette hypothèse est étayée par des études analytiques factorielles qui ont montré chez le Rat (File, 1993 ; File et Zangrossi, 1993) et la Souris (Holmes et Rodgers, 1998) que les indices comportementaux de l'anxiété sont représentés par des facteurs distincts dans les deux tests. Lorsque trois expérimentations sont réalisées, les indices comportementaux de l'anxiété, mesurés dans le 2^{ème} et le 3^{ème} test sont représentés par le même facteur (Fernandes et File, 1996). Toutefois, l'analyse de Wall et Messier (2000) ne soutient pas l'idée d'une anxiété de nature différente

dans les deux sessions de test dans l'EPM, mais tend plutôt à montrer que l'état émotionnel est plus prononcé lors d'une seconde expérimentation.

2.2. Phénomène de « tolérance » aux benzodiazépines (« one-trial tolerance »)

Contrairement à ce qui était attendu, à savoir sensibiliser les modèles animaux d'anxiété en réalisant deux ou plusieurs sessions de tests, de nombreux travaux ont montré que la répétition de l'exposition de l'animal au modèle entraîne une modification comportementale et l'atténuation ou la perte de l'effet de type anxiolytique des BZDs lors du retest (Calzavara *et al.*, 2005 ; File, 1990b ; File et Zangrossi, 1993 ; Hascoët *et al.*, 1997 ; Holmes et Rodgers, 1999 ; Lister, 1987 ; Rodgers *et al.*, 1992 ; Rodgers et Shepherd, 1993). Sur le plan comportemental, une simple réexposition de rongeurs non traités à un même modèle d'anxiété, produit une tolérance similaire à celle observée lors de l'administration chronique de BZDs apparaissant normalement après trois semaines de traitement (File *et al.*, 1990b). Cette similitude comportementale observée pour la première fois dans l'EPM a tout naturellement conduit File (1990) à appeler la perte d'effet anxiolytique après une première expérience de l'EPM sous le terme de « one-trial tolérance » ou tolérance liée à la première expérience du test. L'atténuation, voire l'abolition de l'effet des BZDs a été rapportée chez le Rat et la Souris en réponse à différentes BZDs, tels que le chlordiazépoxyde, le midazolam et le diazépam, dans divers modèles animaux d'anxiété, tels que l'EPM (Cabib et Castellano, 1997 ; Cruz-Morales *et al.*, 2002 ; Dal-Col *et al.*, 2003 ; Escarabajal *et al.*, 2003 ; Frussa-Filho et Ribeiro Rde, 2002 ; Holmes et Rodgers, 1999 ; Rodgers *et al.*, 1992), le test de la double enceinte illuminée/sombre (Holmes *et al.*, 2001), le test des quatre-plaques (Hascoët *et al.*, 1997).

Néanmoins, quelques rares études rapportent des résultats contradictoires. En effet, Blumstein et Crawley (1983) ont montré que le diazépam conservait sa capacité à augmenter le nombre de transitions entre les enceintes illuminée et sombre lorsque les souris étaient soumises à des tests successifs. Ces observations contrastent avec la perte d'effet de type anxiolytique du CDP (10 mg/kg) observée par Holmes et Rodgers (2001) chez des souris utilisées une seconde fois dans le test de la double enceinte illuminée/sombre. Ces résultats contradictoires peuvent s'expliquer par l'utilisation de souches (C57BL/6J *versus* Swiss-Webster) et de

protocoles différents (injection du diazépam avant chaque test *versus* injection du CDP avant le retest seulement). De plus, dans l'étude d'Holmes et Rodgers (2001), le CDP n'a pas modifié le nombre de transitions entre les deux compartiments. Une autre étude a révélé que le diazépam entraînait, chez des souris (Swiss) réexposées, une augmentation significative du temps passé dans le compartiment illuminé (Artaiz *et al.*, 1998). Ces travaux ont toutefois rapporté une diminution de l'ordre de 50% de l'exploration du compartiment illuminé entre les tests.

Certains modèles d'anxiété dits « de peur conditionnée » sont basés sur la répétition de l'exposition de rongeurs au modèle et ont été validés du fait de leur sensibilité aux BZDs. Par exemple, dans les modèles de conflit, comme le test de Geller-Seifter, les BZDs conservent leur effet anxiolytique chez les animaux exposés de façon répétée au test (Geller, 1964). Dans le test de privation d'eau de Vogel, les BZDs exercent leur effet anxiolytique lors de 2 tests successifs (File et Zangrossi, 1993). A l'exception du FPT (Hascoët *et al.*, 1997), l'effet de tolérance aux BZDs survenant lors d'expérimentations répétées, ne concerne donc pas les modèles de peur conditionnée.

File (1993) a suggéré que les mécanismes sous-tendant l'effet de tolérance aux BZDs lié à l'expérimentation puissent être distincts de ceux à l'origine de la tolérance survenant au cours d'un traitement chronique par les BZDs. En effet, lors d'un traitement chronique, les indices de l'anxiété augmentent chez les rongeurs tolérants aux effets de type anxiolytique des BZDs lorsqu'ils sont expérimentés dans l'EPM 24h après le sevrage (File *et al.*, 1987). Au contraire, File *et al.* (1990) n'a pas observé de réponse anxiogène « de type sevrage » chez les rats tolérants au CDP expérimentés une seconde fois.

Divers travaux réalisés exclusivement dans l'EPM ont essayé de caractériser le phénomène de tolérance aux BZDs lors d'un retest. Les études divergent lorsqu'il s'agit de déterminer le facteur crucial, intervenant lors du premier test, à l'origine de la perte d'efficacité des BZDs lors de la réexposition des rongeurs à l'EPM. Pour certains auteurs, l'expérience des bras ouverts lors d'un premier test, induit la perte d'effet de type anxiolytique des BZDs lors d'un retest. Différentes observations renforcent cette hypothèse. Tout d'abord, Pellow *et al.* (1985) ont montré que le confinement dans un bras ouvert était plus stressant que le confinement dans un bras fermé provoquant notamment une augmentation de l'immobilisation et de la défécation, ainsi qu'une diminution de l'exploration. De plus, File *et al.* (1990) ont montré que, contrairement au confinement dans

un bras fermé, le confinement de rats (Lister) dans un bras ouvert 24 heures au préalable entraînait la perte de l'effet de type anxiolytique du CDP (7,5 mg/kg) lors d'un retest dans un EPM traditionnel. Par ailleurs, le confinement dans un bras ouvert (3 fois 30 minutes) ne prévient pas la diminution d'activité dans les BO lorsque les rats sont autorisés ultérieurement à explorer librement l'ensemble de l'EPM (Treit *et al.*, 1993a). Ces différentes études suggèrent donc que le développement de la tolérance aux BZDs dépend de l'apprentissage motivé par la peur relative à l'exploration des BO.

Une seconde hypothèse soutient que l'effet de tolérance aux BZDs lors du retest est inhérent à l'expérience des bras fermés lors de la première exploration de l'EPM. Falter *et al.* (1992) ont montré que le confinement des rats pendant 20 minutes dans un bras ouvert et réalisé juste avant une expérimentation dans l'EPM, n'altère pas les effets de type anxiolytique du CDP, contrairement au confinement dans un bras fermé qui entraîne une atténuation marquée de l'activité du CDP. D'autres travaux plus récents rejoignent ces premières observations. En effet, Holmes et Rodgers (1999) ont montré que le CDP (10 mg/kg) conserve son effet de type anxiolytique dans l'EPM lorsque les souris (Swiss-Webster) ont été confinées 24 heures auparavant dans un bras ouvert. En revanche, Frussa-Filho et Ribeiro (2002) ont observé que des rats (Wistar) soumis lors d'un prétest à un EPM constitué de 4 BO, ne répondent pas aux effets du CDP (5 mg/kg) lors d'un retest dans un EPM traditionnel. En revanche, le confinement dans un bras fermé (Holmes et Rodgers, 1999), l'exploration d'un EPM à 4 BF (Frussa-Filho et Ribeiro, 2002) ou bien traditionnel (Frussa-Filho et Ribeiro, 2002 ; Holmes et Rodgers, 1999) entraîne une perte de l'activité du CDP lors d'un retest dans un EPM traditionnel. Contrairement à l'étude d'Holmes et Rodgers (1999), Frussa-Filho et Ribeiro (2002) ont mis en évidence une modification de l'anxiété basale se traduisant notamment par une augmentation des indices de l'anxiété, et ce quelle que soit la nature du prétest (exposition : nulle, 4 BO, 4 BF ou EPM traditionnel). Ces différentes études pré-citées suggèrent que les bras fermés constituent le facteur crucial à l'origine de la tolérance aux BZDs lors du retest.

Par ailleurs, Bertoglio et Carobrez (2002b) proposent une troisième explication au phénomène de tolérance aux BZDs survenant lors d'un retest dans l'EPM. Ces auteurs ont montré que le midazolam conserve son effet anxiolytique dans l'EPM lorsque les rats (wistar) ont été précédemment confinés dans un bras ouvert ou dans un bras fermé pendant 5 minutes (lors du premier test) suggérant que l'ensemble du modèle (2 BO + 2 BF) est impliqué dans la tolérance aux BZDs (Bertoglio et Carobrez, 2002c). La co-existence de deux environnements aversifs différents (bras ouverts/bras fermés) serait la clé des mécanismes sous-tendant les

processus d'apprentissage d'évitement acquis au cours de la première exploration de l'EPM (Bertoglio et Carobrez, 2000).

L'ensemble de ces études ne s'accorde pas sur « l'identité » du facteur crucial à l'origine de la tolérance aux BZDs dans l'EPM. Certains résultats divergents peuvent probablement s'expliquer par l'utilisation d'espèces, de souches et de méthodologies différentes.

2.3. Dépendance et indépendance

Dans les modèles animaux d'anxiété, la réponse comportementale des rongeurs naïfs peut être influencée par une multitude de facteurs ; certains liés aux sujets tels que l'espèce, la souche, le genre et l'âge (Crawley *et al.*, 1997 ; Imhof *et al.*, 1993 ; Markowska *et al.*, 1998 ; Ramos *et al.*, 1999 ; Rodgers et Cole, 1993b) et d'autres dépendant de l'environnement, tels que les conditions d'éclairage et le stress de la manipulation de l'animal (Andrews et File, 1993 ; Griebel *et al.*, 1993 ; Izidio *et al.*, 2005a). L'influence de ces facteurs sur le comportement des rongeurs lors d'un retest (aversion pour les BO et/ou phénomène de tolérance aux BZDs) a fait l'objet de nombreuses études conduites exclusivement dans l'EPM.

2.3.1. Matériaux constituant l'EPM

La manière dont sont construits les paradigmes d'EPM [matière (bois/métal), BF opaques ou transparents, dimensions] varient selon les laboratoires. Certains possèdent des petits rebords à l'extrémité des bras ouverts, ajoutés par certaines équipes pour encourager l'exploration des BO (Rodgers et Johnson, 1995) et empêcher la chute des animaux (Cruz *et al.*, 1994). Albrechet-Souza *et al.* (2005) ont étudié l'effet du midazolam (0,5 et 1 mg/kg) chez des rats (Wistar) soumis à deux sessions de test dans un EPM classique (bras fermés opaques) et dans un EPM modifié comportant des BF transparents. Lors du premier test, le midazolam a exercé un effet de type anxiolytique dans les deux types d'EPM employés. L'effet était néanmoins plus prononcé (à la dose de 0,5 mg/kg) dans l'EPM modifié. Ces résultats rejoignent ceux d'études précédentes (Anseloni et Brandao, 1997 ; Anseloni *et al.*, 1995). Il semblerait que l'EPM modifié permette une meilleure distinction entre les

différentes parties du modèle, possédant ainsi un plus grand potentiel discriminatif (Dere *et al.*, 2002). En revanche, le midazolam perd son activité chez les rats ayant pratiqué le test 24 heures auparavant, et ce, quel que soit l'EPM utilisé (Albrechet-Souza *et al.*, 2005). De même, File *et al.* (1990b) ont observé lors d'un retest dans l'EPM une tolérance au CDP (7,5 mg/kg) quel que soit le type d'EPM utilisé (bois/métal). Par ailleurs, Fernandes et File (1996) ont étudié l'influence de la présence de petits rebords sur les BO sur le phénomène de tolérance au CDP (7,5 mg/kg) lors d'un test-retest dans l'EPM. Cette étude a montré que chez les rats naïfs, le CDP exerce un effet de type anxiolytique seulement dans l'EPM ne possédant pas de rebords. Chez les rats exposés 24 heures au préalable, la présence de rebords sur les BO empêche l'apparition de la tolérance au CDP lors d'un second test. Cependant, l'anxiété augmente lors du 2^{ème} test quel que soit l'EPM utilisé (avec ou sans rebord(s) dans les BO). Lors d'un second test, la nature de l'anxiété dans l'EPM sans rebord semble être différente de celle qui est mesurée dans l'EPM avec rebords. L'analyse factorielle des différents indices comportementaux, mesurés au cours de trois tests successifs dans les deux EPM, le confirme. En effet, dans l'EPM sans rebord, les indices de l'anxiété déterminés dans le 1^{er} test et dans les tests successifs (2^{ème} et 3^{ème}) sont modélisés par des facteurs indépendants. En revanche, dans l'EPM avec des rebords, les indices de l'anxiété déterminés dans chacun des 3 tests sont représentés par trois facteurs indépendants. Fernandez et File (1996) suggèrent que, lors d'un premier test, les deux modèles d'EPM permettent la détermination d'une anxiété de même nature, mais de sensibilité différente (ex : anxiété généralisée ou peur des espaces ouverts). En revanche, lors d'un second test, l'anxiété mesurée dans chaque EPM semble différente (EPM sans rebord : phobie/ peur de la hauteur ; EPM avec rebords : inconnu). Lors d'un 3^{ème} test, l'anxiété déterminée dans l'EPM sans rebord est semblable à celle observée dans le 2^{ème} test, alors que dans l'EPM avec des rebords, l'anxiété mesurée dans 2^{ème} et 3^{ème} test paraît de nature différente. La présence de rebords semble donc influencer la nature de l'anxiété détectée lors du retest. Néanmoins, les travaux de Fernandez et File (1996) ne sont pas soutenus par tous. Certaines équipes, comme celle de Rodgers, emploient exclusivement un EPM à rebords pour leurs expérimentations. Contrairement à Fernandez et File (1996), ces dernières ont montré dans de nombreux travaux, que les BZDs exercent une activité anxiolytique lors du 1^{er} test. De plus, ces études ont observé un effet de tolérance aux BZDs chez les animaux réexposés, suggérant que la présence de ces rebords n'influence pas le phénomène de tolérance aux BZDs.

2.3.2. Rythme circadien et conditions d'éclairage

Le rythme circadien synchronise et influence un large panel de processus physiologiques et comportementaux, tels que le sommeil (Kamei *et al.*, 1998), l'alimentation (Currie et Coscina, 1993 ; Morien *et al.*, 1999), la température corporelle (Weinert et Waterhouse, 1999) et le comportement exploratoire des rongeurs (Easton *et al.*, 2003). Toutefois, pour des raisons pratiques, la majorité des études précliniques utilisant principalement des espèces dites « nocturnes » sont réalisées lors de la phase diurne du rythme circadien (Kelliher *et al.*, 2000). Malgré l'existence de résultats contradictoires, il a été suggéré que le rythme circadien des rongeurs puisse être une source de variabilité dans les modèles animaux d'anxiété, et notamment dans l'EPM (Jones et King, 2001 ; Lu et Nagayama, 1996 ; 1997 ; Nagayama et Lu, 1998). La réponse pharmacologique des rongeurs à certaines molécules, tels que les ligands des récepteurs 5-HT_{1A}, semble varier selon les phases du cycle (Cao et Rodgers, 1998a ; b ; Clenet *et al.*, 2005 ; Currie et Coscina, 1993 ; Lu et Nagayama, 1996). En effet, (Cao et Rodgers, 1998a) ont montré par exemple que l'antagoniste des récepteurs de sous-type 5-HT_{1A}, le LY297996, était anxiolytique dans la phase mid-dark mais pas dans la phase mid-light.

Par ailleurs, alors que certains travaux suggèrent que les conditions d'éclairage n'altèrent pas le comportement basal des rongeurs dans l'EPM (Becker et Grecksch, 1996 ; Falter *et al.*, 1992 ; Jones et King, 2001 ; Lister, 1987 ; Pellow *et al.*, 1985), d'autres ont montré qu'elles influençaient la réponse comportementale (Bert *et al.*, 2002 ; Cao et Rodgers, 1998a ; Cardenas *et al.*, 2001 ; Griebel *et al.*, 1993) et pharmacologique des rongeurs (Handley et McBlane, 1993). En effet, il a été observé dans l'EPM que les animaux observés dans une pièce faiblement éclairée étaient moins anxieux que ceux observés dans une pièce fortement éclairée (Bert *et al.*, 2002 ; Bertoglio et Carobrez, 2002b ; Cardenas *et al.*, 2001 ; Griebel *et al.*, 1993). De plus, l'effet anxiolytique ou anxiogène de certaines substances, comme les ligands des récepteurs 5-HT_{1A} semblent dépendants des conditions d'éclairage (Clenet *et al.*, 2005). Par exemple, le 8-OH-DPAT a montré une activité anxiolytique sous un fort éclairage et anxiogène sous un faible éclairage (Handley et McBlane, 1993). Certains travaux se sont donc intéressés à l'influence du rythme circadien et des conditions d'illumination sur le comportement des rongeurs soumis à deux sessions de test dans l'EPM.

Les résultats de ces études rapportent une diminution de l'exploration des BO indépendamment de la phase du cycle (diurne/nocturne) et des conditions d'éclairage lors d'une seconde exploration de l'EPM (Bertoglio et Carobrez, 2002b ; Pereira *et al.*, 2005). La

diminution de l'exploration est progressive, débutant entre la deuxième et la troisième minute du premier test et persiste lors du retest (Bertoglio et Carobrez, 2002b). Contrairement à ces études, Calzavara *et al.* (2005) n'ont pas montré de diminution de l'exploration des BO lors du second test lorsque les deux sessions d'EPM étaient réalisées dans des conditions de bruit et de lumière différentes (premier test : lumière blanche, absence de bruit ; second test : éclairage rouge, bruit 60 dB). Par ailleurs, Bertoglio et Carobrez (2002b) révèlent une interaction entre les phases du cycle circadien et les conditions d'illumination. En effet, les sujets du groupe NL (nocturne/faible éclairage) ont présenté une exploration des BO lors des deux sessions de test significativement plus faible que le groupe DL (diurne/faible éclairage), suggérant l'influence des phases circadiennes lorsque l'expérimentation est réalisée dans une salle faiblement éclairée. L'évaluation du risque était diminuée chez les rats testés sous un fort éclairage, pour les deux groupes, nocturnes et diurnes lors du premier test. Même si cette variable était élevée lors de la première minute du second test comparé à la dernière minute du premier test, il a diminué progressivement lors du retest, indépendamment de la phase du cycle circadien (Bertoglio et Carobrez, 2002b).

Par ailleurs, Calzavara *et al.* (2005) observent un effet de tolérance au CDP (5 mg/kg) lors d'un retest dans l'EPM, lorsque les deux sessions de test sont réalisées dans des conditions de bruit et de lumière différentes (premier test : lumière blanche, sans bruit ; second test : éclairage rouge, bruit 60 dB), suggérant que les paramètres modifiant les conditions d'apprentissage aversif dans l'EPM n'influencent pas le phénomène de tolérance aux BZDs lors d'un retest.

2.3.3. Manipulation de l'animal

Des stress externes, tels que la manipulation et les injections peuvent influencer le comportement exploratoire basal des rongeurs soumis aux paradigmes d'anxiété (Andrews et File, 1993 ; File *et al.*, 1992 ; Steenbergen *et al.*, 1990 ; Zangrossi et File, 1992). La manipulation répétée des animaux précédant le test (dont la fréquence varie de plusieurs jours à plusieurs semaines) est réalisée afin de les familiariser aux stimuli stressants auxquels ils sont soumis juste avant le test (changement de cage, pesée, injection). Andrews et File (1993) ont montré en effet que les animaux habitués à être manipulés étaient moins anxieux dans l'EPM que ceux qui ne l'étaient pas. Cependant, cette observation n'a pas été retrouvée par (Brett et Pratt, 1990). Par ailleurs, ces travaux ont montré que la manipulation répétée et quotidienne des animaux avant le test présentait l'inconvénient d'entraîner une perte de l'effet

de type anxiolytique des BZDs dans l'EPM (Andrews et File, 1993 ; Brett et Pratt, 1990), suggérant que la manipulation altère la réponse aux BZDs. Le complexe-récepteur GABA-BZD peut être influencé par les stress environnementaux, au même titre que l'administration de molécules anxiolytiques ou anxiogéniques (Biggio *et al.*, 1990). Par exemple, il a été montré que la manipulation répétée des rongeurs augmentait les sites de liaison aux BZDs (Andrews et File, 1993) et au contraire, la manipulation « aiguë » « isolée » diminuait les sites de liaison aux BZDs, un effet contrecarré par le diazépam (Andrews et File, 1993). De plus, File *et al.* (1990a) ont montré que la libération de GABA induite par le K^+ , dans les couches hippocampales et corticales, était réduite de façon similaire par la manipulation répétée de rats (21 jours) et par l'administration de CDP (7,5 mg/kg). Néanmoins, le CDP a réduit la libération de GABA (induite par le K^+) sans influencer la libération ou la capture basale du GABA, alors que la manipulation répétée de l'animal a augmenté dans un premier temps la capture du GABA, puis a entraîné une diminution de sa libération. File *et al.* (1990a) suggèrent que la libération de GABA observée chez les animaux n'ayant pas été habitués à être manipulés traduit un phénomène compensatoire afin de limiter les effets anxiogènes de l'événement stressant. Au contraire, certains travaux ont montré que les BZDs conservent leur effet anxiolytique dans l'EPM chez des rats naïfs manipulés de façon répétée avant le test (File *et al.*, 1992). En revanche, lors d'un second test, File *et al.* (1992) observent une tolérance au CDP dans l'EPM, seulement chez les rats habitués à être manipulés. Il semblerait donc que les effets de la manipulation de l'animal et du test se combinent pour réduire l'effet anxiolytique du CDP. Andrews et File (1993) suggèrent que des événements incontrôlés survenant avant l'arrivée de l'animal au laboratoire puissent expliquer l'influence des manipulations sur la réponse pharmacologique des rongeurs.

Par ailleurs, Lapin (1995) a montré qu'une injection intrapéritonéale de NaCl chez des souris (Swiss-NIH) diminue le rapport des entrées dans les BO sur les entrées totales (BO + BF), en comparaison avec une manipulation simple ou une piqûre sans injection, dépourvues d'effet par elles-mêmes. De fait, Lapin (1995) suggère que l'injection d'une solution exerce un effet anxiogène. Néanmoins, le temps passé dans les BO reste inchangé par ces manipulations. Dans la plupart des études intégrant une procédure de test-retest, les rongeurs ne reçoivent pas d'injection lors de la première expérimentation. En effet, certains suggèrent qu'une injection en soi peut masquer la modification du comportement basal et influencer la réponse aux BZDs des animaux retestés (Bertoglio et Carobrez, 2002c ; Holmes et Rodgers, 1999 ; Rodgers et Shepherd, 1993). Toutefois, certains travaux ne soutiennent pas cette

hypothèse. En effet, des études ont révélé un profil comportemental stable au cours des deux sessions de test dans l'EPM chez les animaux qui ont reçu une injection lors du premier test (File, 1990b ; File *et al.*, 1990a), rejetant l'idée selon laquelle une injection en soi augmente l'anxiété (Adamec *et al.*, 1991 ; Lapin, 1995). De même, dans le test de la double enceinte éclairée, Holmes *et al.* (2001) ont montré que la manipulation de l'animal (prise en main + injection de NaCl) 30 minutes avant la première expérimentation n'influait pas le comportement des rongeurs naïfs ou non. Les indices d'anxiété se sont révélés constants lors des deux sessions de test. Par ailleurs, le phénomène de tolérance aux BZDs ne semble pas être influencé par la réalisation d'injections. En effet, Escarabajal *et al.* (2003) ne montrent pas d'influence de la manipulation de l'animal (prise en main + injection de NaCl) réalisée 30 minutes avant la première expérimentation sur le phénomène de tolérance aux BZDs. De plus, la manipulation répétée (prise en main et injection) n'influence pas l'atténuation de l'effet anxiolytique du diazépam (Rodgers *et al.*, 1992).

2.3.4. Durée du test

L'aversion pour les BO et la tolérance aux BZDs semblent dépendre du temps d'exploration du premier passage dans l'EPM (Dal-Col *et al.*, 2003 ; File, 1993 ; Rodgers *et al.*, 1996). Dal-Col *et al.* (2003) ont montré qu'en diminuant le temps de la première exploration de l'EPM, les rats (Wistar) présentaient une aversion moins marquée pour les BO lors d'un retest. En effet, lorsque la durée du test était de 5 minutes dans l'EPM, Dal-Col *et al.* (2003) ont observé une diminution significative du pourcentage de TBO et d'EBO ainsi que du nombre d'EBO ; alors que seuls les pourcentages de TBO et d'EBO ont diminué significativement entre les deux sessions de test lorsque la première expérimentation était réduite à deux minutes. De plus, quand la durée de la première expérience n'est que d'une minute, seul le pourcentage de temps passé dans les BO a diminué de façon significative entre les deux expérimentations (Dal-Col *et al.*, 2003). Contrairement à ces travaux, Calzavera *et al.* (2005) n'ont pas observé de modifications significatives du pourcentage de TBO entre les deux sessions de test dans l'EPM, en réduisant la durée de la première exploration à 1 minute, suggérant que la diminution du temps de la première expérimentation n'entraîne pas de modifications comportementales entre les deux tests.

Par ailleurs, lorsque la première exploration de l'EPM est d'une durée d'1 minute, le midazolam (1,5 mg/kg) exerce un effet de type anxiolytique chez les rats (Wistar) réexposés

dans l'EPM (5 minutes). En revanche, le midazolam perd son effet anxiolytique lorsque la première exposition dure de 2 à 5 minutes. Cette étude rejoint celle de Rodgers *et al.* (1996) et ensemble ils suggèrent que le fait de diminuer le temps d'exploration d'un nouvel environnement, diminue le temps nécessaire à l'apprentissage perturbant ainsi l'apprentissage émotionnel acquis/survenant à la première expérience du modèle. Ces deux études révèlent également l'importance de la première minute de test dans cet apprentissage motivé par la peur. Contrairement à ces travaux, Calzavara *et al.* (2005) n'a pas rapporté d'effet anxiolytique en réponse au CDP dans l'EPM lorsque le premier test dans l'EPM est réduit à 1 minute.

Certaines études ont mis en évidence que le fait d'augmenter le temps d'exposition de l'animal, lors des deux sessions de test dans l'EPM, à 10 minutes, prévenait la perte de l'effet anxiolytique des BZDs chez le Rat et la Souris retestés (File *et al.*, 1993 ; Holmes et Rodgers, 1999). En revanche, lorsque la durée du 1^{er} test est fixée à 10 minutes et celle du second test à 5 minutes, l'activité anxiolytique des BZDs disparaît (File *et al.*, 1993 ; Holmes et Rodgers, 1999). Ces résultats contrastent néanmoins avec ceux d'une autre étude réalisée dans les mêmes conditions (premier test : 10 minutes ; second test : 5 minutes) dans laquelle l'effet de type anxiolytique du diazépam persistait chez les rats retestés (File, 1993). Ces résultats ont amené File *et al.* (1993) à suggérer que la réponse émotionnelle observée lors du retest puisse être de nature phobique. En revanche, lorsque la durée de la deuxième expérimentation est la seule à être augmentée, File *et al.* (1993) observent une tolérance au diazépam lors du retest.

2.3.5. Souche

Le comportement et la réponse pharmacologique des rongeurs naïfs varient selon la souche dans les modèles animaux d'anxiété (Blanchard *et al.*, 1998a ; Cole *et al.*, 1995 ; Crawley *et al.*, 1997 ; Rodgers *et al.*, 1999 ; Tang et Sanford, 2005 ; Trullas et Skolnick, 1993). Certaines équipes se sont donc intéressées à l'influence de la souche sur la réponse comportementale lors d'un test-retest dans l'EPM. Un premier travail réalisé par Holmes *et al.* (2000) a étudié et comparé dans l'EPM, le comportement d'une souche sauvage de souris, *versus* une souche de souris de laboratoire, la souche Swiss CD-1, lors d'un test-retest. Les animaux domestiqués sont caractérisés par des réactions défensives atténuées (Blanchard *et al.*, 1986 ; Blanchard *et al.*, 1997). A titre d'exemple, à l'approche d'un rat, les réponses de fuite et d'évitement des souris CD-1 sont moins intenses que celles des souris sauvages

(Blanchard *et al.*, 1998a). Holmes *et al.* (2000) rapportent un comportement diamétralement opposé entre la souche de laboratoire et la souche sauvage étudiées. En effet, lors des deux sessions de test, les souris sauvages ont démontré un comportement exploratoire élevé et une préférence pour les BO contrairement aux souris de la souche de laboratoire préférant les BF. Récemment, Izidio *et al.* (2005b) ont étudié, lors de deux sessions de test dans l'EPM, le comportement de deux souches de rats, la souche Lewis et la souche de rats naturellement hypertendus (SHR, spontaneously hypertensive rats), connues pour leurs différences comportementales dans les modèles animaux d'anxiété (Berton *et al.*, 1998 ; Ramos *et al.*, 1997 ; Ramos *et al.*, 2002 ; Ramos *et al.*, 1998). Cette étude rapporte que la différence entre ces deux souches persiste lors du retest. En effet, même si les indices comportementaux d'anxiété (le temps passé et le pourcentage d'entrées dans les bras ouverts) diminuent lors du second test indépendamment de la souche, les rats Lewis demeurent plus anxieux que les rats SHR. Contrairement à de nombreux travaux (File, 1993 ; File *et al.*, 1993 ; Holmes et Rodgers, 1998), Izidio *et al.* (2005) suggèrent que la réponse émotionnelle entraînée par le test et le retest possède des composantes psychologiques communes.

2.3.6. Genre

Concernant l'influence du genre sur les indices de l'anxiété, mesurés chez les animaux naïfs dans divers modèles animaux, bien souvent les études se contredisent ; certaines rapportant des effets minimes (pour exemple : Kellogg *et al.*, 1991 ; Rodgers et Cole, 1993b) d'autres révélant des différences entre les sexes (Blanchard *et al.*, 1998b ; Holmes *et al.*, 2000). Néanmoins, le genre ne semble pas influencer la réponse comportementale des rongeurs lors d'une réexposition à l'EPM. En effet, Izidio *et al.* (2005) ont montré que, quel que soit le genre, une première exposition à l'EPM, entraîne une augmentation des indices de l'anxiété lors du retest, tels que le temps passé et le pourcentage d'entrées dans les BO.

2.3.7. Age

Les modifications du comportement émotionnel, comme l'augmentation de l'anxiété représentent un des aspects les plus importants de l'âge chez l'Homme et les rongeurs (Bessa *et al.*, 2005). L'âge est associé de façon caractéristique à des perturbations des processus d'apprentissage (Frick *et al.*, 2000 ; Labar *et al.*, 2004). Une étude récente a montré que le facteur « âge » influençait les indices comportementaux classiques de l'anxiété, tels que le pourcentage de temps passé et le nombre d'entrées dans les bras ouverts lors d'un retest dans l'EPM (Bessa *et al.*, 2005). Les auteurs ont observé une diminution de ces indices chez les rats jeunes (2 et 3 mois) lors du retest, révélant une augmentation de l'anxiété (Bessa *et al.*, 2005). Au contraire, chez les rats plus âgés (12 mois) et âgés (18 mois) ces indices étaient augmentés lors du retest (Bessa *et al.*, 2005). De plus, lors des deux sessions de test, Bessa *et al.* (2005) ont révélé une influence significative de l'âge sur le comportement d'évaluation du risque ; celui-ci diminuant progressivement avec l'âge. Néanmoins, cette variable s'est révélée significativement différente entre les deux sessions de test uniquement chez les groupes de rats les plus jeunes (2 mois) et les plus âgés (18 mois). Au cours du second test, l'évaluation du risque était augmentée chez ces deux groupes par rapport au premier test. Bessa *et al.* (2005) suggèrent donc l'existence d'une modification qualitative du comportement anxieux liée à l'âge.

Par ailleurs, chez les animaux naïfs, le midazolam (1 mg/kg) a exercé un effet de type anxiolytique chez les rats jeunes (3 mois) et sédatif chez les rats âgés (Bessa *et al.*, 2005), probablement lié à une diminution de la densité ou à une altération de l'activité des récepteurs au GABA_A (Tehrani *et al.*, 1995 ; Wikinski *et al.*, 2001). Lors d'une seconde expérimentation dans l'EPM, les animaux étudiés se sont révélés être tolérants au midazolam indépendamment de l'âge (3 et 12 mois) (Bessa *et al.*, 2005). Le facteur « âge » semble donc influencer le comportement basal de l'animal. En revanche l'effet, de tolérance aux BZDs semble être indépendant de ce facteur.

2.4. Tolérance aux benzodiazépines : hypothèses étiologiques

Différentes hypothèses explicatives, basées sur des approches comportementales, pharmacologiques et neurochimiques ont été proposées pour expliquer le phénomène de tolérance aux BZDs.

2.4.1. Locomotion

L'équipe de Dawson (Dawson *et al.*, 1994 ; Dawson et Tricklebank, 1995) a été la première à suggérer que la perte d'activité des BZDs lors d'un 2^{ème} test dans l'EPM provient d'une familiarisation de l'animal au modèle se traduisant par une diminution de l'activité locomotrice. Cette adaptation locomotrice dans le second test a été rapportée par différentes études (Fernandes et File, 1996 ; Pereira *et al.*, 2005) et semble indépendante de la nature des BF (opaques ou transparents) (Albrechet-Souza *et al.*, 2005) et de l'âge des rongeurs (Bessa *et al.*, 2005). Cependant de nombreuses études ne soutiennent pas l'hypothèse de Dawson *et al.* (1994) (Calzavara *et al.*, 2005 ; Frussa-Filho *et al.*, 1999 ; Gonzalez et File, 1997 ; Holmes et Rodgers, 1998 ; Pereira *et al.*, 1999 ; Rodgers *et al.*, 1996 ; Rodgers et Shepherd, 1993). En effet, ces travaux ont montré que les éléments d'exploration et de locomotion étaient augmentés ou restaient stables entre deux ou plusieurs sessions de test dans l'EPM (Bertoglio et Carobrez, 2002c ; Espejo, 1997a). Certains auteurs ont observé par exemple une augmentation du temps passé par l'animal dans les BF (Izidio *et al.*, 2005b). Cependant, le nombre d'entrées dans les BF, considéré comme le meilleur indice de l'activité locomotrice dans l'EPM (Bessa *et al.*, 2005 ; Claus et Bindra, 1960 ; Cruz *et al.*, 1994 ; Espejo, 1997a ; Kaesermann, 1986 ; Rodgers et Johnson, 1995) est resté inchangé, rejetant ainsi l'hypothèse de Dawson. L'ensemble de ces résultats suggèrent plutôt, qu'au fur et à mesure que l'animal acquiert les informations spatiales sur le dispositif expérimental, l'anxiété augmente et la motivation pour explorer les BO décroît parallèlement.

2.4.2. *Altération de l'état émotionnel*

Une deuxième hypothèse explique la tolérance aux BZDs par une modification de l'état émotionnel (File et Zangrossi, 1993 ; Holmes et Rodgers, 1999) . Lors d'un second test dans l'EPM, l'animal présenterait une peur des BO de nature phobique acquise lors du 1^{er} test et contre laquelle les BZDs s'avèrent inefficaces. L'anxiété observée au cours de la 2^{ème} expérimentation pourrait modéliser une phobie ou une peur de la hauteur des bras (File, 1993 ; File et Zangrossi, 1993), alors que l'anxiété observée lors du 1^{er} test, inhérente à l'absence de rebords dans les BO pourrait modéliser une anxiété généralisée (Hogg et File, 1994) ou une peur panique (Graeff *et al.*, 1993). L'hypothèse de l'acquisition d'un état phobique repose sur des observations expérimentales et cliniques. Chez l'Homme, les sujets souffrant de troubles phobiques sont généralement insensibles aux BZDs. De plus, l'exposition prolongée du sujet au facteur déclenchant atténue ou supprime la réponse de nature phobique. Or (File *et al.*, 1993) ont observé que le fait d'augmenter le temps d'exposition (10 minutes) des rats dans le 1^{er} test, prévenait la perte de l'effet de type anxiolytique du CDP habituellement observée dans un 2^{ème} test. Ces similitudes comportementales entre l'Homme et le Rongeur, ont conduit File à interpréter l'absence de tolérance aux BZDs comme étant une conséquence de l'extinction de l'anxiété de type phobique entraînée par une augmentation de l'exposition au 1^{er} test (File *et al.*, 1993). Cependant cette interprétation n'est pas soutenue par tous. En effet, même si Holmes et Rodgers (1999) ont montré comme File *et al.* (1993) que le fait d'augmenter le temps d'exploration dans les 2 tests à 10 minutes restaure l'effet du CDP dans le 2^{ème} test, ils ont néanmoins observé une modification de certains indices comportementaux entre les deux tests tels qu'une diminution des entrées et du temps passé dans les BO, traduisant un comportement anxieux chez les souris dans le 2^{ème} test, similaire à celui observé lors de tests d'une durée classique (5 minutes). Holmes et Rodgers (1999) suggèrent donc qu'une exposition prolongée lors du 1^{er} test augmente l'anxiété et ne l'éteint pas comme le suggère File. Cette hypothèse est confortée par l'étude de (File *et al.*, 1994) qui a mis en évidence une augmentation du taux de corticostérone chez des rats exposés à deux sessions de tests dans l'EPM, d'une durée de 10 minutes par rapport aux rats expérimentés deux fois dans l'EPM pendant 5 minutes lors des deux tests.

Quelle que soit la nature de l'anxiété observée lors du 1^{er} et du 2^{ème} test, les différentes études s'accordent sur l'hypothèse d'une modification de l'état émotionnel au cours de la

seconde expérimentation ; un état contre lequel les BZDs sont inactives. Par ailleurs, différentes observations expérimentales indiquent que la première expérience de l'EPM est associée à une forme d'apprentissage émotionnel. En effet, le phénomène de tolérance aux BZDs persiste jusqu'à 2 semaines après le 1^{er} test dans l'EPM (File *et al.*, 1990b). De plus, File *et al.* (1990b) ont montré que l'administration de doses élevées de CDP (75 mg/kg) lors du 1^{er} test empêchait l'apparition de la tolérance au CDP au cours d'un 2^{ème} test, probablement lié aux propriétés amnésiantes de cette forte dose de CDP. Dal-Col *et al.* (2003) suggèrent que la procédure de test-retest dans l'EPM puisse être un bon outil pour étudier la mémoire émotionnelle des rongeurs.

2.4.3. Absence de motivations conflictuelles

Rodgers et Shepherd (1993) suggèrent que la tolérance aux BZDs lors d'une 2^{ème} exposition à l'EPM s'explique par l'absence de conflit d'approche/d'évitement ou de conflit entre la volonté d'explorer et la peur des espaces ouverts au cours de la 2^{ème} exploration de l'EPM. En effet, la connaissance des différentes parties du dispositif expérimental par l'animal se traduit lors d'un second test par une diminution de l'exploration des aires aversives, réduisant ainsi le conflit. Cette diminution du conflit expliquerait la perte de réponse aux BZDs lors d'un 2^{ème} test. Cette hypothèse est confortée par l'étude de Pereira *et al.* (1999) qui a observé, que lorsqu'une nouvelle source de conflit était introduite dans le 1^{er} test en rendant notamment les BF aversifs (souffle d'air chaud et lumière de 100 Watts), l'effet anxiolytique du CDP (5 mg/kg) était restauré lors d'un second test. La possibilité pour l'animal de pouvoir choisir entre différentes situations plus ou moins aversives semble être impliquée dans les processus d'apprentissage (Bertoglio et Carobrez, 2000).

2.4.4. Altération des sites récepteurs du complexe GABA_A

La procédure de « test-retest » entraînerait une modification adaptative du site de fixation des BZDs. Gonzalez et File (1997) ont montré que chez des rats réexposés à l'EPM, le midazolam (injecté dans le noyau dorsal du raphé (DRN) perdait son activité. Au contraire, le flumazénil (injecté dans le DRN), un antagoniste des récepteurs aux BZDs dépourvu d'effet chez les rats naïfs, a exercé un effet de type anxiolytique lors du second test (Gonzalez et File, 1997). Gonzalez et File (1997) suggèrent qu'une première exposition à l'EPM entraîne la libération d'agonistes inverses endogènes, qui se lient sur les récepteurs aux BZDs, les désensibilisent et altèrent leur état. Toutefois, Chacur *et al.* (1999) ont montré que, contrairement au ³H-muscimol, la liaison du ³H-flunitrazépam est augmentée dans l'amygdale et l'hippocampe de rats (Wistar) immédiatement après un 1^{er} test dans l'EPM. De fait, Chacur *et al.* (1999) ne soutiennent pas l'hypothèse d'une simple désensibilisation des récepteurs aux BZDs sous-tendant la tolérance aux BZDs.

Certains travaux suggèrent qu'une première expérience de l'EPM, modifie l'ensemble du complexe-récepteur GABA_A et non pas seulement les sites-récepteurs aux BZDs (Bertoglio et Carobrez, 2002a). En effet, le phénomène de tolérance a été observé pour d'autres molécules se liant au complexe récepteur GABA_A, tels que l'éthanol (Bertoglio et Carobrez, 2002a ; Cole *et al.*, 1999) et le phénobarbital (Bertoglio et Carobrez, 2002a ; File, 1993). Une altération de la composition en sous-unités du complexe-récepteur GABA_A, le rendant insensible aux modulations allostériques pourrait expliquer l'absence d'activité des BZDs et celle d'autres ligands lors d'un second test dans l'EPM (Bertoglio et Carobrez, 2002a). Cette hypothèse spéculative reste à confirmer ou à infirmer. Cependant, Boerngen-Lacerda et Souza-Formigoni (2000) ont montré un effet anxiolytique de l'éthanol (2 g/kg) dans l'EPM chez des souris testées au préalable 3 jours consécutifs, successivement dans un actimètre, un test du champ ouvert et dans un EPM. Ces résultats contradictoires peuvent s'expliquer par des différences méthodologiques, comme la durée de l'EPM (5 minutes vs 3 minutes), les prétests (EPM *versus* actimètre+openfield+EPM) et l'âge (13-15 *versus* 6-7 semaines).

2.5. Influence du traitement

De nombreuses études ont étudié l'influence de divers systèmes de neurotransmission sur les processus d'apprentissage aversif et de mémoire émotionnelle lors d'un « test-retest » dans un modèle d'anxiété, en modifiant les procédures d'injection (avant ou après un 1^{er} test ou avant un 2^{ème} test).

Certains travaux soutiennent que l'effet de tolérance aux BZDs survient indépendamment du traitement reçu par l'animal lors du premier test. File (1990b) a en effet observé une tolérance au CDP lors d'un 2^{ème} test dans l'EPM, et ce, quel que soit le traitement reçu lors du premier test [véhicule (eau + tween), CDP ou flumazénil]. D'autres travaux ont montré également que l'administration de BZDs lors d'une première expérience de l'EPM n'empêchait pas l'apparition de la tolérance lors d'un second test (Cruz-Morales *et al.*, 2002) et la réponse apprise de type phobique liée à une première expérience de l'EPM (Cruz-Morales *et al.*, 2002). Par ailleurs, il a été montré que l'injection de scopolamine (1 mg/kg) lors d'un premier passage dans l'EPM n'empêchait ni l'augmentation de l'anxiété des souris (Swiss) contrôles (traitées avec une solution saline), ni l'apparition de la tolérance au CDP (5 mg/kg) lors d'un second passage (Calzavara *et al.*, 2005).

D'autres études au contraire suggèrent que la nature du traitement administré à la première exposition peut perturber l'apprentissage acquis lors du 1^{er} test supposé être à l'origine de la perte d'effet des BZDs dans un 2^{ème} test dans l'EPM (Escarabajal *et al.*, 2003). Dans une étude récente, Escarabajal *et al.* (2003) ont montré que lorsque des rats (Wistar) recevaient une injection de CDP (8 mg/kg) ou de buspirone (2,5 mg/kg) lors d'un 1^{er} test dans l'EPM, le CDP (administré avant le 2^{ème} test) conservait son effet anxiolytique lors d'un second test réalisé 72 heures après. Ces travaux suggèrent que l'administration de CDP ou de buspirone a influencé l'apprentissage. Contrairement à l'étude de Calzavara *et al.* (2005), (Bertoglio et Carobrez, 2004) ont montré que l'injection de scopolamine lors du 1^{er} test (1 et 1,5 mg/kg) prévient la perte d'effet anxiolytique du midazolam lors d'un second test chez des rats, suggérant une perturbation de l'apprentissage. Par ailleurs, une autre étude a montré que l'injection de morphine (4 mg/kg) lors d'un premier test prévenait la tolérance normalement observée au CDP lors d'un second test (Leszczuk et Flaherty, 2000).

Lors d'un 2^{ème} test dans le FPT, le FG 7142, un agoniste inverse des récepteurs aux BZDs, le diazépam et le lorazépam, administrés à l'animal 30 minutes avant la 2^{ème}

expérimentation n'ont pas d'effet sur l'augmentation de l'anxiété chez les souris testées 24 heures auparavant sans traitement, suggérant d'une part l'incapacité de ces ligands à moduler la mémoire émotionnelle et d'autre part que l'expérience du test entraîne une altération de la fonction des récepteurs GABA_A/BZDs (Hascoët *et al.*, 1997). En revanche, Holmes et Rodgers (2003) ne soutiennent pas cette hypothèse. En effet, même si ces auteurs montrent dans l'EPM, que l'effet anxiogène du FG 7142 est aboli par l'expérience au préalable du test, ils observent néanmoins que le flumazénil n'exerce aucun effet chez les animaux naïfs et re-testés.

Par ailleurs, la phénelzine, un inhibiteur non sélectif des monoamines oxydases et la fluoxétine, un IRSS, respectivement sans effet et anxiogène chez les souris (Swiss-Webster) naïves soumises à l'EPM, augmentent le comportement anxieux des souris soumises à un 2^{ème} test dans l'EPM, suggérant qu'une première expérience de l'EPM augmente la sensibilité des animaux à la fluoxétine et à la phénelzine (Holmes et Rodgers, 2003). Les auteurs de cette étude suggèrent que l'augmentation de la sensibilité à la phénelzine et à la fluoxétine, chez les animaux déjà expérimentés une première fois dans l'EPM, peut s'expliquer par une augmentation de la sensibilité fonctionnelle de récepteurs 5-HT_{1A}. Cette hypothèse s'appuie sur différentes observations. En effet, l'administration aiguë de phénelzine et de fluoxétine est censée entraîner une élévation des taux extracellulaires de 5-HT (Blier et de Montigny, 1985), activant en retour les autorécepteurs somato-dendritiques 5-HT_{1A} (Blier *et al.*, 1998). De plus, diverses études ont mis en évidence l'implication des récepteurs 5-HT_{1A} dans l'expression comportementale des rongeurs soumis à un test-retest dans l'EPM (ces travaux seront exposés plus loin dans notre travail) et suggèrent qu'une première expérience de l'EPM modifie la sensibilité fonctionnelle de ces récepteurs (Cheeta *et al.*, 2000 ; File *et al.*, 1996).

Divers travaux se sont intéressés à l'influence du système cholinergique sur l'altération du comportement exploratoire des rongeurs lors d'un retest dans un paradigme d'anxiété. Dans l'EPM, Rodgers *et al.* (1996) ont montré que l'administration de scopolamine (0,1 – 1 mg/kg) à des souris (DBA/2) immédiatement après un 1^{er} test dans l'EPM, ne modifie pas le comportement anxieux observé lors d'un 2^{ème} test réalisé 24h après dans l'EPM. Dans le modèle des quatre-plaques, la scopolamine administrée à des souris par voie intrapéritonéale 30 minutes avant le 1^{er} test entraîne une augmentation du nombre de passages punis, à forte dose (0,125 – 4 mg/kg). Lorsque ces souris sont testées une seconde fois, sans traitement, celles-ci présentent une augmentation de l'anxiété habituellement observée lors d'un retest (Hascoët *et al.*, 1997). En revanche, lorsque la scopolamine est administrée 30

minutes avant le 2^{ème} test, elle s'oppose à l'augmentation de l'anxiété chez les souris testées 24 heures auparavant sans traitement. Ces différentes observations suggèrent que la scopolamine ne perturbe pas l'apprentissage, mais influence la mémoire émotionnelle. A la différence de la scopolamine, Hascoët *et al.* (1997) n'a pas révélé d'effet pour la méthylscopolamine sur le comportement des souris lors d'un test-retest dans le FPT, et ce, quel que soit le moment de l'injection (avant le 1^{er} ou le 2^{ème} test).

L'influence du système cholinergique semble être différente dans un 1^{er} test et dans un 2^{ème} test et varier selon l'aire cérébrale innervée. L'étude de Cheeta *et al.* (2000) illustre bien ces propos. En effet, ces auteurs ont montré que la nicotine administrée dans l'hippocampe dorsal exerce un effet anxiolytique chez des rats réexposés à l'EPM, alors qu'elle n'a pas d'effet chez les naïfs. En revanche, injectée dans le septum latéral, la nicotine a exercé un effet anxiogène lors du 1^{er} test et aucun effet lors du 2^{ème} test (ne modifie pas l'augmentation de l'anxiété). Contrairement à un 1^{er} test dans l'EPM, l'hippocampe dorsal semble jouer un rôle plus important dans le comportement anxieux observé lors d'un 2^{ème} test dans l'EPM (File *et al.*, 1998a). De plus, ces résultats suggèrent que l'augmentation de la transmission cholinergique dans l'hippocampe dorsal exerce une influence anxiolytique. D'autres travaux soutiennent cette hypothèse. En effet ces derniers rapportent que la mécamylamine, un antagoniste des récepteurs nicotiques et la pirenzépine, un antagoniste des récepteurs muscariniques M₁, injectées dans l'hippocampe dorsal de rats exercent un effet anxiogène lors d'un 2^{ème} test dans l'EPM, alors que la nicotine et l'agoniste des récepteurs muscariniques M₁, le McN-A-343 exercent une activité anxiolytique (File *et al.*, 2000 ; File *et al.*, 1998a ; Kenny *et al.*, 2000 ; Ouagazzal *et al.*, 1999). File *et al.* (2000) suggèrent que le mécanisme sous-tendant l'effet anxiolytique de la nicotine chez les animaux déjà expérimentés une 1^{ère} fois dans l'EPM peut s'expliquer par une augmentation de l'activité cholinergique dans l'hippocampe, qui en retour inhiberait la libération de 5-HT ou d'autres neurotransmetteurs. Au contraire, l'augmentation de l'activité cholinergique dans l'aire infralimbique (IL) du cortex préfrontal (CPF) ventromédian (vmCPF) entraînerait plutôt un comportement anxieux au cours d'un 2^{ème} test dans l'EPM. En effet, Wall *et al.* (2001) ont montré que l'injection de scopolamine dans l'ILvmCPF entraînait un effet anxiogène lors d'un 1^{er} test dans l'EPM et n'influçait pas le comportement des animaux expérimentés une 2^{ème} fois dans l'EPM sans traitement. En revanche, dans les mêmes conditions expérimentales, la pirenzépine, un antagoniste des récepteurs M₁ et le McN-A-343, un agoniste des récepteurs M₁ ont exercé respectivement chez l'animal, un effet anxiolytique et anxiogène lors des deux tests (Wall *et*

al., 2001). Ces observations suggèrent qu'une augmentation de la transmission cholinergique dans le vmCPF est à l'origine de l'anxiété observée dans l'EPM (Wall *et al.*, 2001). Ces observations rejoignent l'hypothèse selon laquelle l'activation du système cholinergique dans le CPF médian informe les animaux sur la présence d'un danger (Sarter et Bruno, 1999). Toutefois, Lamprea *et al.* (2000) suggèrent que l'innervation cholinergique de l'hippocampe, du cortex frontal ou des deux modulent l'initiation de l'activité exploratoire, nécessaire à l'acquisition et à la rétention d'informations spatiales, mais n'affectent pas l'expression de l'anxiété dans l'EPM.

D'autres systèmes de neurotransmission semblent jouer un rôle dans les modifications comportementales consécutives à un « test-retest » dans les modèles animaux (Hascoët *et al.*, 1997). Wall et Messier (2002) ont montré par exemple que l'injection dans le ILmCPF des souris, de NorBNI, un agoniste des récepteurs kappa à des souris (CD-1) avant un 1^{er} test dans l'EPM, entraîne un effet anxiogène chez l'animal. Cet effet est toujours observé chez les souris réexposées au test, sans traitement (Wall et Messier, 2000b ; 2002). Au contraire, dans les mêmes conditions expérimentales, le U-69593, un agoniste des récepteurs kappa s'est révélé anxiolytique lors des deux confrontations de l'animal à l'EPM (Wall et Messier, 2000b) . En revanche, l'injection simultanée de pirenzépine et de NorBNI produit chez l'animal un comportement anxieux dans le 1^{er} test et s'avère inactif dans le second , suggérant une interaction directe ou indirecte des ligands Kappa avec le système cholinergique (Wall et Messier, 2000b).

Une autre étude a révélé que le SR141716A, un antagoniste des récepteurs cannabinoïdes CB1, réduisait de façon significative l'anxiété des souris soumises une seconde fois à l'EPM, alors que chez les souris naïves, il était dépourvu d'effet (Rodgers *et al.*, 2003). Une 1^{ère} expérience de l'EPM sensibilise donc les animaux aux effets anxiolytiques du SR141716A dans l'EPM.

Par ailleurs, le système dopaminergique semble également influencer le comportement des rongeurs soumis à deux sessions de tests dans l'EPM (Wall *et al.*, 2003) ; ces travaux seront détaillés ultérieurement.

Toutes ces études étayaient l'hypothèse d'une anxiété de nature différente dans le 1^{er} et le second test et, corroborent les résultats des analyses descriptives factorielles. Les régions et

les systèmes de neurotransmission contrôlant le comportement de l'animal interviennent de façon différente dans un premier test et dans un second test .

Toutefois, cette analyse de la littérature portant sur le test-retest, que nous avons jugée nécessaire avant d'entreprendre notre travail, est quelque peu décevante. Les études sont « disparates » et bien souvent les hypothèses qui en ressortent sont hâtives et ne reposent pas sur des preuves tangibles pour expliquer les modifications comportementales et/ou pharmacologiques. Par ailleurs, certains travaux suggèrent qu'un « test-retest » dans l'EPM sensibilise l'effet de certaines substances inactives lors d'un 1^{er} test (Holmes et Rodgers, 2003 ; Rodgers *et al.*, 2003). Néanmoins, le terme de discrimination ou de détection semble plus approprié que celui de sensibilisation.

2.6. Aires cérébrales impliquées

D'autres aires cérébrales liées au système de peur et de défense, telles que l'hypothalamus médian (Brandao *et al.*, 1986 ; Fuchs et Siegel, 1984 ; Milani et Graeff, 1987), la dlPAG (Bertoglio *et al.*, 2005) et l'amygdale (File *et al.*, 1998b), semblent également moduler la perte d'effet des BZDs lors d'un second test dans l'EPM. En effet, une première étude a montré que l'inactivation de l'hypothalamus dorsomédian de rats par une injection de lidocaïne, connue pour bloquer temporairement l'activité fonctionnelle neuronale (Packard et McGaugh, 1996 ; Salinas *et al.*, 1993), avant le 2^{ème} test, restaure l'effet de type anxiolytique du CDP lors d'un second passage dans l'EPM (File *et al.*, 1999). Néanmoins, cette restauration est partielle. En effet, l'inactivation de l'hypothalamus dorsomédian modifie la composante de fuite (escape) de la réponse, révélée par l'augmentation du temps passé dans les BO, mais n'influence pas la composante « évitement », le pourcentage d'entrées dans les BO restant inchangé ; suggérant que l'hypothalamus dorsomédian joue un rôle important dans les réponses de fuite et un rôle très faible dans les réponses d'évitement (File *et al.*, 1999). Une autre étude, réalisée par la même équipe a montré que l'inactivation réversible du noyau basolatéral de l'amygdale de rats, par la lidocaïne, administrée immédiatement après le 1^{er} test, restaure l'effet anxiolytique du CDP lors d'un second test. Récemment Bertoglio *et al.* (2005) ont observé que de la dlPAG jouait également un rôle dans l'expression du phénomène de tolérance aux BZDs, puisque l'inactivation réversible de cette structure par la lidocaïne

avant le 2^{ème} test, restaure l'effet anxiolytique du midazolam (MDZ) lors d'un second passage dans l'EPM. Bertoglio *et al.* (2005) suggèrent que l'augmentation de l'excitabilité de la dlPAG contrecarre la facilitation de la conduite d'approche des rongeurs produite par le midazolam lors d'un second passage dans l'EPM, entraînant l'apparition du phénomène de la tolérance aux BZD. Les résultats des travaux de Bertoglio et de File montrent l'importance de l'hypothalamus dorsomédian et de la dlPAG dans la restitution (« retrieval ») de l'information, censée être impliquée dans la perte de sensibilité aux BZDs lors du second test. L'administration de lidocaïne dans la dlPAG, avant ou juste après le 1^{er} test, ne s'oppose pas à l'apparition de la tolérance au MDZ. En revanche, lorsqu'elle est administrée avant le 2^{ème} test, le MDZ retrouve son activité anxiolytique (Bertoglio *et al.*, 2005). La dlPAG ne semble donc pas être impliquée dans les processus d'acquisition et de consolidation de l'apprentissage aversif acquis lors de la 1^{ère} exploration du modèle et conduisant à la perte de l'effet anxiolytique des BZDs (Bertoglio *et al.*, 2005). En revanche, le noyau basolatéral de l'amygdale semble être un des sites clé, recruté dans les étapes de consolidation des informations acquises lors du 1^{er} test dans l'EPM, puisque son inactivation juste après le 1^{er} test, prévient la perte d'activité anxiolytique du CDP lors d'un second passage dans l'EPM. File *et al.* (1998b) n'excluent pas pour autant la participation de cette structure cérébrale dans les phénomènes d'acquisition et de mémorisation des informations. Par ailleurs, l'infusion de lidocaïne dans le noyau basolatéral de l'amygdale ne bloque pas totalement le souvenir d'une première exploration de l'EPM (File *et al.*, 1998b). En effet, même si l'inactivation de cette structure s'oppose à l'apparition d'une tolérance aux CDP, elle n'empêche pas pour autant la diminution du pourcentage du temps passé dans les BO par les rats non traités, suggérant que le noyau basolatéral de l'amygdale est essentiel à la consolidation de l'information qui change la nature de l'anxiété lors du second test, mais n'est pas essentielle à la consolidation des autres informations entraînant une réponse de suppression comportementale lors du second test (File *et al.*, 1998b). Ceci rejoint l'étude de Killcross *et al.* (1997) qui a montré que les lésions du noyau basolatéral de l'amygdale n'altèrent pas toutes les variables de l'aversion conditionnée. En effet, de telles lésions altèrent l'évitement d'un stimulus aversif conditionné sans modifier pour autant la réponse de « suppression » comportementale (Killcross *et al.*, 1997). De même, chez les rats traités par une solution saline, l'administration en soi de lidocaïne dans l'hypothalamus dorsomédian et la dlPAG n'augmente pas l'exploration des BO lors du second test dans l'EPM (Bertoglio *et al.*, 2005 ; File *et al.*, 1999). Etant donné que l'inactivation isolée du noyau dorsomédian de l'hypothalamus ou de la dlPAG n'influence pas le comportement du rongeur lors d'un second test dans l'EPM, mais qu'elle restaure l'activité

anxiolytique du CDP ou du MDZ chez les animaux ayant fait l'expérience de l'EPM, il a été suggéré que la réponse des récepteurs aux BZDs, localisés en dehors de ces structures cérébrales peut avoir été modifiée (Bertoglio *et al.*, 2005 ; File *et al.*, 1999). Lors d'un premier test, l'effet anxiolytique des BZDs pourrait s'expliquer par une diminution de l'activité de structures cérébrales contrôlant le comportement défensif, et l'inactivité des BZDs lors d'un second test pourrait être le fruit d'une augmentation de l'activité de ces régions cérébrales, telles que l'hypothalamus dorsomédian et la dlPAG (Bertoglio *et al.*, 2005). Des modifications allostériques rapides des récepteurs aux BZDs-GABA dans les aires de projections hypothalamiques, comme le cortex frontal, l'hippocampe, l'amygdale (Bernardis et Bellinger, 1987 ; LeDoux *et al.*, 1988), la PAG, les noyaux du raphé et du locus coeruleus (Swanson, 1987) pourraient être un mécanisme entraînant la réponse lors du 2^{ème} test et l'insensibilité aux BZDs. La dlPAG envoie des projections descendantes dans la moelle et ascendantes dans l'hypothalamus dorsal (Cameron *et al.*, 1995). Ainsi, la dlPAG pourrait neutraliser l'effet anxiolytique du midazolam lors d'un second test, en influençant les aires motrices de la moelle directement ou indirectement via le système hypothalamo-limbique (Bertoglio *et al.*, 2005). De plus, ces effets pourraient être le résultat d'une diminution de l'activité GABAergique et une augmentation de l'activité excitatrice du système glutamatergique. Bertoglio *et al.* (2005) suggèrent que la dlPAG participe en tant que voie commune finale dans l'expression des réponses de défense (Bertoglio *et al.*, 2005).

2.7. Conclusion

La réexposition des rongeurs à un modèle animal d'anxiété sensibilise le comportement anxieux des animaux et atténue ou abolit l'effet anxiolytique des BZDs. Ces modifications comportementale et pharmacologique sont reproductibles et peu sensibles aux facteurs environnementaux et expérimentaux. Le comportement différent, des souris naïves (non pré-testées) et des souris pré-testées dans l'EPM et dans d'autres modèles animaux d'anxiété semble traduire deux formes distinctes d'anxiété (File, 2001 ; Holmes et Rodgers, 1998). Le protocole de test-retest peut ainsi constituer un modèle d'étude à part entière, indépendant et spécifique, et permettre l'exploration d'une anxiété de nature différente. Le premier test (chez des souris naïves) pourrait constituer un modèle de panique (Graeff *et al.*, 1993) et le protocole de test-retest un modèle de phobie dans lequel les BZDs sont inactives. Les mécanismes apparaissent complexes et semblent impliquer différentes régions cérébrales et différents neurotransmetteurs. Néanmoins aucune hypothèse étiologique tangible ne ressort des différents travaux évoqués précédemment. De plus, le pouvoir « sensibilisant » du protocole de test-retest n'a pas été mis en évidence dans l'EPM. Certains travaux ont néanmoins montré que ce protocole permettait d'augmenter le pouvoir discriminatif de ce test.

IV. MATERIELS ET METHODES

A. Animaux et substances utilisées

1. Animaux

Des souris mâles de la souche Swiss, naïves (provenant du centre d'élevage Janvier, France), pesant entre 20 et 24 g le jour du test, ont été utilisées pour cette étude.

Dès leur arrivée au laboratoire, les souris sont réparties par groupe de 18 dans des cages de 40 cm x 28 cm x 17 cm, où l'animal a libre accès à l'eau et à la nourriture. Les animaux sont hébergés dans l'animalerie (cycle d'éclairage: 12 h de lumière (de 7 à 19 h) et 12h d'obscurité ; température: 21 +/- 1°C ; hygrométrie: 50%) jusqu'à l'expérimentation.

Les règles d'éthique du Ministère Français de l'Agriculture pour l'expérimentation sur les animaux de laboratoire ont été respectées (loi n° 87.848).

2. Substances employées

- Antidépresseurs : **paroxétine** HCl (Smithkline Beecham, France) ; **venlafaxine** HCl (Wyeth, France) ; **milnacipran** HCl (Pierre Fabre, France) ; **imipramine** HCl (RBI, Sigma, France) ; **désipramine** HCl (RBI, Sigma, France), **fluoxétine** HCl (Lilly, France) ; **maprotiline** HCl (RBI, Sigma, France), **trazodone** HCl (UPSA, France) ; **nomifensine** (maléate ; RBI, Sigma, France).
- Ligands GABAergiques : **diazépam** (RBI, Sigma, France) ; **alprazolam** (RBI, Sigma, France) ; **flumazenil** (Tocris, France).

- Ligands des récepteurs 5-HT_{1A} : **buspirone** HCl (Bristol-Myers, France), **8-OH-DPAT**, (±)-8-hydroxy-2-(di-η-propylamino)tétralin (RBI, Sigma, France) ; **WAY 100635**, N-[2-[4-(2-méthoxyphényl)-1-pipérazinyl]-N-2-pyridinylcyclohexane-carboxamide maléate (RBI, Sigma, France).
- Agonistes des récepteurs 5-HT₂ : **DOI** HCl, (±)-2,5-diméthoxy-4-iodoamphétamine (RBI, Sigma, France) ; **BW 723C86** HCl, α-méthyl-5-(2-thienylméthoxy)-1H-indole-3-éthanamine (Tocris, France) ; **RO 60-0175** HCl, (s)-2-(6-chloro-5fluoroindol-1-yl)-1-méthyléthylamine (Roche, France).
- Antagonistes des récepteurs 5-HT₂ : **SR 46349B**, [2-propèn-1-one, 1-(2-fluorophényl)-3-(4-hydroxyphényl)-O-[2-(diméthylamino)éthylloxime] (Sanofi Recherche, France) ; **SB 206553 HCL**, N-3-pyridinyl-3,5-dihydro-5méthyl-benzo[1,2-b:4,5-b']dipyrrole-1[2H]carboxamide (RBI, Sigma, France) ; **RS 10-2221 HCL**, 8-[5-2,4-diméthoxy-5-(4-trifluorométhylphénylsulphonamido)phényl-5-oxopentyl]-1,3,8-triazaspiro[4,5]décane-2,4-dione (Tocris, France).
- Ligands noradrénergiques : **clonidine** (RBI, Sigma, France), **guanabenz** (Tocris, France).
- Ligand muscarinique : **atropine** sulphate (RBI, Sigma, France).
- Ligands dopaminergiques : **R-(+)-SKF 38393**, (±)-1-phényl-2,3,4,5-tétrahydro-(1H)-3-benzazépine-7,8-diol (RBI, Sigma, France) ; **(-)-quinpirole** HCl (Tocris, France) ; **SCH 23390** HCl, ((R)-(+)-7-chloro-8-hydroxy-3-méthyl-1-phényl-2,3,4,5-tétrahydro-1H-3-benzazépine) (Tocris, France) ; **(s)-(-)-sulpiride** (Tocris, France).
- Ligand opioïde : **morphine** HCl (Coopération Pharmaceutique Française, France).

3. Préparations et mode d'administration

La paroxétine, la venlafaxine, l'imipramine, la désipramine, le DOI, le RO 60-0175, le SB 206553, l'atropine, la morphine, la clonidine, le guanabenz, la buspirone, le 8-OH-DPAT, et le WAY 100635 sont dissous dans de l'eau distillée. Les autres substances sont solubilisées dans une solution d'eau distillée contenant 5% de Tween 80 (Merck, Allemagne).

Les différentes substances sont administrées par voie intra-péritonéale (i.p.) ou sous-cutanée (s.c.) selon le mode aigu sous un volume de 0,5 ml/ 20 g de poids corporel, 30 minutes avant le test pour les études d'effets propres 45 minutes (prétraitement) ou 30 minutes (traitement) avant le test pour les études d'interaction et d'association.

B. Les modèles animaux

1. Procédure générale

Les tests sont réalisés dans des pièces calmes. Les souris sont placées dans la salle d'expérimentation 1 heure avant le test, permettant ainsi aux animaux de s'acclimater à ce nouvel environnement et d'éviter les réponses de type néo-phobique(s). Les groupes sont constitués de 8 à 12 souris.

2. Le test d'actimétrie (Boissier et Simon, 1965)

L'actimètre permet de déterminer l'effet d'une substance sur la locomotion d'un animal. Cet appareil est constitué de six compartiments munis de cellules photoélectriques générant deux faisceaux à l'intérieur de chaque enceinte (27 x 22 x 11 cm). L'activité locomotrice de l'animal, reflétée par le nombre de rupture des faisceaux, est mesurée pendant 10 minutes.

3. Le test de la plaque chauffante (Jacob *et al.*, 1974)

Le test de la plaque-chauffante permet d'évaluer les propriétés analgésiques éventuelles de molécules. Ce modèle est constitué d'une plaque métallique chauffante (55°C) sur laquelle repose un cylindre en verre sans fond (13 x 17 cm). Le test consiste à placer l'animal dans le cylindre, à même la plaque chauffante pendant une durée maximale de 120 secondes. La variable mesurée dans ce test est la latence du 1^{er} saut réalisé par l'animal (en seconde). Une dose de 4 mg/kg de morphine, constituant un contrôle positif est testée parallèlement.

4. Le test des quatre-plaques (Aron *et al.*, 1971 ; Boissier *et al.*, 1968)

4.1. Description

Le test des quatre-plaques (FPT) est composé d'une enceinte (18x25x16 cm) dont le fond est constitué de quatre plaques métalliques identiques et rectangulaires (8x11 cm), séparées les unes des autres par un espace de 4 mm (Bioseb, France). Les plaques sont reliées à un générateur de chocs électriques (intensité : 0,6 mA, durée : 0,5 s). La partie supérieure de l'enceinte est fermée par un couvercle transparent afin d'éviter que l'animal ne s'échappe. L'animal est introduit dans l'enceinte et peut l'explorer librement pendant 15 secondes. Puis, passé ce délai, à chaque fois que l'animal passe d'une plaque à l'autre, il reçoit un choc électrique plantaire de faible intensité. Dans ce modèle, on détermine le nombre de chocs délivrés c-à-d de passages punis pendant 1 minute. L'effet des substances anxiolytiques se traduit par une augmentation du nombre de passages punis.



Photographie du test des quatre-plaques

4.2. Procédure de test-retest

Dans ce travail, le protocole de « test-retest » consiste à tester un même animal 2 fois dans le FPT, à un intervalle de 24 heures (schéma 1).

Lors du 1^{er} test (pré-test), chaque souris est identifiée. Le nombre de passages punis de l'animal est comptabilisé au cours du premier et du second test. A l'issue de la 1^{ère} expérimentation, les souris sont réparties en groupes homogènes puis replacées dans l'animalerie. Lors du 2^{ème} test, le comportement de souris naïves (non pré-testées) est étudié parallèlement à celui des souris pré-testées 24h auparavant.

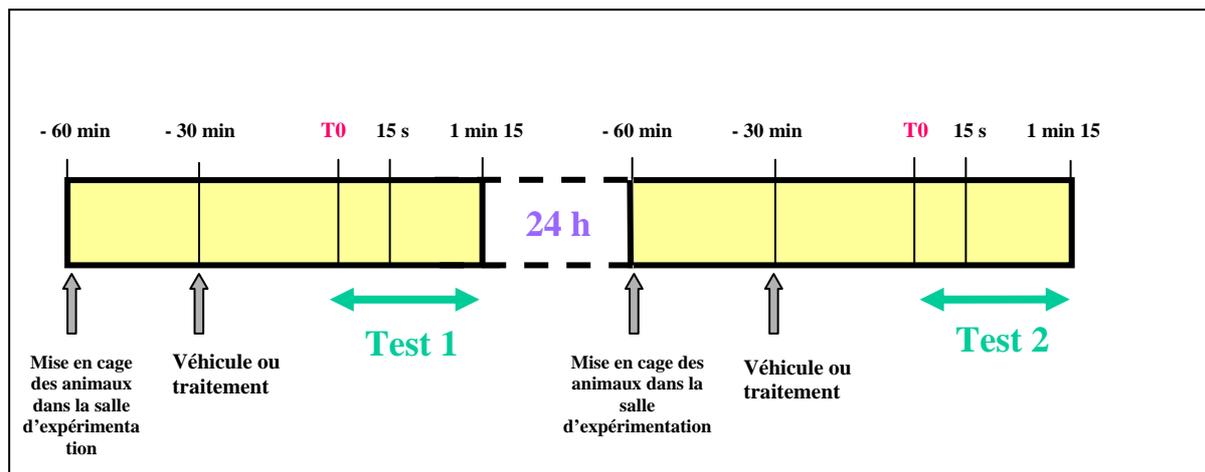


Schéma 1 : Représentation schématique du protocole de « test-retest »

C. Déplétions

1. Réactifs et substances utilisés

6-OH-DA (RBI, Sigma, France) ; paroxétine HCl (Smithkline Beecham, France) ; désipramine HCl (RBI, Sigma, France) ; hydrate de chloral (RBI, Sigma, France), acide ascorbique (Merck, Darmstadt, Allemagne), PCPA (para-chlorophénylalanine ; Sigma, Saint Louis, Etats unis), DSP-4 (N-(2-chloroéthyl)-N-éthyl-2-bromobenzylamine HCl ; Sigma, Saint Louis, Etats unis).

2. Protocoles expérimentaux

2.1. Déplétion en noradrénaline

La lésion du système noradrénergique est réalisée par une administration unique de 50 mg/kg par voie i.p d'une neurotoxine, le DSP-4, 168 heures avant le 1^{er} test dans le FPT (Redrobe *et al.*, 1998 ; Yu *et al.*, 1994).

2.2. Déplétion en sérotonine

La déplétion en 5-HT est obtenue en administrant à l'animal 3 injections i.p. de 300 mg/kg de PCPA [un inhibiteur de la synthèse de 5-HT (Dursun et Handley, 1993)] 72, 48 et 24 heures avant le 1^{er} test (Redrobe *et al.*, 1998)..

2.3. Déplétion en dopamine

La déplétion en DA est réalisée par l'administration bilatérale intra-cérébro-ventriculaire (ICV) de 6-OH-DA, 2 semaines avant le 1^{er} test.

Trente minutes avant l'administration de la 6-OH-DA ou du véhicule (pour les souris contrôles), 20 mg/kg de désipramine et 16 mg/kg de paroxétine sont administrés à l'animal par voie i.p., afin de protéger respectivement les neurones noradrénergiques et sérotoninergiques d'une neurodégénérescence (Bjorklund *et al.*, 1975). Puis les souris sont anesthésiées par une injection i.p. de 400 mg/kg d'hydrate de chloral. Une fois endormies, les souris sont posées sur un appareil à stéréotaxie (Bioseb, France) et maintenues grâce à deux barres placées dans les oreilles de l'animal. La 6-OH-DA (30 µg/µl), dissous dans 0,1% d'acide ascorbique, est ensuite injecté dans les deux ventricules cérébraux (15 µg pour chaque ventricule), grâce à une pompe d'infusion (KDS scientific), à un débit de 0,2 µl/min pendant 2 minutes et 30 secondes. Afin d'éviter l'efflux de la solution injectée, le système d'infusion est maintenu en place pendant 2 minutes. Les coordonnées du Bregma en mm sont les suivantes : antérieure = -0,6, latérale = ± 1,2 et ventrale = -2,2. Une fois opérés, les animaux sont isolés pendant 48 heures dans une cage individuelle. Puis, ils sont placés par groupes de 12 dans l'animalerie. Une période post-opératoire de 14 jours est observée pour que la neurotoxine agisse de façon optimale sur la dégénérescence des neurones dopaminergiques.

D. Analyses statistiques

1. Actimétrie

Les résultats de l'actimétrie sont exprimés en moyenne d'activité locomotrice \pm l'écart standard de la moyenne (SEM). Pour s'assurer que les données suivent une loi normale, un test de Kolmogorof-Smirnov est réalisé. Puis, une ANOVA à 1 facteur est réalisée afin de comparer les groupes traités au groupe contrôle (véhicule). Si celle-ci est significative, un test *a posteriori* de Dunnett est effectué.

2. Test de la plaque chauffante

Les résultats sont exprimés en moyenne du temps de latence du 1^{er} saut (secondes) \pm SEM. La distribution des données est vérifiée au préalable par un test non paramétrique de Kolmogorof-Smirnov. Puis, afin de comparer le groupe contrôle aux groupes traités, une ANOVA à 1 facteur est réalisée. Si celle-ci est significative, un test *a posteriori* de Dunnett est effectué. Les effets de la morphine, incluse comme témoin positif, sont comparés au groupe contrôle par un test t de Student.

3. Test des quatre-plaques

Les résultats sont exprimés en moyenne de passages punis \pm SEM. On vérifie la distribution normale des données en effectuant un test non paramétrique de Kolmogorof-Smirnov.

3.1. Effets propres

Une ANOVA à 1 facteur est réalisée, afin de comparer les groupes traités au groupe contrôle (véhicule). Si celle-ci est significative, un test *a posteriori* de Dunnett est effectué.

Les effets du diazépam, inclus comme témoin positif, sont comparés au groupe contrôle par un test t de Student.

3.2. Test-retest

Concernant les souris testées 2 fois dans le FPT, la comparaison entre le 1^{er} et le 2^{ème} test est réalisée pour chacun des groupes grâce à un test pour échantillons appariés (étude 3).

3.2.1. Sans interaction

L'influence du 1^{er} test sur les effets d'un traitement dans le FPT est réalisée par une ANOVA à 2 facteurs [facteur prétest (oui/non) et facteur traitement], suivie d'un test de Bonferoni (étude 3) ou de Dunnett (autres études), lorsque l'ANOVA est significative. L'objectif était de comparer, les groupes traités (souris naïves ou non) avec les groupes qui ont reçu le véhicule (souris naïves d'une part et souris pré-testées d'autre part). Chez les souris naïves, les effets du diazépam ou de l'alprazolam (étude 3), inclus comme contrôles positifs, sont comparés au groupe qui a reçu le véhicule grâce à un test t de Student.

3.2.2. Avec interaction

L'influence du pré-traitement sur le traitement est réalisée, séparément pour les groupes de souris naïves et pré-testées, par une ANOVA à 2 facteurs (pré-traitement x traitement), suivie d'un test *a posteriori* de Sidak lorsque l'ANOVA est significative. Chez les souris naïves, les effets du diazépam sont comparés au groupe qui a reçu le véhicule grâce à un test t de Student.

Les différences sont considérées significatives lorsque $p \leq 0,05$.

Les analyses sont effectuées par le programme SPSS 10.0 pour ordinateur compatible IBM.

V. RESULTATS

A. Etude 1 : Le test des quatre-plaques, un modèle d'anxiété ou d'analgésie ?

1. Objectif de l'étude

Divers systèmes de neurotransmission, tels que le système GABAergique, sérotoninergique, dopaminergique et opioïde sont impliqués non seulement dans les états anxieux, mais également dans la nociception (pour revue : Millan, 2002 ; 2003). Le système de nociception peut être activé par une variété de stimuli stressants comme les chocs plantaires, la défaite sociale et la stimulation de la PAG chez le rat (Fardin *et al.*, 1984 ; Grisel *et al.*, 1993 ; Sowards et Sowards, 2002). Etant donné que dans le FPT, les souris reçoivent un choc électrique plantaire de faible intensité (0,6 mA), une ambiguïté persiste quant à la nature de l'effet anti-punition de molécules anxiolytiques observé dans ce modèle. Certains auteurs suggèrent toutefois une indépendance entre l'analgésie et les états anxieux (Borges *et al.*, 1988).

L'objectif de cette étude était de comparer les effets de substances, possédant des mécanismes d'action différents, dans le FPT et le test de la plaque chauffante, un modèle animal d'analgésie. Ceci, afin de distinguer l'effet de type anxiolytique observé dans le FPT d'une quelconque altération de la sensibilité de la douleur.

Nous avons choisi d'étudier de nombreuses substances dans le test de la plaque chauffante à des doses anxiolytiques, anxiogènes et/ou inactives. Deux BZDs, le diazépam et l'alprazolam, divers ADs au mécanisme d'action différent [des IRSSs (paroxétine et fluoxétine), des IRSNs (imipramine, milnacipran et venlafaxine), des inhibiteurs sélectifs de la recapture de la NA (désipramine et maprotiline), un inhibiteur de la recapture de la 5-HT et antagoniste des récepteurs 5-HT_{2A} (trazodone) et un inhibiteur de la recapture de la DA (nomifensine)] (étude 1a). Des ligands dopaminergiques (SKF 38393, un agoniste des

récepteurs D_1 ; SCH 23390, antagoniste des récepteurs D_1 ; quinpirole, un agoniste des récepteurs D_2 ; sulpiride antagoniste des récepteurs D_2) et des ligands noradrénergiques (clonidine, un agoniste des récepteurs α , guanabenz, un agoniste spécifique des récepteurs α_2) ont également été étudiés dans le test de la plaque chauffante (étude 1b). Les différents résultats ont été comparés à ceux obtenus dans cette étude ou précédemment dans le FPT .

2. Résultats

2.1. Etude 1a

Ripoll N, Hascoët M, Bourin M. The four-plate test: anxiolytic or analgesic paradigm? *Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry*, in press

The four-plate test: anxiolytic or analgesic paradigm?

Nadège Ripoll, 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

* corresponding author

Phone: +33-2-40412852

Fax: +33-2-40412856

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

Abstract

The four-plates test (FPT) is an animal model of anxiety in which the exploration of the novel surroundings is suppressed by the delivery of a mild electric foot shock. The antinociceptive system has been reported to be activated by a variety of stressful stimuli such as footshock. The present study was thus designed to compare effects of drugs in the FPT and in the hot-plate test (an animal model of pain), in order to disambiguate the drug-induced anti-punishment effects obtained in the FPT from alterations in pain sensitivity. Various compounds, known to be implicated in anxiety states as well as nociception, have been studied. Although morphine induced a strong antinociceptive effect, it did not modify the number of shocks received in the FPT. Alprazolam and diazepam induced an anxiolytic-like effect in the FPT, at doses that did not induce any effect in the hot-plate test. The antidepressants previously reported anxiogenic (desipramine, maprotiline) in the FPT, were found to be analgesic at the same doses. Milnacipran, venlafaxine, and paroxetine did not modify the pain threshold, whereas they have previously been shown to induce anxiolytic-like effects in the FPT. The dopaminergic antidepressant agent nomifensine was without effect on both tests. Our results suggest that the reported drug-induced anti-punishment effects in the FPT are not related to modifications of pain threshold but to a pure anxiolytic-like effect.

Keywords: Antidepressants ; Aversive states ; Benzodiazepines ; Four-plate test ; Hot-plate test ; Nociception

Abbreviations: AD(s), antidepressant(s) ; BZD(s), benzodiazepine(s) ; FPT, four-plates test ; GABA, gamma-aminobutyric acid ; 5-HT, 5-hydroxytryptamine, serotonin ; NA, noradrenaline ; PAG, periaqueductal gray ; SSRI(s), selective serotonin reuptake inhibitor(s) ; SNRI serotonin and noradrenaline reuptake inhibitor(s).

1. Introduction

The four-plates test (FPT) is an animal model of anxiety based on spontaneous response (Aron et al., 1971). Animals are exposed to a novel environment. The exploration of this novel surroundings is suppressed by the delivery of mild electric foot shock contingent to quadrant crossing. Animal can only escape from this aversive situation by remaining motionless (passive avoidance). This model of conditioned fear presents several advantages. It is a simple and quick procedure and there is no need for prior training of animals. In this test, benzodiazepines (BZDs) induce a strong anti-punishment effect, which has been proposed to reflect their anxiolytic activity (Bourin et al., 1992). The FPT also allows the detection of anxiolytic effects of other non-BZD anxiolytic compounds such as selective serotonin (5-HT) reuptake inhibitors (SSRI) or mixed serotonin and noradrenaline (NA) reuptake inhibitors (SNRI) (Hascoët et al., 2000). Substance P and opioid systems as well as others systems, such as serotonergic, noradrenergic, GABAergic, dopaminergic systems, are implicated in nociception as well as in anxiety states. The antinociceptive system can also be activated by a variety of stressful stimuli such as footshock and social defeat (Grisel et al., 1993) and stimulation of the periaqueductal gray (PAG) in rat (Fardin et al., 1984). Since mice receive electric foot shock, it is possible that an analgesic action could account for the effects observed in the FPT. However, antidepressants (ADs) with different mechanisms of action, which are known to have analgesic properties (Yokogawa et al., 2002) are not active in the FPT (i.e.: fluoxetine, imipramine) (Hascoët et al., 2000). Furthermore, the antidepressants (tricyclics, SSRIs, SNRIs) which possess analgesic properties are active in the treatment of chronic pain in human (Sindrup and Jensen, 1999) but not in acute pain. A direct activation of the endogenous opioid system or potentiation of the analgesic effect mediated by serotonergic and/or noradrenergic pathways or combinations of both are thought to be involved in their anti-nociceptive effect (Duman et al., 2004). Debate exists as to the nature of

antidepressant-induced anti-nociception (Gray et al., 1998). In animal experiments and clinical studies, administration of ADs has yielded confusing results reporting anti-nociceptive or no effects (Otsuka et al., 2001). Studies have revealed the presence of at least four types of 5-HT receptors in the spinal cord (5-HT₁, 5-HT₂, 5-HT₃ and 5-HT₄) (Millan, 2002). However, the exact nature of receptors involved in the 5-HT modulation of pain in the spinal cord remains to be elucidated (Bardin et al., 2000) and controversies exist concerning the possible role played by these receptors (Xu et al., 1994). For example, activation of the 5-HT₂ receptors has been both reported to facilitate and to inhibit the transmission of the nociceptive impulse (Eide and Hole, 1991).

Several lines of evidence indicate interactions between the opioid and GABAergic systems and suggest that acute activation of supraspinal GABA_A receptors antagonises morphine-induced analgesia (Rady and Fujimoto, 1993). The acute administration of BZDs increased the pain threshold in rats (Wuster et al., 1980). Evidence exists that the interplay of BZDs and morphine on anti-nociception depends upon the BZD ligand, dose, mode of administration (acute or repeated) (Wala et al., 2001) and tests used (Rosland et al., 1990).

The hot-plate test is a behavioural model of nociception where organized behaviours such as hind paw-licking and jumping are elicited following noxious thermal stimulus. These reactions are controlled by supraspinal mechanisms. Licking is a rapid response elicited by painful thermal stimuli that is a direct indicator of nociceptive threshold (Espejo and Mir, 1993). In contrast, jumping represents a more elaborated response with a longer latency and encompasses an emotional component of escaping (Espejo et al., 1994). Some studies suggest that analgesia and the behavioural manifestations have different neurochemical substrates or that neuronal systems such as PAG in the rat may be independently triggered during the aversive state and the analgesia (Borges et al., 1988). Unpublished results in our laboratory

have previously shown that at anxiolytic doses in the FPT, BZDs and ADs do not modify pain sensitivity in the hot-plate test.

The present study was thus designed to compare drug effects in the FPT and in the hot-plate test, in order to disambiguate drug-induced anti-punishment effects obtained in the FPT from alterations in pain sensitivity and to confirm our previous unpublished data. We have thus studied various compounds in the hot-plate test at anxiolytic and/or anxiogenic and/or inactive doses in the FPT: BZDs, such as diazepam and alprazolam and ADs with different mechanisms of action [SNRIs (imipramine, milnacipran and venlafaxine), selective noradrenalin reuptake inhibitors (desipramine and maprotiline), 5-HT_{2A} antagonist/serotonin reuptake inhibitor (trazodone), SSRIs (paroxetine and fluoxetine) and the dopamine reuptake inhibitor (nomifensine)]. The hot-plate results are compared with results previously obtained in the FPT (for ADs) (Hascoët et al., 2000). Furthermore, the effects of morphine and nomifensine in the FPT were compared with results in the hot-plate test. The locomotor activity, previously (Bourin et al., 1992 ; 1996 ; 2005 ; David et al., 2003 ; Redrobe et al., 1998) or not determined, was also discussed.

2. Methods

2.1. Animals

Male mice (Swiss strain) (Centre d'élevage Janvier, France) weighing 20-24g were used throughout this study. They were housed in groups of 18 per cage (40 cm x 28 cm x 17 cm) on 12:12 light: dark cycle (light on 0700 hours) and had free access to food and water. The ambient temperature of the room was maintained at $21 \pm 1^\circ\text{C}$ and the humidity was 50%.

Experimental groups were composed of 8 to 12 mice. All experiments were performed according to the guidelines of the French Ministry of Agriculture for experiments with laboratory animals (law n° 87 848). Testing was performed between 09:00 and 13:00 hours.

2.2. Drugs

Diazepam (RBI, Sigma, France) ; alprazolam (RBI, Sigma, France) ; paroxetine HCl (Smithkline Beecham, France) ; venlafaxine (Wyeth, France) ; milnacipran (Pierre Fabre, France) ; imipramine HCl (RBI, Sigma, France) ; desipramine (RBI, Sigma, France), fluoxetine (Lilly, France) ; maprotiline (RBI, Sigma, France), trazodone (UPSA) ; nomifensine (RBI, Sigma, France) and morphine HCl (MO) (Coopération Pharmaceutique Française, France) were used.

Paroxetine, venlafaxine and morphine were dissolved in distilled water and all other compounds were dissolved in a 5% concentration of Tween-80. All drugs or vehicle were administered intraperitoneally (i.p.) 30 min before the test in a volume of 0.5 ml/20 g of body weight.

2.3. 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 (27 x 22 x 11 cm) 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.

2.4. The Hot-plate Test (Jacob et al., 1974)

This test evaluates the analgesic potential of molecules (selective suppression of pain). The animal is placed on the metal plate heated to 55°C surrounded by a glass cylinder (13 x 17 cm). The latency (in seconds) of the first jumping is measured. A cut-off time of 2 minutes is applied. Morphine (4 mg/kg) is used as an internal standard.

2.5. The FPT (Aron et al., 1971) (BIOSEB, France)

This apparatus consists of a cage (18 x 25 x 16 cm) floored by four identical rectangular metal plates (8 x 11 cm) separated from one another by a gap of 4 mm. The plates are connected to a device that can generate electric shocks (0.6 mA, 0.5 s). The top of the cage is covered by a transparent perspex lid that prevents escape behaviour. Following a 15 s habituation period, the animal is subjected to an electric shock during each crossing from one plate to another. The number of crossings is recorded during a 1-min test period.

2.6. Statistical analysis

All behavioural data are presented as means \pm S.E.M. The normal distribution of data was verified by a Kolmogorof–Smirnov test. Comparisons between treated and the control groups were conducted using a one-way analysis of variance (ANOVA), followed by a Dunnett's test if ANOVA was significant ($P < 0.05$). The comparison between the saline treated group and the diazepam (for the FPT) or morphine (for the hot-plate test) treated group were performed by a Student's *t* test.

All analyses were conducted using the SPSS program (version 10.1) for IBM compatible computers.

3. Results

3.1. Spontaneous locomotor activity

3.1.1. Effect of morphine

Morphine did not modify the locomotor activity ($F_{(3,32)} = 1.20$, $p > 0.05$) (Table 1).

3.1.2. Effect of trazodone

Trazodone decreased the locomotor activity at the dose of 16 mg/kg ($F_{(4,55)} = 3.93$, $p < 0.01$; $p < 0.01$ after a Dunnett's posthoc test) (Table 1).

3.1.3. Effect of nomifensine

Nomifensine increased the locomotor activity at the doses of 8 and 16 mg/kg ($F_{(5,66)} = 16.52$, $p < 0.001$; $p < 0.001$ and $p < 0.01$ respectively after a Dunnett's posthoc test) (Table 1).

3.2. Hot-plate

3.2.1. Effect of morphine in the hot-plate

Morphine increased the latency of the first jumping at doses of 4 ($p < 0.05$) and 8 mg/kg ($p < 0.01$) ($F_{(3,36)} = 3.97$, $p < 0.05$) (Fig 1).

3.2.2. Effects of drugs acting on the GABAergic system

Diazepam increased the latency of the first jumping at doses of 0.25 ($p < 0.05$) and 2 mg/kg ($p < 0.01$) ($F_{(5,53)} = 4.20$, $p < 0.01$), alprazolam at 1 and 2 mg/kg ($p < 0.05$) ($F_{(5,53)} = 7.23$, $p < 0.01$) (Table 2).

3.2.3. Effects of antidepressants

Fluoxetine (1 to 16 mg/kg), milnacipran (1 to 16 mg/kg), venlafaxine (1 to 16 mg/kg), paroxetine (1 to 16 mg/kg), imipramine (1 to 16 mg/kg) and nomifensine (1 to 16 mg/kg) did not modify the latency of the first jumping in comparison with controls (respectively: $F_{(5,53)} = 2.063$, $p > 0.05$; $F_{(5,53)} = 1.79$, $p > 0.05$; $F_{(5,54)} = 4.32$, $p < 0.01$, $p > 0.05$ (for all tested doses) after post hoc analysis; $F_{(5,53)} = 2.015$, $p > 0.05$; $F_{(5,54)} = 1.53$, $p > 0.05$; $F_{(5,54)} = 1.66$, $p > 0.05$) (Table 3). Desipramine only increased the latency of the first jumping at 16 mg/kg ($p < 0.05$) ($F_{(4,45)} = 3.56$, $p < 0.05$) (Table 3) while maprotiline increased the latency of the first jumping at doses of 8 ($p < 0.05$) and 16 mg/kg ($p < 0.01$) ($F_{(4,43)} = 4.51$, $p < 0.01$) (Table 3). Trazodone increased the latency of the first jumping at all doses between 2 mg/kg and 16 mg/kg, ($F_{(5,54)} = 42.97$, $p < 0.01$) (Table 3). Morphine (4 mg/kg) included as a positive control also increased the latency of the first jumping ($p < 0.01$, by Student's t test).

3.3. Four-plates test

3.3.1. Effect of morphine on mouse behaviour in the FPT

Morphine (1-8 mg/kg) did not modify punished responding in comparison with controls in the dose range tested in Swiss mice ($F_{(4,45)} = 1.76$, $p > 0.05$) (Fig 2). Diazepam included as a positive control increased the number of punished passages in mice ($p < 0.01$ by Student's t test).

3.3.2 Effect of nomifensine on mouse behaviour in the FPT

Nomifensine did not modify punished crossings in mice ($F_{(5,54)} = 1.88$; $p > 0.05$) (Fig 3).

Diazepam included as a positive control increased the number of punished passages in mice ($p < 0.01$ by Student's t test).

4. Discussion

4.1. Effect of morphine

As expected, morphine induced strong anti-nociceptive effects in the hot-plate test for doses that did not induce any effect in the actimeter test. μ -, κ - and δ -receptors have been shown to be implicated in the opioid mediated pain circuitry (Gaveriaux-Ruff and Kieffer, 2002). Stressful environmental events have been reported to activate endogenous mechanisms of pain inhibition (Grisel et al., 1993). In fact, defeat/scent exposure are associated with a peak anti-nociceptive response immediately after testing (Randall and Rodgers, 1988). Furthermore, a 5-min exposure to the elevated plus maze induces an increase in tail-flick latency in mice (Lee and Rodgers, 1990). Some studies have suggested the involvement of opioid mechanisms in the modulation of escape reactions (Terman et al., 1984). Sutton et al. (1997) revealed that exposure of rats to inescapable shock potentiated the analgesic response to a low dose of morphine (1 mg/kg) 24 h later. However, other studies support the involvement of non-opioid substrates in the pain inhibition induced for example by exposure to the elevated plus maze (Lee and Rodgers, 1990) or defeat experience (Randall and Rodgers, 1988). Moreover, as found in our study, at doses active in alleviating pain in various tests, morphine did not increase the number of shocks received in the FPT (Table 4) (Boissier et al., 1968). Similarly, μ opioid agonists (such as morphine) exerted negligible activity in the Vogel conflict test and only weak and variable actions in the Geller-Seifter conflict model (Millan, 2003). However, some anxiolytic-like effects have been reported to be induced by κ -opioid receptor ligands in the elevated plus maze (Privette and Terrian, 1995). Furthermore, mice deprived of μ -receptors showed an anxiolytic phenotype (Kieffer and Gavériaux-Ruff, 2002), probably due to a relief of the tonic inhibitory influence of μ -

opioid receptors upon limbic populations of GABAergic interneurons (Millan, 2003). Our results also suggest, as other works (Fanselow, 1986 ; Nobre et al., 2000), that the neural substrates underlying the defence reaction in the FPT and nociception are independent.

4.2. Effects of benzodiazepines

Our results show an anti-nociceptive effect for alprazolam at the highest doses tested (1 and 2 mg/kg) and for diazepam at doses of 0.25 and 2 mg/kg. Previous works have shown that BZDs significantly inhibit anti-nociceptive effects of a range of environmental stimuli such as footshock (Drugan et al., 1984). However, there are conflicting reports on the ability of BZDs to induce anti-nociceptive effects (Gatch, 1999 ; Nadeson et al., 1996). Furthermore diazepam induces a dose-dependent attenuation of the effect of opiates in various animal models of pain, such as tail-flick and hot-plate tests (Pakulska and Czarnecka, 2001 ; Rosland and Hole, 1990). However, the data of interaction studies between BZDs and opioids are contradictory. On one hand, BZDs have been reported to antagonise morphine-induced analgesia in the hot plate (Luger et al., 1994) and tail-flick tests (Rady and Fujimoto, 1993) at supraspinal level. On the other hand, BZDs can potentialise morphine-induced analgesia in the spinal cord in the hot plate (Yanez et al., 1990) and tail-flick tests (Pick, 1997). With the exception of the 0.25 mg/kg dose for diazepam, alprazolam and diazepam, have both been found previously to decrease spontaneous locomotor activity (Table 4) and to induce a strong dose-dependent myorelaxation at the doses effective in the hot-plate test (Bourin et al., 1992). These effects may account for the results obtained in the hot-plate test (Table 4). Furthermore, in previous studies conducted in the FPT, alprazolam was found to be anxiolytic from 0.25 to 1 mg/kg and diazepam at 1 and 2 mg/kg (Bourin et al., 1992 ; Table 4). In contrast, to the hot-plate test, anxiolytic-like effects of these BZDs observed in the FPT were not altered by their

sedative and myorelaxation properties. The anti-nociceptive effects of these BZDs are therefore questionable. Only the effect induced by diazepam 0.25 mg/kg may thus represent a pure anti-nociceptive effect in the hot-plate test. In addition this dose has not been found to induce anxiolytic-like effect in the FPT (Bourin et al., 1992).

This suggests that GABAergic anxiolytic and anti-nociceptive processes are triggered differently, each being dependent on different doses and/or brain regions. The anti-punishment effect of the two BZDs studied can thus not be attributed to an anti-nociceptive effect. This is consistent with other reports of the independence of anti-nociception and behavioural defensive mechanisms (Borges et al., 1988).

4.3. Effects of antidepressants

Only the NA reuptake inhibitors (desipramine and maprotiline) and the 5-HT_{2A} antagonist/ 5-HT reuptake inhibitor trazodone induced analgesia in the hot-plate test. The SSRIs and SNRIs were found to be without effect. Trazodone induced a particularly strong dose-dependent anti-nociceptive effect. These results are in agreement with earlier studies showing anti-nociceptive activity for desipramine (Fasmer et al., 1989 ; Otsuka et al., 2001), maprotiline (Yokogawa et al., 2002) and trazodone (Okuda et al., 2003 ; Schreiber et al., 2000) in thermal, mechanical and/or chemical pain tests. However, not all studies have found anti-nociceptive effects for desipramine in the hot plate (Lund et al., 1990) or maprotiline in the formalin tests (Ardid et al., 1992). Numerous studies which have reported anti-nociceptive effects for imipramine (Abdel-Salam et al., 2003 ; Spiegel et al., 1983), the SNRIs, milnacipran (Yokogawa et al., 2002), and venlafaxine (Schreiber et al., 1999) and the SSRIs fluoxetine (Abdel-Salam et al., 2003 ; Singh et al., 2001) and paroxetine (Duman et al., 2004 ;

Gray et al., 1999) in various pain models are in disagreement with our findings. This discrepancy might be attributable to different experimental conditions and variables measured, noxious stimuli, doses administered, species and strain used. Indeed, some studies revealed only weak effects (Shin et al., 2004 ; Yokagawa et al., 2002). According to clinical data, a noradrenergic action is thought to be analgesic while a serotonergic action as produced by the SSRIs, for example is ineffective (Atkinson et al., 1999) excepted at very high plasma concentrations (Sindrup et al., 1991). In general, monoamine reuptake inhibitors are more effective in chronic than acute pain (Shin et al., 2004). Increased levels of monoamines in the synaptic cleft are therefore presumed to lead to changes in pain thresholds and induce anti-nociception (Yokogawa et al., 2002). However, the nature of antidepressant-induced anti-nociception is debated (Gray et al., 1998). A direct activation of the endogenous opioid system or potentiation of an analgesic effect mediated by serotonergic and/or noradrenergic pathways (Gray et al., 1999) or combinations of these are thought to be involved in their anti-nociceptive effect (Duman et al., 2004). Moreover, dopamine is implicated in modulation of pain response via supraspinal mechanisms (Hagelberg et al., 2004 ; Magnusson and Fischer, 2000). However, our results show that nomifensine did not modify the latency of the first jumping in comparison with control group. In contrast to our results, there are reports that nomifensine can induce analgesia in the hot-plate test (Takahashi and Paz, 1987) and in the acetic-acid writhing test (Takahashi and Paz, 1987 ; Gonzalez et al., 1980). However, a more recent study, consistent with our results failed to show any nomifensine-induced anti-nociceptive effect in the hot-plate test (Gilbert and Franklin, 2001).

Interestingly, the compounds found to be analgesic in the hot-plate test (desipramine, maprotiline and trazodone) were also found to be either anxiogenic or without any effect (trazodone) in the FPT (Hascoët et al., 2000) at the same doses (Table 5). These compounds have not been shown to modify the locomotor activity, excepted trazodone which decreased it

at the only dose of 16 mg/kg (Table 5). Thus, excepted for this last, antinociceptive and anxiogenic-like effects are not triggered by a shift in locomotion. On the contrary, ADs reported to be without effect in the hot-plate test have been previously found to be anxiolytic in the FPT (Hascoët et al., 2000) (Table 5). These drugs have not been shown to produce a shift in locomotion, except venlafaxine at the highest dose (16 mg/kg) which increased it (Redrobe et al., 1998) (Table 5). The antidepressants-induced effects in the FPT are also pure anxiolytic-like effects, except at the doubtful dose of 16 mg/kg of venlafaxine. Only fluoxetine, imipramine and nomifensine did not have any effect on the nociceptive threshold, the number of punished passages in the FPT (Hascoët et al., 2000) and on locomotion, except nomifensine at higher doses (8 and 16 mg/kg) which increased the locomotor activity (Table 5). In the hot-plate test and under our experimental conditions, it is possible that SSRIs, SNRIs did not target supraspinal level structures explaining also their lack of effect. Moreover, the variety of reported effects for all ADs may be explained by the fact that they have varying affinities for target receptors (Gray et al., 1999 ; Otsuka et al., 2001 ; Schreiber et al., 1999 ; 2000 ; Yokogawa et al., 2002) and for inhibiting neuronal uptake of the neurotransmitters (Sanchez and Hyttel, 1999). It can be postulated that nociceptive effect induced by desipramine, trazodone and maprotiline are mediated by adrenoceptor activation rather than 5-HT or opioid receptors. In view of the absence of a relation between anti-nociceptive and anti-punishment effects and inconsistent results on the ability of ADs to induce analgesia in various pain models, we suggest that analgesia and anti-aversive effects are completely independent. The anti-punishment effects obtained in the FPT following acute administration of ADs cannot be attributed to analgesia or increased-locomotor activities.

5. Conclusion

In summary, if the neural substrates for aversion and pain were the same, then one would expect that anxiolytic and anxiogenic compounds would respectively produce increase or decrease of pain threshold. But, our results show no relation between anti-nociceptive and anti-punishment effects. It can thus be inferred that, although the neurotransmitters are implicated not only in pain but also in aversive mechanisms, they act through different pathways, in different brain areas and/or receptors according to the situation. Finally, taking into account the inconsistencies of data among the various pain models, the ability of various drugs to modify pain threshold independently of behavioural defensive mechanisms (Borges et al., 1988 ; Prado and Roberts, 1985) leads us to suggest that the reported drug-induced anti-punishment effect in the FPT cannot be attributed to modification of the pain threshold but to a pure anxiolytic-like effect.

Acknowledgements

The authors thank Marie-Noëlle Hervé and Marie-Claude Colombel for their help.

References

Abdel-Salam, O.M., Nofal, S.M., El-Shenawy, S.M., 2003. Evaluation of the anti-inflammatory and anti-nociceptive effects of different antidepressants in the rat. *Pharmacol. Res.* 48, 157-165.

Ardid, D., Marty, H., Fialip, J., Privat, A.M., Eschalier, A., Lavarenne, J., 1992. Comparative effects of different uptake inhibitor antidepressants in two pain tests in mice. *Fundam. Clin. Pharmacol.* 6, 75-82.

Aron, C., Simon, P., Larousse, C., Boissier, J.R., 1971 Evaluation of a rapid technique for detecting minor tranquilizers. *Neuropharmacology* 10, 459-469.

Atkinson, J.H., Slater, M.A., Wahlgren, D.R., Williams, R.A., Zisook, S., Pruitt, S.D., Epping-Jordan, J.E., Patterson, T.L., Grant, I., Abramson, I., Garfin, S.R., 1999. Effects of noradrenergic and serotonergic antidepressants on chronic low back pain intensity. *Pain* 83, 137-145.

Bardin, L., Lavarenne, J., Eschalier, A., 2000. Serotonin receptor subtypes involved in the spinal antinociceptive effect of 5-HT in rats. *Pain* 86, 11-18.

Boissier, J.R., Simon, P., 1965. Action of caffeine on the spontaneous motility of the mouse. *Arch. Int. Pharmacodyn. Ther.* 158, 212-221.

Boissier, J.R., Simon, P., Aron, C., 1968. A new method for rapid screening of minor tranquilizers in mice. *Eur. J. Pharmacol.* 4, 145-151.

Borges, P.C., Coimbra, N.C., Brandao, M.L., 1988. Independence of aversive and pain mechanisms in the dorsal periaqueductal gray matter of the rat. *Braz. J. Med. Biol. Res.* 21, 1027-1031.

Bourin, M., Redrobe, J.P., Hascoët, M., Baker, G.B., Colombel, M.C., 1996. A schematic representation of the psychopharmacological profile of antidepressants. *Prog. Neuropsychopharmacol. Biol. Psychiatry* 20, 1389-1402.

Bourin, M., Hascoët, M., Mansouri, B., Colombel, M.C., 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.

Bourin, M., Masse, F., Dailly, E., Hascoët, M., 2005. Anxiolytic-like effect of milnacipran in the four-plate test in mice: Mechanism of action. *Pharmacol. Biochem. Behav.* 81, 645-656.

David, D.J., Renard, C.E., Jolliet, P., Hascoët, M., Bourin, M., 2003. Antidepressant-like effects in various mice strains in the forced swimming test. *Psychopharmacology* 166, 373-382.

Drugan, R.C., Ryan, S.M., Minor, T.R., Maier, S.F., 1984. Librium prevents the analgesia and shuttlebox escape deficit typically observed following inescapable shock. *Pharmacol. Biochem. Behav.* 21, 749-754.

Duman, E.N., Kesim, M., Kadioglu, M., Yaris, E., Kalyoncu, N.I., Erciyes, N., 2004. Possible involvement of opioidergic and serotonergic mechanisms in antinociceptive effect of paroxetine in acute pain. *J. Pharmacol. Sci.* 94, 161-165.

Eide, P.K., Hole, K., 1991. Different role of 5-HT_{1A} and 5-HT₂ receptors in spinal cord in the control of nociceptive responsiveness. *Neuropharmacology* 30, 727-731.

Espejo, E.F., Mir, D., 1993. Structure of the rat's behaviour in the hot plate test. *Behav. Brain Res.* 56, 171-176.

Espejo, E.F., Stinus, L., Cador, M., Mir, D., 1994. Effects of morphine and naloxone on behaviour in the hot plate test: an ethopharmacological study in the rat. *Psychopharmacology* 113, 500-510.

Fanselow, M.S., 1986. Conditioned fear-induced opiate analgesia: a competing motivational state theory of stress analgesia. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 467, 40-54.

Fardin, V., Oliveras, J.L., Besson, J.M., 1984. A reinvestigation of the analgesic effects induced by stimulation of the periaqueductal gray matter in the rat. I. The production of behavioral side effects together with analgesia. *Brain Res.* 306, 105-123.

Fasmer, O.B., Hunskar, S., Hole, K., 1989. Antinociceptive effects of serotonergic reuptake inhibitors in mice. *Neuropharmacology* 28, 1363-1366.

Gatch, M.B., 1999. Effects of benzodiazepines on acute and chronic ethanol-induced nociception in rats. *Alcohol Clin. Exp. Res.* 23, 1736-1743.

Gaveriaux-Ruff, C., Kieffer, B.L., 2002. Opioid receptor genes inactivated in mice: the highlights. *Neuropeptides* 36, 62-71.

Gilbert, A.K., Franklin, K.B.J., 2001. Characterization of the analgesic properties of nomifensine in rats. *Pharmacol. Biochem. Behav.* 68, 783-787.

Gonzalez, J.P., Sewell, R.D., Spencer, P.S., 1980. Antinociceptive activity of opiates in the presence of the antidepressant agent nomifensine. *Neuropharmacology* 19, 613-618.

Gray, A.M., Spencer, P.S., Sewell, R.D., 1998. The involvement of the opioidergic system in the antinociceptive mechanism of action of antidepressant compounds. *Br. J. Pharmacol.* 124, 669-674.

Gray, A.M., Pache, D.M., Sewell, R.D., 1999. Do alpha2-adrenoceptors play an integral role in the antinociceptive mechanism of action of antidepressant compounds? *Eur. J. Pharmacol.* 378, 161-168.

Grisel, J.E., Fleshner, M., Watkins, L.R., Maier, S.F., 1993. Opioid and nonopioid interactions in two forms of stress-induced analgesia. *Pharmacol. Biochem. Behav.* 45, 161-172.

Hagelberg, N., Jaaskelainen, S.K., Martikainen, I.K., Mansikka, H., Forssell, H., Scheinin, H., Hietala, J., Pertovaara, A., 2004. Striatal dopamine D2 receptors in modulation of pain in humans: a review. *Eur. J. Pharmacol.* 500, 187-192.

Hascoët, M., Bourin, M., Colombel, M.C., Fiocco, A.J., Baker, G.B., 2000. Anxiolytic-like effects of antidepressants after acute administration in a four-plate test in mice. *Pharmacol. Biochem. Behav.* 65, 339-344.

Jacob, J.J., Tremblay, E.C., Colombel, M.C., 1974. Enhancement of nociceptive reactions by naloxone in mice and rats. *Psychopharmacologia* 37, 217-223.

Kieffer, B.L., Gaveriaux-Ruff, C., 2002. Exploring the opioid system by gene knockout. *Prog. Neurobiol.* 66, 285-306.

Lee, C., Rodgers, R.J., 1990. Antinociceptive effects of elevated plus-maze exposure: influence of opiate receptor manipulations. *Psychopharmacology* 102, 507-513.

Luger, T.J., Hayashi, T., Lorenz, I.H., Hill, H.F., 1994. Mechanisms of the influence of midazolam on morphine antinociception at spinal and supraspinal levels in rats. *Eur. J. Pharmacol.* 271, 421-431.

Lund, A., Tjolsen, A., Hole, K., 1990. Antinociceptive effect of intrathecally-administered desipramine and zimelidine in rats. *Neuropharmacology* 29, 819-823.

Magnusson, J.E., Fisher, K., 2000. The involvement of dopamine in nociception: the role of D(1) and D(2) receptors in the dorsolateral striatum. *Brain Res.* 855, 260-266.

Millan, M.J., 2002. Descending control of pain. *Prog. Neurobiol.* 66, 355-474.

Millan, M.J., 2003. The neurobiology and control of anxious states. *Prog. Neurobiol.* 70, 83-244.

Nadeson, R., Guo, Z., Porter, V., Gent, J.P., Goodchild, C.S., 1996. Gamma-aminobutyric acidA receptors and spinally mediated antinociception in rats. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 278, 620-626.

Nobre, M.J., Ribeiro dos Santos, N., Aguiar, M.S., Brandao, M.L., 2000. Blockade of mu- and activation of kappa-opioid receptors in the dorsal periaqueductal gray matter produce defensive behavior in rats tested in the elevated plus-maze. *Eur. J. Pharmacol.* 404, 145-151.

Okuda, K., Takanishi, T., Yoshimoto, K., Ueda, S., 2003. Trazodone hydrochloride attenuates thermal hyperalgesia in a chronic constriction injury rat model. *Eur. J. Anaesthesiol.* 20, 409-415.

Otsuka, N., Kiuchi, Y., Yokogawa, F., Masuda, Y., Oguchi, K., Hosoyamada, A., 2001. Antinociceptive efficacy of antidepressants: assessment of five antidepressants and four monoamine receptors in rats. *J. Anesth.* 15, 154-158.

Pakulska, W., Czarnecka, E., 2001. Effect of diazepam and midazolam on the antinociceptive effect of morphine, metamizol and indomethacin in mice. *Pharmazie* 56, 89-91.

Pick, C.G., 1997. Antinociceptive interaction between alprazolam and opioids. *Brain Res. Bull.* 42, 239-243.

Prado, W.A., Roberts, M.H., 1985. An assessment of the antinociceptive and aversive effects of stimulating identified sites in the rat brain. *Brain Res.* 340, 219-228.

Privette, T.H., Terrian, D.M., 1995. Kappa opioid agonists produce anxiolytic-like behavior on the elevated plus-maze. *Psychopharmacology* 118, 444-450.

Rady, J.J., Fujimoto, J.M., 1993. Dynorphin A(1-17) mediates midazolam antagonism of morphine antinociception in mice. *Pharmacol. Biochem. Behav.* 46, 331-339.

Randall, J.I., Rodgers, R.J., 1988. Adaptive pain inhibition in murine resident-intruder interactions. *Int. J. Neurosci.* 41, 251-259.

Redrobe, J.P., Bourin, M., Colombel, M.C., Baker, G.B., 1998. Dose-dependent noradrenergic and serotonergic properties of venlafaxine in animal models indicative of antidepressant activity. *Psychopharmacology* 138, 1-8.

Rosland, J.H., Hole, K., 1990. Benzodiazepine-induced antagonism of opioid antinociception may be abolished by spinalization or blockade of the benzodiazepine receptor. *Pharmacol. Biochem. Behav.* 37, 505-509.

Rosland, J.H., Hunskaar, S., Hole, K., 1990. Diazepam attenuates morphine antinociception test-dependently in mice. *Pharmacol. Toxicol.* 66, 382-386.

Sanchez, C., Hyttel, J., 1999. Comparison of the effects of antidepressants and their metabolites on reuptake of biogenic amines and on receptor binding. *Cell. Mol. Neurobiol.*, 19, 467-489.

Schreiber, S., Backer, M.M., Pick, C.G., 1999. The antinociceptive effect of venlafaxine in mice is mediated through opioid and adrenergic mechanisms. *Neurosci. Lett.* 273, 85-88.

Schreiber, S., Backer, M.M., Herman, I., Shamir, D., Boniel, T., Pick, C.G., 2000. The antinociceptive effect of trazodone in mice is mediated through both mu-opioid and serotonergic mechanisms. *Behav. Brain. Res.* 114, 51-56.

Shin, S.W., Eisenach, J.C., Rao, S.G., Tong, C., 2004. The monoamine reuptake inhibitor milnacipran does not affect nociception to acute visceral distension in rats. *Anesth. Analg.* 98, 1365-1369.

Sindrup, S.H., Grodum, E., Gram, L.F., Beck-Nielsen H., 1991. Concentration-response relationship in paroxetine treatment of diabetic neuropathy symptoms: a patient-blinded dose escalation study. *Ther. Drug Monit.* 13, 408-414.

Sindrup, S.H., Jensen, T.S., 1999. Efficacy of pharmacological treatments of neuropathic pain: an update and effect related to mechanism of drug action. *Pain* 83, 389-400.

Singh, V.P., Jain, N.K., Kulkarni, S.K., 2001. On the antinociceptive effect of fluoxetine, a selective serotonin reuptake inhibitor. *Brain Res.* 915, 218-226.

Spiegel, K., Kalb, R., Pasternak, G.W., 1983. Analgesic activity of tricyclic antidepressants. *Ann. Neurol.* 13, 462-465.

Sutton, L.C., Lea, S.E., Will, M.J., Schwartz, B.A., Hartley, C.E., Poole, J.C., Watkins, L.R., Maier, S.F., 1997. Inescapable shock-induced potentiation of morphine analgesia. *Behav. Neurosci.* 111, 1105-1113.

Takahashi, R.N., Paz, M.M., 1987. Influence of naloxone on analgesic effects of antidepressants in mice. *Braz. J. Med. Biol. Res.* 20, 607-610.

Terman, G.W., Shavit, Y., Lewis, J.W., Cannon, J.T., Liebeskind, J.C., 1984. Intrinsic mechanisms of pain inhibition: activation by stress. *Science* 226, 1270-1277.

Wala, E.P., Sloan, J.W., Jing, X., Holtman, J.R., 2001. The effects of diazepam dependence and withdrawal on morphine-induced antinociception and changes in locomotion in male and female rats. *Pharmacol. Biochem. Behav.* 69, 475-484.

Wuster, M., Duka, T., Herz, A., 1980. Diazepam-induced release of opioid activity in the rat brain. *Neurosci. Lett.* 16, 335-337.

Xu, W., Qiu, X.C., Han, J.S., 1994. Serotonin receptor subtypes in spinal antinociception in the rat. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 269, 1182-1189.

Yanez, A., Sabbe, M.B., Stevens, C.W., Yaksh, T.L., 1990. Interaction of midazolam and morphine in the spinal cord of the rat. *Neuropharmacology* 29, 359-364.

Yokogawa, F., Kiuchi, Y., Ishikawa, Y., Otsuka, N., Masuda, Y., Oguchi, K., Hosoyamada, A., 2002. An investigation of monoamine receptors involved in antinociceptive effects of antidepressants. *Anesth. Analg.* 95, 163-168.

Table 1: Effects of morphine, trazodone and nomifensine in the locomotor activity test

Doses (mg/kg)	Vehicle	1	2	4	8	16
Morphine	152.60 ± 11.35	155.33 ± 10.57	-	155.40 ± 13.15	125.40 ± 16.12	-
Trazodone	139.08 ± 11.29	-	130.17 ± 18.52	109.50 ± 12.08	106.75 ± 11.87	74.17 ± 9.14**
Nomifensini	155.00 ± 10.65	192.75 ± 13.89	168.42 ± 6.44	180.00 ± 14.44	348.75 ± 32.06***	242.58 ± 17.75**

Effect of morphine (1, 4 and 8 mg/kg), trazodone (2-16 mg/kg) and nomifensine (1-16 mg/kg) on the spontaneous locomotor activity. All data are shown as means ± S.E.M, n = 6-12 per group. ** indicates significant difference from vehicle group, ** p<0.01, ***p<0.001 by Dunnett's post hoc test after one-way ANOVA.

Table 2: Effects of diazepam and alprazolam in the hot-plate test

Doses (mg/kg)	Vehicle	0.125	0.25	0.5	1	2	4	MO 4
Diazepam	43.3 ± 4.93	-	58.9 ± 5.25*	47.1 ± 3.52	55.22 ± 2.69	65.8 ± 2.57**	57.5 ± 4.22	82.2 ± 5.69**
Alprazolam	46.1 ± 3.56	35.4 ± 1.72	48.2 ± 3.21	57.7 ± 4.31	62.7 ± 2.87*	63.6 ± 6.92*	-	105.4 ± 6.02**

Effect of diazepam (0.25-4 mg/kg) and alprazolam (0.125-2 mg/kg) on the latency of the first jumping. All data are shown as means ± S.E.M, n = 9-10 per group. * indicates significant difference from vehicle group * p<0.05, ** p<0.01 by Dunnett's post hoc test after one-way ANOVA or Student's t test.

Table 3: Effects of antidepressants in the hot-plate test

Doses (mg/kg)	Vehicle	1	2	4	8	16	MO 4
Fluoxetine	46.4 ± 4.63	53.6 ± 4.13	49.9 ± 2.68	58.8 ± 5.49	43.7 ± 2.66	58.1 ± 6.0	92.1 ± 6.89**
Milnacipran	45.2 ± 2.23	44.8 ± 5.36	32.1 ± 3.14	43.0 ± 3.51	46.0 ± 3.55	47.7 ± 4.29	84.4 ± 2.50**
Venlafaxine	43.0 ± 3.25	47.5 ± 4.40	43.8 ± 3.29	49.4 ± 4.17	49.4 ± 3.87	55.8 ± 3.39	92.9 ± 7.49**
Paroxetine	60.2 ± 4.44	47.4 ± 5.25	62.5 ± 8.56	57.3 ± 3.14	44.5 ± 3.52	52.7 ± 2.55	94.2 ± 8.01**
Imipramine	58.2 ± 3.42	47.3 ± 4.68	48.6 ± 2.71	47.1 ± 3.66	61.5 ± 5.14	68.1 ± 5.15	109.1 ± 4.30**
Desipramine	46.6 ± 3.34	-	52.7 ± 5.75	45.0 ± 3.97	55.0 ± 3.55	63.9 ± 2.67*	92.6 ± 5.64**
Maprotiline	46.6 ± 3.34	-	51.5 ± 5.86	53.9 ± 3.73	63.0 ± 3.08*	70.4 ± 5.44**	92.6 ± 5.64**
Trazodone	46.6 ± 3.34	61.3 ± 3.89	68.8 ± 4.04**	71.2 ± 6.11**	109.6 ± 5.98**	120.0 ± 0.0**	92.6 ± 5.64**
Nomifensine	46.6 ± 3.34	61.9 ± 4.63	46.5 ± 3.20	57.5 ± 4.96	52.9 ± 5.80	50.6 ± 4.53	92.6 ± 5.64**

Effect of fluoxetine (1-16 mg/kg), milnacipran (1-16 mg/kg), venlafaxine (1-16 mg/kg), paroxetine (1-16 mg/kg), imipramine (1-16 mg/kg), desipramine (2-16 mg/kg), maprotiline (2-16 mg/kg), trazodone (1-16 mg/kg) and nomifensine (1-16 mg/kg) on the latency of the first jumping. All data are shown as means ± S.E.M, n = 9-10 per group. * indicates significant difference from Vehicle group * p<0.05, ** p<0.01 by Dunnett's post hoc test after one-way ANOVA or Student's t test.

Table 4: Comparison of the effects of morphine, diazepam and alprazolam in the hot-plate test, FPT and locomotor activity test

	Hot-plate	FPT	Locomotor activity
Morphine	+ (4 and 8mg/kg)	0	0
Diazepam	+ (0.25 and 2 mg/kg)	+ (1 and 2 mg/kg)	- (1- 4 mg/kg)
Alprazolam	+ (1 and 2 mg/kg)	+ (0.25 - 1 mg/kg)	- (0.50 - 4 mg/kg)

+ indicates an analgesic or anxiolytic-like effect. – indicates a hyperalgetic or anxiogenic-like effect or sedative effect. 0 indicates no effect. * results from Bourin et al., 1992.

Table 5: Comparison of the effects of antidepressants in the hot-plate test, FPT and locomotor activity test

	Hot-plate	FPT	Locomotor activity
Fluoxetine	0	0 *	0 ^α
Milnacipran	0	+ * (4 - 16 mg/kg)	0 ^δ
Venlafaxine	0	+ * (4 - 16 mg/kg)	+ ^γ (16 mg/kg)
Paroxetine	0	+ * (4 - 16 mg/kg)	0 @
Imipramine	0	0 *	0 @
Desipramine	+ (16 mg/kg)	- * (2 - 16 mg/kg)	0 @
Maprotiline	+ (8 and 16 mg/kg)	- * (2 - 16 mg/kg)	0 ^α
Trazodone	+ (2 - 16 mg/kg)	0 *	- (16 mg/kg)
Nomifensine	0	0	+ (8 and 16 mg/kg)

+ indicates an analgesic or anxiolytic-like effect or locomotor stimulant effect. – indicates a hyperalgetic or anxiogenic-like effect or sedative effect. 0 indicates no effect. Results from : *Hascoët et al., 2000 ; ^α Bourin et al., 1996 ; @ David et al., 2003 ; ^γ Redrobe et al., 1998 ; ^δ Bourin et al., 2005.

Fig 1: Effect of morphine on mouse behaviour in the hot-plate test

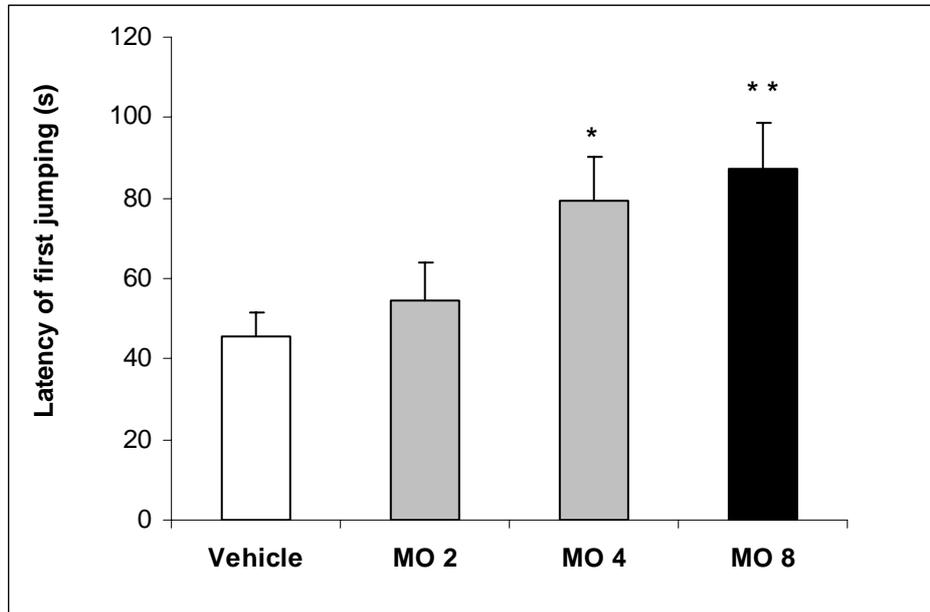


Fig 2: Effect of morphine on mouse behaviour in the FPT

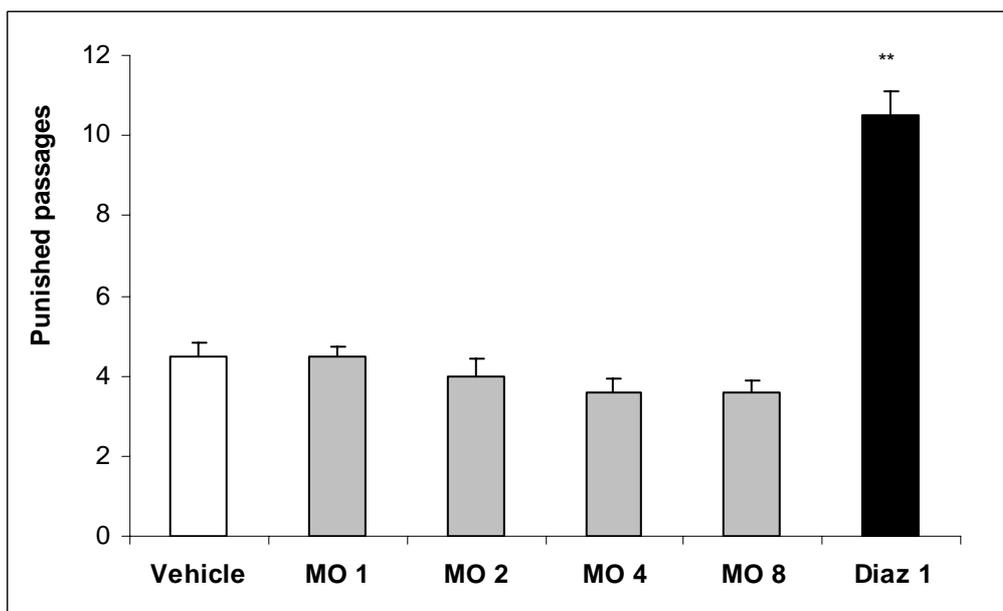


Fig 3: Effect of nomifensine on mouse behaviour in the FPT

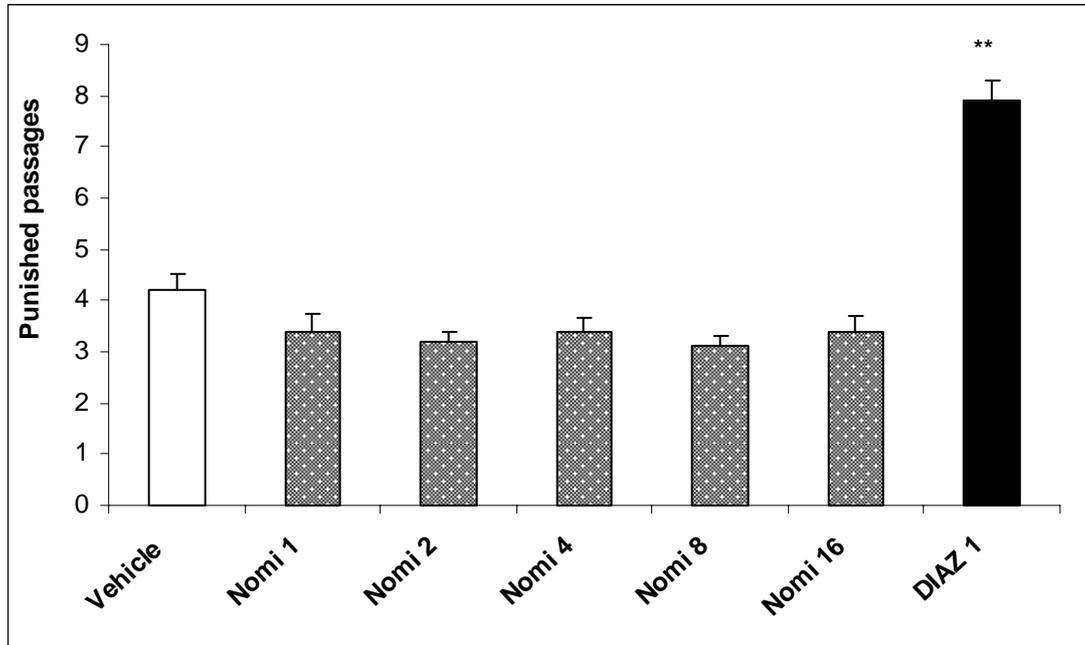


Figure legends

Figure 1: Effect of morphine in the hot-plate test

Effect of morphine (2-8 mg/kg), on the latency of the first jumping. All data are shown as means \pm S.E.M, n = 10 per group. * indicates significant difference from saline group * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$ by Dunnett's post hoc test after one-way ANOVA.

Figure 2: Effect of morphine on mouse behaviour in the FPT

Effect of morphine (1-8 mg/kg) administered 30 min i.p. before the test on the number of punished passages in mice. All data are shown as means \pm S.E.M, n = 10 per group. ** indicates significant difference from saline group $p < 0.01$ by Student's t test.

Figure 3: Effect of nomifensine on mouse behaviour in the FPT

Effect of nomifensine (1-16 mg/kg) administered 30 min i.p. before the test on the number of punished passages in mice. All data are shown as means \pm S.E.M, n = 10 per group. ** indicates significant difference from saline group, $p < 0.01$ by a Student's t test.

2.2. Etude 1b

2.2.1. Effet des ligands dopaminergiques dans le test d'actimétrie

2.2.1.1. Effet du sulpiride sur l'activité locomotrice spontanée des souris

Aux doses testées (0,125 à 8 mg/kg), le sulpiride ne modifie pas de façon significative l'activité locomotrice ($F_{(7,72)} = 0,534$; $p > 0,05$ révélé par une ANOVA à un facteur) (Figure 1).

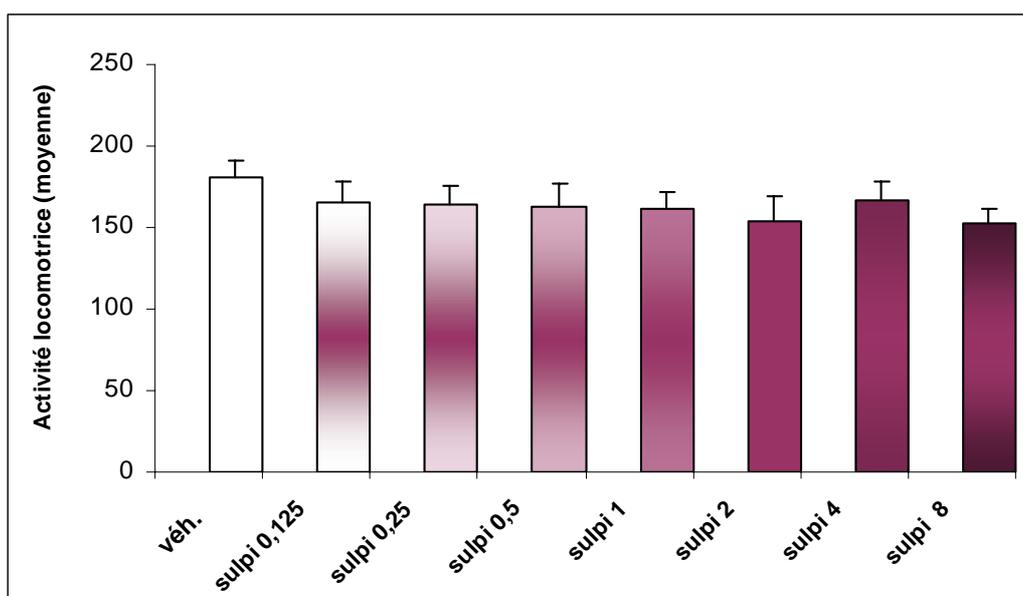


Figure 1 : Effet du sulpiride (0,5 à 8 mg/kg) administré 30 min avant le test par voie i.p. sur l'activité locomotrice des souris. Les résultats sont exprimés en activité locomotrice moyenne \pm S.E.M. (n = 10 par groupe).

2.2.1.2. Effet du quinpirole sur l'activité locomotrice spontanée des souris

Le quinpirole diminue significativement l'activité locomotrice à partir de 0,03 mg/kg ($F_{(9,90)} = 5,61$; $p < 0,001$ révélé par une ANOVA à un facteur) (Figure 2). Aux doses plus faibles (0,004 à 0,016 mg/kg), le quinpirole ne modifie pas l'activité locomotrice des souris par rapport au groupe contrôle ($p > 0,05$ après un test *posthoc* de Dunnett) (Figure 2).

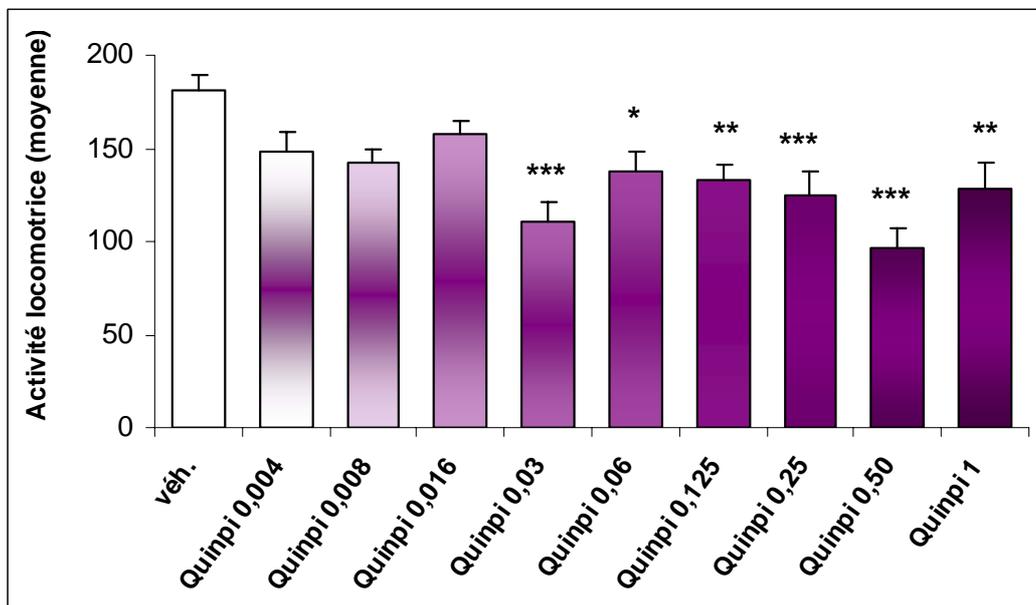


Figure 2 : Effet du quinpirole (0,004 à 1 mg/kg) administré 30 min avant le test par voie sous-cutanée sur l'activité locomotrice des souris. Les résultats sont exprimés en activité locomotrice moyenne \pm S.E.M. ($n = 10$ par groupe). ** indique une différence significative avec le groupe contrôle (veh.) de souris naïves, ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$.

2.2.1.3. Effet du SCH 23390 sur l'activité locomotrice spontanée des souris

Aux doses de 0,03 à 1 mg/kg, le SCH 23390 diminue significativement et de façon dose-dépendante l'activité locomotrice ($F_{(8,81)} = 32,65$; $p < 0,001$ révélé par une ANOVA à un facteur ; $p < 0,001$ après un test *posthoc* de Dunnett) (Figure 3). Aux doses plus faibles de 0,015 et 0,008 mg/kg, le SCH 23390 ne modifie pas l'activité locomotrice des souris par rapport au groupe contrôle ($p > 0,05$ après un test *posthoc* de Dunnett) (Figure 3).

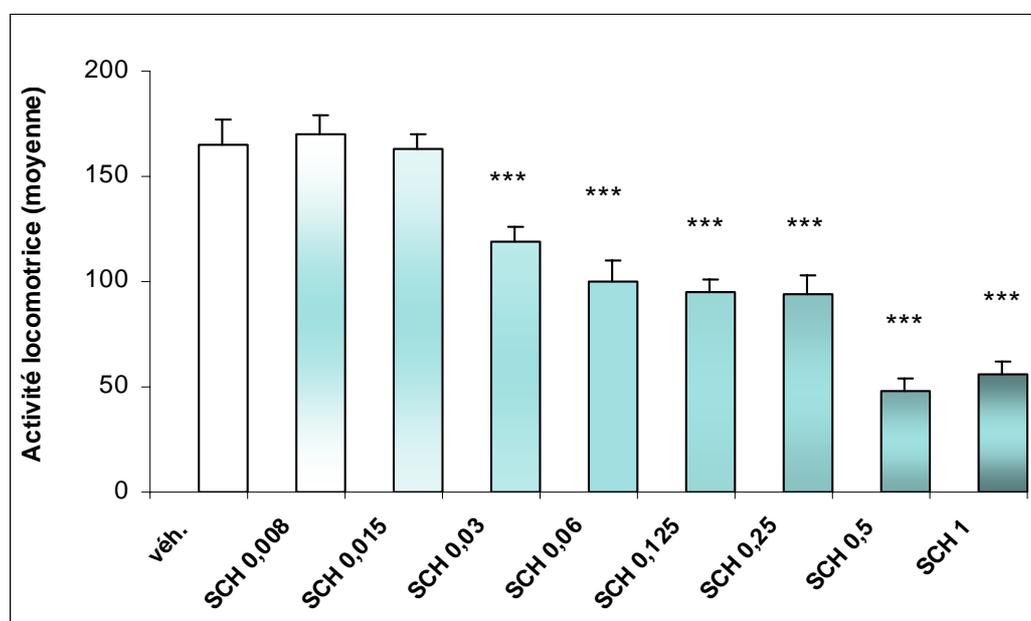


Figure 3 : Effet du SCH 23390 (0,008 à 1 mg/kg) administré 30 min avant le test sur l'activité locomotrice des souris. Les résultats sont exprimés en activité locomotrice moyenne \pm S.E.M (n = 10 par groupe). *** indique une différence significative avec le groupe contrôle (vét.) de souris naïves, $p < 0,001$.

2.2.1.4. Effet du SKF 38393 sur l'activité locomotrice spontanée des souris

Aux doses testées (0,06 à 8 mg/kg), le SKF 38393 ne modifie pas de façon significative l'activité locomotrice ($F_{(8,81)} = 1,24$; $p > 0,05$ révélé par une ANOVA à un facteur) (Figure 4).

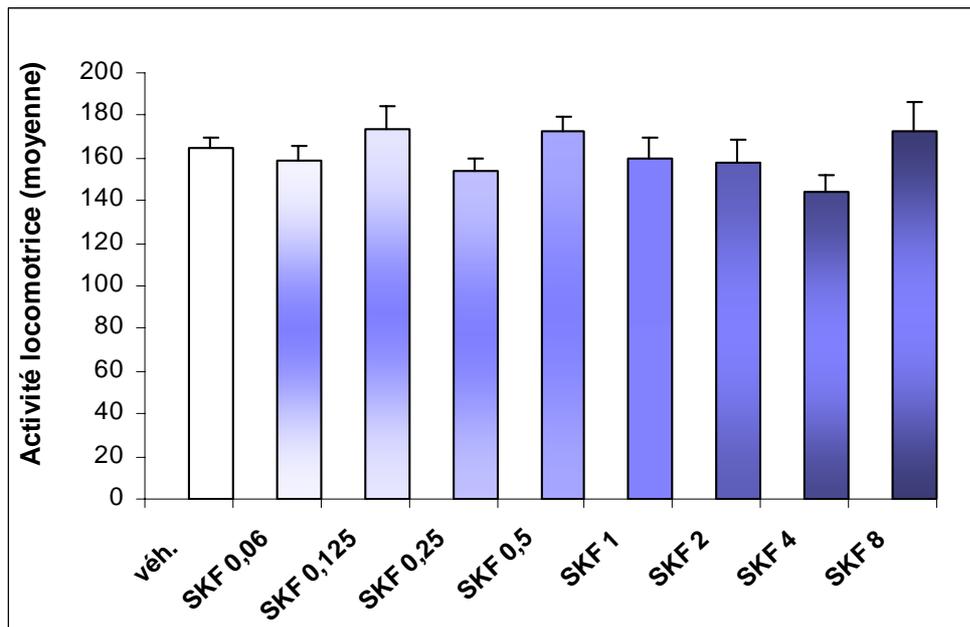


Figure 4 : Effet du SKF38393 (0,06 à 8 mg/kg) administré 30 min avant le test sur l'activité locomotrice des souris. Les résultats sont exprimés en activité locomotrice moyenne \pm S.E.M (n = 10 par groupe).

2.2.2. Effet des ligands noradrénergiques et dopaminergiques dans le test de la plaque chauffante

2.2.2.1. Effet du guanabenz et de la clonidine

Aux doses étudiées, le guanabenz (0,03 à 0,5 mg/kg) n'a pas modifié la latence du 1^{er} saut par rapport au groupe contrôle (véhicule) [$F_{(5,54)} = 0,430$; $p > 0,05$ déterminé par une ANOVA à un facteur] (Table 2). Au contraire, la clonidine a augmenté la latence du 1^{er} saut par rapport au groupe contrôle à toutes les doses étudiées (0,03 à 0,25 mg/kg, $p < 0,01$) [$F_{(4,45)} = 19,09$; $p < 0,01$ déterminé par une ANOVA à un facteur suivie d'un test de Dunnett] (Table 2). Aux doses de 0,06 mg/kg et 0,25 mg/kg, l'effet plus marqué était du même ordre de grandeur que celui de la morphine (4 mg/kg). La morphine, incluse comme témoin positif, a augmenté de manière significative la latence du 1^{er} saut des rongeurs par rapport au groupe contrôle ($p < 0,01$ déterminé par un test de Student).

Doses (mg/kg)	véhicule	0,03	0,06	0,125	0,25	0,5	MO 4
Guanabenz	47,5 ± 6,32	59,0 ± 5,25	54,3 ± 4,96	53,2 ± 7,24	54,6 ± 5,68	59,2 ± 9,13	107,2 ± 6,16@@
Clonidine	49,2 ± 4,86	80,4 ± 8,41**	111,5 ± 4,84**	93,8 ± 8,36**	117,3 ± 2,7**	-	112,4 ± 4,60@@

Table 2 : Effet du guanabenz (0,03 à 0,5 mg/kg) et de la clonidine (0,03 à 0,25 mg/kg) administrés 30 min avant le test par voie i.p. sur la latence du 1^{er} saut dans le test de la plaque chauffante. Les résultats sont exprimés en moyenne de latence ± S.E.M (n = 10). ** indique une différence significative avec le groupe contrôle (véhicule), $p < 0,01$. @@ indique une différence significative entre le groupe contrôle et celui qui a reçu la morphine (4 mg/kg : MO 4) $p < 0,01$.

2.2.2.2. Effet du quinpirole, du sulpiride, du SCH 23390 et du SKF 38393

Aux doses étudiées, le sulpiride (0,5 à 8 mg/kg), le SCH 23390 (0,02 à 0,06 mg/kg) et le SKF 38393 (1 à 8 mg/kg) n'ont pas modifié la latence du 1^{er} saut par rapport au groupe contrôle (véhicule) [respectivement : $F_{(5,53)} = 0,265$ ($p > 0,05$) ; $F_{(4,45)} = 0,609$ ($p > 0,05$) et $F_{(4,45)} = 0,824$ ($p > 0,05$) déterminés par une ANOVA à un facteur] (Table 3). Au contraire, le quinpirole a exercé un effet analgésique à toutes les doses étudiées (0,125 à 1 mg/kg ; $p < 0,01$) [$F_{(4,45)} = 71,81$; $p < 0,01$ déterminé par une ANOVA suivie par un test de Dunnett] (Table 3). Dans tous les cas, la morphine, incluse comme témoin positif, a augmenté de manière significative la latence du 1^{er} saut des rongeurs par rapport au groupe contrôle ($p < 0,01$ déterminé par un test de Student).

Doses (mg/kg)	véhicule	0,02	0,03	0,045	0,06	0,125	0,25	0,5	1	2	4	8	MO 4
Quinpirole	46,0 ± 5,54	-	-	-	-	68,0 ± 5,65**	92,0 ± 3,18**	119,5 ± 0,5**	120,0 ± 0,00**	-	-	-	106,7 ± 5,37@@
Sulpiride	48,8 ± 4,46	-	-	-	-	-	-	54,78 ± 2,50	47,5 ± 3,88	46,4 ± 4,96	59,2 ± 7,01	44,1 ± 3,43	109,0 ± 5,78@@
SCH 23390	46,0 ± 5,54	51,0 ± 1,74	56,5 ± 4,40	48,0 ± 2,22	55,4 ± 3,73	-	-	-	-	-	-	-	106,7 ± 5,37@@
SKF 38393	47,2 ± 3,92								56,1 ± 3,37	53,5 ± 4,84	52,9 ± 4,83	52,6 ± 3,63	93,1 ± 4,24@@

Table 3 : Effets du quinpirole (0,125 à 1 mg/kg), sulpiride (0,5 à 8 mg/kg), SCH 23390 (0,02 à 0,06 mg/kg) et du SKF 38393 (1 à 8 mg/kg) administrés 30 min avant le test par voie (i.p.) ou sous-cutanée sur la latence du 1^{er} dans le test de la plaque chauffante. Les résultats sont exprimés en moyenne de latence ± S.E.M (n = 9 - 10). ** indique une différence significative avec le groupe contrôle (véhicule), p<0,01. @@ indique une différence significative entre le groupe contrôle et celui qui a reçu la morphine (4 mg/kg : MO 4) p<0,01.

2.2.3. Effets comportementaux des ligands dopaminergiques dans le test des quatre-plaques

2.2.3.1. Effet du SKF 38393

Le SKF 38393 (0,125 à 8 mg/kg) n'a pas modifié le nombre de passages punis acceptés par les animaux [$F_{(7,72)} = 1,32$; $p > 0,05$ déterminé par une ANOVA à un facteur] (Figure 5). Le diazépam (1 mg/kg) a augmenté le nombre de passages punis acceptés par les souris ($p < 0,001$).

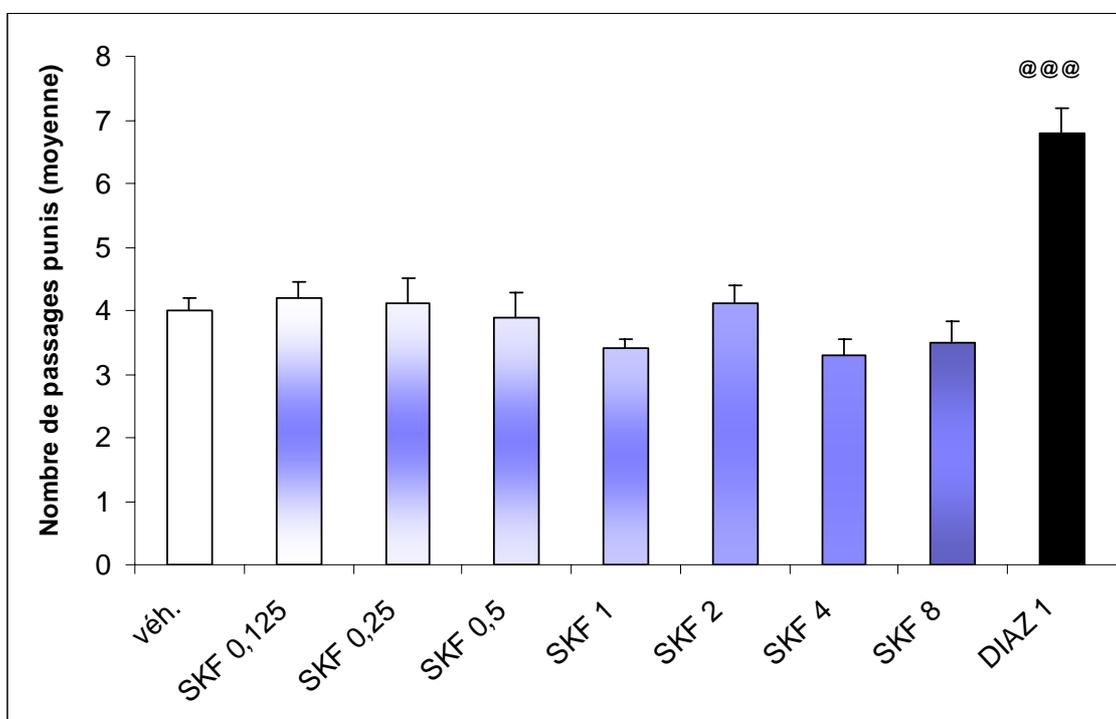


Figure 5 : Effet du SKF 38393 (0,125 à 8 mg/kg), administré 30 min avant le test par voie i.p., sur le nombre de passages punis acceptés par les souris dans le FPT. Les résultats sont exprimés en moyenne de passages punis \pm S.E.M (n = 10). L'analyse statistique ne révèle pas de différences significatives entre les groupes traités par le SKF 38393 et le groupe contrôle (véhicule, véh.). @@@ indique une différence significative entre les groupes contrôle et diazépam, $p < 0,001$.

2.2.3.2. Effet du SCH 23390

Aux doses de 0,03 ($p < 0,01$) et de 0,045 mg/k ($p < 0,05$), le SCH 23390 a augmenté de façon significative le nombre de passages punis acceptés par les animaux [$F_{(5,54)} = 6,36$; $p < 0,01$ déterminé par une ANOVA à un facteur suivie d'un test *a posteriori* de Dunnett] (Figure 6). Le diazépam (1 mg/kg) a augmenté le nombre de passages punis acceptés par les souris ($p < 0,001$ déterminé par un test t de Student).

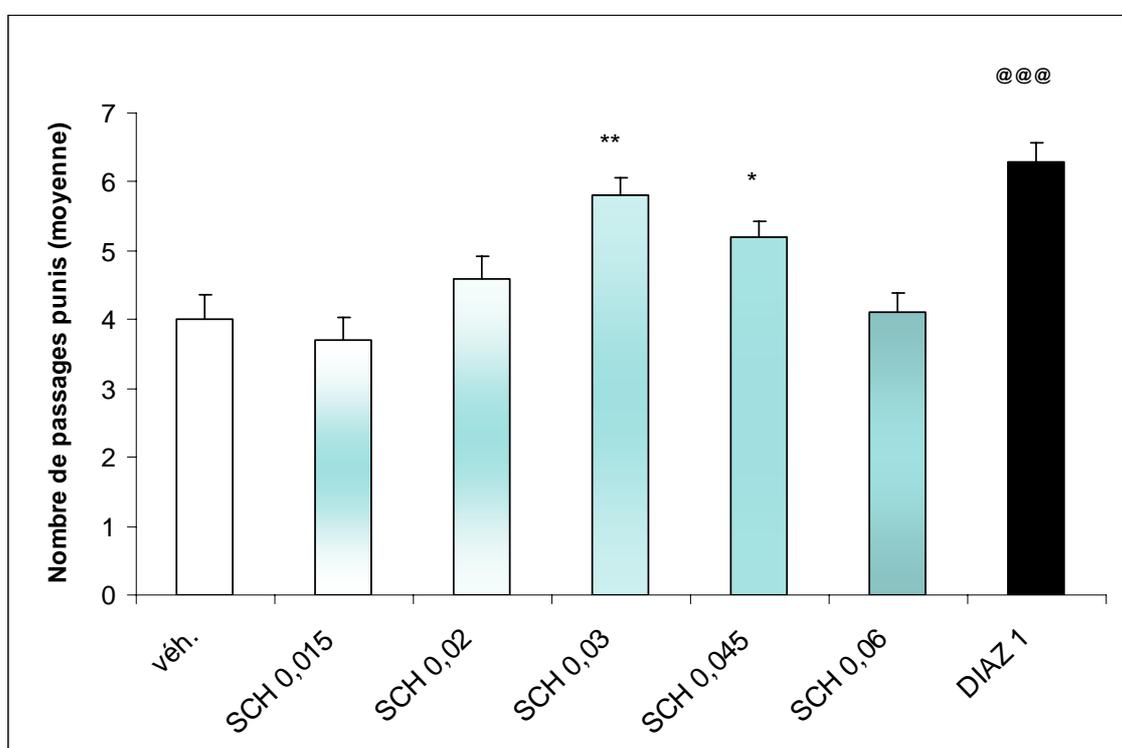


Figure 6 : Effet du SCH 23390 (0,015 à 0,06 mg/kg), administré 30 min avant le test par voie i.p., sur le nombre de passages punis acceptés par les souris dans le FPT. Les résultats sont exprimés en moyenne de passages punis \pm S.E.M (n = 10). * indique une différence significative entre les groupes traités par le SCH 23390 et le groupe contrôle, * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$. @@@ indique une différence significative entre les groupes contrôle et diazépam, $p < 0,001$.

2.2.3.3. Effet du quinpirole

L'analyse statistique révèle que le quinpirole diminue significativement le nombre de passages punis à la dose de 1 mg/kg [$F_{(6,63)} = 5,25$; $p < 0,01$ déterminé par une ANOVA à un facteur suivie d'un test *a posteriori* de Dunnett] (Figure 7). A la dose de 0,5 mg/kg, le quinpirole tend à augmenter le nombre de passages punis par rapport au groupe contrôle. Le diazépam (1 mg/kg) a augmenté le nombre de passages punis acceptés par les souris ($p < 0,001$ déterminé par un test t de Student).

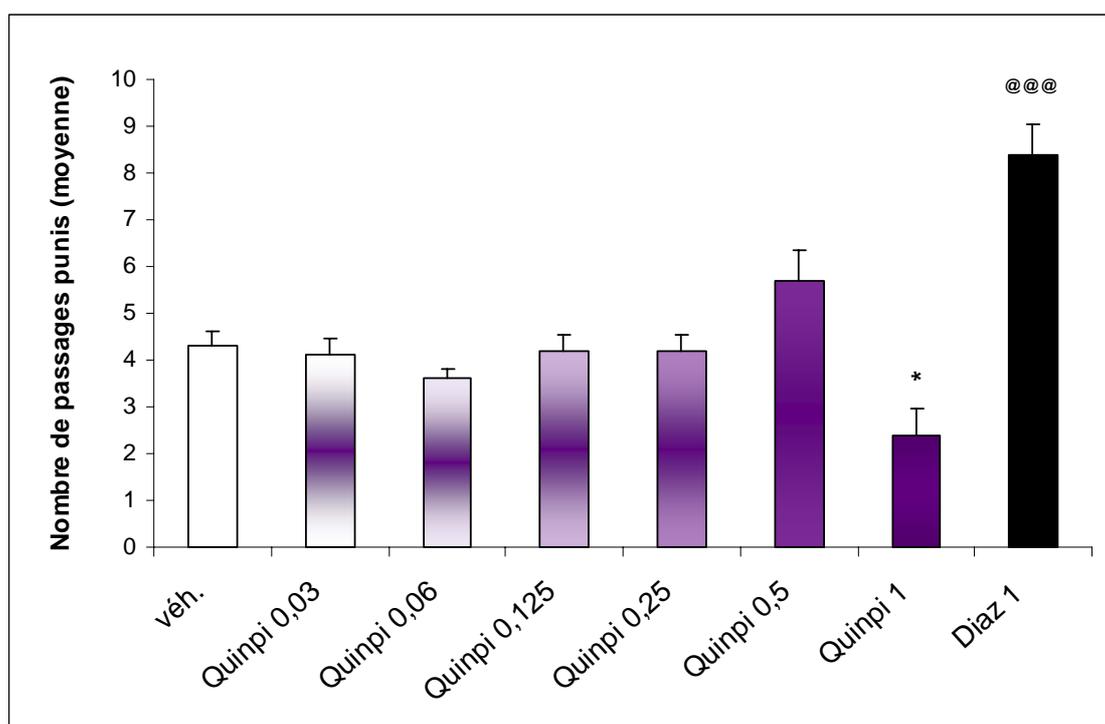


Figure 7 : Effet du quinpirole (0,03 à 1 mg/kg), administré 30 min avant le test par voie i.p. sur le nombre de passages punis acceptés par les souris dans le FPT. Les résultats sont exprimés en moyenne de passages punis \pm S.E.M (n = 10). * indique une différence significative avec le groupe contrôle, * $p < 0,05$. @@@ indique une différence significative entre les groupes contrôle et diazépam, $p < 0,001$.

2.2.3.4. Effet du sulpiride

Aux doses utilisées (0,25 à 8 mg/kg), le sulpiride n'a pas modifié le nombre de passages punis acceptés par les animaux [$F_{(6,62)} = 1,08$; $p > 0,05$ déterminé par une ANOVA à un facteur] (Figure 8). Le diazépam (1 mg/kg) a augmenté le nombre de passages punis acceptés par les souris ($p < 0,01$).

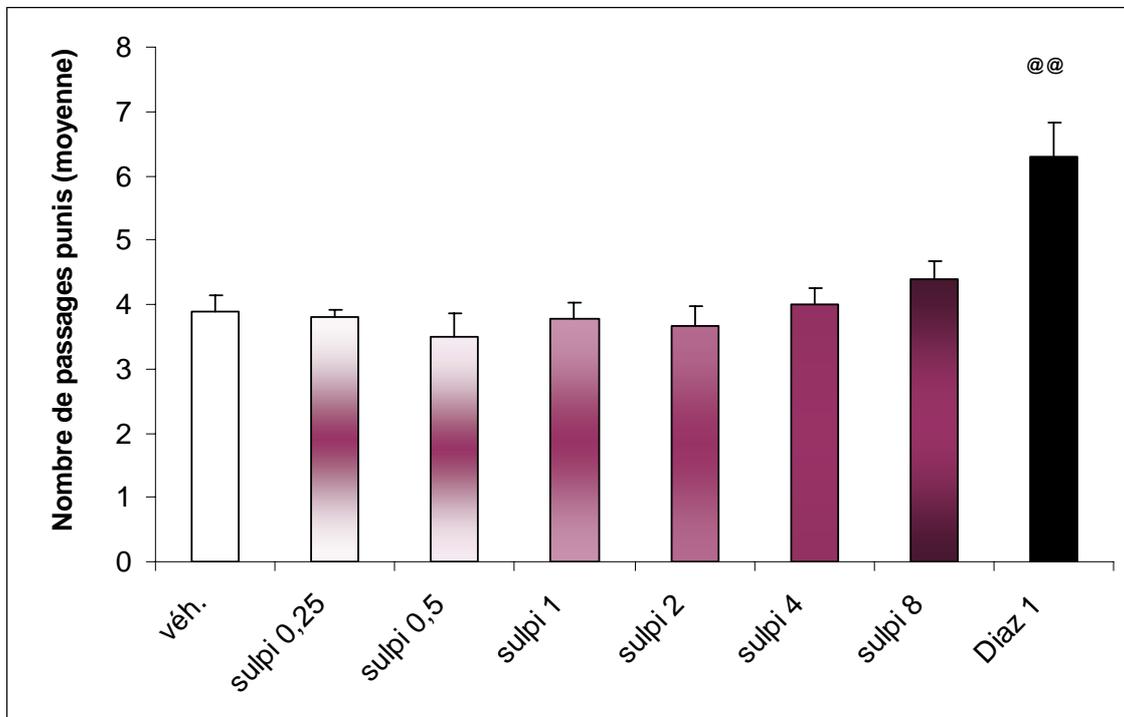


Figure 8 : Effet du sulpiride (0,25 à 8 mg/kg) administré 30 min avant le test par voie i.p. sur le nombre de passages punis acceptés par les souris dans le FPT. Les résultats sont exprimés en moyenne de passages punis \pm S.E.M (n = 9 - 10). L'analyse statistique ne révèle pas de différences significatives entre les groupes traités par le sulpiride et le groupe contrôle (vét.). @@@ indique une différence significative entre les groupes contrôle et diazépam, $p < 0,001$.

2.2.4. Comparaison des effets des ligands noradrénergiques et dopaminergiques dans le test de la plaque chauffante et le test des quatre-plaques

	Test de la plaque chauffante	FPT*	Actimétrie*
Clonidine	+	0	-
	(0,03 – 0,25 mg/kg)		(0,015 ; 0,06 ; 1- 4 mg/kg)
Guanabenz	0	0	-
			(0,5 – 4 mg/kg)

Table 4 : comparaison des effets de la clonidine et du guanabenz dans le test de la plaque chauffante et dans le FPT. + : effet analgésique ; - : effet sédatif ; 0 : absence d'effet. * [Masse et *al.*, 2005].

	Test de la plaque chauffante	FPT	Actimétrie
Quinpirole	+	-	-
	(0,125 - 1 mg/kg)	(1 mg/kg)	(0,03 - 1 mg/kg)
Sulpiride	0	0	0
SCH 23390	0	+	-
		(0,03 et 0,045 mg/kg)	(0,03 - 1 mg/kg)
SKF 38393	0	0	0

Table 5 : comparaison des effets des ligands D₁ et D₂ dans le test de la plaque chauffante et dans le FPT. + : effet analgésique ou anxiolytique ; - : effet anxiogène ou sédatif ; 0 : absence d'effet.

2.3. Synthèse des résultats des études 1a et 1b

Dans le test de la plaque chauffante, la morphine, à la dose de 4 mg/kg, entraîne un effet anti-nociceptif marqué. En revanche, cette dernière ne modifie pas le nombre de passages punis des souris dans le FPT (étude 1a).

L'alprazolam et le diazépam entraînent une augmentation du nombre de passages punis dans le FPT à des doses inactives dans le test de la plaque chauffante (étude 1a).

La désipramine, la maprotiline et la trazodone produisent un effet analgésique dans le test de la plaque chauffante (étude 1a), alors que pour les mêmes doses, elles n'ont pas exercé d'effet (trazodone) ou ont entraîné un effet de type anxiogène (désipramine, maprotiline) dans le FPT (Hascoët *et al.*, 2000a). Au contraire, le milnacipran, la venlafaxine et la paroxétine anxiolytiques dans le FPT (Hascoët *et al.*, 2000a), n'exercent aucun effet dans le test de la plaque chauffante (étude 1a). La fluoxétine, l'imipramine et la nomifensine ne modifient ni le seuil nociceptif, ni le nombre de passages punis (étude 1a, Hascoët *et al.*, 2000a).

Ces résultats, discutés dans l'étude 1a, montrent que les molécules anxiolytiques et anxiogènes n'entraînent pas respectivement d'augmentation et de diminution du seuil de la perception de la douleur.

L'étude 1b révèle un effet de type anti-nociceptif marqué pour la clonidine dans le test de la plaque chauffante à des doses n'altérant pas les performances musculaires des animaux dans le test du rota-rod (Galeotti *et al.*, 2004). En revanche, le guanabenz n'exerce aucun effet. Nos résultats rejoignent les observations de nombreuses études qui ont rapporté un effet anti-nociceptif pour la clonidine (Duflo *et al.*, 2003 ; Fielding *et al.*, 1981 ; Hascoët *et al.*, 2000a ; Nakamura et Ferreira, 1988 ; Nguyen *et al.*, 1997). Chez l'Homme, la clonidine est utilisée comme traitement adjuvant de la thérapie anti-douleur (Davis *et al.*, 1991 ; De Kock *et al.*, 1997 ; Eisenach *et al.*, 1995 ; Jeffs *et al.*, 2002 ; Kulka, 1996 ; Yoshikawa *et al.*, 2001). Le système noradrénergique descendant, originaire du pédoncule cérébral, est considéré comme un des systèmes majeurs contrôlant la douleur. Ce dernier exerce une influence inhibitrice tonique sur la transmission de l'information nociceptive à partir des afférences terminales dans la corne dorsale de moelle épinière, via les récepteurs noradrénergiques α_2 localisés au niveau pré- et postsynaptique (Proudfit, 1988 ; Yaksh *et al.*, 1981). Chez les rongeurs, il a été montré que ce système participait à l'antinociception induite par les

substances opioïdes (Kuraishi *et al.*, 1983 ; Matsumoto *et al.*, 1996 ; Wigdor et Wilcox, 1987). Certains travaux suggèrent que la modulation de la nociception impliquerait plus particulièrement l'activation des récepteurs de sous-type α_{2A} (Kable *et al.*, 2000). D'autres études en revanche, ont montré que l'activité anti-nociceptive des ligands des récepteurs α_2 impliquait à la fois les récepteurs de sous-type α_1 et α_2 (Hayes *et al.*, 1986 ; Howe *et al.*, 1983). D'après Tasker et Melzack (1989), la contribution différentielle des récepteurs de sous-type α_1 et α_2 dépendrait du modèle animal utilisé. Par ailleurs, certaines études suggèrent que les récepteurs α_1 modulent l'information nociceptive au niveau supraspinal (Asano *et al.*, 2000 ; Yokogawa *et al.*, 2002 ; Zhang *et al.*, 1998). Dans le test de la plaque chauffante, il est probable que la clonidine, peu spécifique des récepteurs α_2 , exerce son effet anti-nociceptif via les récepteurs α_1 , ce qui expliquerait ainsi l'absence d'effet du guanabenz, un agoniste sélectif des récepteurs α_{2A} .

Toutefois, l'effet anti-nociceptif apparemment observé, pourrait s'expliquer par une sédation élevée entraînée par la clonidine, et empêchant les animaux de réagir. En effet, une étude a montré qu'aux doses utilisées dans notre travail, à l'exception de la dose de 0,03 mg/kg, la clonidine provoque une sédation chez les souris soumises au test d'actimétrie (Masse *et al.*, 2005 ; Table 4). De plus, une étude plus ancienne réalisée dans notre laboratoire a montré qu'aux doses étudiées ici, la clonidine a entraîné une diminution marquée de l'activité locomotrice spontanée des rongeurs (Malinge *et al.*, 1989). On peut donc s'interroger sur la nature même de l'effet de la clonidine observé dans le test de la plaque chauffante. Par ailleurs, alors que la clonidine provoque un effet de type anti-nociceptif marqué dans le test de la plaque chauffante, elle ne modifie pas le nombre de passages punis des souris dans le FPT (étude 1b, Table 4). Le guanabenz quant à lui n'a exercé aucun effet dans les deux tests (étude 1b, Table 4).

Concernant les ligands dopaminergiques, notre étude a montré que le sulpiride, le SCH 23390 et le SKF 38393 ne modifient pas le temps de latence du 1^{er} saut des rongeurs par rapport au groupe contrôle dans le test de la plaque chauffante. En revanche, le quinpirole a exercé un effet anti-nociceptif à toutes les doses testées et de façon dose-dépendante. Nos résultats rejoignent ceux de nombreux travaux qui ont rapporté un effet anti-nociceptif pour le quinpirole dans de nombreux modèles de nociception (Altier et Stewart, 1999 ; Lin *et al.*, 1981 ; Magnusson et Fisher, 2000 ; Michael-Titus *et al.*, 1990 ; Taylor *et al.*, 2003). Chez l'Homme, diverses études cliniques et d'imagerie cérébrale ont mis en évidence l'implication du système dopaminergique dans le contrôle de la douleur (Casey *et al.*, 1996 ; Coghill *et al.*,

2003 ; Coghill *et al.*, 1999 ; Derbyshire *et al.*, 1997 ; Iadarola *et al.*, 1998 ; Jones *et al.*, 1991 ; Witjas *et al.*, 2002). De plus, certains auteurs suggèrent que les agents dopaminergiques pourraient constituer une thérapie intéressante dans le traitement des douleurs neuropathiques (Semenchuk *et al.*, 2001 ; Stiasny-Kolster *et al.*, 2004). A la suite d'une stimulation périphérique douloureuse, la DA serait libérée par les afférences primaires, pour activer les récepteurs D₂ localisés dans le striatum dorsolatéral, qui ensuite réduirait l'excitabilité neuronale induite par un input cortical sensori-moteur (Magnusson et Fisher, 2000). Il a été suggéré que les récepteurs D₂ peuvent moduler l'information nociceptive par des mécanismes supraspinaux (Hagelberg *et al.*, 2004). Contrairement à nos travaux Ben-Sreti *et al.* (1983) a montré que le sulpiride augmentait les réponses de douleur. De plus, différentes études ont rapporté que le sulpiride bloquait les effets anti-nociceptifs de substances antalgiques (Carta *et al.*, 1999). Cependant, des études contradictoires ont montré une potentialisation des effets anti-nociceptifs (Kamei et Saitoh, 1996 ; Rooney et Sewell, 1989). De plus, l'administration systémique d'antagonistes D₂ pourrait entraîner une réponse anti-nociceptive, impliquant probablement des mécanismes opioïdiques (Weizman *et al.*, 2003). Nos résultats montrent que l'agoniste et l'antagoniste des récepteurs D₁, le SKF 38393 et le SCH 23390 ne modifient pas les réponses de douleur, suggérant que les récepteurs D₁ ne sont pas impliqués dans les processus nociceptifs, comme l'ont suggéré d'autres études (Ben-Sreti *et al.*, 1983 ; Karper *et al.*, 2000 ; Lin *et al.*, 1981 ; Magnusson et Fisher, 2000). Cependant, (Flores *et al.*, 2004) ont montré que l'administration de SCH 23390 dans la substance grise périaqueducule (PAG), atténuait de façon dose-dépendante l'analgésie induite par les opiacés dans le test de la plaque chauffante, alors qu'un antagoniste D₂, l'étilclopride, n'a pas exercé d'effet. Ces différences avec nos résultats peuvent s'expliquer par les voies d'administration et les aires cérébrales stimulées par les ligands dopaminergiques différentes.

Par ailleurs, notre étude révèle que le sulpiride (0,125 – 8 mg/kg) et le SKF 38393 (0,06 – 8 mg/kg) n'exercent aucune influence sur la locomotion aux doses testées. En revanche, le SCH 23390 diminue l'activité locomotrice spontanée à partir de 0,03 mg/kg et ce, de façon dose-dépendante. De même, le quinpirole diminue significativement la locomotion à partir de 0,03 mg/kg. Nos résultats confirment ceux d'une étude précédente réalisée dans notre laboratoire (Renard *et al.*, 2001). Néanmoins, certains travaux ne rejoignent pas nos résultats. Koeltzow *et al.* (2003) ont montré qu'à la dose de 0,5 mg/kg, le quinpirole stimule l'activité locomotrice de rats. De plus, dans l'étude Eilam et Szechtman (1989), le quinpirole diminue l'activité locomotrice à la dose de 0,03 mg/kg et l'augmente à partir de la dose de 0,125 mg/kg. De faibles doses de quinpirole supprimeraient l'activité

locomotrice, via l'activation des auto-récepteurs D₂. Les différences entre ces études et nos résultats s'expliquent probablement par l'utilisation de souches, d'espèces et de modèles différents.

Etant donné l'effet du quinpirole sur l'activité locomotrice spontanée des souris, l'effet observé dans le test de la plaque chauffante pourrait être lié à un effet sédatif plus qu'à un effet anti-nociceptif.

Le système d'inhibition de la douleur, médié par le système dopaminergique, est activé lors d'un stress aigu (Cuadra *et al.*, 2000 ; Feenstra et Botterblom, 1996 ; Feenstra *et al.*, 1995), *via* la libération d'opioïdes endogènes et de substance P dans l'aire tegmentale ventrale (ATV). En réponse à un stress, tels que des chocs plantaires chez le Rat et la Souris, des modifications de la libération et du métabolisme de la DA ont été observées (Dazzi *et al.*, 2001 ; Deutch *et al.*, 1985 ; Fadda *et al.*, 1978 ; Uehara *et al.*, 2003). Nos résultats montrent que dans le FPT, seul le SCH 23390 a entraîné un effet de type anxiolytique. A ces doses, le SCH 23390 n'a pas modifié le temps de latence du 1^{er} saut par rapport au groupe contrôle (Table 5). En revanche, le quinpirole exerce un effet anxiogène à la dose de 1 mg/kg, alors qu'à cette dose, il a augmenté le temps de latence du 1^{er} saut dans le test de la plaque chauffante (Table 5). Ces différentes observations ne mettent pas en évidence de corrélations entre les effets observés dans le FPT et le test de la plaque chauffante.

Dans l'ensemble, nos résultats montrent que l'administration de molécules anxiolytiques et anxiogènes ne se traduit pas par une augmentation ou une diminution du seuil de la perception de la douleur. Cette étude confirme donc qu'un effet anti-punition observé dans le FPT ne s'explique pas par une modification de la perception de la douleur, mais représente bien un effet anxiolytique indépendant et lève ainsi toute ambiguïté concernant les résultats obtenus dans ce modèle. Ce travail, jugé nécessaire avant d'entreprendre toute étude dans le FPT, « re-valide » ainsi ce modèle en tant que modèle d'anxiété.

B. Etude 2 : Implication des récepteurs 5-HT₂ dans les effets de type anxiolytique des antidépresseurs dans le test des quatre-plaques

Nic Dhonnchadha BA, Ripoll N, Clenet F, Hascoët M, Bourin M. Implication of 5-HT₂ receptor subtypes in the mechanism of action of antidepressants in the four plates test. *Psychopharmacology* 2005 ;179(2):418-29.

1. Objectif de l'étude

Même si il est établi que les ADs possèdent des propriétés anxiolytiques, leur mécanisme d'action n'est toujours pas élucidé (Bourin *et al.*, 2002 ; Bourin et Lambert, 2002 ; Vaswani *et al.*, 2003). Les ADs, tels que les IRSS et les IRSN provoquent une augmentation des concentrations synaptiques en 5-HT, du fait de leur action inhibitrice sur la recapture de la 5-HT (Beyer *et al.*, 2002 ; Kreiss et Lucki, 1995), activant de nombreux récepteurs sérotoninergiques post-synaptiques, tels que les récepteurs de sous-type 5-HT_{1A}, 5-HT_{1D}, 5-HT_{2A}, 5-HT_{2C} et 5-HT₃. Cependant, à l'heure actuelle on ne connaît pas « l'identité » du ou des sous-type(s) de récepteur(s) de la 5-HT impliqué(s) dans les effets anxiolytiques des ADs.

L'objectif de cette étude était d'évaluer l'implication des récepteurs 5-HT₂ dans le mécanisme d'action des ADs chez des souris naïves testées dans le FPT. Nous avons tout d'abord étudié, l'effet de la paroxétine (0,25 à 8 mg/kg), un IRSS et celui de la venlafaxine (0,25 à 16 mg/kg), un IRSN. Puis, nous nous sommes intéressés à l'influence d'un pré-traitement par des antagonistes des récepteurs 5-HT₂ sur l'activité anti-punition de la paroxétine et de la venlafaxine. Pour cela, nous avons étudié l'effet de la co-administration du SR 46349B (0,1 et 1 mg/kg), un antagoniste des récepteurs 5-HT_{2A} ; du SB 206553 (0,1 et 1 mg/kg) un antagoniste des récepteurs 5-HT_{2B/2C} et du RS 10-2221 (0,1 et 1 mg/kg) un antagoniste des récepteurs 5-HT_{2C} avec la paroxétine (8 mg/kg) et la venlafaxine (8 mg/kg). Ensuite, nous avons étudié la co-administration de doses inactives d'agonistes des récepteurs 5-HT₂ [le DOI (0,06 et 0,25 mg/kg), un agoniste des récepteurs de sous-type 5-HT_{2A/2C} ; le BW 723C86 (0,5 et 2 mg/kg), un agoniste des récepteurs de sous-type 5-HT_{2B/2C} et le RO 60-0175 (0,25 et 1 mg/kg), un agoniste des récepteurs de sous-type 5-HT_{2C}] avec des doses sub-actives de paroxétine (0,25 et 1 mg/kg) et de venlafaxine (0,25 et 1 mg/kg) afin de déterminer si ces associations étaient capables d'agir de façon synergique pour entraîner un effet de type anxiolytique.

2. Synthèse des résultats

Les résultats de cette étude confirment que la paroxétine (0,5 ; 2 ; 4 et 8 mg/kg) et la venlafaxine (2 à 16 mg/kg) augmentent de façon dose dépendante le nombre de passages punis, et rejoignent ceux d'une étude précédente réalisée dans notre laboratoire .

Contrairement au SB 206553, un antagoniste des récepteurs 5-HT_{2B/2C} et au RS 10-2221, un antagoniste des récepteurs 5-HT_{2C}, le SR 46349B, un antagoniste des récepteurs 5-HT_{2A}, a bloqué l'activité anti-punition de la paroxétine, suggérant que, seuls les récepteurs 5-HT_{2A} sont impliqués dans l'action anxiolytique de la paroxétine dans le FPT. En revanche, l'activité de type anxiolytique de la venlafaxine dans le FPT semble impliquer les récepteurs 5-HT_{2A} ainsi que les récepteurs 5-HT_{2B}, puisque son effet est bloqué par le SR 46349B et le SB 206553 et n'est pas modifié par le RS 10-2221.

Par ailleurs, nos résultats ont montré que le BW 723C86 (un agoniste des récepteurs 5-HT_{2B}) et le RO 60-0175 (un agoniste des récepteurs 5-HT_{2C}) potentialisent l'effet de la paroxétine. Cependant, contrairement au BW 723C86, le RO 60-0175 a augmenté la réponse de la paroxétine (0,25 mg/kg) à une seule dose de 1 mg/kg. Récemment, Damjanoska *et al.* (2003) ont montré que le RO 60-0175 possédait une affinité pour les récepteurs 5-HT_{2B} (pK_i = 9,3) et suggèrent qu'il agirait plutôt comme un agoniste non sélectif des récepteurs 5-HT_{2C}. Ainsi, la potentialisation de l'effet de la paroxétine par le RO 60-0175 (1 mg/kg) pourrait s'expliquer par une activation des récepteurs 5-HT_{2B} plus que des récepteurs 5-HT_{2C}. En revanche, l'administration de DOI et de paroxétine ne se traduit pas par une augmentation significative du nombre de passages punis. Par ailleurs, parmi les trois agonistes étudiés, seul le DOI s'est avéré capable de potentialiser les effets de la venlafaxine. L'activation des récepteurs 5-HT_{2A} semble donc augmenter les effets anxiolytiques de la venlafaxine et l'activation des récepteurs 5-HT_{2B}, celles de la paroxétine. L'effet anxiolytique obtenu par l'association d'agonistes des récepteurs 5-HT₂ avec les ADs s'explique probablement par une augmentation de la disponibilité en 5-HT au niveau synaptique. L'absence de potentialisation des effets de la venlafaxine par le BW 723C86 et le RO 60-0175 peut se justifier par l'emploi de doses trop faibles de venlafaxine pour entraîner une augmentation de la 5-HT synaptique, ou bien par un effet inhibiteur exercé par les deux agonistes, activant des récepteurs pré-synaptiques et provoquant une diminution de la libération de 5-HT.

Cette étude confirme l'effet de type anxiolytique de la paroxétine et de la venlafaxine dans le FPT et révèle l'importance du rôle joué par les récepteurs 5-HT₂ dans le mécanisme d'action des ADs.

C. Etude 3 : Protocole modifié du test des quatre-plaques et discrimination entre les substances anxiolytiques

Ripoll N, Nic Dhonnchadha BA, Sebille V, Bourin M, Hascoët M. The four-plates test-retest paradigm to discriminate anxiolytic effects. *Psychopharmacology* 2005 180 (1):73-83.

1. Objectif de l'étude

De nombreux laboratoires ont essayé de sensibiliser les modèles animaux de l'anxiété en exposant la souris deux jours consécutifs à une session expérimentale. Cependant, la répétition de l'exposition de l'animal au test (test et pré-test 24 heures auparavant) entraîne une modification comportementale et pharmacologique de leur réponse se traduisant par une augmentation de l'anxiété et une atténuation voire une abolition de l'effet anxiolytique des BZDs (File et Zangrossi, 1993 ; Hascoët *et al.*, 1997 ; Holmes et Rodgers, 1999). Le comportement différent des animaux naïfs (non pré-testées) et des animaux pré-testées semble traduire deux formes distinctes d'anxiété (File, 2001 ; Holmes et Rodgers, 1998). De plus, dans l'EPM, différentes équipes suggèrent que la 1^{ère} expérience du test est associée à un apprentissage aversif (émotionnel). Le protocole de test-retest pourrait constituer un modèle d'étude à part entière, indépendant et spécifique, permettant ainsi l'exploration d'une anxiété de nature différente insensible aux BZDs. A l'heure actuelle, aucune hypothèse sérieuse permet d'expliquer les mécanismes neuro-physiologiques impliqués dans ces modifications comportementales et pharmacologiques. De plus, la caractérisation de l'effet d'un test-retest s'est limitée à l'influence d'un premier test sur l'effet anxiolytique des BZDs dans l'EPM exclusivement. Très peu d'intérêt a été porté sur les autres molécules anxiolytiques non-benzodiazépiniques. Or, les antidépresseurs, tels que les inhibiteurs de la recapture de la sérotonine (IRSSs), s'avèrent être des médicaments actifs dans le traitement de tous les troubles anxieux (Bourin et Baker, 1996). Par ailleurs, des travaux préliminaires dans notre laboratoire ont montré que le DOI (un agoniste des récepteurs sérotoninergiques 5-HT_{2A/2C}) exerce un effet anxiolytique chez les souris dans l'EPM et le FPT (Nic Dhonnchadha *et al.*, 2003a). De plus, comme nous l'avons observé dans l'étude précédente (Etude 2), les récepteurs 5-HT_{2A} semblent être impliqués dans les propriétés anxiolytiques de la paroxétine (Nic Dhonnchadha *et al.*, 2005).

Le FPT (Aron *et al.*, 1971 ; Boissier *et al.*, 1968) est un modèle animal d'anxiété simple et rapide, possédant une bonne validité prédictive. En effet, il permet la détection de l'effet anxiolytique non seulement des BZDs mais également de molécules non-BZDs, tels que les IRSSs (Hascoët *et al.*, 2000a).

La première partie de ce travail a eu pour objectif l'étude de la fonction des récepteurs aux BZDs lors d'un « test-retest » dans le FPT (protocole modifié des quatre-plaques) et ce,

afin de confirmer la perte d'activité anxiolytique des BZDs et d'étudier le phénomène d'acquisition ou d'apprentissage chez les souris pré-testées dans ce modèle. Nous avons donc étudié dans ce modèle le diazépam (1 mg/kg) et l'alprazolam (0,25 mg/kg), plus efficace que le diazépam dans de nombreux troubles anxieux chez l'Homme. Nous nous sommes ensuite intéressés à l'implication de la mémoire lors d'un test-retest dans le FPT. L'atropine (4 mg/kg), un antagoniste des récepteurs muscariniques connu pour ses propriétés amnésiantes (Castellano *et al.*, 1999 ; Pan et Han, 2000) a donc été étudiée dans ce modèle. L'effet du flumazénil (8 mg/kg), un antagoniste des récepteurs aux BZDs, a également été examiné, afin de mettre en évidence une éventuelle modification fonctionnelle des récepteurs aux BZDs, consécutive à un 1^{er} test.

Puis, nous nous sommes intéressés dans une seconde partie aux effets de molécules non-benzodiazépiniques, exerçant des effets de type anxiolytique chez les souris naïves, pour déterminer si le protocole de « test-retest » permet une discrimination entre les BZDs et les autres molécules anxiolytiques non-benzodiazépiniques. Pour répondre à cette question, nous avons donc étudié l'effet de deux ADs de mécanisme d'action différent, la paroxétine (4 et 8 mg/kg), un IRSS et la venlafaxine (4 et 16 mg/kg), un IRSN, ainsi que celui du DOI (1 mg/kg).

2. Synthèse des résultats

Nos résultats confirment que lors d'un second test, les BZDs (dans cette étude : le diazépam et l'alprazolam), administrées avant le 2^{ème} test, perdent leur activité de type anxiolytique, et, révèlent l'incapacité de ces dernières à s'opposer à l'augmentation de l'anxiété observée lors du 2^{ème} test. De plus, le comportement anxieux des souris traitées par le diazépam ou l'alprazolam survient indépendamment du traitement reçu par l'animal lors du 1^{er} test (véhicule ou BZD), suggérant que l'anxiolyse entraînée par les BZDs au cours du 1^{er} test n'empêche pas l'acquisition d'un apprentissage aversif. Par ailleurs, le flumazénil, un antagoniste des récepteurs aux BZDs ne redresse pas la diminution du nombre de passages punis observée chez les souris lors d'un 2^{ème} test. Selon l'hypothèse de Gonzales et File (1997), ces premiers résultats pourraient suggérer que le « test-retest » entraîne une modification fonctionnelle des récepteurs aux BZDs.

Tout comme les BZDs, la paroxétine et la venlafaxine perdent leur effet de type anxiolytique lors d'un 2^{ème} test dans le FPT et n'empêchent pas le comportement anxieux des animaux lors d'un 2^{ème} test. En revanche, le DOI s'oppose à la diminution du nombre de passages punis habituellement observée au cours d'un 2^{ème} test, traduisant un effet de type anxiolytique, certes atténué par rapport au 1^{er} test. Cet effet anti-punition ne s'explique pas par une perturbation des processus mnésiques par le DOI (Harvey, 2003 ; Meneses, 2002 ; Prado-Alcala *et al.*, 2003), ni par un effet anti-nociceptif. Par ailleurs, l'atropine a exercé un effet anti-punition chez les souris pré-testées. Néanmoins, son effet est faible et discutable, suggérant qu'il n'entraîne pas une véritable amnésie.

Ces données suggèrent que le protocole modifié du test des quatre-plaques permet de discriminer les effets de substances agissant *via* les récepteurs 5-HT₂ des autres. Le mécanisme d'action du DOI est probablement différent de celui des autres substances anxiolytiques testées dans cette étude et reste à déterminer.

Pour conclure, ce modèle de « test-retest » dans le FPT constitue un nouvel outil pour l'exploration d'autres systèmes de neurotransmission impliqués dans l'anxiété.

D. Etude 4 : Implication des récepteurs 5-HT_{2A} dans l'effet anxiolytique du DOI chez des souris réexposées au test des quatre-plaques

Ripoll N, Hascoët M, Bourin M. Implication of 5-HT(2A) subtype receptors in DOI activity in the four-plates test-retest paradigm in mice. Behav Brain Res 2006;166: 131-39.

1. Objectif de l'étude

Dans l'étude précédente nous avons montré que le DOI (1 mg/kg) s'oppose à l'augmentation de l'anxiété chez les souris lors d'un 2^{ème} test dans le FPT. Néanmoins, le ou les sous-type(s) de récepteur(s) impliqué(s) dans cet effet n'a pas été déterminé. En effet, même si le DOI est l'agoniste le plus sélectif des récepteurs 5-HT_{2A} disponible à ce jour (Pierce et Peroutka, 1989 ; Porter *et al.*, 1999 ; Titeler *et al.*, 1988), il possède néanmoins in vitro chez le Rat une affinité similaire pour les trois sous-types de récepteurs 5-HT₂, puisque (Baxter *et al.*, 1995) ont rapporté des pki de 7,3 ; 7,4 et 7,8 respectivement pour les sous-types de récepteurs 5-HT_{2A}, 5-HT_{2B} et 5-HT_{2C}. Dans les modèles animaux d'anxiété, l'effet des différents ligands des récepteurs 5-HT₂ varie selon les études (pour revue : Millan, 2003). Néanmoins, dans le FPT, l'effet anti-punition du DOI s'exerce chez les souris naïves par l'intermédiaire des récepteurs 5-HT_{2A} (Nic Dhonnchadha *et al.*, 2003b). Par ailleurs, au cours de l'étude précédente (étude 3), seule 1 dose de DOI (1 mg/kg) a été étudiée. On peut donc se demander si l'effet du DOI lors d'un 2^{ème} test est dose-dépendant.

L'objectif de cette étude était tout d'abord d'évaluer si l'effet du DOI est dose-dépendant lors d'un 2^{ème} test, puis de déterminer quel(s) sous-type(s) de récepteur(s) est impliqué dans les effets anti-punition du DOI chez les souris testées une seconde fois dans le FPT. Pour ceci, une gamme de doses de DOI (0.25 à 4 mg/kg) a été étudiée dans le protocole modifié du test des quatre-plaques. Puis, nous avons examiné l'effet du BW 723C86 (1 à 16 mg/kg) un agoniste des récepteurs 5-HT_{2B} et du RO 60-0175 (0,25 à 4 mg/kg) un agoniste des récepteurs 5-HT_{2C}, chez des souris testées une 1^{ère} fois et une seconde fois dans le FPT. Ensuite, nous avons étudié l'effet d'un pré-traitement par le SR 46349B (0,1 et 1 mg/kg), un antagoniste des récepteurs 5-HT_{2A} (Rinaldi-Carmona *et al.*, 1992), le SB 206553 (0,1 et 1 mg/kg) un antagoniste des récepteurs 5-HT_{2B/2C} (Kennett *et al.*, 1996), et le RS 10-2221 (0,1 et 1 mg/kg) un antagoniste des récepteurs 5-HT_{2C} (Bonhaus *et al.*, 1998 ; Bonhaus *et al.*, 1997) sur l'effet anti-punition du DOI lors d'un test-retest dans le FPT.

2. Synthèse des résultats

Chez les souris testées une 2^{ème} fois, le DOI exerce un effet anti-punition semblable aux doses de 1, 2 et 4 mg/kg. Chez les souris naïves, le DOI exerce son activité à partir de 0,5 mg/kg. Néanmoins, l'effet du DOI à la dose de 4 mg/kg est plus faible qu'aux autres doses. Cela est probablement dû à une activation des récepteurs 5-HT_{2C}. Le BW 723C86 (8 mg/kg), un agoniste des récepteurs 5-HT_{2B} a exercé un effet anxiolytique chez les souris naïves. En revanche, chez les souris testées 24 h auparavant, il est dépourvu d'effet. L'agoniste des récepteurs 5-HT_{2C}, le RO 60-0175 n'a pas modifié le nombre de passages punis par rapport au groupe contrôle chez les souris naïves et chez les souris pré-testées. Les souris expérimentées la veille et traitées par le BW 723C86 ou le RO 60-0175 ont présenté un comportement anxieux similaire à celui des souris testées une 2^{ème} fois dans le FPT ayant reçu le véhicule.

Parmi les 3 antagonistes étudiés en association avec le DOI (1 mg/kg), seul l'antagoniste spécifique des récepteurs 5-HT_{2A}, le SR 46349B s'est avéré capable de bloquer l'activité du DOI, aux deux doses testées (0,1 et 1 mg/kg) chez les souris naïves et à la dose la plus élevée (1mg/kg) chez les souris pré-testées 24 h auparavant. En revanche, le SB 206553, antagoniste des récepteurs 5-HT_{2B/2C} et le RS 102221, antagoniste des récepteurs 5-HT_{2C}, n'ont pas modifié l'activité anti-punition du DOI.

L'ensemble de ces résultats montre donc que le DOI exerce son activité dans le FPT via les récepteurs 5-HT_{2A} aussi bien chez les souris naïves que chez les souris pré-testées. Cependant, des modifications comportementales et pharmacologiques surviennent entre les deux sessions de test dans le FPT. De ce fait, on peut se demander, si les effets du DOI via les récepteurs 5-HT_{2A} impliquent les mêmes voies neuronales chez les souris naïves et chez les souris pré-testées.

E. Etude 5 : Etude des ligands des récepteurs 5-HT_{1A}

1. Objectif de l'étude

Divers travaux pré-cliniques et cliniques suggèrent l'implication des récepteurs sérotoninergiques de sous-types 5-HT_{1A} non seulement dans la pathogénie de la dépression mais également dans celle des troubles anxieux (Hamon, 1994 ; Lesch *et al.*, 2003 ; Overstreet *et al.*, 2003 ; Parks *et al.*, 1998 ; Strobel *et al.*, 2003 ; Toth, 2003). De plus, ces récepteurs semblent moduler l'apprentissage et les fonctions mnésiques (Galeotti *et al.*, 2000 ; Harder *et al.*, 1996 ; Liang, 1999 ; Manuel-Apolinar et Meneses, 2004 ; Pitsikas *et al.*, 2005).

Une forte densité en récepteurs 5-HT_{1A} a été retrouvée dans les noyaux du raphé (dorsal et médian), l'hippocampe et le septum (Pazos et Palacios, 1985). Ces récepteurs sont également présents dans le cortex enthorhinal et dans l'amygdale (Pompeiano *et al.*, 1992). Dans les noyaux du raphé, les récepteurs 5-HT_{1A} sont localisés au niveau somatodendritique sur les corps cellulaires des neurones sérotoninergiques (présynaptique) et au niveau postsynaptique dans les différentes aires de projection cérébrale de ces neurones, telles que le cortex, l'amygdale et l'hippocampe (Glaser et De Vry, 1992 ; Hall *et al.*, 1985 ; Hamon, 1997 ; Sim *et al.*, 1997 ; Zifa et Fillion, 1992).

L'activation des récepteurs 5-HT_{1A} semble être associée à un effet de type anxiolytique et/ou antidépresseur (Jolas *et al.*, 1995 ; Matsuda *et al.*, 1995). Le profil de l'activité d'un agoniste des récepteurs 5-HT_{1A} semble dépendre de la localisation, pré- ou post-synaptique des récepteurs qu'il active (De Vry, 1995 ; Koek *et al.*, 2001). Malgré des controverses, certaines études suggèrent que l'effet antidépresseur des agonistes 5-HT_{1A} est lié à une action au niveau des sites postsynaptiques, et l'effet anxiolytique médié par les récepteurs présynaptiques (De Vry, 1995 ; Jolas *et al.*, 1995 ; Remy *et al.*, 1996 ; Schreiber et De Vry, 1993). Les récepteurs 5-HT_{1A} présynaptiques sont impliqués dans le rétro-contrôle négatif (Pineyro et Blier, 1999 ; Zifa et Fillion, 1992). L'activation de ces derniers par des agonistes diminue l'activité électrique des neurones sérotoninergiques, entraînant une suppression de la synthèse de la 5-HT, du turnover et de la libération de la 5-HT dans différentes aires de projection cérébrale (Hutson *et al.*, 1989 ; Sprouse et Aghajanian, 1987).

Toutefois des controverses persistent quant au rôle précis joué par les récepteurs 5-HT_{1A} dans les manifestations anxieuses. Dans les modèles animaux d'anxiété, le profil des agonistes des récepteurs 5-HT_{1A}, administrés de façon systémique, est très variable. En effet,

selon les études des effets de type anxiolytique et anxiogène, ou bien aucun effet ont été rapportés (Barrett et Vanover, 1993 ; De Vry, 1995 ; Griebel, 1995 ; Millan, 2003). Divers travaux ont montré par exemple que, le 8-OH-DPAT un agoniste des récepteurs 5-HT_{1A} exerçait des effets anxiolytiques chez les rongeurs dans divers modèles animaux, tels que le test de vocalisation ultrasonique (Bartoszyk *et al.*, 1997 ; De Vry, 1995 ; De Vry *et al.*, 1993 ; De Vry *et al.*, 2004 ; Remy *et al.*, 1996 ; Sanchez et Mork, 1999 ; Schreiber *et al.*, 1998), le test de stimulation électrique de la dPAG (Nogueira et Graeff, 1995), le test d'interaction sociale (Andrews *et al.*, 1994) et le test de Vogel (Millan, 2003). Un effet anxiolytique aboli par la co-administration de WAY 100635, un antagoniste des récepteurs 5-HT_{1A} (Bartoszyk *et al.*, 1997 ; De Vry *et al.*, 2004). En revanche, d'autres travaux ont rapporté que le 8-OH-DPAT ne modifiait pas le comportement des rongeurs (Hascoët *et al.*, 1997), ou bien qu'il entraînait un effet anxiogène (Griebel *et al.*, 1993 ; Micheau et Van Marrewijk, 1999 ; Treit *et al.*, 1993b). De même, des résultats variables ont été observés avec les agonistes partiels et les antagonistes (De Vry *et al.*, 2004 ; Dekeyne *et al.*, 2000 ; Griebel *et al.*, 2000 ; Hascoët *et al.*, 2000b ; Peng *et al.*, 2004). Ces résultats contradictoires peuvent s'expliquer par l'utilisation de modèles animaux variés générant une anxiété de nature différente (Treit *et al.*, 1993b). Néanmoins des effets opposés, suite à l'administration de ligands 5-HT_{1A}, ont été rapportés dans les mêmes modèles (Griebel *et al.*, 1993 ; Hogg *et al.*, 1994). De nombreux facteurs semblent influencer les effets des ligands 5-HT_{1A} administrés de façon systémique, tels que le rythme circadien, la dose administrée, le tonus sérotoninergique endogène et la localisation des récepteurs 5-HT_{1A} stimulés (pré- *versus* postsynaptiques) (File *et al.*, 1996 ; Nagayama et Lu, 1998). La variabilité des effets des ligands 5-HT_{1A} semble également dépendre de l'aire cérébrale stimulée (Cheeta *et al.*, 2000 ; File *et al.*, 1996 ; Gonzalez *et al.*, 1996 ; Hogg *et al.*, 1994). Par ailleurs, des études ont montré que les récepteurs 5-HT_{1A} étaient impliqués dans les modifications comportementales survenant lors de la réalisation de deux sessions de tests dans l'EPM (Cheeta *et al.*, 2000). Une première expérience de l'EPM pourrait altérer la sensibilité fonctionnelle de ces récepteurs.

Divers travaux suggèrent l'existence d'une interaction entre les récepteurs 5-HT_{1A} et 5-HT_{2A} (Nogueira et Graeff, 1995).

L'objectif de cette étude était dans un premier temps d'évaluer l'implication des récepteurs 5-HT_{1A} dans le protocole modifié du test des quatre-plaques. Nous avons choisi d'étudier le 8-OH-DPAT, un agoniste sélectif des récepteurs 5-HT_{1A} (Arvidsson *et al.*, 1981) (0,5 à 8 mg/kg), la buspirone, un agoniste partiel (Hjorth et Carlsson, 1982) (0,03 à 0,5

mg/kg) et le WAY 100635 un antagoniste puissant et sélectif à faibles doses (0,008 ; 0,015 et 0,03 mg/kg) et à fortes doses (0,25 ; 0,5 et 1 mg/kg) (Corradetti *et al.*, 1996a ; Corradetti *et al.*, 1996b ; Forster *et al.*, 1995). Puis dans une seconde partie, nous avons étudié l'influence d'un pré-traitement par ces ligands sur les effets du DOI, afin de déterminer l'existence potentielle d'une interaction entre les récepteurs 5-HT_{1A} et 5-HT_{2A}. Des doses inactives et/ou actives de 8-OH-DPAT (1 et 2 mg/kg), de buspirone (0,06 et 0,5 mg/kg) et de WAY 100635 (0,008 et 0,25 mg/kg) furent donc étudiées en association avec une dose inactive (0,25 mg/kg) et active (2 mg/kg) de DOI.

2. Résultats

2.1. Effets propres

2.1.1. Le 8-OH-DPAT

L'ANOVA à 2 facteurs révèle des facteurs pré-test ($F_{(1,108)} = 53,22$; $p < 0,001$), traitement ($F_{(5,108)} = 9,10$; $p < 0,001$) et interaction significatifs ($F_{(5,108)} = 23,95$; $p > 0,05$). Le 8-OH-DPAT augmente de façon significative le nombre de passages punis aux doses de 1 et 2 mg/kg chez les souris pré-testées ($p < 0,05$ et $p < 0,01$ respectivement après une ANOVA à un facteur suivie d'un test *posthoc*, $F_{(11, 108)} = 19,86$; $p < 0,001$) et aux doses de 1 et 4 mg/kg chez les souris naïves ($p < 0,05$) (figure 9). L'analyse *posthoc* révèle une différence significative entre les groupes pré-testés, à l'exception de ceux qui ont reçu 1 et 2 mg/kg de 8-OH-DPAT, et le groupe contrôle (vét.) de souris naïves ($p < 0,001$) (figure 9). Le diazépam augmente de façon significative le nombre de passages punis par rapport au groupe contrôle chez les souris naïves ($p < 0,001$; par un test de Student).

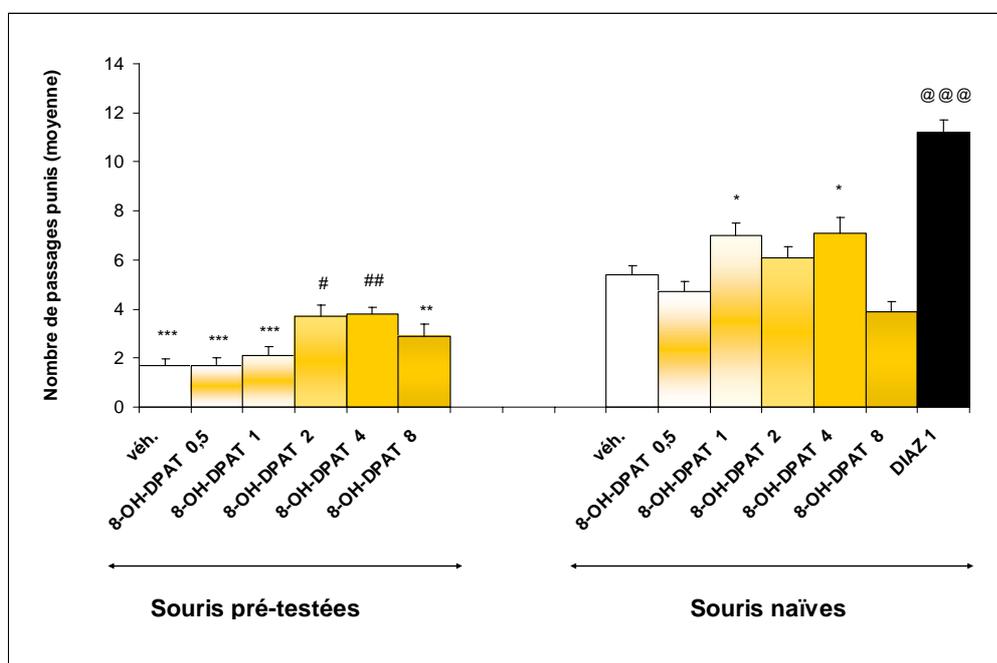


Figure 9 : Effet du 8-OH-DPAT (0,5 à 8 mg/kg) administré 30 min avant le test par voie i.p. dans le FPT modifié. Les résultats sont exprimés en nombre de passages punis moyen \pm S.E.M. ($n = 10$ par groupe). * indique une différence significative avec le groupe contrôle (vét.) de souris naïves, * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$. # indique une différence significative avec le groupe contrôle (vét.) de souris pré-testées, # $p < 0,05$; ## $p < 0,001$. @@@ indique une différence significative entre le groupe contrôle et le groupe traité par du diazépam, de souris naïves, $p < 0,001$.

2.1.2. La buspirone

L'ANOVA à 2 facteurs révèle des facteurs pré-test ($F_{(1,108)} = 155,52$; $p < 0,001$), traitement ($F_{(5,108)} = 2,30$; $p = 0,05$) et interaction significatifs ($F_{(5,108)} = 2,72$; $p < 0,05$). Chez les souris pré-testées, la buspirone (0,03 à 0,5 mg/kg) ne modifie pas de façon significative le nombre de passages punis par rapport au groupe contrôle (véh. ; $p > 0,05$) (figure 10). En revanche, chez les souris naïves, elle augmente significativement le nombre de passages punis à la dose de 0,5 mg/kg ($p < 0,05$) après une ANOVA à un facteur suivie d'un test *posthoc*, $F_{(11,108)} = 16,42$; $p < 0,001$) (figure 10). De plus, quel que soit le traitement reçu, l'analyse statistique révèle un nombre de passages punis significativement plus faible chez les souris pré-testées par rapport au groupe contrôle de souris naïves ($p < 0,001$; excepté pour le groupe de souris pré-testées qui a reçu le véhicule : $p < 0,01$). Le diazépam augmente de façon significative le nombre de passages punis par rapport au groupe contrôle ($p < 0,001$; par un test de Student).

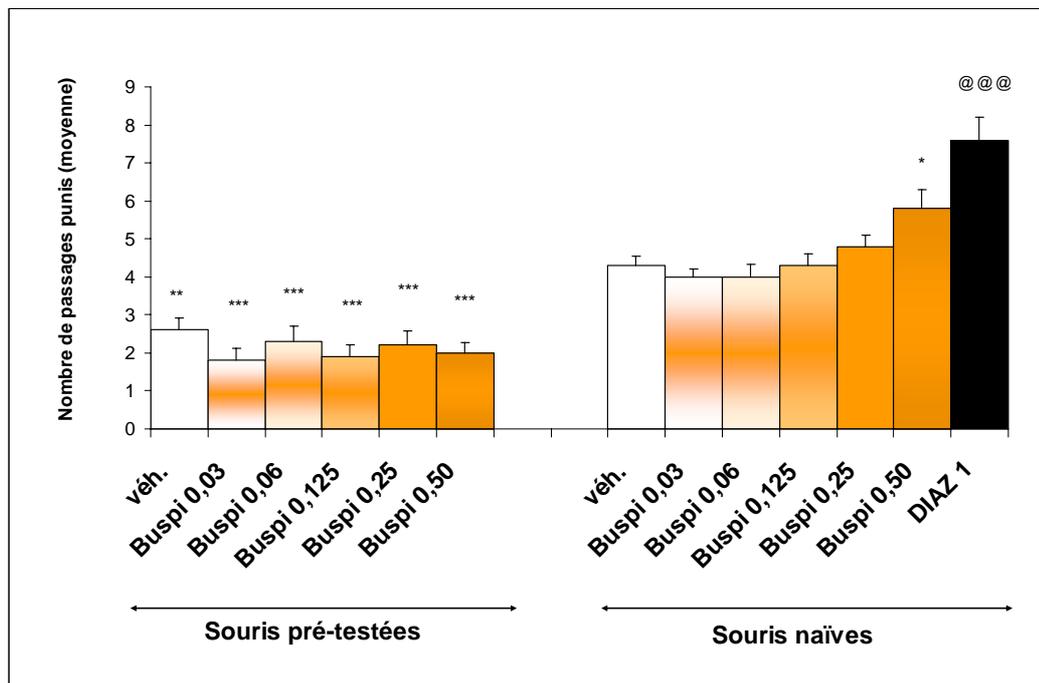


Figure 10 : Effet de la buspirone (0,03 à 0,5 mg/kg) administrée 30 min avant le test par voie i.p. dans le FPT modifié. Les résultats sont exprimés en nombre de passages punis moyen \pm S.E.M. ($n = 10$ par groupe). * indique une différence significative avec le groupe contrôle (véh.) de souris naïves, * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$. @@@ indique une différence significative entre le groupe contrôle et le groupe traité par du diazépam, de souris naïves, $p < 0,001$.

2.1.3. Le WAY 100635

L'ANOVA à 2 facteurs révèle des facteurs pré-test ($F_{(1,126)} = 155,52$; $p < 0,001$), traitement ($F_{(6,126)} = 2,30$; $p = 0,05$) et interaction significatifs ($F_{(6,126)} = 2,72$; $p < 0,05$). Le WAY 100635 (0,008 à 1 mg/kg) ne modifie pas de façon significative le nombre de passages punis par rapport au groupe contrôle (vét.) chez les souris pré-testées ($p > 0,05$) (figure 11). De plus, les groupes pré-testés sont caractérisés par un nombre de passages punis significativement plus faible que celui du groupe contrôle de souris naïves ($p < 0,001$ après une ANOVA à un facteur suivie d'un test *posthoc* ($F_{(13, 126)} = 16,42$; $p < 0,001$). Chez les souris naïves, le WAY 100635 augmente significativement le nombre de passages punis à la dose de 0,25 mg/kg ($p < 0,05$) (figure 11). Le diazépam augmente de façon significative le nombre de passages punis par rapport au groupe contrôle ($p < 0,001$; par un test de Student).

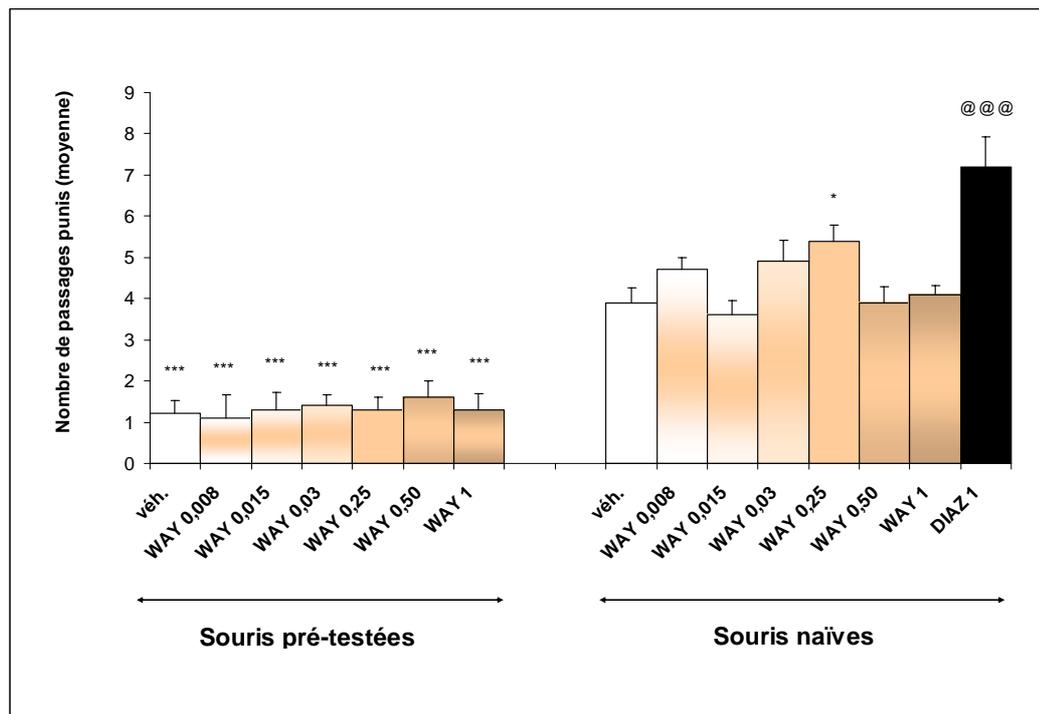


Figure 11 : Effet du WAY 100635 (0,008 ; 0,015 ; 0,03 ; 0,25 ; 0,5 et 1 mg/kg) administré 30 min avant le test par voie i.p. dans le FPT modifié. Les résultats sont exprimés en nombre de passages punis moyen \pm S.E.M. (n = 10 par groupe). * indique une différence significative avec le groupe contrôle (vét.) de souris naïves, * $p < 0,05$; *** $p < 0,001$. @@@ indique une différence significative entre le groupe contrôle et le groupe traité par du diazépam, de souris naïves, $p < 0,001$.

2.2. Interactions

2.2.1. Le 8-OH-DPAT et le DOI

Concernant les souris pré-testées, l'ANOVA à 2 facteurs révèle un facteur pré-traitement non significatif ($F_{(2,81)} = 1,96$; $p > 0,05$) et des facteurs traitement ($F_{(2,81)} = 7,30$; $p = 0,001$) et interaction significatifs ($F_{(4,81)} = 7,00$; $p < 0,001$). Le 8-OH-DPAT (2 mg/kg) et le DOI (2 mg/kg) augmentent significativement le nombre de passages punis par rapport au groupe contrôle ($p < 0,05$; $p < 0,001$ respectivement après une ANOVA à un facteur suivie du test *posthoc* de Sidak, $F_{(8,81)} = 5,82$; $p < 0,001$) (figure 12). Aux doses plus faibles, le 8-OH-DPAT (1 mg/kg) et le DOI (0,25 mg/kg) ne modifient pas le nombre de passages punis par rapport au groupe contrôle ($p > 0,05$) (figure 12). Même si d'une part, l'association, 8-OH-DPAT (1mg/kg) + DOI (0,25 mg/kg) augmente de façon significative le nombre de passages punis par rapport au groupe contrôle, et d'autre part la combinaison 8-OH-DPAT (2 mg/kg) + DOI (2mg/kg) diminue significativement le nombre de passages punis, l'analyse statistique ne révèle pas d'interaction significative entre le 8-OH-DPAT (1 ou 2 mg/kg) et le DOI (0,25 ou 2 mg/kg) ($p > 0,05$) (figure 12).

Concernant les souris naïves, l'ANOVA à 2 facteurs révèle un facteur pré-traitement non significatif ($F_{(2,79)} = 0,67$; $p > 0,05$) et des facteurs traitement ($F_{(2,79)} = 15,37$; $p < 0,001$) et interaction ($F_{(4,79)} = 2,76$; $p < 0,05$) significatifs. Le 8-OH-DPAT (1 et 2 mg/kg) et le DOI (0,25 mg/kg) ne modifient pas le nombre de passages punis par rapport au groupe contrôle ($p > 0,05$ après une ANOVA à un facteur suivie du test *posthoc* de Sidak, $F_{(8,79)} = 5,43$; $p < 0,001$) (figure 12). Le DOI (2 mg/kg) augmente significativement le nombre de chocs reçus ($p < 0,001$). Même si le nombre de passages punis moyen des groupes traités par l'association 8-OH-DPAT (1 et 2 mg/kg) + DOI (2 mg/kg) ne diffère pas statistiquement de celui du groupe contrôle, l'analyse statistique ne révèle pas d'interaction significative entre le 8-OH-DPAT (1 ou 2 mg/kg) et le DOI (0,25 ou 2 mg/kg) ($p > 0,05$) (figure 12). Le diazépam augmente de façon significative le nombre de passages punis par rapport au groupe contrôle ($p < 0,001$; par un test t de Student).

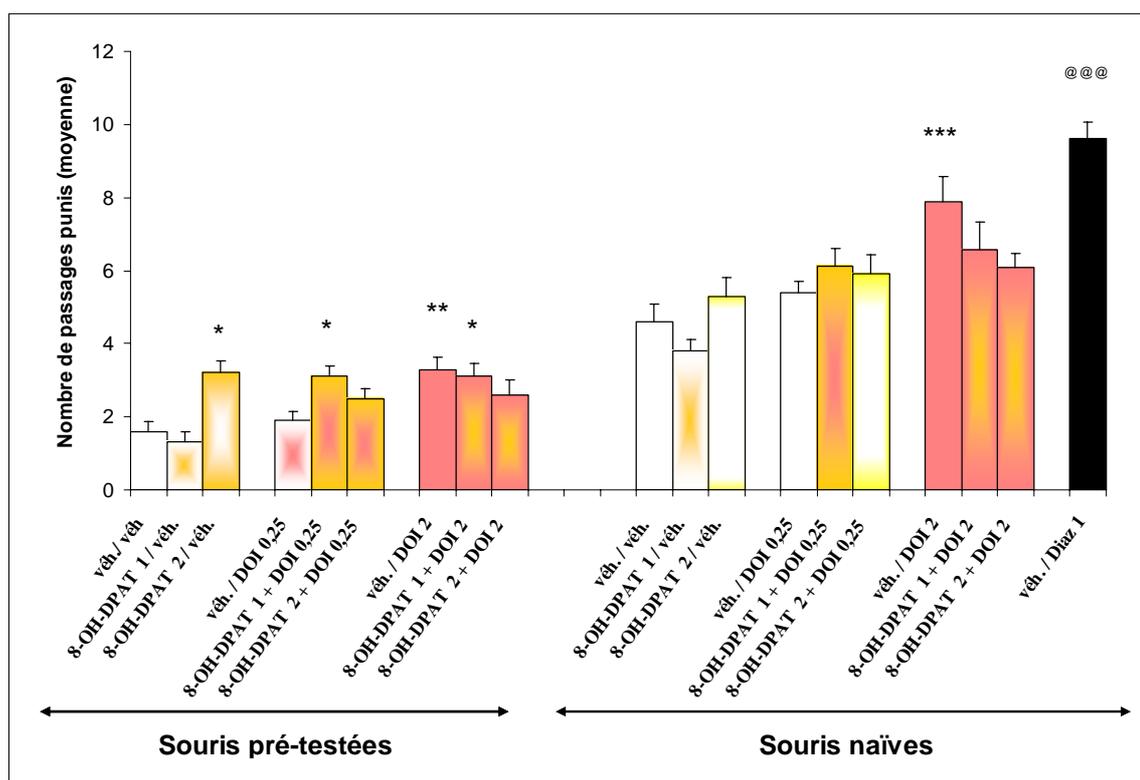


Figure 12 : Effet du 8-OH-DPAT (1 et 2 mg/kg ; administré 45 min avant le test par voie i.p.) et du DOI (0,25 et 2 mg/kg ; administré 30 min avant le test par voie i.p.) dans le FPT modifié. Les résultats sont exprimés en nombre de passages punis moyen \pm S.E.M. (n = 9-10 par groupe). * indique une différence significative entre les groupes traités et leur groupe contrôle (vét./vét.) correspondant, * p<0,05 ; ** p<0,01 ; *** p<0,001. @@@ indique une différence significative entre le groupe contrôle et le groupe traité par du diazépam, de souris naïves, p<0,001.

2.2.2. La buspirone et le DOI

Concernant les souris pré-testées, l'ANOVA à 2 facteurs révèle un facteur pré-traitement non significatif ($F_{(2,81)} = 0,117$; $p > 0,05$) et des facteurs traitement ($F_{(2,81)} = 42,67$; $p = 0,001$) et interaction significatifs ($F_{(4,81)} = 3,75$; $p < 0,01$). La buspirone (0,06 et 0,5 mg/kg) et le DOI (0,25 mg/kg) ne modifient pas le nombre de passages punis par rapport au groupe contrôle ($p > 0,05$) (figure 13). Le DOI (2 mg/kg) exerce un effet anti-punition significatif ($p < 0,001$ après une ANOVA à un facteur suivie du test *posthoc* de Sidak, $F_{(8,81)} = 12,57$; $p < 0,001$). Même si, l'association de buspirone (0,5 mg/kg) + DOI (0,25 mg/kg) augmente de façon significative le nombre de passages punis par rapport au groupe contrôle, l'analyse statistique ne révèle pas d'interaction significative entre la buspirone (0,06 et 0,5 mg/kg) et le DOI (0,25 ou 2 mg/kg) ($p > 0,05$) (figure 13).

Concernant les souris naïves, l'ANOVA à 2 facteurs révèle un facteur pré-traitement non significatif ($F_{(2,80)} = 1,10$; $p > 0,05$) et des facteurs traitement ($F_{(2,80)} = 49,03$; $p < 0,001$) et interaction ($F_{(4,80)} = 6,04$; $p < 0,001$) significatifs. La buspirone (0,06 et 0,5 mg/kg) et le DOI (0,25 mg/kg) ne modifient pas le nombre de passages punis par rapport au groupe contrôle ($p > 0,05$) (figure 13). Le DOI (2 mg/kg) exerce un effet anti-punition significatif ($p < 0,001$) après une ANOVA à un facteur suivie du test *posthoc* de Sidak, $F_{(8,80)} = 15,87$; $p < 0,001$). Même si, pour les groupes « buspirone 0,06 + DOI 0,25 » et « buspirone 0,5 + DOI 0,25 », le nombre de passages punis est significativement plus élevé par rapport au groupe contrôle ($p < 0,01$ et $p < 0,05$ respectivement), l'analyse statistique ne révèle pas d'interaction significative entre la buspirone (0,06 et 0,5 mg/kg) et le DOI (0,25 et 2 mg/kg) ($p > 0,05$). De plus, les groupes « buspirone 0,06 + DOI 2 » et « buspirone 0,5 + DOI 2 », augmentent le nombre de passages punis par rapport au groupe contrôle ($p < 0,001$ et $p < 0,05$ respectivement). Par ailleurs, l'analyse statistique révèle une interaction significative entre la buspirone (0,5 mg/kg) et le DOI (2 mg/kg) ($p < 0,001$). Le diazépam augmente de façon significative le nombre de passages punis par rapport au groupe contrôle ($p < 0,001$; par un test de Student).

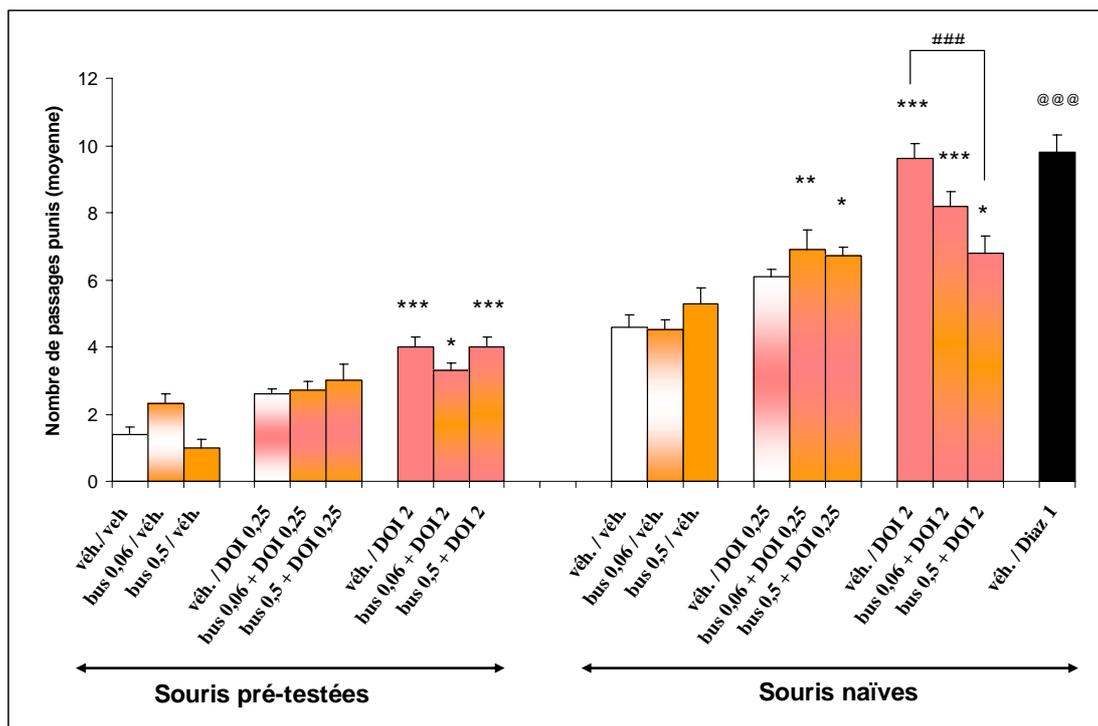


Figure 13 : Effet de la buspirone (0,06 et 0,5 mg/kg ; administrée 45 min avant le test par voie i.p.) et du DOI (0,25 et 2 mg/kg ; administré 30 min avant le test par voie i.p.) dans le FPT modifié. Les résultats sont exprimés en nombre de passages punis moyen \pm S.E.M. (n= 9-10 par groupe). * indique une différence significative entre les groupes traités et leur groupe contrôle (véh./véh.) correspondant, * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$. ### indique une différence significative entre le groupe traité par du DOI et celui traité par l'association (buspirone + DOI), $p < 0,001$. @@@ indique une différence significative entre le groupe contrôle et le groupe traité par du diazépam, de souris naïves, $p < 0,001$.

2.2.3. Le WAY 100635 et le DOI

Concernant les souris pré-testées, l'ANOVA à 2 facteurs révèle un facteur pré-traitement non significatif ($F_{(2,81)} = 0,103$; $p > 0,05$), un facteur traitement significatif ($F_{(2,81)} = 17,51$; $p < 0,001$) et un facteur interaction non significatif ($F_{(4,81)} = 1,065$; $p > 0,05$). Néanmoins l'analyse *posthoc* ne révèle pas de différences significatives entre le groupe contrôle (véh.) et les autres groupes ($p > 0,05$ après une ANOVA à un facteur suivie du test *posthoc* de Sidak, $F_{(8,81)} = 4,94$; $p < 0,001$) (figure 14). Elle confirme également l'absence d'interaction entre le WAY 100635 (0,008 et 0,25 mg/kg) et le DOI (0,25 et 2 mg/kg).

Concernant les souris naïves, l'ANOVA à 2 facteurs révèle un facteur pré-traitement non significatif ($F_{(2,81)} = 0,43$; $p > 0,05$), un facteur traitement significatif ($F_{(2,81)} = 33,0$; $p < 0,001$) et un facteur interaction non significatif ($F_{(4,81)} = 1,30$; $p > 0,05$). Le WAY 100635 (0,008 et 0,25 mg/kg) et le DOI (0,25 mg/kg) ne modifient pas le nombre de passages punis par rapport au groupe contrôle ($p > 0,05$; après une ANOVA à un facteur suivie du test *posthoc* de Sidak, $F_{(8,81)} = 9,0$; $p < 0,001$) (figure 14). Le DOI (2 mg/kg) exerce un effet anti-punition significatif ($p < 0,001$). L'analyse statistique ne révèle pas d'interaction significative entre le WAY 100635 (0,008 et 0,25 mg/kg) et le DOI (0,25 ou 2 mg/kg) ($p > 0,05$) (figure 14). Néanmoins, le nombre de passages punis moyen des groupes traités par l'association de WAY 100635 (0,008 et 0,25 mg/kg) et DOI (2 mg/kg) est significativement plus élevé que celui du groupe contrôle ($p < 0,05$; $p < 0,001$ respectivement). Le diazépam augmente de façon significative le nombre de passages punis par rapport au groupe contrôle ($p < 0,001$; par un test de Student).

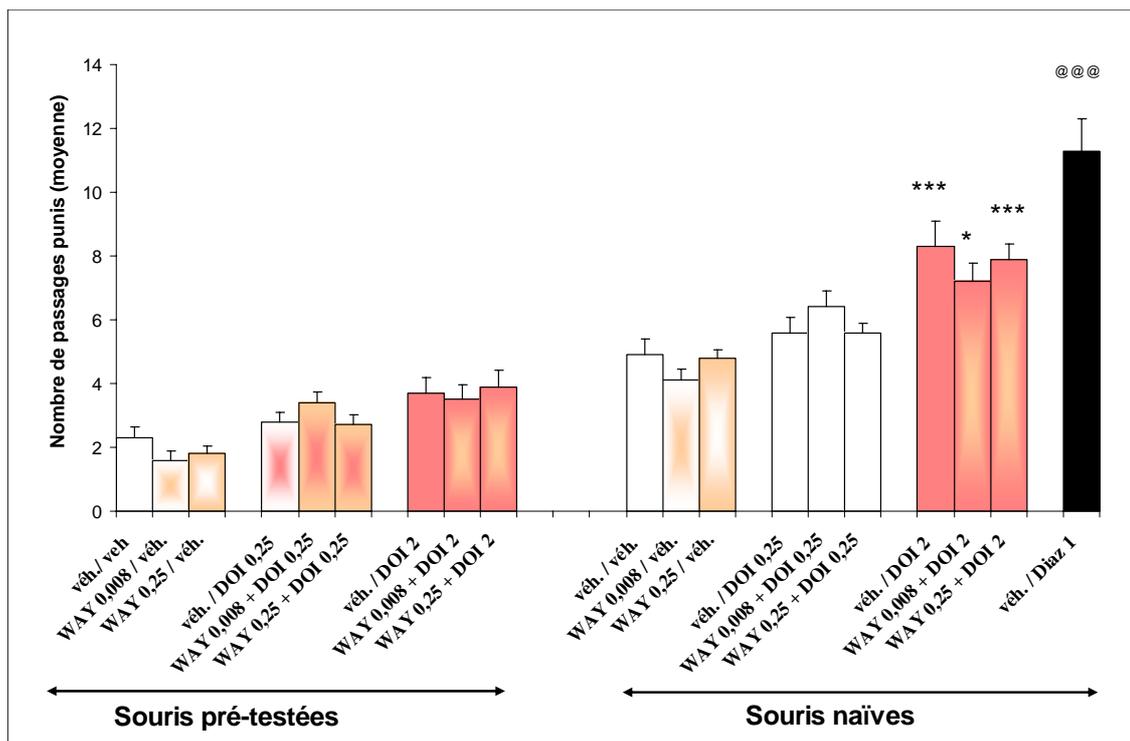


Figure 14 : Effet du WAY 100635 (0,008 et 0,25 mg/kg ; administré 45 min avant le test par voie i.p.) et du DOI (0,25 et 2 mg/kg ; administré 30 min avant le test par voie i.p.) dans le FPT modifié. Les résultats sont exprimés en nombre de passages punis moyen \pm S.E.M. (n = 10 par groupe). * indique une différence significative entre les groupes traités et leur groupe contrôle (vét./vét.) correspondant, * p<0,05 ; *** p<0,001. @@@ indique une différence significative entre le groupe contrôle et le groupe traité par du diazépam, de souris naïves, p<0,001.

3. Discussion

L'objectif de cette étude était d'une part d'étudier l'effet de ligands 5-HT_{1A} et d'autre part, leur influence sur l'activité du DOI, dans notre protocole modifié des quatre-plaques.

Nos travaux montrent que chez les souris naïves, le 8-OH-DPAT a exercé un effet anxiolytique aux doses de 1 et 4 mg/kg et aux doses de 2 et 4 mg/kg chez les souris pré-testées. La buspirone et le WAY 100635 ont augmenté le nombre de passages punis des souris naïves (par rapport aux souris qui ont reçu le véhicule) aux doses respectives de 0,5 et 0,25 mg/kg. En revanche, ces substances n'ont pas influencé le comportement des rongeurs soumis à un 2^{ème} test dans le FPT. Néanmoins, dans la seconde partie de notre étude (interactions), l'effet de type anxiolytique du 8-OH-DPAT, de la buspirone et du WAY 100635 n'a pas été retrouvé chez les souris naïves. Ces différentes observations suggèrent que les récepteurs 5-HT_{1A} ne jouent pas un rôle crucial dans le FPT, chez les souris naïves. Nos résultats rejoignent ceux de l'étude d'Hascoët *et al.* (2000b), qui n'a pas rapporté d'effet pour la buspirone (0.06 et 0.5 mg/kg) chez des souris naïves dans le FPT. De plus, dans une autre étude réalisée à nouveau dans le FPT, ces auteurs n'ont pas mis en évidence d'effet anti-punition pour le 8-OH-DPAT chez des souris naïves (Hascoët *et al.*, 1997). L'étude des ligands des récepteurs 5-HT_{1A} a fait l'objet de très nombreuses études dans les modèles animaux d'anxiété. Les résultats qui en ressortent sont variables et contradictoires (De Vry, 1995 ; Griebel *et al.*, 2000 ; Millan, 2003). Une multitude de facteurs semblent orienter la réponse aux ligands 5-HT_{1A} et de ce fait être à l'origine de la variabilité des résultats, tels que le rythme circadien (Clenet *et al.*, 2005 ; Nagayama et Lu, 1998), la nature de l'anxiété générée par le modèle (Griebel *et al.*, 2000), l'anxiété basale du rongeur, la localisation du site récepteur stimulé (pré- *versus* postsynaptique) (File *et al.*, 1996 ; Lopez-Rubalcava, 1996), l'aire cérébrale préférentiellement impliquée dans le modèle (Cheeta *et al.*, 2000). L'activation des neurones sérotoninergiques ascendants, originaires du NDR et/ou du NMR, exerce un rôle différent, pro- *versus* anti-aversif, selon l'aire cérébrale innervée et le modèle employé (Graeff *et al.*, 1997). Dans notre modèle, l'absence d'effet reproductible des 3 ligands 5-HT_{1A} chez les souris naïves, nous amène à formuler 2 hypothèses : une première excluant la participation des récepteurs 5-HT_{1A} dans le FPT chez les souris naïves. Une seconde explication pourrait être l'absence de sensibilité de ces récepteurs à la période où nous avons réalisé cette étude (9-13h). En revanche, les récepteurs 5-HT_{1A} semblent être

impliqués chez les souris pré-testées, puisque le 8-OH-DPAT exerce un effet anti-punition chez ces dernières aux doses de 2 et 4 mg/kg. L'effet anti-punition pourrait s'expliquer alors par une augmentation de la transmission sérotoninergique *via* l'activation des sites postsynaptiques ou par une diminution *via* l'activation des sites présynaptiques. Toutefois, les comportements d'évitement semblent être corrélés à une diminution des taux de 5-HT (Graeff, 2002). Un effet postsynaptique, sous-tendant l'activité anti-punition du 8-OH-DPAT, semble donc plus probable dans notre modèle. Toutefois, ces considérations spéculatives restent à infirmer ou à confirmer. D'autres études ont mis en évidence l'implication des récepteurs 5-HT_{1A} lors d'un 2^{ème} test dans l'EPM. Toutefois, contrairement à nos résultats, il a été montré que le 8-OH-DPAT, administré dans l'hippocampe dorsal de rats, exerçait un effet anxiogène lors du 2^{ème} test dans le l'EPM (Cheeta *et al.*, 2000 ; File *et al.*, 1996), contrecarré par le WAY 100635 (File *et al.*, 1996) . Au contraire lorsqu'il est administré dans le MRN, il exerce un effet anxiolytique lors d'un 2^{ème} test dans l'EPM (File *et al.*, 1996), un effet antagonisé par le WAY 100635. Une autre étude a montré que l'administration de 8-OH-DPAT dans le septum latéral de rats, ne modifie pas le comportement des rongeurs (Cheeta *et al.*, 2000). Par ailleurs, il a été montré que, l'injection dans l'hippocampe ventral de souris (Swiss-Webster) de WAY 100635 (3 µg/ 0,2 µl) se traduit par un effet anxiolytique lors d'un 1^{er} test dans l'EPM (Nunes-de-Souza *et al.*, 2002). Cet effet n'a pas été observé chez les souris expérimentées une seconde fois dans l'EPM (Nunes-de-Souza *et al.*, 2002). En revanche, injecté dans l'hippocampe dorsal, le WAY100635 n'exerce aucun effet lors d'un 1^{er} et d'un 2^{ème} test (Nunes-de-Souza *et al.*, 2002). Par ailleurs, Canto-de-Souza *et al.* (2002) ont montré que l'injection du WAY100635 dans le NDR et dans le NMR n'entraîne aucune modification comportementale lors d'un 2^{ème} test dans l'EPM. Ces différentes études ont suggéré que les récepteurs 5-HT_{1A} postsynaptiques de l'hippocampe ventral étaient impliqués dans l'anxiété dans l'EPM et qu'une 1^{ère} expérience de l'EPM altérait la sensibilité fonctionnelle de ces récepteurs. La discordance entre ces études et nos résultats peuvent s'expliquer par l'utilisation d'espèces et de modèles différents ainsi que du site d'injection (systémique *versus* local). La comparaison entre nos études est donc difficilement réalisable.

L'effet anti-punition du 8-OH-DPAT dans notre modèle pourrait s'exercer indirectement via le système dopaminergique. Cette hypothèse s'appuie sur des observations expérimentales. En effet, divers travaux ont montré que cette substance facilitait la transmission dopaminergique (Benloucif et Galloway, 1991 ; Rollema *et al.*, 2000 ; Zifa et Fillion, 1992). Rollema *et al.* (2000) ont montré, par exemple, que le 8-OH-DPAT augmentait la libération corticale de DA chez des rats, sans affecter la libération striatale. Cet effet est

bloqué par le WAY 100635. Par ailleurs, il est établi que la buspirone possède une affinité pour les récepteurs dopaminergiques D₂ (De Vry *et al.*, 1991), et agit en tant qu'antagoniste au niveau de ces sites récepteurs (McMillen *et al.*, 1983). Or un blocage des récepteurs D₂ ne modifie pas le comportement des souris pré-testées dans le FPT (étude 5a). L'influence différentielle des ligands 5-HT_{1A} sur le système dopaminergique pourrait expliquer que seul le 8-OH-DPAT a exercé une activité dans notre protocole modifié des quatre-plaques. Néanmoins, cette hypothèse reste à élucider.

Par ailleurs, de nombreuses études suggèrent que les récepteurs 5-HT_{1A} modulent l'apprentissage et les fonctions mnésiques (Galeotti *et al.*, 2000 ; Liang, 1999 ; Manuel-Apolinar et Meneses, 2004 ; Pache *et al.*, 2003 ; Pitsikas *et al.*, 2005). Néanmoins, Hascoët *et al.* (1997) ont observé que, l'administration de 8-OH-DPAT avant un 1^{er} test dans le FPT ne s'oppose pas à l'augmentation de l'anxiété lors d'un second test sans traitement, suggérant que le 8-OH-DPAT ne bloque pas l'acquisition. Par ailleurs, Galeotti *et al.* (2000) ont montré que le 8-OH-DPAT supprime l'amnésie induite par le WAY 100635, la scopolamine et la dicyclomine. L'effet anti-punition du 8-OH-DPAT dans notre modèle interfère probablement avec la mémoire aversive, mais ne s'explique pas par un effet amnésiant.

La seconde partie de cette étude a consisté à étudier l'influence de ces ligands 5-HT_{1A} sur l'activité anti-punition du DOI. Nos résultats montrent que seule la buspirone est capable d'atténuer l'effet anti-punition du DOI (2 mg/kg) chez les souris naïves. Aucune interaction significative n'a été observée chez les souris pré-testées. Néanmoins, dans l'étude de l'association avec le WAY 100635, le DOI (2 mg/kg) n'a pas exercé d'effet anti-punition significatif chez les souris pré-testées ; toutefois nous ne pensons pas que l'absence de potentialisation et d'antagonisme par le WAY 100635 (0,008 et 0,25 mg/kg) puisse s'expliquer par l'inactivité du DOI. Contrairement à nos travaux Nogueira et Graeff (1995) ont montré, dans un test de stimulation électrique de la dPAG, que les agonistes des récepteurs 5-HT_{1A} (8-OH-DPAT, BAY-R-1532) et le DOI diminuaient les réponses de fuite, traduisant un effet anxiolytique. Leurs effets ont été bloqués respectivement par la spipérone, un antagoniste des récepteurs 5-HT_{2A} et le NAN-190, un antagoniste des récepteurs 5-HT_{1A}, suggérant une interaction fonctionnelle entre ces récepteurs (Nogueira et Graeff, 1995). Mais l'étude récente de (de Paula Soares et Zangrossi, 2004) n'a pas confirmé ces résultats. Diverses études suggèrent l'existence d'une interaction entre les récepteurs 5-HT_{1A} et 5-HT_{2A}, co-localisés sur les mêmes neurones (Amargos-Bosch *et al.*, 2004 ; Cornea-Hebert *et al.*, 2002 ; Feng *et al.*, 2001). Néanmoins certains travaux rapportent une interaction inhibitrice entre les deux

récepteurs (Armagos-Bosch *et al.*, 2004), l'activation de l'un inhibant celle de l'autre et vice versa.

F. Etude 6 : Interaction de la clonidine avec le DOI

1. Objectifs de l'étude

Nous avons montré précédemment que l'effet anti-punition du DOI s'exerçait aussi bien chez les souris naïves que chez les souris expérimentées 24 h auparavant, dans le FPT via les récepteurs 5-HT_{2A} (étude 4). Récemment, Masse *et al.* (2006) ont rapporté qu'un prétraitement par la clonidine, un agoniste des récepteurs noradrénergiques α_2 , empêchait le DOI d'exercer son activité anxiolytique dans le FPT chez des souris naïves, suggérant une interaction entre les récepteurs 5-HT_{2A} et le système noradrénergique, et plus particulièrement les récepteurs α_2 . Cette hypothèse est étayée par d'autres observations. En effet, l'activité anxiolytique de divers ADs, IRSSs et IRSNs, tels que la paroxétine et la venlafaxine, s'exerçant dans le FPT apparemment *via* les récepteurs 5-HT_{2A}, est abolie par un prétraitement de clonidine (Masse *et al.*, 2005). Ces différents travaux suggèrent qu'une balance entre la 5-HT et la NA est un facteur crucial dans l'effet anxiolytique dans le FPT.

De nombreuses études électrophysiologiques, comportementales et pharmacologiques ont mis en évidence des interactions entre les systèmes noradrénergique et sérotoninergique (Bourin *et al.*, 2005 ; Cryan *et al.*, 2004). Les neurones sérotoninergiques du noyau dorsal du raphé (NDR) reçoivent des projections du locus coeruleus (Baraban et Aghajanian, 1980 ; Szabo *et al.*, 1999). Les récepteurs noradrénergiques α_1 , exprimés dans le NDR, modulent l'activité des neurones sérotoninergiques ascendants (Adell et Artigas, 1999). De plus, l'activation des récepteurs α_2 présents sur des neurones sérotoninergiques inhibe la libération de 5-HT dans les structures cortico-limbiques, tels que le cortex préfrontal et l'hippocampe (Adell et Artigas, 1999 ; Haddjeri *et al.*, 1996 ; Numazawa *et al.*, 1995). Au contraire, le blocage de ces récepteurs présents au niveau des afférences noradrénergiques dans le NDR augmente l'activité neuronale et la libération de 5-HT dans les aires terminales (Weikop *et al.*, 2004).

L'implication du système noradrénergique dans l'anxiété a été démontrée, et plus particulièrement des récepteurs noradrénergiques de sous-type α_2 , (Millan, 2003 ; Sevy *et al.*, 1989). Il existe différents sous-types de récepteurs α_2 : les récepteurs α_{2A} , α_{2B} et α_{2C} (Boyajian et Leslie, 1987 ; Bylund et Chacko, 1999). Les récepteurs α_{2A} , localisés au niveau pré- et postsynaptique, sont largement distribués dans le SNC. Ils sont exprimés en forte

densité dans le cortex et le locus coeruleus. Au niveau cérébral, les récepteurs α_{2B} sont essentiellement localisés dans le thalamus. Les récepteurs α_{2C} , quant à eux ont été retrouvés dans le striatum, le cortex et sur les dendrites du locus coeruleus. Les études des ligands des récepteurs α_2 dans les modèles animaux d'anxiété fournissent des résultats variés (Millan, 2003). Les résultats contradictoires rapportés peuvent s'expliquer par la localisation différente (pré- *versus* postsynaptique) des récepteurs stimulés par les ligands des récepteurs α_2 (Millan, 2003). En ce qui concerne l'influence des récepteurs α_1 dans l'anxiété, les résultats sont peu nombreux et souvent contradictoires, mais la balance pencherait pour un effet anxiogène lors de l'activation de ces récepteurs (Cecchi *et al.*, 2002 ; Millan, 2003). Toutefois, ces récepteurs ne semblent pas être impliqués dans le FPT et n'influencent pas l'effet anti-punition des ADs et du DOI (Bourin *et al.*, 2005 ; Masse *et al.*, 2006).

L'objectif de ce travail était d'évaluer l'effet de la clonidine sur l'activité anti-punition du DOI chez des souris pré-testées, afin de déterminer si l'effet observé chez les souris naïves s'observe également ou diffère chez les souris testées 24h auparavant dans le FPT. Dans ce but, nous avons étudié, dans notre protocole modifié des quatre-plaques, l'effet de l'interaction de 2 doses de clonidine (0,03 et 0,06 mg/kg) avec une dose inactive et active de DOI (0,25 et 2 mg/kg). Les doses de clonidine et de DOI ont été choisies en fonction d'études précédentes (Masse *et al.*, 2006 ; étude 4).

2. Résultats

Concernant les souris pré-testées, l'ANOVA à 2 facteurs révèle un facteur pré-traitement non significatif ($F_{(2,98)} = 0,949$; $p > 0,05$), un facteur traitement significatif ($F_{(2,98)} = 19,90$; $p < 0,001$) et un facteur interaction non significatif ($F_{(4,98)} = 1,05$; $p > 0,05$). La clonidine (0,03 et 0,06 mg/kg) et le DOI (0,25 mg/kg) ne modifient pas le nombre de passages punis par rapport au groupe contrôle ($p > 0,05$) (figure 15). Le DOI (2 mg/kg) exerce un effet anti-punition significatif ($p < 0,001$ après une ANOVA à un facteur suivie du test *posthoc* de Sidak, $F_{(8,98)} = 5,64$; $p < 0,001$). L'analyse statistique ne révèle pas d'interaction significative entre la clonidine (0,03 et 0,06 mg/kg) et le DOI (0,25 ou 2 mg/kg) ($p > 0,05$) (figure 15).

Concernant les souris naïves, l'ANOVA à 2 facteurs révèle des facteurs pré-traitement ($F_{(2,99)} = 11,79$; $p < 0,001$), traitement ($F_{(2,99)} = 28,20$; $p < 0,001$) et interaction ($F_{(4,99)} = 9,32$; $p < 0,001$) significatifs. La clonidine (0,03 et 0,06 mg/kg) et le DOI (0,25 mg/kg) ne modifient pas le nombre de passages punis par rapport au groupe contrôle ($p > 0,05$; après une ANOVA à un facteur suivie du test *posthoc* de Sidak, $F_{(8,99)} = 14,66$; $p < 0,001$) (figure 15). Le DOI (2 mg/kg) exerce un effet anti-punition significatif ($p < 0,001$). L'analyse statistique ne révèle pas d'interaction significative entre la clonidine (0,03 et 0,06 mg/kg) et le DOI (0,25 mg/kg) ($p > 0,05$) (figure 15). En revanche, aux 2 doses testées (0,03 et 0,06 mg/kg), la clonidine antagonise l'effet anti-punition du DOI (2 mg/kg) ($p < 0,001$) (figure 15). Le diazépam augmente de façon significative le nombre de passages punis par rapport au groupe contrôle ($p < 0,001$ par un test de Student).

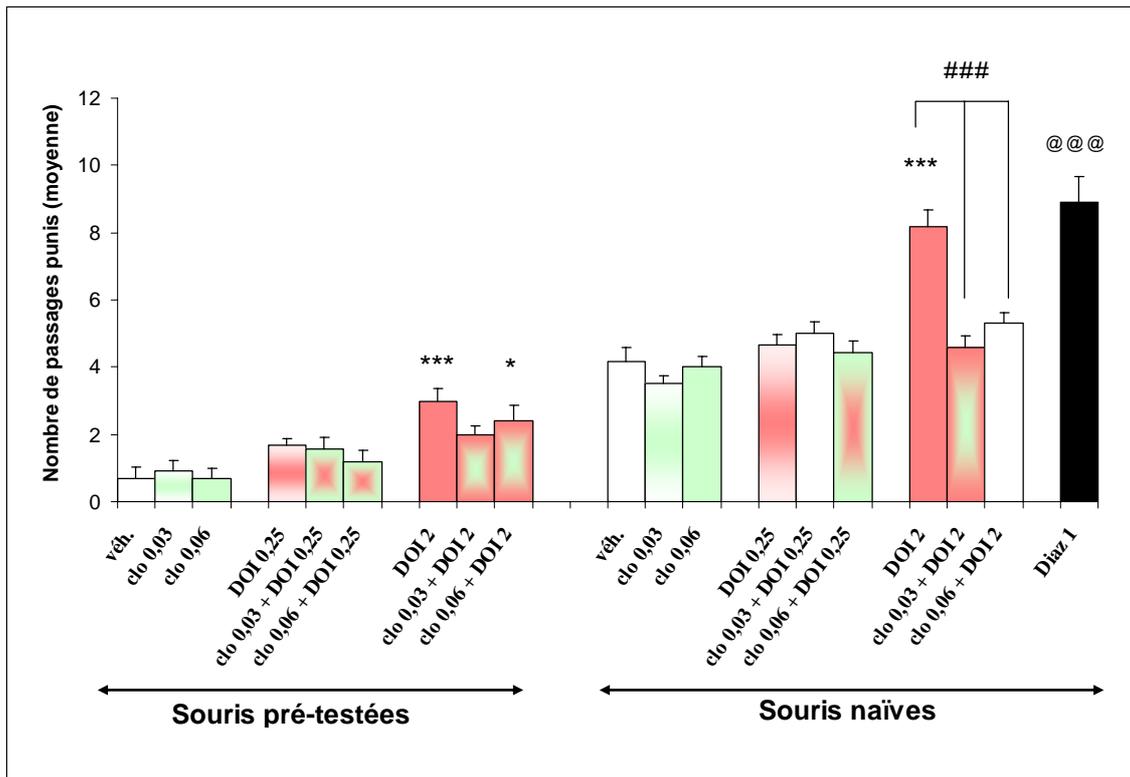


Figure 15 : Effet de la clonidine (0,03 et 0,06 mg/kg ; administrée 45 min avant le test par voie i.p.) et du DOI (0,25 et 2 mg/kg ; administré 30 min avant le test par voie i.p.) dans le FPT modifié. Les résultats sont exprimés en nombre de passages punis moyen \pm S.E.M. (n = 11-12 par groupe). * indique une différence significative entre les groupes traités et leur groupe contrôle (veh.) correspondant, * $p < 0,05$; *** $p < 0,001$. ### indique des différences significatives entre les groupes traités par le DOI et ceux traités par l'association (clonidine + DOI), $p < 0,001$. @@@ indique une différence significative entre le groupe contrôle et le groupe traité par du diazépam, de souris naïves, $p < 0,001$.

3. Discussion

L'objectif de ce travail était d'étudier l'effet de la clonidine sur l'activité anti-punition du DOI dans notre protocole modifié des quatre-plaques.

Aux doses étudiées (0,03 et 0,06 mg/kg), la clonidine, un agoniste des récepteurs α_2 n'a pas exercé d'effet chez les souris naïves rejoignant ainsi les travaux récents de Masse *et al.* (2005). L'activation isolée des récepteurs α_2 ne se traduit donc pas par une modification comportementale dans le FPT. D'autres travaux ont néanmoins rapporté que la clonidine et d'autres agonistes des récepteurs α_2 exerçaient un effet anxiolytique dans divers modèles animaux d'anxiété (Fontana *et al.*, 1989 ; Handley et Mithani, 1984 ; Lopez-Rubalcava et Fernandez-Guasti, 1994 ; Millan *et al.*, 2000). Une autre étude a montré que la clonidine antagonisait les effets anti-conflit de la yohimbine, un antagoniste des récepteurs α_2 dans un test modifié de Vogel (Soderpalm *et al.*, 1995). Ces résultats contradictoires peuvent s'expliquer par la localisation différente (pré- versus postsynaptique) des récepteurs stimulés par les ligands α_2 (Millan, 2003).

Il a été suggéré que les récepteurs α_2 sont impliqués dans les mécanismes sous-tendant la mémoire aversive (Davies *et al.*, 2004 ; Hall *et al.*, 2001 ; Moller *et al.*, 1994). La stimulation des récepteurs α_2 pourrait altérer l'apprentissage aversif en diminuant la libération de NA dans l'amygdale (Fendt *et al.*, 1994). Dans un modèle d'évitement passif chez la Souris, Galeotti *et al.* (2004) ont montré, par exemple, que la clonidine et le guanabenz, un autre agoniste des récepteurs α_2 , altéraient les processus de mémoire via l'activation sélective des récepteurs noradrénergiques de sous-type α_{2A} . Toutefois, dans notre modèle, la clonidine n'a pas bloqué l'augmentation de l'anxiété inhérente à un 1^{er} test. Nos résultats montrent donc que dans le FPT, la clonidine n'altère pas l'expression de l'apprentissage aversif acquis au cours du 1^{er} test.

Nos résultats ont montré par ailleurs, que la clonidine supprime l'effet anti-punition du DOI chez les souris naïves et confirment ainsi les premières observations de Masse *et al.* (2006), révélant une interaction entre les récepteurs α_2 et 5-HT_{2A} dans le FPT. Masse *et al.* (2006) ont montré que la clonidine et la guanfacine un agoniste spécifique des récepteurs α_{2A} , altéraient de façon similaire l'activité anti-punition du DOI dans le FPT, suggérant que l'effet inhibiteur de la clonidine s'exerce *via* les récepteurs α_{2A} . Néanmoins, contrairement à nos observations, l'étude de Masse *et al.* (2006) a montré que la clonidine (0,06 mg/kg)

antagonisait la dose de 1 mg/kg de DOI, mais pas celle de 2 mg/kg. Dans notre étude, l'effet du DOI (2 mg/kg) a été supprimé par les 2 doses étudiées de clonidine (0,03 et 0,06 mg/kg).

Par ailleurs, d'autres travaux ont mis en évidence une interaction entre les récepteurs α_2 et 5-HT₂. (Matsumoto *et al.*, 1997) ont montré, par exemple, que le comportement des « tics de la tête » ou « head-twitch behaviour » induit par le 5-MeO-DMT, un agoniste des récepteurs 5-HT₂ était supprimé par un pré-traitement par la clonidine ou la kétansérine, un antagoniste des récepteurs 5-HT₂. Néanmoins, cette étude n'a pas employé de ligands 5-HT₂ très spécifiques.

L'activation des récepteurs α_2 inhibe la libération de NA dans différentes structures cérébrales, comme l'hippocampe (Dennis *et al.*, 1987). Ainsi, une diminution de la NA, provoquée par l'administration de clonidine, pourrait être à l'origine de la perte d'effet du DOI. Par ailleurs, l'administration systémique de DOI exerce un effet inhibiteur indirect sur le locus coeruleus en augmentant la neurotransmission sérotoninergique et/ou par une activation tonique des neurones GABAergiques inhibiteurs (Chiang et Aston-Jones, 1993). La stimulation des récepteurs α_2 localisés sur les neurones sérotoninergiques bloque la libération de 5-HT (Adell et Artigas, 1999 ; Haddjeri *et al.*, 1996 ; Numazawa *et al.*, 1995). Il est donc probable qu'en diminuant la libération de 5-HT, la clonidine empêche le DOI d'exercer son effet anti-punition dans le FPT. Néanmoins, Masse *et al.* (2006) ont montré qu'une déplétion en 5-HT ou en NA n'abolit pas l'activité du DOI chez des souris naïves soumises au FPT. Ces observations suggèrent que les neurones noradrénergiques et sérotoninergiques ne sont pas impliqués dans l'effet anti-punition du DOI.

Les récepteurs α_2 sont également exprimés et agissent sur les neurones dopaminergiques et GABAergiques (Cathala *et al.*, 2002). Des travaux ont montré que la clonidine modulait la transmission dopaminergique (Grenhoff et Svensson, 1989), alors qu'au contraire, le DOI l'active, notamment au niveau méso-cortical (Gobert et Millan, 1999). L'effet inhibiteur de la clonidine pourrait impliquer le système dopaminergique et/ou GABAergique.

En revanche, chez les souris déjà testées dans le FPT, la clonidine n'a pas aboli de façon significative l'activité du DOI. Une diminution de l'effet anti-punition du DOI a néanmoins été observée avec la dose de 0,03 mg/kg de clonidine. Sur un plan purement statistique, ces résultats ne mettent pas en évidence d'interaction entre les effets de la liaison aux récepteurs α_2 et ceux de la liaison aux récepteurs 5-HT_{2A}. Toutefois, il est probable, qu'à la dose de 0,03 mg/kg, la clonidine, en stimulant les récepteurs postsynaptiques α_2 a entraîné

une diminution de la libération de neurotransmetteurs, tel que la DA, entraînant une atténuation de l'effet du DOI.

Différentes hypothèses ont été avancées, néanmoins les mécanismes impliqués dans l'effet anti-punition du DOI restent à élucider. Des études de déplétion pourraient étayer ou infirmer certaines suppositions.

G. Etude 7 : Etude du système dopaminergique

1. Etude 7a : Effets propres des ligands dopaminergiques

1.1. Objectif de l'étude

L'étude du rôle joué par la dopamine (DA) dans l'élaboration et le contrôle des états anxieux a très peu été étudiée comparé à la 5-HT et à la NA (Gendreau *et al.*, 1998 ; Harari, 2002 ; Reis *et al.*, 2004 ; Stein *et al.*, 2002). Chez l'homme, la plupart des études se sont concentrées sur l'influence de la DA dans les troubles de l'humeur, la schizophrénie et la maladie de Parkinson (Deutch, 1993 ; Fibiger, 1995). Pourtant, un faisceau d'informations suggère une co-morbidité entre ces syndromes et les troubles anxieux (Braga *et al.*, 2004 ; Brown *et al.*, 2001 ; Nuti *et al.*, 2004). De plus, des données cliniques, pharmacologiques et expérimentales ont mis en évidence la participation du système dopaminergique, plus particulièrement la voie dopaminergique méso-cortico- limbique, dans les syndromes anxieux (Le Moal et Simon, 1991 ; Millan, 2003 ; Salamone, 1994). La voie mésocorticolimbique dont les corps cellulaires (A10) sont localisés dans l'aire tegmentale ventrale (ATV) du mésencéphale, à proximité de ceux du groupe A9 (de la voie nigrostriée), se projette dans différentes structures limbiques, telles que le noyau accumbens, le septum, les tubercules olfactifs, l'amygdale (voie méso-amygdaloïde), l'hippocampe et dans différentes régions corticales (Fallon et Moore, 1978 ; Oades et Halliday, 1987 ; Swanson, 1982 ; Voorn *et al.*, 1986). La voie dopaminergique mésocorticale provient essentiellement de l'ATV et innerve le cortex préfrontal (CPF) médian, le cortex cingulaire antérieur et le cortex suprarhinal (Fuxe *et al.*, 1974 ; Gardner et Ashby, 2000 ; Swanson, 1982).

A l'heure actuelle, la relation entre la transmission dopaminergique et les désordres anxieux reste encore relativement peu connue et apparaît complexe. En effet, chez l'Homme, une diminution ou au contraire une activation de la transmission dopaminergique est retrouvée selon les syndromes. La phobie sociale, par exemple, est associée à une suppression de la transmission dopaminergique et de l'activité des récepteurs dopaminergiques (Schneier *et al.*, 2000 ; Stein *et al.*, 2002 ; Tiihonen *et al.*, 1997). De même, les troubles émotionnels des sujets parkinsonniens sont intimement liés à une perturbation de la voie dopaminergique méso-amygdalienne (Braak et Braak, 2000 ; Tessitore *et al.*, 2002). Au contraire, les sujets présentant une anxiété « trait » enclins aux attaques de panique, présentent une augmentation

de l'activité dopaminergique centrale (Mizuki *et al.*, 1997 ; Pitchot *et al.*, 1992 ; Roy-Byrne *et al.*, 1986).

Chez l'animal, de nombreux auteurs ont montré que le système dopaminergique jouait un rôle important dans les manifestations anxieuses dans les modèles de peur conditionnée et non conditionnée (Bardo *et al.*, 1996 ; Pezze et Feldon, 2004 ; Popova *et al.*, 1996 ; Reis *et al.*, 2004). La voie méso-cortico-limbique semble être activée en réponse à un stress conditionné ou non (Greba et Kokkinidis, 2000 ; Pezze et Feldon, 2004). Par ailleurs, des travaux ont mis en évidence des modifications du métabolisme et de la libération de DA dans les aires de projections, consécutives à un stress (Cabib *et al.*, 1988 ; Coco *et al.*, 1992 ; Konstandi *et al.*, 2000 ; Thiel et Schwarting, 2001).

Cependant, tout comme chez l'Homme, le rôle joué par le système dopaminergique chez l'animal semble plus complexe qu'il n'y paraît. La déplétion en DA dans le mCPF entraîne par exemple un comportement anxieux chez les rats soumis à l'EPM (Espejo, 1997b), suggérant que l'activation dopaminergique dans le mCPF est nécessaire à l'animal pour engager une réponse comportementale adaptée à un stimulus anxiogène.

Différents travaux expérimentaux rapportent que l'application d'un stress entraîne des modifications de la densité des récepteurs dopaminergiques, notamment au niveau mésoaccumbal et nigrostriatal (Cabib *et al.*, 1998 ; Puglisi-Allegra *et al.*, 1991 ; Scheggi *et al.*, 2002). Néanmoins, ces modifications dépendraient du sous-type de récepteur, et de l'aire cérébrale stimulés ainsi que de la souche utilisée (Cabib *et al.*, 1998). Cinq sous-types de récepteurs dopaminergiques ont été identifiés (D₁, D₂, D₃, D₄ et D₅) au niveau central et périphérique (Seemann, 1995). Ces récepteurs de structure heptahélicoïdale se répartissent en 2 sous-groupes : les récepteurs « D₁-like » comprenant les sous-types de récepteurs D₁ et D₅, couplés à des protéines Gs et les récepteurs « D₂-like » comprenant les sous-types D₂, D₃, D₄ et leurs isoformes couplés à des protéines Gi/0 (Andersen *et al.*, 1990 ; Giros *et al.*, 1989). Parmi les 5 sous-types de récepteurs, les sous-types D₁ et D₂ ont été les plus étudiés dans la littérature. Ces récepteurs sont impliqués dans l'anxiété mais également dans les processus d'apprentissage et de mémorisation (mémoire émotionnelle et mémoire de travail) (Pezze et Feldon, 2004). La plupart des études expérimentales suggèrent que les antagonistes et les agonistes des récepteurs D₁ et/ou D₂ possèdent respectivement des propriétés de type anxiolytique et anxiogène dans les modèles animaux de peur conditionnée et non conditionnée (Millan, 2003 ; Puglisi-Allegra et Cabib, 1988 ; Reis *et al.*, 2004 ; Simon *et al.*, 1993). Néanmoins, certains travaux ne rejoignent pas cette hypothèse (Wall *et al.*, 2004 ; Wall

et al., 2003). Ces résultats contradictoires s'expliquent probablement par l'utilisation de souches, d'espèces et de modèles différents (Gendreau *et al.*, 1998 ; Reis *et al.*, 2004).

Par ailleurs, Wall *et al.* (2003) ont montré que l'inhibition de la transmission dopaminergique provoque un effet anxiolytique chez des souris aussi bien lors d'un 1^{er} test que d'un 2^{ème} test dans l'EPM.

Etant donné le rôle non négligeable que semble jouer la DA non seulement dans la modulation des états anxieux mais également dans les processus d'apprentissage et de mémorisation, l'étude de ce système nous est apparu incontournable dans le protocole modifié des quatre-plaques.

Nous avons donc choisi d'étudier le SKF 38393, un agoniste spécifique des récepteurs D₁ (Bouron et Reuter, 1999) ; le SCH 23390, un antagoniste spécifique des récepteurs D₁ (Andersen et Gronvald, 1986) ; le quinpirole, un agoniste des récepteurs D₂ (Lokhandwala et Steenberg, 1984) et le sulpiride un antagoniste des récepteurs D₂ (Guarraci *et al.*, 2000 ; Standish-Barry *et al.*, 1983 ; White et Wang, 1984).

1.2. Résultats

1.2.1. Test-retest dans le test des quatre-plaques

1.2.1.1. Le sulpiride

L'ANOVA à 2 facteurs révèle des facteurs pré-test ($F_{(1,108)} = 237,5$; $p < 0,001$), un facteur traitement ($F_{(5,108)} = 3,90$; $p < 0,01$) significatif et un facteur interaction non significatif ($F_{(5,108)} = 0,58$; $p > 0,05$). Le sulpiride n'exerce pas d'effet chez les souris pré-testées et naïves ($p > 0,05$ *versus* leur groupe contrôle (vét.) respectif, déterminé grâce à une ANOVA à un facteur suivie d'un test *posthoc* $F_{(11,108)} = 23,62$; $p < 0,001$) (figure 16). De plus, quel que soit le traitement reçu, l'analyse statistique révèle un nombre de passages punis significativement plus faible chez les souris pré-testées par rapport au groupe contrôle de souris naïves ($p < 0,001$). Le diazépam augmente de façon significative le nombre de passages punis par rapport au groupe contrôle ($p < 0,001$; par un test de Student).

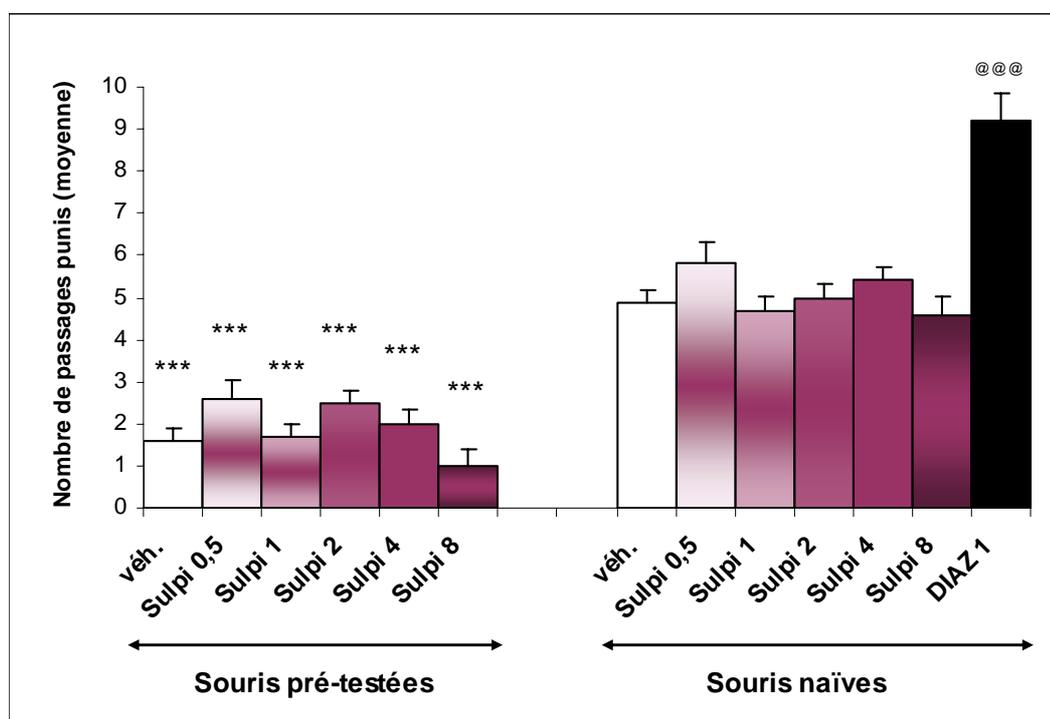


Figure 16 : Effet du sulpiride (0,5 à 8 mg/kg) administré 30 min avant le test par voie i.p. dans le FPT modifié. Les résultats sont exprimés en nombre de passages punis moyen \pm S.E.M. ($n = 9$ à 10 par groupe). *** indique une différence significative avec le groupe contrôle (vét.) de souris naïves, $p < 0,001$. @@@ indique une différence significative entre le groupe contrôle et le groupe traité par du diazépam, de souris naïves, $p < 0,001$.

1.2.1.2. Le quinpirole

L'ANOVA à 2 facteurs révèle des facteurs pré-test ($F_{(1,108)} = 157,74$; $p < 0,001$), un traitement ($F_{(5,108)} = 6,27$; $p < 0,001$) et interaction significatifs ($F_{(5,108)} = 3,72$; $p < 0,01$). Le quinpirole n'exerce pas d'effet chez les souris pré-testées ($p > 0,05$ versus le groupe contrôle de souris pré-testées, déterminé grâce une ANOVA à un facteur suivie d'un test *posthoc* $F_{(11,108)} = 19,07$; $p < 0,001$) (figure 17). De plus, quel que soit le traitement reçu, l'analyse statistique révèle un nombre de passages punis significativement plus faible chez les souris pré-testées par rapport au groupe contrôle de souris naïves ($p < 0,01$; $p < 0,001$). En revanche, à la dose de 0,5 mg/kg, le quinpirole augmente le nombre de passages punis chez les souris naïves ($p < 0,001$). Le diazépam augmente de façon significative le nombre de passages punis par rapport au groupe contrôle ($p < 0,001$; par un test de Student).

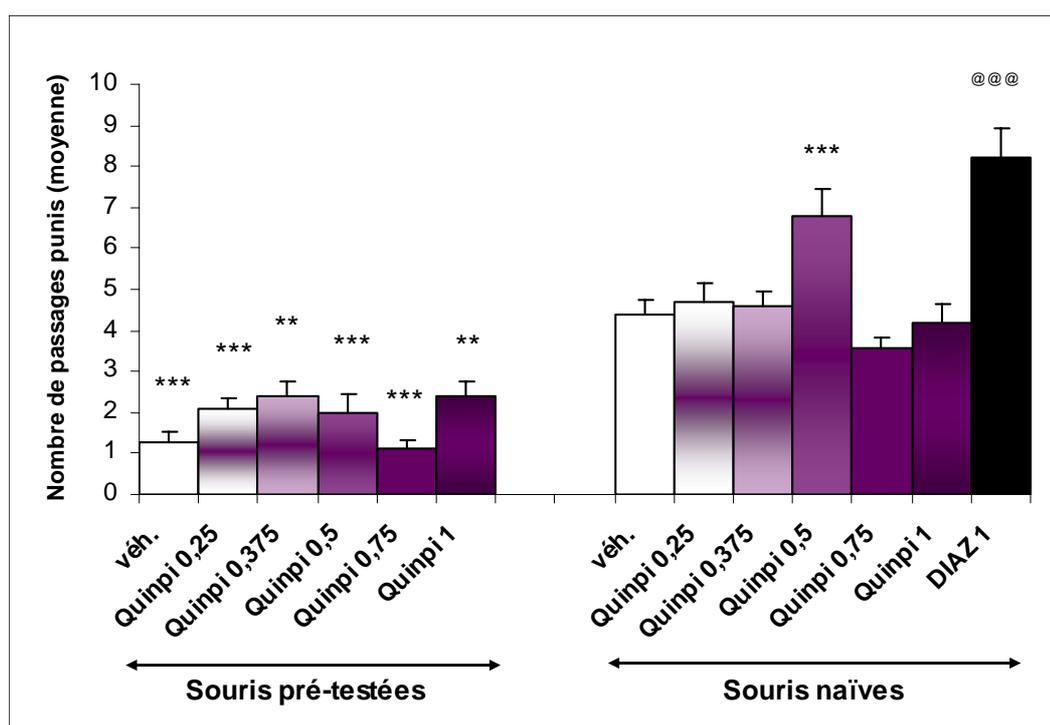


Figure 17 : Effet du quinpirole (0,25 à 1 mg/kg) administré 30 min avant le test par voie sous-cutanée dans le FPT modifié. Les résultats sont exprimés en nombre de passages punis moyen \pm S.E.M. ($n = 10$ par groupe). ** indique une différence significative avec le groupe contrôle (vét.) de souris naïves, ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$. @@@ indique une différence significative entre le groupe contrôle et le groupe traité par du diazépam, de souris naïves, $p < 0,001$.

1.2.1.3. Le SCH 23390

L'ANOVA à 2 facteurs révèle des facteurs pré-test significatifs ($F_{(1,90)} = 236,20$; $p < 0,001$), un facteur traitement significatif ($F_{(4,90)} = 3,48$; $p < 0,05$) et un facteur interaction non significatif ($F_{(4,90)} = 1,09$; $p > 0,05$). Le SCH 23390 n'exerce pas d'effet chez les souris pré-testées et naïves ($p > 0,05$ versus leur groupe contrôle (véh.) respectif, déterminé grâce à une ANOVA à un facteur suivie d'un test *posthoc* $F_{(9,90)} = 28,28$; $p < 0,001$) (figure 18). De plus, quel que soit le traitement reçu, l'analyse statistique révèle un nombre de passages punis significativement plus faible chez les souris pré-testées par rapport au groupe contrôle de souris naïves ($p < 0,001$). Le diazépam augmente de façon significative le nombre de passages punis par rapport au groupe contrôle ($p < 0,001$; par un test de Student).

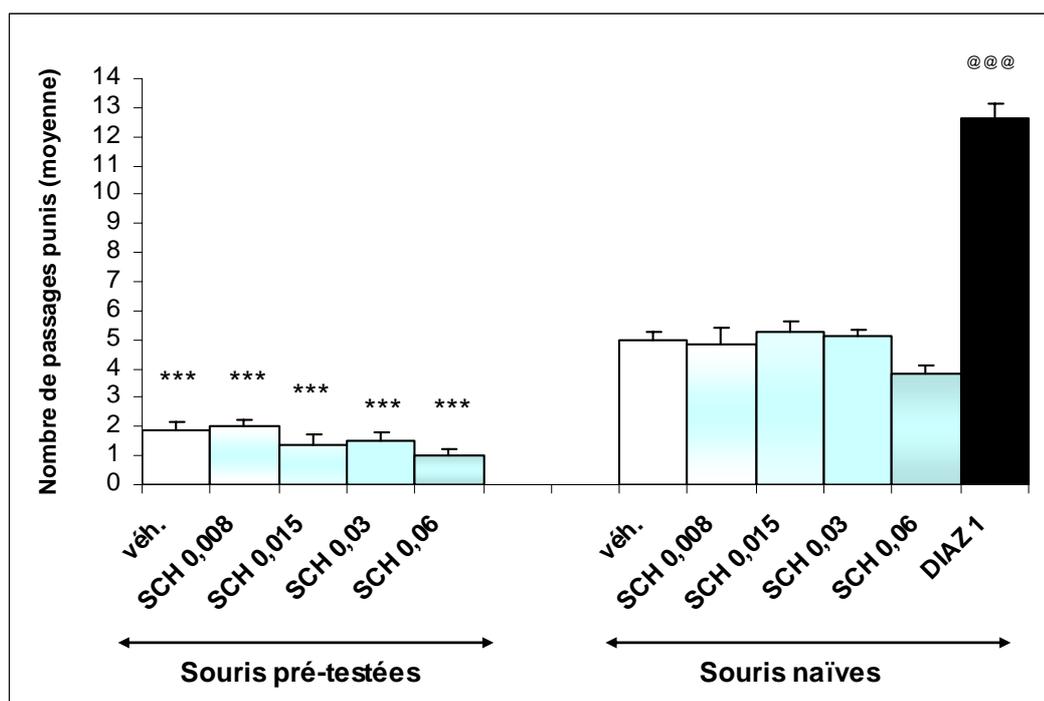


Figure 18 : Effet du SCH 23390 (0,008 à 0,06 mg/kg) administré 30 min avant le test par voie i.p. dans le FPT modifié. Les résultats sont exprimés en nombre de passages punis moyen \pm S.E.M. ($n = 10$ par groupe). *** indique une différence significative avec le groupe contrôle (véh.) de souris naïves, $p < 0,001$. @@@ indique une différence significative entre le groupe contrôle et le groupe traité par du diazépam, de souris naïves, $p < 0,001$.

1.2.1.4. Le SKF 38393

L'ANOVA à 2 facteurs révèle des facteur pré-test significatif ($F_{(1,108)} = 190,04$; $p < 0,001$), un facteur traitement significatif ($F_{(5,108)} = 3,08$; $p < 0,05$) et un facteur interaction significatif ($F_{(5,108)} = 2,47$; $p < 0,05$). Le SKF 38393 n'exerce pas d'effet chez les souris naïves ($p > 0,05$ déterminé grâce une ANOVA à un facteur suivie d'un test *posthoc* $F_{(11,108)} = 19,80$; $p < 0,001$) (figure 19). En revanche, chez les souris pré-testées, le SKF 38393 augmente le nombre de passages punis, par rapport au groupe contrôle, aux doses de 2 ($p < 0,05$), 8 ($p < 0,01$) et 16 mg/kg ($p < 0,01$). Néanmoins, quel que soit le traitement reçu, l'analyse statistique révèle un nombre de passages punis significativement plus faible chez les souris pré-testées par rapport au groupe contrôle de souris naïves ($p < 0,001$). Le diazépam augmente de façon significative le nombre de passages punis par rapport au groupe contrôle ($p < 0,001$; par un test de Student).

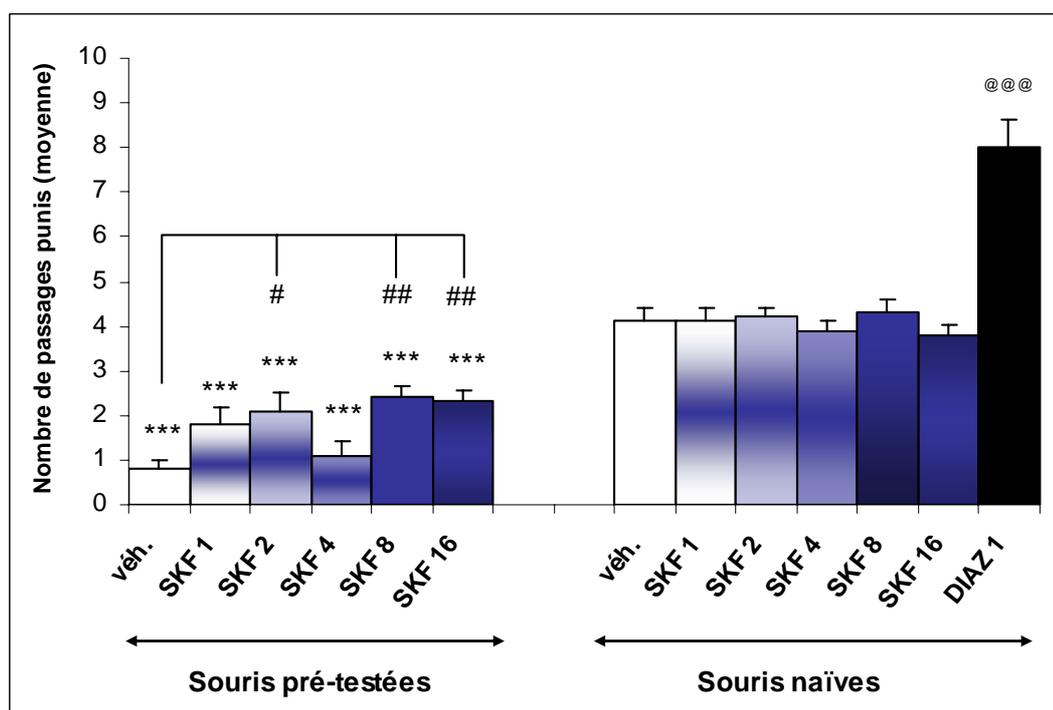


Figure 19 : Effet du SKF 38393 (1 à 16 mg/kg) administré 30 min avant le test par voie i.p. dans le FPT modifié. Les résultats sont exprimés en nombre de passages punis moyen \pm S.E.M. (n = 10 par groupe). *** indique une différence significative avec le groupe contrôle (véh.) de souris naïves, $p < 0,001$. # indique une différence significative avec le groupe contrôle de souris pré-testées, # $p < 0,01$; ## $p < 0,01$. @@@ indique une différence significative entre le groupe contrôle et le groupe traité par du diazépam, de souris naïves, $p < 0,001$.

1.3. Discussion

Dans notre modèle, les deux ligands antagonistes étudiés, le sulpiride et le SCH 23390 sont dépourvus d'effet aussi bien chez les souris naïves que chez les souris pré-testées. Au contraire, les agonistes étudiés se sont révélés actifs. Le quinpirole a exercé un effet de type anxiolytique chez les souris naïves (0,5 mg/kg) et le SKF 38393 chez les souris pré-testées aux doses de 2, 8 et 16 mg/kg. A première vue, nos résultats suggèrent qu'un effet anti-punition, requiert l'activation des récepteurs D₂ chez les souris naïves et D₁ chez les souris pré-testées. Cependant, l'effet anti-punition observé pour le quinpirole et le SKF 38393 n'a pas été retrouvé au cours des études ultérieures d'interactions (étude 7b) reproduites à plusieurs reprises. De plus, contrairement à ce travail, le SCH 23390 a exercé un effet anti-punition aux doses de 0,03 et 0,045 mg/kg chez les souris naïves dans une étude précédente (étude 1b). Dans cette même étude, le quinpirole n'a pas modifié significativement le comportement des souris à la dose de 0,5 mg/kg. Par ailleurs, l'effet anti-punition du SKF38393 retrouvé dans cette étude est faible et discutable. En effet, cet effet anti-punition chez les souris pré-testées n'a pas été retrouvé dans l'étude suivante (étude 7b).

Les effets variables et non reproductibles de ces ligands suggèrent que la stimulation isolée des récepteurs D₁ et D₂ ne joue pas de rôle décisif dans notre modèle. Différents travaux ont montré que les ligands D₁ ou D₂ ne modifiaient pas le comportement de l'animal dans les modèles d'anxiété, rejoignant ainsi nos observations. En effet, le sulpiride s'est avéré inactif dans le modèle du stress qui induit une hyperthermie (Lecci *et al.*, 1990), dans le test de la double enceinte éclairée (Shimada *et al.*, 1995) et contre la néophobie de souris BALB/c dans le modèle de libre exploration (Belzung et Berton, 1997). De même, le quinpirole s'est révélé dénué d'effet dans l'EPM (Belzung *et al.*, 1991 ; Rodgers *et al.*, 1994). Concernant les ligands des récepteurs de sous-type D₁, le SCH 23390 a été rapporté inactif dans l'EPM (Rodgers *et al.*, 1994), le test de réactivité sociale chez des souris de souche A/J (Gendreau *et al.*, 1997), dans le test du « freezing conditionné » (Inoue *et al.*, 2000) et dans le test de suppression motrice conditionnée par un stress (Kamei *et al.*, 1995). Inoue *et al.* (2000) et Kamei *et al.* (1995) ont montré que le SKF 38393 ne modifiait pas le comportement des rongeurs dans le test du « freezing conditionné » et dans le test de suppression motrice conditionnée par un stress.

Ces différentes études et nos résultats contrastent néanmoins avec de nombreux travaux attribuant des propriétés anxiolytiques et anxiogènes respectivement aux antagonistes et aux agonistes des récepteurs de sous-types D₁ et D₂. En effet, de nombreuses études rapportent un effet de type anxiolytique pour le sulpiride dans les modèles animaux de peur conditionnée, tels que le test de Vogel (Siemiakowski *et al.*, 2000) ; le test de conflit (Pich et Samanin, 1986), le test de privation d'eau (Pich et Samanin, 1986) et dans les modèles de peur non conditionnée, tels que l'EPM (Rodgers *et al.*, 1994 ; Wall *et al.*, 2003), le test de la double enceinte éclairée (Costall *et al.*, 1987), le test « hyperdefensiveness » chez la Souris (Puglisi-Allegra et Cabib, 1988). Le blocage des récepteurs dopaminergiques de sous-type D₁ par des antagonistes spécifiques entraîne également des réponses de type anxiolytique dans les modèles animaux d'anxiété. Ainsi, l'injection de SCH 23390 dans l'amygdale se traduit par une diminution des indices d'anxiété dans le test de « freezing » conditionné (Guarraci *et al.*, 1999), de « fear-potentiated acoustic startle » (Greba et Kokkinidis, 2000 ; Lamont et Kokkinidis, 1998) et de la double enceinte éclairée (de la Mora *et al.*, 2005). De même, administré de façon systémique ou périphérique, le SCH 23390 exerce un effet de type anxiolytique dans le test de la double enceinte éclairée (Simon *et al.*, 1993) et dans le test de vocalisation ultrasonique (Bartoszyk, 1998). Contrairement aux molécules antagonistes des récepteurs D₁ ou D₂, les agonistes des récepteurs D₁ ou D₂ se sont révélés anxiogènes dans divers modèles animaux d'anxiété (Arnt *et al.*, 1987 ; Clark et White, 1987 ; Gao et Cutler, 1993 ; Gendreau *et al.*, 1997 ; Gendreau *et al.*, 1998 ; Puglisi-Allegra et Cabib, 1988 ; Reis *et al.*, 2004 ; Simon *et al.*, 1993). La plupart de ces études suggèrent une corrélation positive entre l'activation de la transmission dopaminergique, via les sous-types de récepteurs D₁ et D₂, et l'expression d'un comportement aversif dans les modèles animaux d'anxiété de peur conditionnée ou non. La stimulation des récepteurs D₁ par des agonistes spécifiques supprimerait la capacité du CPF à bloquer l'activité de l'amygdale (Grace et Rosenkranz, 2002). De plus, la stimulation des récepteurs D₂ augmenterait l'excitabilité des neurones de l'amygdale latérale (Grace et Rosenkranz, 2002).

Toutefois, quelques travaux s'opposent aux observations évoquées précédemment. Simon *et al.* (1993) ont montré que le sulpiride exerçait un effet anxiogène dans le test de la double enceinte éclairée. Dans une autre étude, le SCH 23390 a altéré l'expression de la réactivité sociale-émotionnelle chez des souris C57BL/6J isolées (Gendreau *et al.*, 1997). Divers travaux ont également montré que les agonistes D₁ et D₂ possédaient des propriétés anxiolytiques (Munro et Kokkinidis, 1997 ; Siemiakowski *et al.*, 2000 ; Wall *et al.*, 2004).

Les résultats émergeant des différentes études portant sur les ligands des récepteurs D₁ et D₂ dans les modèles animaux d'anxiété sont donc variés et contradictoires. Ces différences s'expliquent probablement par l'utilisation d'espèces, de souches, de voies d'administration et de modèles différents. Dans notre modèle, la stimulation des récepteurs D₁ ou D₂ ne se traduit pas par une modification comportementale. En effet, la sensibilité et l'expression des récepteurs dopaminergiques, physiologique ou en réponse à un évènement stressant peuvent être très différents voire opposés selon la nature du stimulus (Reis *et al.*, 2004), la « contrôlabilité » de la situation, l'histoire et le fond génétique des rongeurs (Cabib *et al.*, 1988 ; Cabib et Puglisi-Allegra, 1994 ; 1996 ; Ng *et al.*, 1994 ; Swerdlow *et al.*, 2004).

Par ailleurs, des études ont montré l'existence d'interactions fonctionnelles entre les récepteurs de sous-type D₁ et D₂ (Gerfen *et al.*, 1995 ; Hjorth et Carlsson, 1988 ; Pollack, 2004 ; Rahman et McBride, 2000 ; Shi *et al.*, 1997 ; Weick et Walters, 1987). Une activation combinée des récepteurs D₁ et D₂ semble être impliquée dans l'acquisition de réponses aversives conditionnées (Reis *et al.*, 2004). Certains travaux ont montré que l'atténuation de la peur conditionnée requiert une co-activation des deux sous-types de récepteurs D₁ et D₂ (Arnt *et al.*, 1987 ; Kamei *et al.*, 1995 ; Reis *et al.*, 2004). Il n'est donc pas impossible que dans le FPT, considéré comme un modèle de peur conditionnée, un effet anti-punition requiert la co-stimulation des récepteurs D₁ et D₂.

Les ligands D₁ et D₂ n'exercent pas d'effets probants et reproductibles chez les souris pré-testées dans notre modèle. Contrairement à nos résultats, Wall *et al.* (2003 ; 2004) ont montré que l'injection d'agonistes D₁, D₂ ou du sulpiride dans le cortex préfrontal ventromédian de souris (CD-1) avant un 1^{er} test, exerçait un effet anxiolytique chez des souris testées une 2^{ème} fois sans traitement dans l'EPM. Ces différences s'expliquent probablement par l'utilisation de modèles, de protocoles (injection avant le 1^{er} test, site d'injection) et de souches différents.

Un faisceau d'informations suggère l'implication des récepteurs D₁ et D₂ dans les processus d'apprentissage. Toutefois, d'après El-Ghundi *et al.* (1998), la stimulation des récepteurs D₁ n'influencerait pas l'acquisition et la consolidation de l'apprentissage aversif, mais ils moduleraient plutôt l'attention dans les modèles de peur non conditionnée et joueraient un rôle important dans l'extinction de la mémoire de peur dans les modèles de peur conditionnée. Néanmoins, nos résultats révèlent que la stimulation des récepteurs D₁ et D₂ ne s'oppose pas à la potentialisation de l'anxiété observée lors d'un 2^{ème} test. Hefco *et al.* (2003) ont montré que les neurones dopaminergiques de l'ATV et de la substance noire jouaient un rôle dans la rétention de la mémoire à court et à long terme sans affecter les phénomènes

d'acquisition. Par ailleurs, Greba *et al.* (2001) a montré que la DA influençait très peu la capacité de l'amygdale à contrôler la peur conditionnée de type Pavlov. En effet, l'injection de raclopride dans l'amygdale baso-latérale, avant la phase d'entraînement, bloque les performances d'acquisition mais ne bloque pas la peur lors du test de rétention. Les récepteurs D₁ et D₂ ne semblent pas être impliqués dans les modifications comportementales observées lors d'un 2^{ème} test. Toutefois, nos résultats n'écartent pas une éventuelle participation directe ou indirecte du système dopaminergique, *via* d'autres récepteurs dopaminergiques (D₃, D₄, D₅), dans notre modèle.

2. Etude 7b : Etude de l'interaction des ligands dopaminergiques avec le DOI

2.1. Objectif de l'étude

L'étude précédente (étude 4) a montré que le DOI exerce son effet anti-punition via l'activation des récepteurs sérotoninergiques de sous-type 5-HT_{2A} dans notre modèle du test des quatre- plaques modifié. Toutefois, son mécanisme d'action précis reste à élucider.

De nombreuses études suggèrent des interactions anatomiques et fonctionnelles entre les systèmes sérotoninergique et dopaminergique dans de nombreuses régions cérébrales. Les neurones dopaminergiques de la substance noire (SN ou A9) et de l'aire tegmentale ventrale (ATV) (A10) reçoivent des afférences sérotoninergiques provenant du noyau dorsal du raphé (NDR) (Herve *et al.*, 1987 ; Moukhles *et al.*, 1997) et du noyau médian du raphé (NMR) (Broderick et Phelix, 1997 ; Herve *et al.*, 1987 ; Vertes *et al.*, 1999). Dans l'ATV, les afférences sérotoninergiques des noyaux du raphé forment des synapses avec les dendrites dopaminergiques (Doherty et Pickel, 2000). Le striatum est également une aire de convergence des afférences dopaminergiques ascendantes et sérotoninergiques (Azmitia et Segal, 1978).

Il semblerait que les systèmes dopaminergique et sérotoninergique se modulent l'un et l'autre. Ces deux systèmes agissent de façon coopérative dans le cerveau antérieur (Martin-Ruiz *et al.*, 2001). La stimulation électrique de la SN supprime l'activité électrique des neurones sérotoninergiques du NDR (Stern *et al.*, 1981). L'infusion de 5-HT dans l'ATV augmente la libération de DA dans le noyau accumbens (Beart et McDonald, 1982 ; Guan et McBride, 1989). De plus, la stimulation des récepteurs dopaminergiques par l'apomorphine, augmente la 5-HT dans le NDR et le cerveau antérieur (Ferre *et al.*, 1994 ; Mendlin *et al.*, 1998) et l'application de L-DOPA dans la SN augmente l'output local de 5-HT (Thorre *et al.*, 1998). Toutefois d'autres travaux, ont montré que l'application locale de 5-HT dans le NDR ou la stimulation électrique de ce dernier excitait ou inhibait les neurones dopaminergiques de l'ATV (Cameron *et al.*, 1997 ; Gervais et Rouillard, 2000 ; Lejeune et Millan, 1998). Le sens de ce contrôle (inhibition/excitation) pourrait dépendre du type de récepteur impliqué et du type cellulaire où le récepteur est exprimé (Olijslagers *et al.*, 2004 ; Pessia *et al.*, 1994). En effet différents sous-types de récepteurs sérotoninergiques sont présents dans les aires

cérébrales innervées par les neurones dopaminergiques : 5-HT_{1, 2, 3,4} et 6. Par ailleurs, les récepteurs D₁ et D₂ sont impliqués dans le contrôle de l'activité sérotoninergique (Martin-Ruiz *et al.*, 2001). Martin-Ruiz *et al.* (2001) suggèrent que les récepteurs de sous-types D₂ contrôlant la transmission sérotoninergique sont situés hors du NDR.

De nombreuses études d'électrophysiologie et de microdialyse ont montré que l'activation des récepteurs sérotoninergiques de sous-type 5-HT_{2A} entraînait la libération de DA extracellulaire, notamment dans l'ATV (Pessia *et al.*, 1994), le cortex frontal (Gobert et Millan, 1999), le cortex préfrontal (Pehek *et al.*, 2001 ; Pehek *et al.*, 2005), le striatum (Lucas et Spampinato, 2000) et le noyau accumbens (Bowers *et al.*, 2000 ; Yan, 2002). Un grand nombre de récepteurs 5-HT_{2A} sont localisés sur des neurones non sérotoninergiques, tels que les neurones dopaminergiques, plus précisément au niveau dendritique et somato-dendritique dans l'ATV (Cornea-Hebert *et al.*, 1999 ; Doherty et Pickel, 2000). Une étude d'immunohistochimie par fluorescence et microscopie confocale, a montré que les récepteurs 5-HT_{2A} étaient co-localisés avec la tyrosine hydroxylase dans tous les subnucléi de l'ATV, et plus particulièrement dans la région antérieure, principalement dans les noyaux paranigraux et les noyaux infrafasciculaires (Nocjar *et al.*, 2002).

Ces différentes observations, nous ont amené à penser que la DA et le système dopaminergique pouvaient peut-être être impliqués dans les effets anti-punition du DOI ou bien les moduler.

L'objectif de ce travail a donc été d'étudier l'influence du sulpiride (2 et 8 mg/kg), du quinpirole (0,375 et 0,5 mg/kg), du SCH 23390 (0,02 et 0,03 mg/kg) et du SKF 38393 (2 et 8 mg/kg) sur l'effet du DOI dans notre modèle des quatre-plaques modifié (test-retest). Pour les études d'interaction, les doses de ligands dopaminergiques ont été choisies en fonction des résultats obtenus dans la première partie de l'étude (étude 1b et 5a). Deux doses de DOI ont été étudiées : une dose de 0,25 mg/kg et de 2 mg/kg, respectivement inactive et active chez les souris naïves et pré-testées (Ripoll *et al.*, in press).

2.2. Résultats

2.2.1. Effets du sulpiride sur le DOI

Concernant les souris pré-testées, l'ANOVA à 2 facteurs révèle des facteurs pré-traitement ($F_{(2,81)} = 4,09$; $p < 0,05$), traitement ($F_{(2,81)} = 19,23$; $p < 0,001$) et interaction ($F_{(4,81)} = 2,95$; $p < 0,05$) significatifs. Le sulpiride (0,5 et 2 mg/kg) et le DOI (0,25 mg/kg) ne modifient pas le nombre de passages punis par rapport au groupe contrôle ($p > 0,05$ après une ANOVA à un facteur suivie du test *posthoc* de Sidak, $F_{(8,81)} = 7,31$; $p < 0,001$) (figure 20). Aux 2 doses testées, le sulpiride ne potentialise pas l'effet du DOI (0,25 mg/kg). Le DOI (2 mg/kg) augmente significativement le nombre de passages punis par rapport au groupe contrôle ($p < 0,001$ après le test *posthoc*) (figure 20). L'effet anti-punition du DOI est antagonisé par le sulpiride à la dose de 0,5 mg/kg ($p < 0,001$). En revanche, la dose plus élevée de 2 mg/kg de sulpiride n'influence pas l'effet du DOI (2 mg/kg) (figure 20).

En ce qui concerne les souris naïves, l'analyse statistique réalisée grâce à une ANOVA à 2 facteurs révèle des facteurs pré-traitement ($F_{(2,81)} = 4,59$; $p < 0,05$), traitement ($F_{(2,81)} = 51,57$; $p < 0,001$) et interaction ($F_{(4,81)} = 4,50$; $p < 0,01$) significatifs. Le sulpiride (0,5 et 2 mg/kg) et le DOI (0,25 mg/kg) ne modifient pas le nombre de passages punis par rapport au groupe contrôle ($p > 0,05$ après une ANOVA à un facteur suivie d'un test *posthoc* de Sidak, $F_{(8,81)} = 16,29$; $p < 0,001$) (figure 20). Aux 2 doses testées, le sulpiride ne potentialise pas l'effet du DOI (0,25 mg/kg). Le DOI (2 mg/kg) augmente significativement le nombre de passages punis par rapport au groupe contrôle ($p < 0,001$ après le test *posthoc*) (figure 20). Le sulpiride antagonise l'effet anti-punition du DOI de façon dose-dépendante (0,5 mg/kg, $p < 0,05$; 2 mg/kg, $p < 0,001$) (figure 20). Le diazépam augmente de façon significative le nombre de passages punis par rapport au groupe contrôle ($p < 0,001$; par un test de Student).

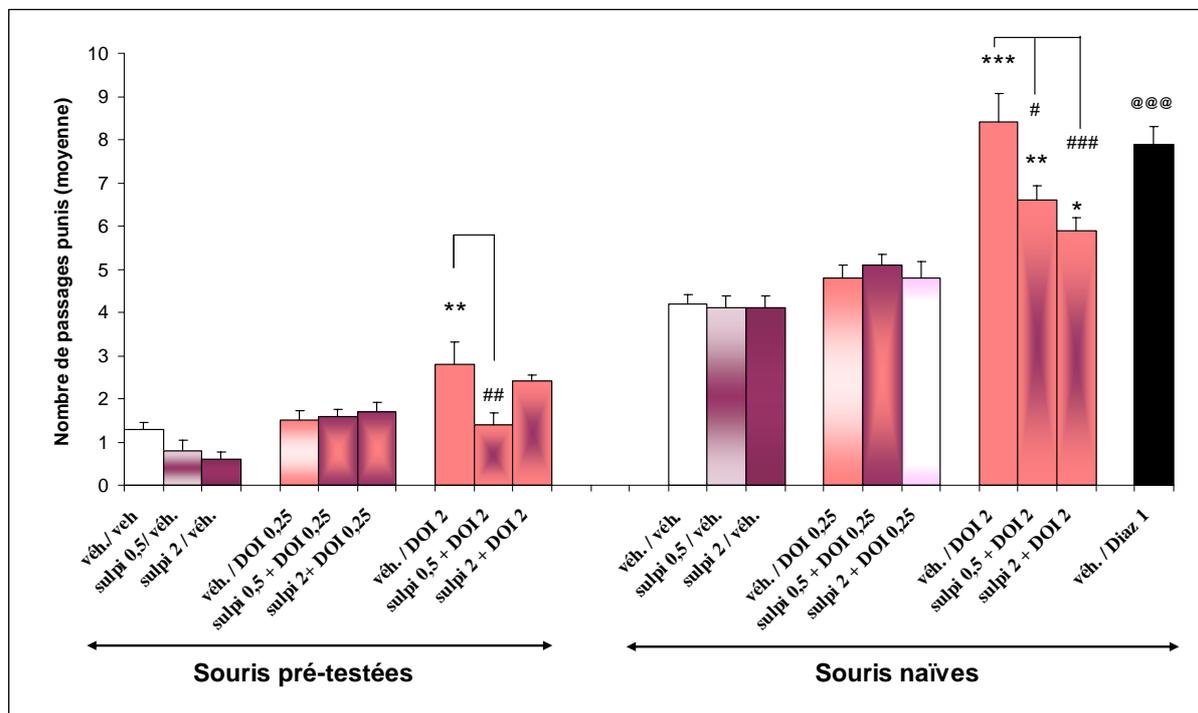


Figure 20 : Effet du sulpiride (0,5 et 2 mg/kg, administrée 45 min avant le test par voie i.p.) et du DOI (0,25 et 2 mg/kg, administrée 30 min avant le test par voie i.p.) dans le FPT modifié. Les résultats sont exprimés en nombre de passages punis moyen \pm S.E.M. (n=10 par groupe). * indique une différence significative entre les groupes traités et leur groupe contrôle (véh./véh.) correspondant, * p<0,05, ** p<0,01, *** p<0,001. # indique une différence significative entre le groupe traité par du DOI et celui traité par l'association (sulpiride + DOI), # p<0,05, ## p<0,01, ###p<0,001. @@@ indique une différence significative entre le groupe contrôle et le groupe traité par du diazépam, de souris naïves, p<0,001.

2.2.2. Effets du quinpirole sur le DOI

Concernant les souris pré-testées, l'ANOVA à 2 facteurs révèle un facteur pré-traitement non significatif ($F_{(2,81)} = 0,65$; $p > 0,05$), un facteur traitement significatif ($F_{(2,81)} = 20,60$; $p < 0,001$) et un facteur interaction non significatif ($F_{(4,81)} = 0,42$; $p > 0,05$). Le quinpirole (0,375 et 0,5 mg/kg) et le DOI (0,25 mg/kg) ne modifient pas le nombre de passages punis par rapport au groupe contrôle ($p > 0,05$) (figure 21). Le DOI (2 mg/kg) augmente significativement le nombre de passages punis par rapport au groupe contrôle ($p < 0,01$ après le test *posthoc*) (figure 21). Aux 2 doses testées, le quinpirole ne modifie pas l'effet du DOI.

En ce qui concerne les souris naïves, l'analyse statistique réalisée grâce à une ANOVA à 2 facteurs révèle un facteur pré-traitement non significatif ($F_{(2,81)} = 0,80$; $p > 0,05$), un facteur traitement significatif ($F_{(2,81)} = 37,26$; $p < 0,001$) et un facteur interaction non significatif ($F_{(4,81)} = 0,59$; $p > 0,05$). Le quinpirole (0,375 et 0,5 mg/kg) et le DOI (0,25 mg/kg) ne modifient pas le nombre de passages punis par rapport au groupe contrôle ($p > 0,05$) (figure 21). Le DOI (2 mg/kg) augmente significativement le nombre de passages punis par rapport au groupe contrôle ($p < 0,001$ après le test *posthoc*) (figure 21). Aux 2 doses testées, le quinpirole ne modifie pas l'effet du DOI. Le diazépam augmente de façon significative le nombre de passages punis par rapport au groupe contrôle ($p < 0,001$; déterminé par un test de Student).

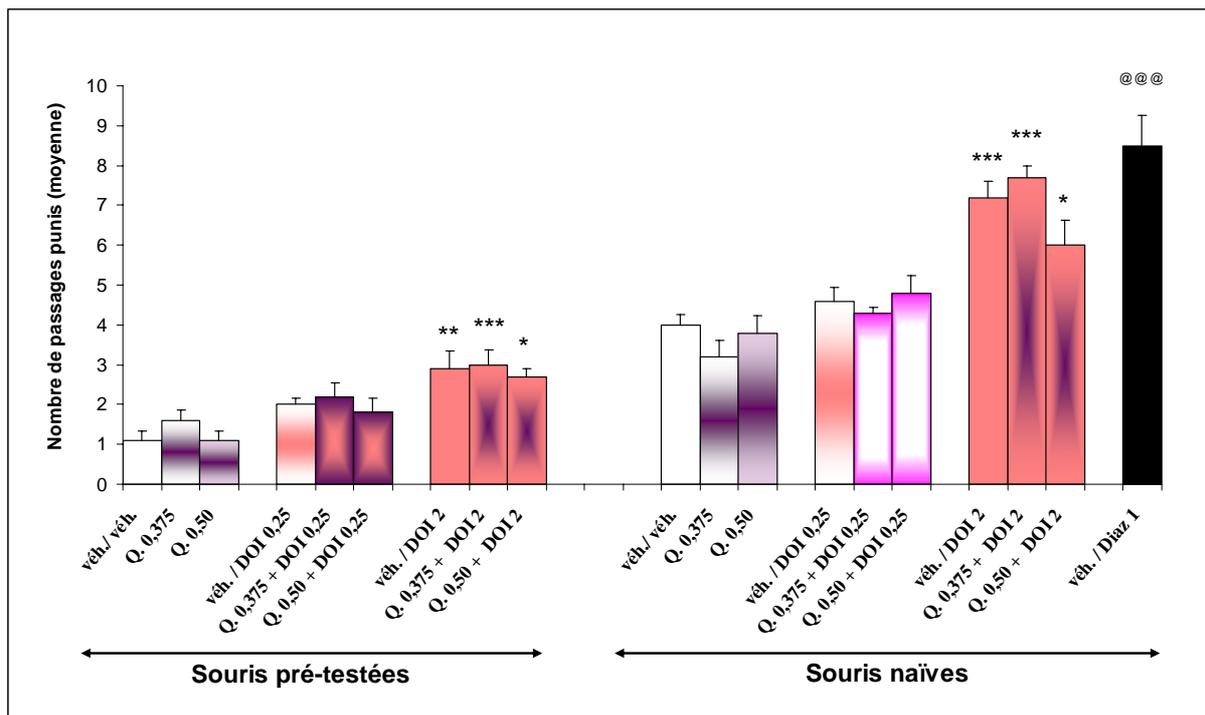


Figure 21 : Effet du quinpirole (0,375 et 0,5 mg/kg, administré 45 min avant le test par voie sous-cutanée) et du DOI (0,25 et 2 mg/kg, administrée 30 min avant le test par voie i.p.) dans le FPT modifié. Les résultats sont exprimés en nombre de passages punis moyen \pm S.E.M. ($n = 10$ par groupe). * indique une différence significative entre les groupes traités et leur groupe contrôle (vét./vét.) correspondant, * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$. @@@ indique une différence significative entre le groupe contrôle et le groupe traité par du diazépam, de souris naïves, $p < 0,001$.

2.2.3. Effets du SCH 23390 sur le DOI

En ce qui concerne les souris pré-testées, l'analyse statistique réalisée grâce à une ANOVA à 2 facteurs révèle des facteurs pré-traitement ($F_{(2,81)} = 4,67$; $p < 0,05$), traitement ($F_{(2,81)} = 14,33$; $p < 0,001$) et interaction significatifs ($F_{(4,81)} = 4,17$; $p < 0,01$). Le SCH 23390 (0,02 et 0,03 mg/kg) et le DOI (0,25 mg/kg) ne modifient pas le nombre de passages punis par rapport au groupe contrôle ($p > 0,05$ après un test de *posthoc*) (figure 22). Aux 2 doses testées, le SCH 23390 ne potentialise pas l'effet du DOI (0,25 mg/kg). Le DOI (2 mg/kg) augmente significativement le nombre de passages punis par rapport au groupe contrôle ($p < 0,001$ après une ANOVA à un facteur suivie d'un test *posthoc*, $F_{(8,81)} = 6,84$; $p < 0,001$) (figure 22). L'effet anti-punition du DOI est antagonisé par le SCH 23390 à la dose de 0,03 mg/kg ($p < 0,001$). En revanche, la dose la plus faible de 0,02 mg/kg de SCH 23390 n'influence pas l'effet du DOI (2 mg/kg) (figure 22).

En ce qui concerne les souris naïves, l'analyse statistique réalisée grâce à une ANOVA à 2 facteurs révèle des facteurs pré-traitement ($F_{(2,81)} = 7,94$; $p < 0,01$), traitement ($F_{(2,81)} = 38,35$; $p < 0,001$) et interaction significatifs ($F_{(4,81)} = 3,91$; $p < 0,01$). Le SCH 23390 (0,02 et 0,03 mg/kg) ne modifient pas le nombre de passages punis par rapport au groupe contrôle ($p > 0,05$ après une ANOVA à un facteur suivie du test *posthoc* de Sidak, $F_{(8,81)} = 13,53$; $p < 0,001$) (figure 22). A la dose de 0,25 mg/kg, le DOI augmente légèrement le nombre de passages punis par rapport au groupe de souris naïves contrôle ($p < 0,05$). Par ailleurs, aux 2 doses testées, le SCH 23390 ne potentialise pas l'effet du DOI (0,25 mg/kg). Le DOI (2 mg/kg) augmente significativement le nombre de passages punis par rapport au groupe contrôle ($p < 0,001$) (figure 22). A la dose de 0,02 mg/kg le SCH 23390 antagonise l'effet anti-punition du DOI ($p < 0,01$) (figure 22). Le diazépam augmente de façon significative le nombre de passages punis par rapport au groupe contrôle ($p < 0,001$; par un test de Student).

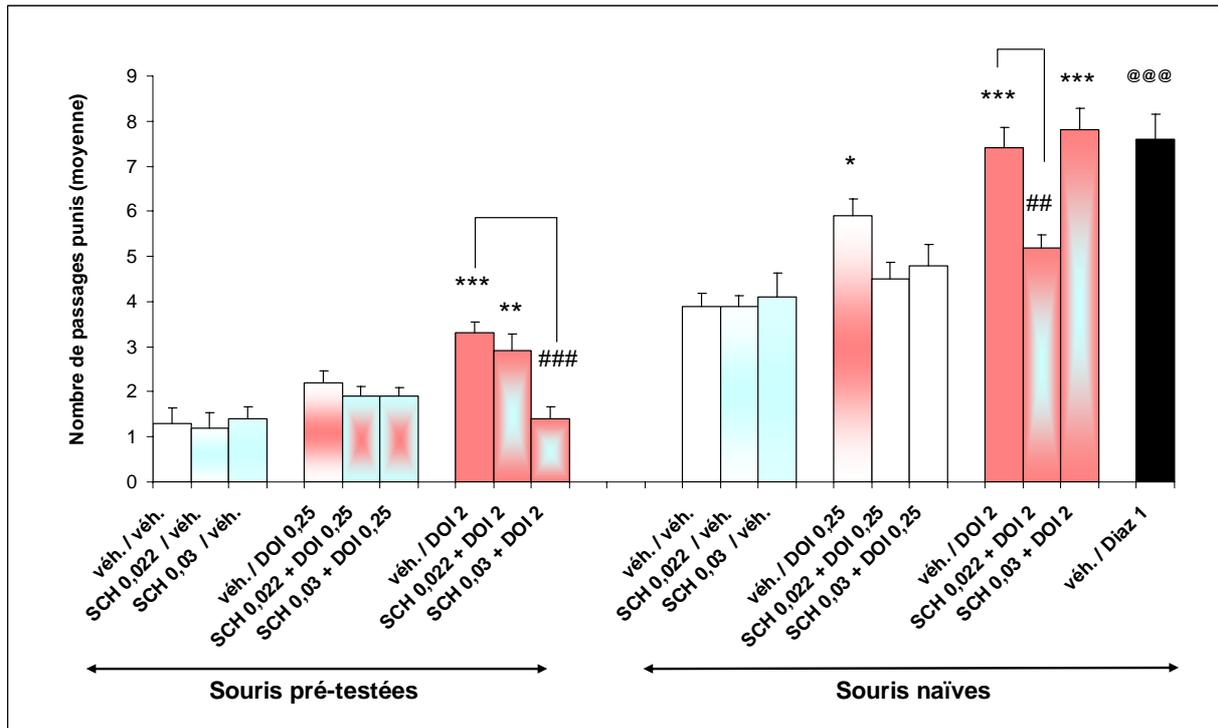


Figure 22 : Effet du SCH 23390 (0,02 et 0,03 mg/kg ; administré 45 min avant le test par voie i.p.) et du DOI (0,25 et 2 mg/kg ; administré 30 min avant le test par voie i.p.) dans le FPT modifié. Les résultats sont exprimés en nombre de passages punis moyen \pm S.E.M. (n = 10 par groupe). * indique une différence significative entre les groupes traités et leur groupe contrôle (vét./vét.) correspondant * p<0,05 ; ** p<0,01 ; *** p<0,001. ## indique une différence significative entre le groupe traité par du DOI et celui traité par l'association (sulpiride + DOI), ## p<0,01 ; ### p<0,001. @@@ indique une différence significative entre le groupe contrôle et le groupe traité par du diazépam, de souris naïves, p<0,001.

2.2.4. Effets du SKF 38393 sur le DOI

Concernant les souris pré-testées, l'ANOVA à 2 facteurs révèle un facteur pré-traitement non significatif ($F_{(2,81)} = 0,72$; $p > 0,05$), un facteur traitement significatif ($F_{(2,81)} = 22,16$; $p < 0,001$) et un facteur interaction non significatif ($F_{(4,81)} = 0,63$; $p > 0,05$). Le SKF38393 (2 et 8 mg/kg) et le DOI (0,25 mg/kg) ne modifient pas le nombre de passages punis par rapport au groupe contrôle ($p > 0,05$) (figure 23). Le DOI (2 mg/kg) augmente significativement le nombre de passages punis par rapport au groupe contrôle ($p < 0,01$ après une ANOVA à un facteur suivie d'un test *posthoc*, $F_{(8,81)} = 5,87$; $p < 0,001$) (figure 23). Même si le groupe qui a reçu l'association de SKF 38393 (8 mg/kg) et de DOI (2 mg/kg) présente un nombre de passages punis moyen non significativement différent de celui du groupe contrôle (vét.) ($p > 0,05$), le SKF38393 ne potentialise pas et n'antagonise pas l'effet du DOI (0,25 et 2 mg/kg) aux 2 doses testées (2 et 8 mg/kg).

En ce qui concerne les souris naïves, l'analyse statistique réalisée grâce à une ANOVA à 2 facteurs révèle un facteur pré-traitement non significatif ($F_{(2,81)} = 1,83$; $p > 0,05$), un facteur traitement significatif ($F_{(2,81)} = 28,40$; $p < 0,001$) et un facteur interaction non significatif ($F_{(4,81)} = 0,64$; $p > 0,05$). Le SKF38393 (2 et 8 mg/kg) et le DOI (0,25 mg/kg) ne modifient pas le nombre de passages punis par rapport au groupe contrôle ($p > 0,05$) (figure 23). Le DOI (2 mg/kg) augmente significativement le nombre de passages punis par rapport au groupe contrôle ($p < 0,001$ après une ANOVA à un facteur suivie d'un test *posthoc*, $F_{(8,81)} = 7,88$; $p < 0,001$) (figure 23). Même si le groupe qui a reçu l'association de SKF 38393 (2 mg/kg) et de DOI (2 mg/kg) présente un nombre de passages punis moyen non significativement différent de celui du groupe contrôle (vét.) ($p > 0,05$), le SKF38393 ne potentialise pas et n'antagonise pas l'effet du DOI (0,25 et 2 mg/kg) aux 2 doses testées (2 et 8 mg/kg). Le diazépam augmente de façon significative le nombre de passages punis par rapport au groupe contrôle ($p < 0,001$ déterminé par un test t de Student).

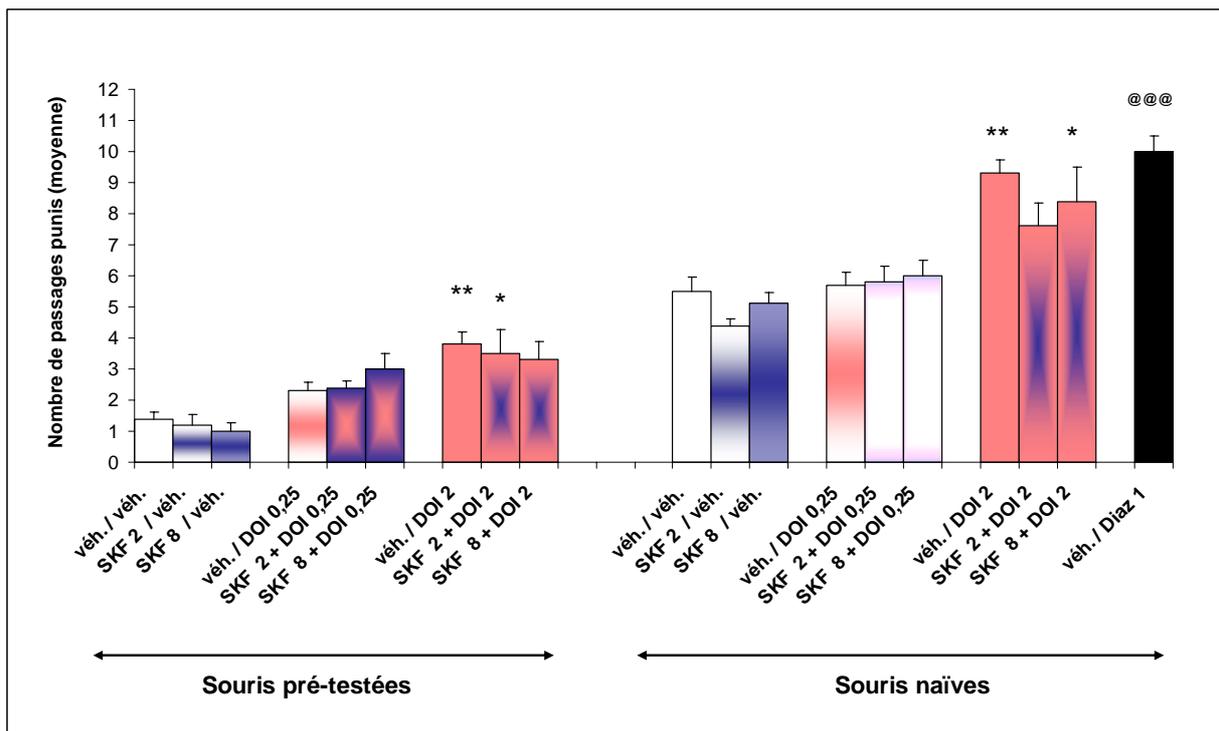


Figure 23 : Effet du SKF 38393 (2 et 8 mg/kg ; administré 45 min avant le test par i.p.) et du DOI (0,25 et 2 mg/kg ; administrée 30 min avant le test par voie i.p.) dans le FPT modifié. Les résultats sont exprimés en nombre de passages punis moyen \pm S.E.M. ($n = 10$ par groupe). * indique une différence significative entre les groupes traités et leur groupe contrôle (vét./vét.) correspondant, * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$. @@@ indique une différence significative entre le groupe contrôle et le groupe traité par du diazépam, de souris naïves, $p < 0,001$.

2.3. Discussion

L'objectif de ce travail était d'étudier l'interaction éventuelle entre les récepteurs D₁ ou D₂ et les récepteurs 5-HT_{2A}. Nos résultats montrent que l'effet anti-punition du DOI (2 mg/kg) est bloqué par le sulpiride, un antagoniste des récepteurs D₂ et par le SCH 23390, un antagoniste des récepteurs D₁. En revanche, le quinpirole, un agoniste des récepteurs D₂ et le SKF 38393, un agoniste des récepteurs D₁, n'ont pas influencé les effets du DOI aux 2 doses testées. Par ailleurs, il est important de préciser que le sulpiride ne se comporte pas comme les neuroleptiques dits atypiques, tel que la clozapine, connus pour exercer un antagonisme au niveau des récepteurs de sous-types 5-HT_{2A} et 5-HT_{2C} (Canton *et al.*, 1994). Le blocage de l'effet anti-punition du DOI par le sulpiride, ne s'explique donc pas par un antagonisme au niveau des sites récepteurs 5-HT_{2A}. Nos résultats suggèrent donc une interaction entre les effets de la liaison aux récepteurs dopaminergiques (D₁ ou D₂) et celle aux récepteurs 5-HT_{2A} chez les souris pré-testées et naïves.

Une multitude d'études suggère que l'activation des récepteurs 5-HT_{2A} potentialise la libération de DA au niveau méso-cortical et méso-limbique (Bowers *et al.*, 2000 ; Gobert et Millan, 1999 ; Pehek *et al.*, 2001 ; Pessia *et al.*, 1994). Une étude de microdialyse conduite dans le mCPF de Rat, a montré que le M100907, un antagoniste des récepteurs de sous-type 5-HT_{2A} bloque de façon dose-dépendante la libération de DA, consécutive à l'administration systémique de DOI (Pehek *et al.*, 2001). De façon similaire, l'administration systémique de DOI à des rats libres de tout mouvement augmente de façon dose-dépendante les taux de DA et de NA dans le dialysat du cortex frontal (Gobert et Millan, 1999). De même, l'infusion locale de DOI dans le noyau accumbens entraîne une libération dose-dépendante de DA extracellulaire (Yan, 2000). Dans le striatum de rats, Lucas et Spampinato (2000) ont montré également que le DOI augmentait l'efflux basal de DA. En revanche, dans ces différentes études, l'administration isolée d'antagonistes 5-HT_{2A} n'a pas modifié l'efflux basal de DA, suggérant que le contrôle positif sur la libération de DA s'exerce lorsque les récepteurs 5-HT_{2A} sont activés. Par ailleurs, il a été montré une action facilitatrice de l'activation des récepteurs 5-HT_{2A} sur la synthèse de DA (Schmidt *et al.*, 1992).

L'interaction observée dans notre étude entre les antagonistes des récepteurs D₁ et D₂ et le DOI peut s'expliquer par une action opposée sur la libération de la DA dans certaines aires cérébrales probablement impliquées dans le FPT.

H. Etude 8 : Déplétion en noradrénaline, sérotonine et dopamine

1. Objectif de l'étude

Un 1^{er} test dans le FPT affecte le comportement des souris et la réponse de ces dernières au diazépam. De plus, même si le DOI conserve son effet anti-punition chez les souris pré-testées, la taille de son effet est néanmoins diminuée. Divers travaux suggèrent une interaction entre le système GABAergique et d'autres systèmes de neurotransmission, tels que les systèmes noradrénergique, sérotoninergique, et dopaminergique. Par ailleurs, nous avons montré précédemment que l'effet anti-punition du DOI s'exerçait *via* les récepteurs 5-HT_{2A} chez les souris naïves et pré-testées. Néanmoins, le mécanisme précis du DOI reste à déterminer. Certains récepteurs 5-HT_{2A} sont localisés sur des neurones dopaminergiques au niveau dendritique et somato-dendritique dans le VTA (Cornéa-Hebert *et al.*, 1999 ; Doherty et Pickel, 2000 ; Nocjar *et al.*, 2002). Une étude réalisée dans notre laboratoire a suggéré qu'une diminution de l'activité sérotoninergique dans l'hippocampe et l'hypothalamus pourrait être un des mécanismes impliqués dans les effets anti-punition du DOI chez des souris naïves soumises au FPT (données non publiées). Par ailleurs, la clonidine a aboli l'effet du DOI chez les souris naïves dans le FPT. Néanmoins, l'implication directe du système noradrénergique semble incertaine. De plus, nous avons montré que le système dopaminergique était impliqué dans les effets anti-punition du DOI, puisque le sulpiride a antagonisé l'effet du DOI chez les souris naïves et pré-testées. Néanmoins ces observations ne prouvent pas l'existence d'une interaction directe avec les neurones dopaminergiques. De nombreuses interrogations restent en suspens ; à savoir, l'effet du DOI implique t'il les mêmes récepteurs chez les souris naïves et pré-testées? Passe t'il par les hétérorécepteurs 5-HT_{2A} ?

Ce travail a consisté à déterminer l'implication du système noradrénergique, sérotoninergique et dopaminergique dans les effets anti-punition du DOI et du diazépam dans le protocole modifié des quatre-plaques, afin d'une part de mettre en évidence d'éventuelles différences sous-tendant le mécanisme d'action du DOI et du diazépam et d'autre part de déterminer si l'effet du DOI s'exerce par la même voie ou par une voie neurochimique distincte chez les souris pré-testées. Nous avons pour cela étudié l'influence d'une lésion des

neurones noradrénergiques, sérotoninergiques ou dopaminergiques sur l'effet du DOI et du diazépam. La déplétion en NA a été réalisée par l'administration systémique de DSP-4, une neurotoxine qui détruit les axones noradrénergiques terminaux du locus coeruleus (Fritschy et Grzanna, 1989). Un pré-traitement de PCPA a été effectué afin de dépléter les neurones sérotoninergiques. La PCPA est un inhibiteur de la synthèse de 5-HT et entraîne une diminution des taux de 5-HT dans l'ensemble du cerveau (Dursun et Handley, 1993). Enfin, la déplétion en DA a été réalisée par l'administration en ICV de 6-OHDA. La 6-OHDA est une neurotoxine entraînant la dégénérescence des neurones catécholaminergiques par la production de peroxyde d'hydroxyde d'hydrogène et de radicaux libres (Cohen et Heikkila, 1974).

2. Résultats

2.1. Déplétion en sérotonine et noradrénaline

L'ANOVA à 2 facteurs révèle chez les souris pré-testées, un facteur prétraitement non significatif ($F_{(2,94)} = 0,17$; $p > 0,05$), un facteur traitement significatif ($F_{(2,94)} = 53,58$; $p < 0,001$) et un facteur interaction non significatif ($F_{(4,94)} = 0,18$; $p > 0,05$). Un prétraitement par le DSP-4 et la PCPA ne modifie pas le comportement basal des souris ($p > 0,05$), l'effet anti-punition du DOI ($p < 0,01$ *versus* véh., déterminé après une ANOVA à un facteur suivie d'un test *posthoc* $F_{(8, 94)} = 13,49$; $p < 0,001$) et le comportement anxieux des souris traitées par le diazépam ($p > 0,05$) (figure 24).

Concernant les souris naïves, l'ANOVA à 2 facteurs révèle un facteur prétraitement significatif ($F_{(2,92)} = 4,51$; $p < 0,05$), un facteur traitement significatif ($F_{(2,92)} = 22,01$; $p < 0,001$) et un facteur interaction non significatif ($F_{(4, 92)} = 1,80$; $p > 0,05$). Un prétraitement par le DSP-4 et la PCPA ne modifie pas le comportement basal des souris ($p > 0,05$) et l'effet anti-punition du DOI ($p < 0,01$ *versus* véh., déterminé après une ANOVA à un facteur suivie d'un test *posthoc* $F_{(8,92)} = 7,64$; $p < 0,001$) (figure 24). En revanche, un prétraitement par la PCPA supprime l'effet anti-punition du diazépam (1 mg/kg) ($p < 0,01$). L'effet du diazépam est atténué par le prétraitement de DSP-4. En effet, le nombre de passages punis ne diffère pas statistiquement entre le « groupe véhicule » et le « groupe diazépam » de souris pré-traitées par le DSP-4. Néanmoins, l'analyse statistique ne révèle pas d'interaction significative (groupe déplété *versus* groupe non déplété $p > 0,05$).

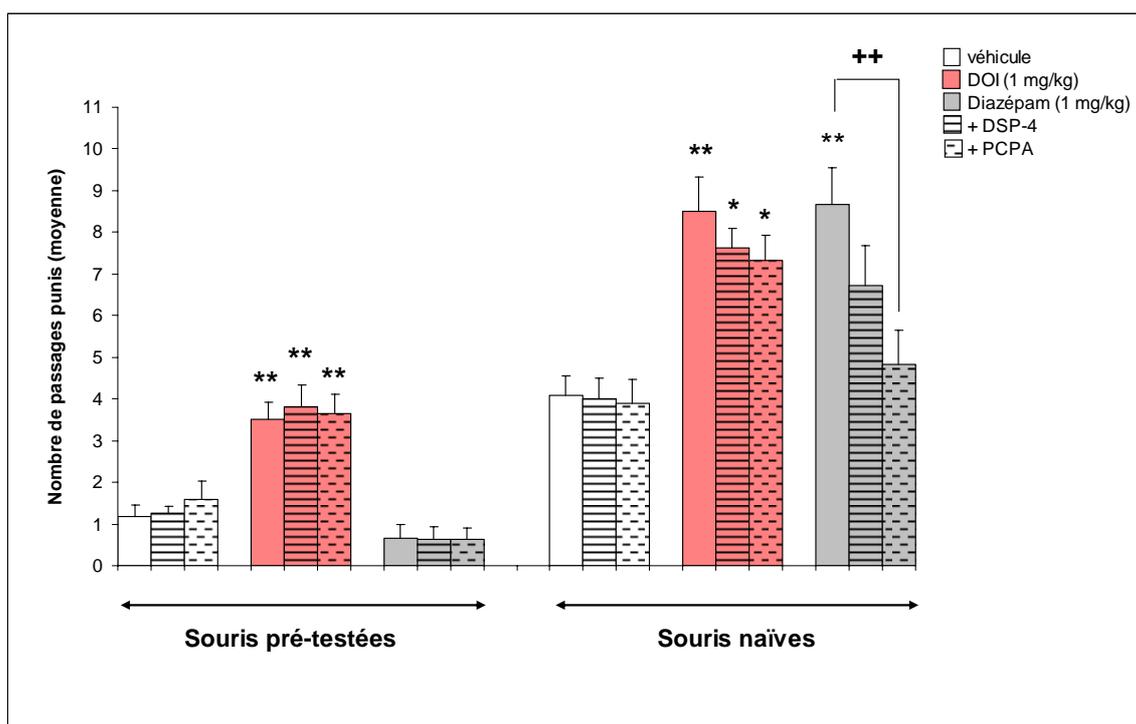


Figure 24 : Effet d'un prétraitement par le DSP-4 et la PCPA sur les effets anti-punition du DOI (1 mg/kg) et du diazépam (1 mg/kg) dans le FPT modifié. Les résultats sont exprimés en nombre de passages punis moyen \pm S.E.M. (n = 11-12 par groupe). * indique une différence significative entre les groupes traités et leur groupe contrôle (véh.) correspondant, * p<0,05 ; ** p<0,01. ++ indique une interaction significative.

2.2. Déplétion en dopamine

Influence de l'opération

L'ANOVA à 2 facteurs révèle chez les souris pré-testées, un facteur prétraitement (opération) non significatif ($F_{(1,56)} = 0,31$; $p > 0,05$), un facteur traitement significatif ($F_{(2,56)} = 18,59$; $p < 0,001$) et un facteur interaction non significatif ($F_{(2,56)} = 0,80$; $p > 0,05$). Concernant les souris naïves, l'ANOVA à 2 facteurs révèle un facteur prétraitement non significatif ($F_{(1,57)} = 0,94$; $p > 0,05$), un facteur traitement significatif ($F_{(2,56)} = 13,23$; $p < 0,001$) et un facteur interaction non significatif ($F_{(2,56)} = 0,35$; $p > 0,05$). L'opération, en soi (injection du véhicule en I.C.V.) ne modifie ni le comportement basal des souris, ni l'effet anti-punition du DOI (1 mg/kg) chez les souris naïves et pré-testées (Table 6).

Influence de la lésion

L'ANOVA à 2 facteurs révèle chez les souris pré-testées, un facteur prétraitement (lésion) significatif ($F_{(1,49)} = 10,43$; $p < 0,01$), un facteur traitement significatif ($F_{(2,49)} = 13,63$; $p < 0,001$) et un facteur interaction significatif ($F_{(2,49)} = 3,11$; $p = 0,05$). Chez les souris pré-testées, le nombre moyen de passages punis des souris traitées par le véhicule ou le diazépam n'est pas modifié par un prétraitement par la 6-OH-DA (groupe non déplété *versus* groupe déplété $p > 0,05$). En revanche, l'effet anti-punition du DOI observé chez les souris non déplétées ($p < 0,001$ *versus* groupe véhicule non déplété déterminé après une ANOVA à un facteur suivie d'un test *posthoc* $F_{(5,49)} = 9,11$; $p < 0,001$) est supprimé par le prétraitement de 6-OH-DA (groupe non déplété *versus* groupe déplété : $p < 0,01$) (figure 25).

Chez les souris naïves, l'ANOVA à 2 facteurs révèle un facteur prétraitement non significatif ($F_{(1,48)} = 2,16$; $p > 0,05$), un facteur traitement significatif ($F_{(2,48)} = 16,97$; $p < 0,001$) et un facteur interaction non significatif ($F_{(2,48)} = 0,21$; $p > 0,05$). Chez les souris naïves, le prétraitement par la 6-OH-DA ne modifie pas statistiquement le nombre moyen de passages punis des souris traitées par le véhicule ou le diazépam ($p < 0,01$: *versus* leur groupe véhicule correspondant ; $p > 0,05$: groupe non déplété *versus* groupe déplété ; déterminés après une ANOVA à un facteur suivie d'un test *posthoc* $F_{(5,48)} = 7,29$; $p < 0,001$) (figure 25). Même si, chez les souris déplétées, le nombre de passages punis moyen des souris traitées par le DOI ne diffère pas significativement de celui des souris traitées par le véhicule, l'analyse statistique ne révèle pas d'interaction significative entre les groupes non déplétés et déplétés de souris traitées par le DOI ($p > 0,05$).

	Souris pré-testées		Souris naïves	
	NOND	OND	NOND	OND
Véhicule	$2,3 \pm 0,37$	$1,9 \pm 0,23$	$4,1 \pm 0,55$	$4,4 \pm 0,66$
DOI (1 mg/kg)	$4,2 \pm 0,57$	$5,1 \pm 0,79$	$7,9 \pm 0,82$	$8,1 \pm 0,64$
Diazépam (1 mg/kg)	$1,7 \pm 0,56$	$1,9 \pm 0,35$	$7,0 \pm 1,24$	$8,4 \pm 0,82$

Table 6 : Effet de l'opération sur les effets anti-punition du DOI (1 mg/kg) et du diazépam (1 mg/kg) dans le FPT modifié. Les résultats sont exprimés en nombre de passages punis moyen \pm S.E.M. (n = 9-10 par groupe). NOND : non opérées, non déplétées ; OND : opérées non déplétées.

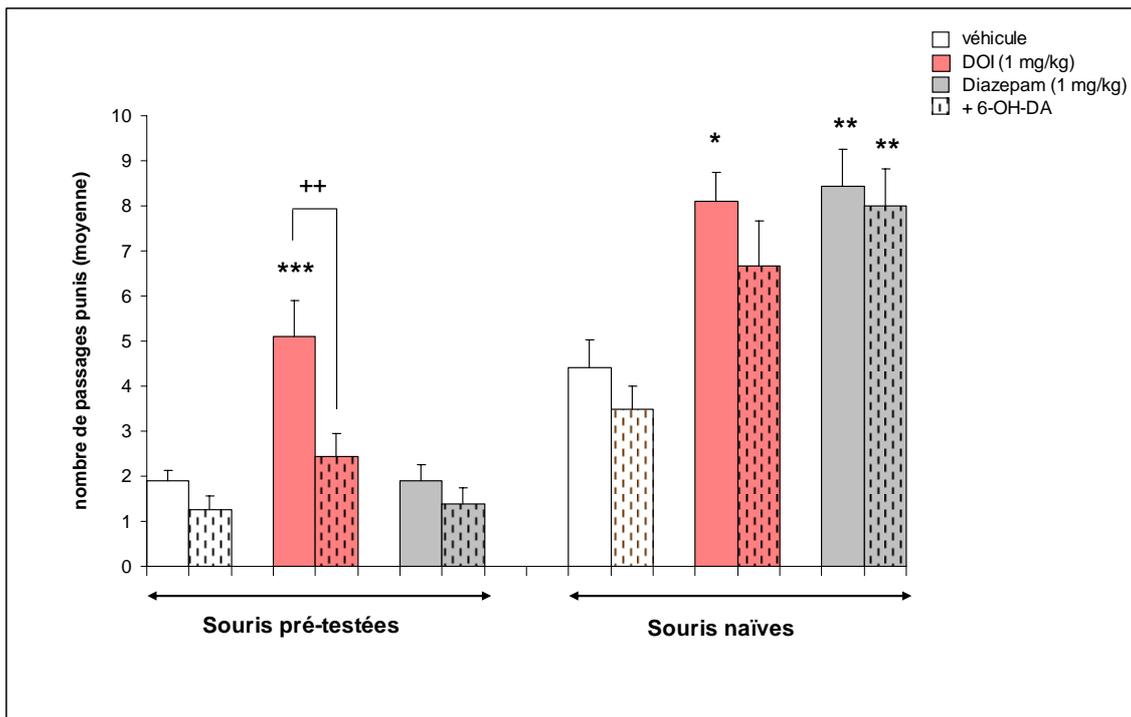


Figure 25 : Effet d'un prétraitement par la 6-OH-DA sur les effets anti-punition du DOI (1 mg/kg) et du diazépam (1 mg/kg) dans le FPT modifié. Les résultats sont exprimés en nombre de passages punis moyen \pm S.E.M. (n = 8-10 par groupe). * indique une différence significative entre les groupes traités et leur groupe contrôle (véh.) correspondant, * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,01$. ++ indique une interaction significative $p < 0,01$.

3. Discussion

Cette étude a été menée afin d'évaluer l'implication du système noradrénergique, sérotoninergique et dopaminergique dans les effets anti-punition du DOI et du diazépam dans notre protocole modifié des quatre-plaques.

Nos résultats montrent que chez les souris naïves une déplétion en 5-HT, une lésion du système noradrénergique ou dopaminergique n'altèrent pas l'effet anti-punition du DOI. De même, l'effet du DOI a persisté chez les souris pré-testées déplétées en NA et 5-HT. En revanche, le DOI perd son activité de type anxiolytique chez les souris pré-testées déplétées en DA. Chez les souris naïves, l'activité anxiolytique du diazépam est atténuée par une déplétion en NA et est abolie par une déplétion en 5-HT. En revanche, un prétraitement par la 6-OH-DA, qui détruit les neurones dopaminergiques, n'altère pas l'effet anti-punition du diazépam chez les souris naïves. Chez les souris pré-testées, la PCPA, le DSP-4 et la 6-OH-DA n'ont pas modifié le comportement anxieux des animaux traités par du diazépam. Nos résultats rejoignent les travaux récents de Masse *et al.* (2006) qui ont montré qu'une déplétion en 5-HT ou NA ne supprimait pas l'effet anti-punition du DOI.

L'ensemble des résultats de cette étude suggère que l'intégrité du système sérotoninergique est nécessaire à l'activité anxiolytique du diazépam chez les souris naïves. Cette observation rejoint l'hypothèse selon laquelle l'effet anxiolytique des BZDs implique des interactions au niveau pré- et post-synaptique avec les terminaisons sérotoninergiques (Lista *et al.*, 1990 ; Soubrié *et al.*, 1981 ; Thiébot *et al.*, 1982). En revanche, l'intégrité du système dopaminergique ne semble pas être une condition nécessaire à l'activité du diazépam. Par ailleurs, l'implication du système noradrénergique ne peut pas être exclue. Nos résultats révèlent en effet qu'un pré-traitement par le DSP-4 atténue l'activité du diazépam. De plus, contrairement à la PCPA qui entraîne une diminution des taux de 5-HT dans l'ensemble du cerveau (Dursun et Handley, 1993), et notamment dans l'hippocampe, l'hypothalamus, le striatum et le cortex (Bourin *et al.*, 2005 ; Dailly *et al.*, 2005), le DSP-4 entraîne une déplétion partielle du système noradrénergique. En effet, il détruit uniquement les axones noradrénergiques terminaux provenant du locus coeruleus et innervant certaines aires cérébrales, tels que le néocortex, l'hippocampe, le bulbe olfactif, le thalamus, le « tectum » et le cervelet (Bourin *et al.*, 2005 ; Dailly *et al.*, 2005 ; Haddjeri *et al.*, 1997). Au contraire, la plupart des axones noradrénergiques du cerveau antérieur basal, de la formation réticulée, de

l'hypothalamus et des des noyaux moteurs du tronc cérébral ne sont pas affectés (Fritschy et Grzanna, 1989).

Nos résultats montrent également que l'intégrité du système sérotoninergique et des axones noradrénergiques terminaux du locus coeruleus ne semble pas être une condition nécessaire à l'activité anti-punition du DOI chez les souris naïves et pré-testées. En revanche, contrairement aux souris naïves, l'activité du DOI chez les souris pré-testées requiert l'intégrité du système dopaminergique. L'effet anti-punition du DOI pourrait s'exercer *via* les récepteurs 5-HT_{2A} localisés sur les neurones à la dopamine. Toutefois cette hypothèse reste à confirmer. Par ailleurs, nos résultats suggèrent que l'effet du DOI chez les souris naïves implique probablement d'autres systèmes de neurotransmission et emprunte une voie différente de celle impliquée chez les souris pré-testées. De plus, nos résultats suggèrent également que l'effet anti-punition du diazépam et du DOI impliquent des voies distinctes chez les animaux naïfs.

Il est important de préciser, que l'opération en soi (injection en ICV du véhicule) n'a pas modifié le comportement habituellement observé chez les souris pré-testées et naïves, traitées par le véhicule, le diazépam ou le DOI le jour du 2^{ème} test.

Par ailleurs, certains travaux ont observé qu'une déplétion en NA (Artaiz et al., 1998 ; Lapidz et al., 2001), en 5-HT (Treit *et al.*, 1993b) ou en DA (Ravard *et al.*, 1990) réduisait l'anxiété basale des rongeurs. Néanmoins, dans notre étude le comportement des animaux contrôles déplétés ne diffère pas de celui des non-déplétés. Marino *et al.* (2005) suggèrent qu'une activité noradrénergique excessive est généralement anxiogène, mais n'est pas forcément anxiolytique lorsqu'elle fait défaut. Les modifications comportementales observées dans le FPT, en réponse ou non à un traitement implique probablement divers systèmes de neurotransmissions interagissant les uns avec les autres.

VI. DISCUSSION GENERALE ET CONCLUSION

L'objectif principal de ce travail était d'évaluer la capacité d'un protocole de « test-retest » dans le FPT à mettre en évidence des différences d'activité entre diverses substances anxiolytiques au mécanisme d'action distinct.

Nous avons tout d'abord étudié le phénomène de tolérance aux BZDs et l'implication des processus d'apprentissage et mnésiques liés à une 1^{ère} confrontation au FPT. Deux BZDs différentes ont été choisies : le diazépam et l'alprazolam. Ce dernier étant plus efficace dans certains troubles anxieux chez l'Homme. Nous nous sommes également intéressés à l'effet de l'atropine, connue pour ses propriétés amnésiantes *via* le blocage des récepteurs muscariniques M₁ (Berkeley *et al.*, 2001). L'apprentissage représente un processus permettant de conserver les informations acquises, capables d'influencer le comportement. Il peut être considéré comme la 1^{ère} étape du processus de mémorisation et correspond à l'encodage. L'état émotionnel lors d'un événement peut influencer le souvenir de celui-ci. Le FPT est considéré comme un modèle de peur conditionnée. Dans ce modèle, la peur est conditionnée par le souvenir des chocs électriques. Lors du 1^{er} test l'animal « comprend » que s'il passe d'une plaque à l'autre, il recevra un choc. Plusieurs chocs sont nécessaires avant que l'animal adapte son comportement. Cette adaptation comportementale se traduit par une suppression de l'exploration de l'enceinte du modèle et/ou des tentatives d'échappement révélées par des sauts. Une première confrontation au modèle semble impliquer un processus de mémorisation à long terme, puisque dans une étude plus ancienne réalisée dans notre laboratoire, Hascoët *et al.* (1997) ont observé un comportement anxieux lorsque le 2^{ème} test était réalisé jusqu'à 42 jours après la 1^{ère} confrontation de l'animal au modèle. La mémoire à long terme comporte une succession de 3 grands processus : l'encodage, le stockage et la restitution des informations. L'efficacité de la restitution dépend de celle de l'encodage. Le processus d'encodage fait appel aux contextes environnemental, cognitif et émotionnel. Chez l'Homme, la mémoire est une association de différents sous-systèmes en constante interaction. L'extinction est l'atténuation d'une peur conditionnée. Celle-ci survient lorsque le stimulus conditionné n'est plus associé à un stimulus aversif. L'extinction diffère de l'oubli dans le sens où la peur originelle persiste. Elle serait liée à la formation d'un nouvel apprentissage.

Nos résultats ont révélé une perte de l'effet anxiolytique des deux BZDs étudiées, ainsi qu'une sensibilisation du comportement anxieux lors du retest. Nos résultats rejoignent les observations des nombreuses études réalisées pour la plupart dans l'EPM (Berkeley *et al.*, 2001 ; Calzavara *et al.*, 2005 ; File et Hitchcott, 1990 ; File et Zangrossi, 1993 ; Hascoët *et al.*, 1997 ; Lister, 1987 ; Rodgers *et al.*, 1992). Contrairement au FPT, l'EPM est considéré comme un modèle de peur non conditionnée basé sur un « stress » éthologique. Néanmoins, nos résultats et ceux cités ci-dessus suggèrent que le caractère conditionné ou non de la peur induite par l'EPM et le FPT ne semble pas être un caractère déterminant.

L'administration des BZDs lors du 1^{er} test n'empêche pas la sensibilisation de l'anxiété lors d'un 2^{ème} test, et ce quel que soit le traitement reçu lors du 2^{ème} test (véhicule ou BZD). Nos résultats suggèrent que dans notre modèle, les BZDs ne s'opposent pas à l'apprentissage, malgré l'anxiolyse lors de la 1^{ère} confrontation au test. L'étude de File (1990) rejoint nos observations. Au contraire, d'autres travaux ont montré que l'administration de BZDs avant un 1^{er} test empêchait l'apprentissage associatif (Escarabajal *et al.*, 2003 ; Hascoët *et al.*, 1997). Etant donné le peu de données dans la littérature, nous ne pouvons pas conclure à une différence entre le FPT et l'EPM avec seulement 3 études. Il est néanmoins tentant de penser que l'intensité du/des stimulus aversif(s) dans le FPT est supérieure à celle de l'EPM.

Notre modèle diffère des autres modèles de peur conditionnée (de type Pavlovien ou opérant), dans lesquels les BZDs conservent leur efficacité. De plus, dans ces modèles, la répétition des tests entraîne une extinction. Dans notre modèle, il est fort probable qu'un nouvel encodage sous-tendant l'extinction n'a pas le temps de se produire. Ces différentes observations nous amènent à nous interroger sur la classification du FPT parmi les modèles de peur conditionnée.

Nos résultats démontrent également que dans notre modèle, les BZDs ne provoquent pas d'amnésie antérograde (ou fixation). Par ailleurs, l'atropine exerce un effet anti-punition de faible amplitude chez les souris pré-testées dans notre modèle. Cette observation nous amène à penser que l'atropine n'entraîne pas d'effet amnésiant stricto sensu, mais pourrait néanmoins interférer avec les processus sous-tendant la restitution des informations. De la même manière, dans le FPT, il a été montré que la scopolamine exerçait un effet de faible amplitude sur la mémoire, lorsque celle-ci était administrée avant le 2^{ème} test (Hascoët *et al.*, 1997). Pourtant de nombreux travaux suggèrent que les ligands capables de bloquer l'activité cholinergique perturbent les fonctions mnésiques. Le système cholinergique du cerveau antérieur basal innerve l'hippocampe, l'amygdale et le néocortex. Ce système est impliqué dans l'apprentissage et la mémoire (Bermudez-Rattoni, 2004 ; Bueno *et al.*, 2000).

L'activation des récepteurs GABA_A peut perturber les processus mnésiques en diminuant les taux d'Ach dans l'hippocampe et le cortex entorhinal de rats (Degroot et Parent, 2001). En réduisant l'activité cholinergique des neurones septo-hippocampiques, les BZDs peuvent entraîner des perturbations mnésiques antérogrades (Lamprea *et al.*, 2000 ; Zarrindast *et al.*, 2002). De nombreuses structures sont impliquées dans les processus mnésiques. Le cortex préfrontal ventromédian reçoit des connections des aires sensorielles et de l'amygdale. L'amygdale joue un rôle clé dans l'encodage ou l'acquisition, l'expression de la peur conditionnée et la restitution des mémoires de peur conditionnées (Grillon *et al.*, 1996 ; LeDoux, 2000). Lorsque celle-ci est activée par un stimulus émotionnel, elle module le stockage des processus mnésiques dans d'autres régions du SNC (Kilpatrick et Cahill, 2003). Si le contrôle cortical est altéré, l'extinction de la peur conditionnée devient alors très difficile. Le conditionnement semble entraîner le développement de faisceaux de neurones dont plusieurs sont résistants à l'extinction. La trace d'une peur conditionnée serait permanente et ce serait l'inhibition corticale qui entraînerait l'extinction. Les multiples connections nerveuses entre les différents noyaux de l'amygdale semblent être le lieu où s'inscrivent les peurs conditionnées à l'origine des différentes manifestations excessives de l'anxiété. La peur conditionnée semble s'inscrire dans les circuits du noyau latéral et du noyau central de l'amygdale. Par ailleurs, l'hippocampe pourrait jouer un rôle, en réduisant l'émergence de souvenirs explicites stressants. Néanmoins, une étude récente a suggéré qu'au niveau de l'hippocampe, l'acétylcholine est impliquée, mais n'est pas nécessaire à l'apprentissage et à la mémorisation (Parent et Baxter, 2004). D'après McNaughton (2004) deux types d'anxiété co-existent, l'une « anxiolytique-sensible », reflétant l'hyperactivité du système septo-hippocampique et l'autre « anxiolytique-insensible », reflétant l'hyperactivité de l'amygdale, l'hypothalamus dorsomédian et de la PAG. Il est probable que le système hippocampique et/ou le système cholinergique soient faiblement impliqués dans notre modèle. En revanche, il est possible que d'autres structures cérébrales, comme le cortex préfrontal et l'amygdale, puissent jouer un rôle important.

De nombreux systèmes de neurotransmission modulent l'apprentissage et la mémoire (Fraser *et al.*, 1996), il est donc possible que certains d'entre eux, tel que le système glutamatergique, interviennent dans notre protocole modifié des quatre-plaques. Par ailleurs, le CPF comme l'hippocampe exercent un rétro-contrôle négatif permettant d'abaisser le niveau d'hormones de stress, lorsque ce niveau est trop élevé. Toutefois, si des taux importants de glucocorticoïdes persistent, le rétrocontrôle négatif peut être aboli, entraînant par conséquent un relâchement du frein sur l'amygdale. Une telle perturbation pourrait se

traduire par un encodage plus intense, résistant à l'extinction. Il serait donc intéressant d'étudier dans de prochaines études, l'effet de ligands glutamatergiques et des récepteurs aux glucocorticoïdes dans notre modèle. Le cortisol pourrait également nous apporter des informations importantes.

Nous nous sommes ensuite posés la question suivante : la tolérance aux BZDs peut-elle s'expliquer par une altération fonctionnelle des sites récepteurs aux BZDs ?

Pour cela nous avons étudié l'effet du flumazénil, un antagoniste du site récepteur aux BZDs, administré avant un 2^{ème} test chez des souris pré-testées. Chez l'Homme, il a été montré que le flumazénil augmentait les attaques de panique chez les sujets souffrant du trouble panique (Nutt *et al.*, 1990 ; Nutt et Malizia, 2001). Contrairement aux travaux d'Holmes et Rodgers (2003), nos résultats ont montré que le flumazénil ne s'opposait pas au comportement anxieux lié à une 1^{ère} confrontation au modèle. Une étude plus ancienne réalisée dans notre laboratoire a montré que l'agoniste inverse, le FG 7142, ne modifiait pas le comportement des rongeurs lors d'un test-retest (Hascoët *et al.*, 1997). Nos résultats couplés à ceux de Hascoët *et al.* (1997) suggèrent qu'une première confrontation au FPT provoque une altération fonctionnelle des sites récepteurs aux BZDs. L'origine de cette absence d'effet des ligands des récepteurs aux BZDS reste à élucider dans notre modèle. Des études suggèrent qu'un stress peut modifier le fonctionnement du système GABA_A-BZD au même titre que l'administration de molécules anxiolytiques et anxiogènes (Biggio *et al.*, 1990). Certains travaux réalisés dans l'EPM suggèrent qu'une procédure de « test-retest » altère l'ensemble du complexe récepteur GABA_A/BZD (Bertoglio et Carobrez, 2002a). Peut-être est-ce le cas dans notre modèle ? Nos résultats peuvent s'expliquer par une désensibilisation rapide des récepteurs ou bien par un réarrangement des sous-unités du complexe récepteur.

Dans les protocoles de « test-retest », les BZDs sont inactives vis-à-vis du comportement basal se traduisant par une anxiété augmentée par rapport au 1^{er} test. (Rodgers *et al.*, 1992). Le comportement différent des animaux naïfs (non pré-testés) et des animaux pré-testés semble traduire deux formes distinctes d'anxiété (Holmes et Rodgers, 1998 ; File, 2001). Le protocole de « test-retest » présente donc l'avantage de permettre l'étude dans un même modèle de 2 types d'anxiété apparemment distinctes, la première sensible et la seconde insensible aux BZDs. A notre grand étonnement, très peu d'études se sont intéressées à l'effet de ligands anxiolytiques non-benzodiazépiniques dans ces protocoles. Nous nous sommes interrogés sur le pouvoir discriminatif de notre protocole modifié des quatre-plaques. Pour

cela deux ADs [la paroxétine, un IRSS et la venlafaxine, un IRSN] et le DOI (un agoniste des récepteurs 5-HT_{2A/2C}) ont été étudiés. Nos résultats ont montré que les deux ADs étudiés perdent leur effet comme les BZDs. En revanche, le DOI, un agoniste des récepteurs 5-HT_{2A/2C} exerce un effet anti-punition chez les souris pré-testées. Néanmoins, la taille de l'effet du DOI est plus faible lors du retest.

Nous nous sommes ensuite posés plusieurs questions : l'effet du DOI est-il dose dépendant chez les souris pré-testées ? Par quel sous-type de récepteurs 5-HT₂ (5-HT_{2A}, 5-HT_{2B} ou 5-HT_{2C}) le DOI exerce-t-il son activité anti-punition chez les souris pré-testées ? s'agit-il des sous-types de récepteurs 5-HT_{2A} comme chez les souris naïves (Nic Dhonchadha *et al.*, 2003b) ? Les sous-types de récepteurs 5-HT_{2B} et 5-HT_{2C} influencent-ils le comportement des souris lors du retest ? Notre étude a montré que l'effet anti-punition du DOI, s'observant de 1 à 4 mg/kg de façon non-dose dépendante, s'exerçait *via* les récepteurs 5-HT_{2A} chez les souris pré-testées, puisque son effet a été antagonisé exclusivement par l'antagoniste des récepteurs 5-HT_{2A}, le SR 46349B. En revanche, les récepteurs de sous-type 5-HT_{2C} ne semblent pas être impliqués. De plus, les récepteurs de sous-type 5-HT_{2B} jouent un rôle faible chez les souris naïves et nul chez les souris pré-testées.

Notre protocole modifié des quatre-plaques ne sensibilise pas l'effet du DOI, dans le sens d'une augmentation de la taille de l'effet, mais permet une discrimination entre les substances stimulant les récepteurs 5-HT_{2A} et les autres molécules anxiolytiques benzodiazépiniques ou non. Nos résultats suggèrent que les récepteurs 5-HT_{2A} sont moins « sensibles » que les récepteurs GABAergiques à la procédure de « test-retest ». Par ailleurs, l'atténuation de l'effet du DOI chez les souris pré-testées pourrait s'expliquer par une diminution de l'expression des récepteurs 5-HT_{2A} ou une diminution de l'activité spontanée de ces récepteurs.

Malgré certaines controverses, des auteurs suggèrent une corrélation positive entre l'anxiété et un faible taux de 5-HT, ce qui expliquerait l'effet des ADs dans les troubles anxieux (Jimerson *et al.*, 1997 ; Stahl, 2003). Chez les souris naïves, l'effet de la paroxétine semble s'exercer dans notre modèle *via* l'activation des récepteurs 5-HT_{2A} et l'effet de la venlafaxine *via* les récepteurs 5-HT_{2A} et 5-HT_{2B}. Par ailleurs, il a été montré que les ADs possèdent une affinité élevée pour les récepteurs de sous-type 5-HT_{2C} (Hyttel, 1994). L'activation de ces récepteurs par les ADs entraîne des effets anxiogènes (Bagdy *et al.*, 2001). L'absence d'effet des ADs chez les souris pré-testées pourrait donc s'expliquer par une stimulation, par ces derniers, des récepteurs 5-HT_{2C}. Néanmoins, cette hypothèse reste à confirmer ou infirmer.

Nous avons ensuite tenté de comprendre de quelle manière le DOI exerçait son effet anti-punition, notamment chez les souris pré-testées. Les récepteurs 5-HT_{2A} interagissent avec de nombreux systèmes de neurotransmission dans le SNC, tels que les systèmes noradrénergique, sérotoninergique et dopaminergique.

Concernant le système noradrénergique, nous avons concentré notre travail sur l'étude de l'interaction des effets de la stimulation des récepteurs α_2 et du DOI. Contrairement à ce que l'on voit chez les souris naïves (Masse *et al.*, 2006), l'activation des récepteurs α_2 ne s'oppose pas à l'action anti-punition du DOI chez les souris pré-testées. Par ailleurs, la lésion des neurones noradrénergiques par le DSP-4 ne se traduit pas par une suppression de l'effet anti-punition du DOI chez les souris naïves et pré-testées. Ces différentes observations conduisent à émettre plusieurs hypothèses qui restent à infirmer ou confirmer. Chez les souris naïves, l'effet inhibiteur de la stimulation des récepteurs α_2 pourrait s'exercer via des neurones noradrénergiques qui ne sont pas issus du locus coeruleus ou bien de façon indirecte en impliquant d'autres systèmes de neurotransmission. En effet, il a été montré que les récepteurs α_2 étaient présents sur des neurones dopaminergiques et GABAergiques (Cathala *et al.*, 2002). En revanche, une implication directe du système noradrénergique chez les souris pré-testées semble improbable.

Dans notre étude d'association de ligands des récepteurs de sous-type 5-HT_{1A} (le 8-OH-DPAT, le WAY 100635 et la buspirone), la seule interaction observée a été un blocage de l'effet anti-punition du DOI par la buspirone. Par ailleurs, nous avons montré qu'une déplétion en 5-HT n'altérerait pas l'activité du DOI au test comme au retest. Cette dernière donnée étaye nos hypothèses formulées précédemment (dans la partie résultats) selon lesquelles l'effet inhibiteur de la buspirone ne semble pas impliquer le système sérotoninergique, mais il pourrait en revanche s'exercer *via* les récepteurs D₂. De plus, nos résultats suggèrent que le système sérotoninergique joue un rôle secondaire dans notre modèle; ce qui pourrait expliquer l'absence d'effet du WAY 100635 et du 8-OH-DPAT chez les souris naïves.

L'étude du système dopaminergique a montré que le sulpiride et le SCH 23390 suppriment l'effet anti-punition du DOI lors du test et du retest. De plus, une lésion du système dopaminergique abolit l'effet anti-punition du DOI chez les souris pré-testées mais pas chez les souris naïves. Ces observations suggèrent que l'effet du DOI chez les souris pré-

testées implique le système dopaminergique et que la DA est nécessaire à l'activité du DOI. En revanche, chez les souris naïves, la DA ne semble pas nécessaire à l'activité anti-punition du DOI, mais interfère néanmoins avec elle. L'activité de type anxiolytique du DOI chez les souris naïves semble donc impliquer d'autres systèmes de neurotransmission.

Par ailleurs, nos résultats (de lésion du système dopaminergique) étayaient notre hypothèse formulée dans la partie des résultats selon laquelle l'effet anti-punition du 8-OH-DPAT chez les souris pré-testées pourrait impliquer la DA. Néanmoins, cette hypothèse mérite d'être confirmée par des études d'interaction entre le 8-OH-DPAT et des ligands dopaminergiques.

Les mécanismes sous-tendant l'activité anti-punition du DOI et impliquant le système dopaminergique restent à élucider. Il est probable qu'une interaction complexe entre les récepteurs 5-HT_{2A}, le système dopaminergique et GABAergique sous-tende l'effet anti-punition du DOI. Diverses données de la littérature étayaient cette hypothèse. Une forte proportion de récepteurs 5-HT_{2A} sont présents sur les neurones GABAergiques dans de nombreuses aires cérébrales (Griffiths et Lovick, 2002). Il semble que le DOI puisse activer les interneurons GABAergiques qui en retour inhibent les neurones pyramidaux (Sokal *et al.*, 2005). Cozzi et Nichols (1996) ont montré par exemple que la stimulation des récepteurs 5-HT_{2A} entraînait la libération de GABA dans le cortex frontal de rats, un effet qui s'est avéré persistant après une déplétion en 5-HT. Dans le cortex préfrontal de Rat, les agonistes dopaminergiques D₂ augmentent la concentration en GABA (Del Arco et Mora, 2000).

Différentes aires cérébrales sont probablement impliquées dans l'effet anti-punition du DOI dans notre modèle. Les récepteurs 5-HT_{2A} sont présents en forte densité dans le cortex, l'hippocampe, l'amygdale, le striatum, l'hypothalamus et le cervelet (Cornea-Hebert *et al.*, 1999 ; Doherty et Pickel, 2000 ; Griffiths et Lovick, 2002 ; Jakab et Goldman-Rakic, 1998 ; Nocjar *et al.*, 2002 ; Xu et Pandey, 2000). Sokal *et al.* (2005) suggèrent que l'activité anxiolytique du DOI pourrait s'exercer *via* une inhibition de l'amygdale. Dans leur étude, ils ont montré que contrairement au DOI et au baclofène un agoniste des récepteurs GABA_B, le WAY100635 et le 8-OH-DPAT ne modulaient pas l'activité de l'amygdale. Les récepteurs 5-HT_{1A} sont peu nombreux dans l'amygdale. On peut penser que l'absence d'effet du 8-OH-DPAT et du WAY100635, observé chez les souris naïves dans notre étude s'explique par une absence d'inhibition de l'amygdale.

Toutes les hypothèses avancées ci-dessus sont bien entendu à étayer par d'autres études. L'étude de ligands des récepteurs GABA_B associés ou non à du DOI serait intéressante à mener dans notre modèle. Des lésions spécifiques pourraient être envisagées

afin de déterminer quelles aires cérébrales interviennent dans notre modèle. L'injection, entre autres, de DOI dans ces structures lésées et non lésées pourrait apporter des précisions importantes sur les mécanismes d'action sous-tendant l'effet de type anxiolytique du DOI dans notre modèle.

Notre travail montre que le protocole modifié des quatre-plaques permet de discriminer les substances dont le mécanisme d'action implique les récepteurs 5-HT₂ des autres molécules anxiolytiques. L'ensemble de nos résultats indique qu'un test-retest dans le FPT pourrait constituer un outil précieux d'une part dans l'étude d'anxiétés de mécanismes neuro-physiologiques distincts, et d'autre part, dans les études de « screening » de molécules potentiellement anxiolytiques, impliquant le système dopaminergique et/ou les récepteurs 5-HT_{2A}.

VII. REFERENCES

- Adamec, R.E., J. Blundell et P. Burton, 2005, Neural circuit changes mediating lasting brain and behavioral response to predator stress, *Neurosci Biobehav Rev* 29, 1225.
- Adell, A. et F. Artigas, 1999, Regulation of the release of 5-hydroxytryptamine in the median raphe nucleus of the rat by catecholaminergic afferents, *Eur J Neurosci* 11, 2305.
- Albrechet-Souza, L., A.R. Oliveira, M.C. De Luca, F.M. Tomazini, N.R. Santos et M.L. Brandao, 2005, A comparative study with two types of elevated plus-maze (transparent vs. opaque walls) on the anxiolytic effects of midazolam, one-trial tolerance and fear-induced analgesia, *Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry* 29, 571.
- Almeida, S.S., R.A. Garcia et L.M. de Oliveira, 1993, Effects of early protein malnutrition and repeated testing upon locomotor and exploratory behaviors in the elevated plus-maze, *Physiol Behav* 54, 749.
- Altier, N. et J. Stewart, 1999, The role of dopamine in the nucleus accumbens in analgesia, *Life Sci* 65, 2269.
- Amargos-Bosch, M., A. Bortolozzi, M.V. Puig, J. Serrats, A. Adell, P. Celada, M. Toth, G. Mengod et F. Artigas, 2004, Co-expression and in vivo interaction of serotonin1A and serotonin2A receptors in pyramidal neurons of prefrontal cortex, *Cereb Cortex* 14, 281.
- American Psychiatric Association DSM-IV-TR. : Diagnostic and Statistical manual of mental disorders, Fourth Edition, Text Revision, DSM-IV-TR. American Psychiatric Association, Washington DC, 2000.
- Andersen, P.H., J.A. Gingrich, M.D. Bates, A. Dearry, P. Falardeau, S.E. Senogles et M.G. Caron, 1990, Dopamine receptor subtypes: beyond the D1/D2 classification, *Trends Pharmacol Sci* 11, 231.
- Andersen, P.H. et F.C. Gronvald, 1986, Specific binding of 3H-SCH 23390 to dopamine D1 receptors in vivo, *Life Sci* 38, 1507.
- Andreatini, R., C. Blanchard, R. Blanchard, M.L. Brandao, A.P. Carobrez, G. Griebel, F.S. Guimaraes, S.L. Handley, F. Jenck, J.R. Leite, J. Rodgers, L.C. Schenberg, C. Da Cunha et F.G. Graeff, 2001, The brain decade in debate: II. Panic or anxiety? From animal models to a neurobiological basis, *Braz J Med Biol Res* 34, 145.

- Andrews, N. et S.E. File, 1993, Handling history of rats modifies behavioural effects of drugs in the elevated plus-maze test of anxiety, *Eur J Pharmacol* 235, 109.
- Andrews, N., S. Hogg, L.E. Gonzalez et S.E. File, 1994, 5-HT_{1A} receptors in the median raphe nucleus and dorsal hippocampus may mediate anxiolytic and anxiogenic behaviours respectively, *Eur J Pharmacol* 264, 259.
- Anseloni, V.Z. et M.L. Brandao, 1997, Ethopharmacological analysis of behaviour of rats using variations of the elevated plus-maze, *Behav Pharmacol* 8, 533.
- Anseloni, V.Z., V. Motta, G. Lima et M.L. Brandao, 1995, Behavioral and pharmacological validation of the elevated plus maze constructed with transparent walls, *Braz J Med Biol Res* 28, 597.
- Antelman, S.M., J.E. Cunnick, D.T. Lysle, A.R. Caggiula, S. Knopf, D.J. Kocan, B.S. Rabin et D.J. Edwards, 1990, Immobilization 12 days (but not one hour) earlier enhanced 2-deoxy-D-glucose-induced immunosuppression: evidence for stressor-induced time-dependent sensitization of the immune system, *Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry* 14, 579.
- Arnt, J., J. Hyttel et J. Perregaard, 1987, Dopamine D-1 receptor agonists combined with the selective D-2 agonist quinpirole facilitate the expression of oral stereotyped behaviour in rats, *Eur J Pharmacol* 133, 137.
- Aron, C., P. Simon, C. Larousse et J.R. Boissier, 1971, Evaluation of a rapid technique for detecting minor tranquilizers, *Neuropharmacology* 10, 459.
- Artaiz, I., A. Zazpe et J. Del Rio, 1998, Characterization of serotonergic mechanisms involved in the behavioural inhibition induced by 5-hydroxytryptophan in a modified light-dark test in mice, *Behav Pharmacol* 9, 103.
- Arvidsson, L.E., U. Hacksell, J.L. Nilsson, S. Hjorth, A. Carlsson, P. Lindberg, D. Sanchez et H. Wikstrom, 1981, 8-Hydroxy-2-(di-n-propylamino)tetralin, a new centrally acting 5-hydroxytryptamine receptor agonist, *J Med Chem* 24, 921.
- Asano, T., S. Dohi, S. Ohta, H. Shimonaka et H. Iida, 2000, Antinociception by epidural and systemic alpha(2)-adrenoceptor agonists and their binding affinity in rat spinal cord and brain, *Anesth Analg* 90, 400.
- Augustsson, H. et B.J. Meyerson, 2004, Exploration and risk assessment: a comparative study of male house mice (*Mus musculus musculus*) and two laboratory strains, *Physiol Behav* 81, 685.
- Azmitia, E.C. et M. Segal, 1978, An autoradiographic analysis of the differential ascending projections of the dorsal and median raphe nuclei in the rat, *J Comp Neurol* 179, 641.

- Bagdy, G., M. Graf, Z.E. Anheuer, E.A. Modos et S. Kantor, 2001, 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* 4, 399.
- Baraban, J.M. et G.K. Aghajanian, 1980, Suppression of firing activity of 5-HT neurons in the dorsal raphe by alpha-adrenoceptor antagonists, *Neuropharmacology* 19, 355.
- Bardo, M.T., R.L. Donohew et N.G. Harrington, 1996, Psychobiology of novelty seeking and drug seeking behavior, *Behav Brain Res* 77, 23.
- Barrett, J.E. et K.E. Vanover, 1993, 5-HT receptors as targets for the development of novel anxiolytic drugs: models, mechanisms and future directions, *Psychopharmacology (Berl)* 112, 1.
- Bartoszyk, G.D., 1998, Anxiolytic effects of dopamine receptor ligands: I. Involvement of dopamine autoreceptors, *Life Sci* 62, 649.
- Bartoszyk, G.D., R. Hegenbart et H. Ziegler, 1997, EMD 68843, a serotonin reuptake inhibitor with selective presynaptic 5-HT_{1A} receptor agonistic properties, *Eur J Pharmacol* 322, 147.
- Baxter, G., G. Kennett, F. Blaney et T. Blackburn, 1995, 5-HT₂ receptor subtypes: a family re-united?, *Trends Pharmacol Sci* 16, 105.
- Beart, P.M. et D. McDonald, 1982, 5-Hydroxytryptamine and 5-hydroxytryptaminergic-dopaminergic interactions in the ventral tegmental area of rat brain, *J Pharm Pharmacol* 34, 591.
- Becker, A. et G. Grecksch, 1996, Illumination has no effect on rats' behavior in the elevated plus-maze, *Physiol Behav* 59, 1175.
- Belzung, C. et F. Berton, 1997, Further pharmacological validation of the BALB/c neophobia in the free exploratory paradigm as an animal model of trait anxiety, *Behav Pharmacol* 8, 541.
- Belzung, C., S. Cabib, L. Fabiani, P. Tolentino et S. Puglisi-Allegra, 1991, LY 171555-induced hyperdefensiveness in the mouse does not implicate benzodiazepine receptors, *Psychopharmacology (Berl)* 103, 449.
- Belzung, C. et G. Griebel, 2001, Measuring normal and pathological anxiety-like behaviour in mice: a review, *Behav Brain Res* 125, 141.
- Benloucif, S. et M.P. Galloway, 1991, Facilitation of dopamine release in vivo by serotonin agonists: studies with microdialysis, *Eur J Pharmacol* 200, 1.

- Ben-Sreti, M.M., J.P. Gonzalez et R.D. Sewell, 1983, Differential effects of SKF 38393 and LY 141865 on nociception and morphine analgesia, *Life Sci* 33 Suppl 1, 665.
- Berkeley, J.L., J. Gomeza, J. Wess, S.E. Hamilton, N.M. Nathanson et A.I. Levey, 2001, M1 muscarinic acetylcholine receptors activate extracellular signal-regulated kinase in CA1 pyramidal neurons in mouse hippocampal slices, *Mol Cell Neurosci* 18, 512.
- Bermudez-Rattoni, F., 2004, Molecular mechanisms of taste-recognition memory, *Nat Rev Neurosci* 5, 209.
- Bernardis, L.L. et L.L. Bellinger, 1987, The dorsomedial hypothalamic nucleus revisited: 1986 update, *Brain Res* 434, 321.
- Bert, B., H. Fink, J.P. Huston et M. Voits, 2002, Fischer 344 and wistar rats differ in anxiety and habituation but not in water maze performance, *Neurobiol Learn Mem* 78, 11.
- Bertoglio, L.J., C. Anzini, C. Lino-de-Oliveira et A.P. Carobrez, 2005, Enhanced dorsolateral periaqueductal gray activity counteracts the anxiolytic response to midazolam on the elevated plus-maze Trial 2 in rats, *Behav Brain Res* 162, 99.
- Bertoglio, L.J. et A.P. Carobrez, 2000, Previous maze experience required to increase open arms avoidance in rats submitted to the elevated plus-maze model of anxiety, *Behav Brain Res* 108, 197.
- Bertoglio, L.J. et A.P. Carobrez, 2002a, Anxiolytic effects of ethanol and phenobarbital are abolished in test-experienced rats submitted to the elevated plus maze, *Pharmacol Biochem Behav* 73, 963.
- Bertoglio, L.J. et A.P. Carobrez, 2002b, Behavioral profile of rats submitted to session 1-session 2 in the elevated plus-maze during diurnal/nocturnal phases and under different illumination conditions, *Behav Brain Res* 132, 135.
- Bertoglio, L.J. et A.P. Carobrez, 2002c, Prior maze experience required to alter midazolam effects in rats submitted to the elevated plus-maze, *Pharmacol Biochem Behav* 72, 449.
- Bertoglio, L.J. et A.P. Carobrez, 2004, Scopolamine given pre-Trial 1 prevents the one-trial tolerance phenomenon in the elevated plus-maze Trial 2, *Behav Pharmacol* 15, 45.
- Berton, O., S. Aguerre, A. Sarrieau, P. Mormede et F. Chaouloff, 1998, Differential effects of social stress on central serotonergic activity and emotional reactivity in Lewis and spontaneously hypertensive rats, *Neuroscience* 82, 147.
- Bessa, J.M., M. Oliveira, J.J. Cerqueira, O.F. Almeida et N. Sousa, 2005, Age-related qualitative shift in emotional behaviour: paradoxical findings after re-exposure of rats in the elevated-plus maze, *Behav Brain Res* 162, 135.

- Beyer, C.E., S. Boikess, B. Luo et L.A. Dawson, 2002, Comparison of the effects of antidepressants on norepinephrine and serotonin concentrations in the rat frontal cortex: an in-vivo microdialysis study, *J Psychopharmacol* 16, 297.
- Biggio, G., A. Concas, M.G. Corda, O. Giorgi, E. Sanna et M. Serra, 1990, GABAergic and dopaminergic transmission in the rat cerebral cortex: effect of stress, anxiolytic and anxiogenic drugs, *Pharmacol Ther* 48, 121.
- Bjorklund, A., A.S. Horn, H.G. Baumgarten, A. Nobin et H.G. Schlossberger, 1975, Neurotoxicity of hydroxylated tryptamines: structure-activity relationships. 2. In vitro studies on monoamine uptake inhibition and uptake impairment, *Acta Physiol Scand Suppl* 429, 29.
- Blanchard, R.J. et D.C. Blanchard, 1989, Attack and defense in rodents as ethoexperimental models for the study of emotion, *Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry* 13 Suppl, S3.
- Blanchard, R.J., K.J. Flannelly et D.C. Blanchard, 1986, Defensive behavior of laboratory and wild *Rattus norvegicus*, *J Comp Psychol* 100, 101.
- Blanchard, R.J., G. Griebel, J.A. Henrie et D.C. Blanchard, 1997, Differentiation of anxiolytic and panicolytic drugs by effects on rat and mouse defense test batteries, *Neurosci Biobehav Rev* 21, 783.
- Blanchard, R.J., M.A. Hebert, P. Ferrari, P. Palanza, R. Figueira, D.C. Blanchard et S. Parmigiani, 1998a, Defensive behaviors in wild and laboratory (Swiss) mice: the mouse defense test battery, *Physiol Behav* 65, 201.
- Blanchard, R.J., J.N. Nikulina, R.R. Sakai, C. McKittrick, B. McEwen et D.C. Blanchard, 1998b, Behavioral and endocrine change following chronic predatory stress, *Physiol Behav* 63, 561.
- Blier, P. et C. de Montigny, 1985, Serotonergic but not noradrenergic neurons in rat central nervous system adapt to long-term treatment with monoamine oxidase inhibitors, *Neuroscience* 16, 949.
- Blier, P., G. Pineyro, M. el Mansari, R. Bergeron et C. de Montigny, 1998, Role of somatodendritic 5-HT autoreceptors in modulating 5-HT neurotransmission, *Ann N Y Acad Sci* 861, 204.
- Blumstein, L.K. et J.N. Crawley, 1983, Further characterization of a simple, automated exploratory model for the anxiolytic effects of benzodiazepines, *Pharmacol Biochem Behav* 18, 37.

- Boerngen-Lacerda, R. et M.L. Souza-Formigoni, 2000, Does the increase in locomotion induced by ethanol indicate its stimulant or anxiolytic properties?, *Pharmacol Biochem Behav* 67, 225.
- Boissier, J.R. et P. Simon, 1965, [Action of caffeine on the spontaneous motility of the mouse], *Arch Int Pharmacodyn Ther* 158, 212.
- Boissier, J.R., P. Simon et C. Aron, 1968, A new method for rapid screening of minor tranquillizers in mice, *Eur J Pharmacol* 4, 145.
- Bonhaus, D.W., C.L. Rocha, M.W. Dawson et R.M. Eglen, 1998, Absorption and brain penetration of a high affinity, highly selective 5-HT_{2C} receptor antagonist, RS-102221, *Ann N Y Acad Sci* 861, 269.
- Bonhaus, D.W., K.K. Weinhardt, M. Taylor, A. DeSouza, P.M. McNeeley, K. Szczepanski, D.J. Fontana, J. Trinh, C.L. Rocha, M.W. Dawson, L.A. Flippin et R.M. Eglen, 1997, RS-102221: a novel high affinity and selective, 5-HT_{2C} receptor antagonist, *Neuropharmacology* 36, 621.
- Borges, P.C., N.C. Coimbra et M.L. Brandao, 1988, Independence of aversive and pain mechanisms in the dorsal periaqueductal gray matter of the rat, *Braz J Med Biol Res* 21, 1027.
- Borsini, F., J. Podhorna et D. Marazziti, 2002, Do animal models of anxiety predict anxiolytic-like effects of antidepressants?, *Psychopharmacology (Berl)* 163, 121.
- Bourin, M., 1995, [The future of pharmacological models], *Therapie* 50, 375.
- Bourin, M., 1997, Animal models of anxiety: are they suitable for predicting drug action in humans?, *Pol J Pharmacol* 49, 79.
- Bourin, M. et G.B. Baker, 1996, The future of antidepressants, *Biomed Pharmacother* 50, 7.
- Bourin, M., D.J. David, P. Jolliet et A. Gardier, 2002, [Mechanism of action of antidepressants and therapeutic perspectives], *Therapie* 57, 385.
- Bourin, M., M. Hascoët, B. Mansouri, M.C. Colombel et J. Bradwejn, 1992, Comparison of behavioral effects after single and repeated administrations of four benzodiazepines in three mice behavioral models, *J Psychiatry Neurosci* 17, 72.
- Bourin, M. et O. Lambert, 2002, Pharmacotherapy of anxious disorders, *Hum Psychopharmacol* 17, 383.
- Bourin, M., F. Masse, E. Dailly et M. Hascoët, 2005, Anxiolytic-like effect milnacipran in the four-plate test in mice: Mechanism of action, *Pharmacology, Biochemistry and Behaviour* 81, 645.

- Bouron, A. et H. Reuter, 1999, The D1 dopamine receptor agonist SKF-38393 stimulates the release of glutamate in the hippocampus, *Neuroscience* 94, 1063.
- Bowers, B.J., M.B. Henry, R.J. Thielen et W.J. McBride, 2000, Serotonin 5-HT(2) receptor stimulation of dopamine release in the posterior but not anterior nucleus accumbens of the rat, *J Neurochem* 75, 1625.
- Boyajian, C.L. et F.M. Leslie, 1987, Pharmacological evidence for alpha-2 adrenoceptor heterogeneity: differential binding properties of [3H]rauwolscine and [3H]idazoxan in rat brain, *J Pharmacol Exp Ther* 241, 1092.
- Braak, H. et E. Braak, 2000, Pathoanatomy of Parkinson's disease, *J Neurol* 247 Suppl 2, II3.
- Braga, R.J., G. Petrides et I. Figueira, 2004, Anxiety disorders in schizophrenia, *Compr Psychiatry* 45, 460.
- Brandao, M.L., G. Di Scala, M.J. Bouchet et P. Schmitt, 1986, Escape behavior produced by the blockade of glutamic acid decarboxylase (GAD) in mesencephalic central gray or medial hypothalamus, *Pharmacol Biochem Behav* 24, 497.
- Brett, R.R. et J.A. Pratt, 1990, Chronic handling modifies the anxiolytic effect of diazepam in the elevated plus-maze, *Eur J Pharmacol* 178, 135.
- Broderick, P.A. et C.F. Phelix, 1997, I. Serotonin (5-HT) within dopamine reward circuits signals open-field behavior. II. Basis for 5-HT--DA interaction in cocaine dysfunctional behavior, *Neurosci Biobehav Rev* 21, 227.
- Brown, T.A., L.A. Campbell, C.L. Lehman, J.R. Grisham et R.B. Mancill, 2001, Current and lifetime comorbidity of the DSM-IV anxiety and mood disorders in a large clinical sample, *J Abnorm Psychol* 110, 585.
- Bueno, O.F., G.M. Oliveira, L.L. Lobo, P.R. Morais, F.H. Melo et S. Tufik, 2000, Cholinergic modulation of inhibitory avoidance impairment induced by paradoxical sleep deprivation, *Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry* 24, 595.
- Bylund, D.B. et D.M. Chacko, 1999, Characterization of alpha2 adrenergic receptor subtypes in human ocular tissue homogenates, *Invest Ophthalmol Vis Sci* 40, 2299.
- Cabib, S. et C. Castellano, 1997, Impairments produced by amphetamine and stress on memory storage are reduced following a chronic stressful experience, *Psychopharmacology (Berl)* 129, 161.
- Cabib, S., L. Giardino, L. Calza, M. Zanni, A. Mele et S. Puglisi-Allegra, 1998, Stress promotes major changes in dopamine receptor densities within the mesoaccumbens and nigrostriatal systems, *Neuroscience* 84, 193.

- Cabib, S., E. Kempf, C. Schleef, A. Mele et S. Puglisi-Allegra, 1988, Different effects of acute and chronic stress on two dopamine-mediated behaviors in the mouse, *Physiol Behav* 43, 223.
- Cabib, S. et S. Puglisi-Allegra, 1994, Opposite responses of mesolimbic dopamine system to controllable and uncontrollable aversive experiences, *J Neurosci* 14, 3333.
- Cabib, S. et S. Puglisi-Allegra, 1996, Different effects of repeated stressful experiences on mesocortical and mesolimbic dopamine metabolism, *Neuroscience* 73, 375.
- Calvo, N., I.D. Martijena, V.A. Molina et M. Volosin, 1998, Metyrapone pretreatment prevents the behavioral and neurochemical sequelae induced by stress, *Brain Res* 800, 227.
- Calzavara, M.B., C.L. Patti, G.B. Lopez, V.C. Abilio, R.H. Silva et R. Frussa-Filho, 2005, Role of learning of open arm avoidance in the phenomenon of one-trial tolerance to the anxiolytic effect of chlordiazepoxide in mice, *Life Sci* 76, 2235.
- Cameron, A.A., I.A. Khan, K.N. Westlund, K.D. Cliffer et W.D. Willis, 1995, The efferent projections of the periaqueductal gray in the rat: a Phaseolus vulgaris-leucoagglutinin study. I. Ascending projections, *J Comp Neurol* 351, 568.
- Cameron, D.L., M.W. Wessendorf et J.T. Williams, 1997, A subset of ventral tegmental area neurons is inhibited by dopamine, 5-hydroxytryptamine and opioids, *Neuroscience* 77, 155.
- Canto-de-Souza, A., R. Luiz Nunes-de-Souza et R.J. Rodgers, 2002, Anxiolytic-like effect of WAY-100635 microinfusions into the median (but not dorsal) raphe nucleus in mice exposed to the plus-maze: influence of prior test experience, *Brain Res* 928, 50.
- Canton, H., L. Verrielle et M.J. Millan, 1994, Competitive antagonism of serotonin (5-HT)_{2C} and 5-HT_{2A} receptor-mediated phosphoinositide (PI) turnover by clozapine in the rat: a comparison to other antipsychotics, *Neurosci Lett* 181, 65.
- Cao, B.J. et R.J. Rodgers, 1998a, Comparative effects of novel 5-HT_{1A} receptor ligands, LY293284, LY315712 and LY297996, on plus-maze anxiety in mice, *Psychopharmacology (Berl)* 139, 185.
- Cao, B.J. et R.J. Rodgers, 1998b, Tolerance to acute anxiolysis but no withdrawal anxiogenesis in mice treated chronically with 5-HT_{1A} receptor antagonist, WAY 100635, *Neurosci Biobehav Rev* 23, 247.
- Cardenas, F., M.R. Lamprea et S. Morato, 2001, Vibrissal sense is not the main sensory modality in rat exploratory behavior in the elevated plus-maze, *Behav Brain Res* 122, 169.

- Carta, G., G.L. Gessa et F. Nava, 1999, Dopamine D(2) receptor antagonists prevent delta(9)-tetrahydrocannabinol-induced antinociception in rats, *Eur J Pharmacol* 384, 153.
- Casey, K.L., S. Minoshima, T.J. Morrow et R.A. Koeppe, 1996, Comparison of human cerebral activation pattern during cutaneous warmth, heat pain, and deep cold pain, *J Neurophysiol* 76, 571.
- Castellano, C., S. Cabib, S. Puglisi-Allegra, A. Gasbarri, A. Sulli, C. Pacitti, I.B. Introini-Collison et J.L. McGaugh, 1999, Strain-dependent involvement of D1 and D2 dopamine receptors in muscarinic cholinergic influences on memory storage, *Behav Brain Res* 98, 17.
- Cathala, L., A. Guyon, D. Eugene et D. Paupardin-Tritsch, 2002, Alpha2-adrenoceptor activation increases a cationic conductance and spontaneous GABAergic synaptic activity in dopaminergic neurones of the rat substantia nigra, *Neuroscience* 115, 1059.
- Cecchi, M., H. Khoshbouei et D.A. Morilak, 2002, 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.
- Cheeta, S., P.J. Kenny et S.E. File, 2000, Hippocampal and septal injections of nicotine and 8-OH-DPAT distinguish among different animal tests of anxiety, *Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry* 24, 1053.
- Chiang, C. et G. Aston-Jones, 1993, A 5-hydroxytryptamine2 agonist augments gamma-aminobutyric acid and excitatory amino acid inputs to noradrenergic locus coeruleus neurons, *Neuroscience* 54, 409.
- Clark, D. et F.J. White, 1987, D1 dopamine receptor--the search for a function: a critical evaluation of the D1/D2 dopamine receptor classification and its functional implications, *Synapse* 1, 347.
- Claus, H.J. et D. Bindra, 1960, Reactions to novelty and stimulus-change induced response decrement, *Can J Psychol* 14, 101.
- Clenet, F., E. Bouyon, M. Hascoët et M. Bourin, 2005, Light/dark cycle manipulation influences mice behaviour in the elevated plus maze, *Behav Brain Res*.
- Coco, M.L., C.M. Kuhn, T.D. Ely et C.D. Kilts, 1992, Selective activation of mesoamygdaloid dopamine neurons by conditioned stress: attenuation by diazepam, *Brain Res* 590, 39.
- Coghill, R.C., J.G. McHaffie et Y.F. Yen, 2003, Neural correlates of interindividual differences in the subjective experience of pain, *Proc Natl Acad Sci U S A* 100, 8538.

- Coghill, R.C., C.N. Sang, J.M. Maisog et M.J. Iadarola, 1999, Pain intensity processing within the human brain: a bilateral, distributed mechanism, *J Neurophysiol* 82, 1934.
- Cohen, G. et R.E. Heikkila, 1974, The generation of hydrogen peroxide, superoxide radical, and hydroxyl radical by 6-hydroxydopamine, dialuric acid, and related cytotoxic agents, *J Biol Chem* 249, 2447.
- Cole, J.C., G.J. Burroughs, C.R. Laverty, N.C. Sheriff, E.A. Sparham et R.J. Rodgers, 1995, Anxiolytic-like effects of yohimbine in the murine plus-maze: strain independence and evidence against alpha 2-adrenoceptor mediation, *Psychopharmacology (Berl)* 118, 425.
- Cole, J.C., J.M. Littleton et H.J. Little, 1999, Effects of repeated ethanol administration in the plus maze; a simple model for conditioned abstinence behaviour, *Psychopharmacology (Berl)* 142, 270.
- Cole, J.C. et R.J. Rodgers, 1993, An ethological analysis of the effects of chlordiazepoxide and bretazenil (Ro 16-6028) in the murine elevated plus-maze, *Behav Pharmacol* 4, 573.
- Cook, M.N., M. Crouse et L. Flaherty, 2002, Anxiety in the elevated zero-maze is augmented in mice after repeated daily exposure, *Behav Genet* 32, 113.
- Cornea-Hebert, V., M. Riad, C. Wu, S.K. Singh et L. Descarries, 1999, Cellular and subcellular distribution of the serotonin 5-HT_{2A} receptor in the central nervous system of adult rat, *J Comp Neurol* 409, 187.
- Cornea-Hebert, V., K.C. Watkins, B.L. Roth, W.K. Kroeze, P. Gaudreau, N. Leclerc et L. Descarries, 2002, Similar ultrastructural distribution of the 5-HT_{2A} serotonin receptor and microtubule-associated protein MAP1A in cortical dendrites of adult rat, *Neuroscience* 113, 23.
- Corradetti, R., E. Le Poul, N. Laaris, M. Hamon et L. Lanfumey, 1996a, Electrophysiological effects of N-(2-(4-(2-methoxyphenyl)-1-piperazinyl)ethyl)-N-(2-pyridinyl) cyclohexane carboxamide (WAY 100635) on dorsal raphe serotonergic neurons and CA1 hippocampal pyramidal cells in vitro, *J Pharmacol Exp Ther* 278, 679.
- Corradetti, R., A.M. Pugliese, E. Le Poul, N. Laaris, M. Hamon et L. Lanfumey, 1996b, Electrophysiological effects of WAY 100635, a new 5-HT_{1A} receptor antagonist, on dorsal raphe nucleus serotonergic neurones and CA1 pyramidal cells in vitro, *Acta Physiol Hung* 84, 407.
- Costall, B., C.A. Hendrie, M.E. Kelly et R.J. Naylor, 1987, Actions of sulpiride and tiapride in a simple model of anxiety in mice, *Neuropharmacology* 26, 195.

- Cozzi, N.V. et D.E. Nichols, 1996, 5-HT_{2A} receptor antagonists inhibit potassium-stimulated gamma-aminobutyric acid release in rat frontal cortex, *Eur J Pharmacol* 309, 25.
- Crawley, J.N., J.K. Belknap, A. Collins, J.C. Crabbe, W. Frankel, N. Henderson, R.J. Hitzemann, S.C. Maxson, L.L. Miner, A.J. Silva, J.M. Wehner, A. Wynshaw-Boris et R. Paylor, 1997, Behavioral phenotypes of inbred mouse strains: implications and recommendations for molecular studies, *Psychopharmacology (Berl)* 132, 107.
- Cruz, A.P., F. Frei et F.G. Graeff, 1994, Ethopharmacological analysis of rat behavior on the elevated plus-maze, *Pharmacol Biochem Behav* 49, 171.
- Cruz-Morales, S.E., N.R. Santos et M.L. Brandao, 2002, One-trial tolerance to midazolam is due to enhancement of fear and reduction of anxiolytic-sensitive behaviors in the elevated plus-maze retest in the rat, *Pharmacol Biochem Behav* 72, 973.
- Cryan, J.F., O.F. O'Leary, S.H. Jin, J.C. Friedland, M. Ouyang, B.R. Hirsch, M.E. Page, A. Dalvi, S.A. Thomas et I. Lucki, 2004, Norepinephrine-deficient mice lack responses to antidepressant drugs, including selective serotonin reuptake inhibitors, *Proc Natl Acad Sci U S A* 101, 8186.
- Cuadra, G., A. Zurita, C.E. Macedo, V.A. Molina et M.L. Brandao, 2000, Electrical stimulation of the midbrain tectum enhances dopamine release in the frontal cortex, *Brain Res Bull* 52, 413.
- Currie, P.J. et D.V. Coscina, 1993, Paraventricular nucleus injections of idazoxan block feeding induced by paraventricular nucleus norepinephrine but not intra-raphé 8-hydroxy-2-(di-n-propylamino)tetralin, *Brain Res* 627, 153.
- Dailly, E., F. Chenu, B. Petit-Demouliere et M. Bourin, 2005, Specificity and efficacy of noradrenaline, serotonin depletion in discrete brain areas of Swiss mice by neurotoxins, *J Neurosci Methods*.
- Dal-Col, M.L., L.O. Pereira, V.P. Rosa, A.V. Calixto, A.P. Carobrez et M.S. Faria, 2003, Lack of midazolam-induced anxiolysis in the plus-maze Trial 2 is dependent on the length of Trial 1, *Pharmacol Biochem Behav* 74, 395.
- Damjanoska, K.J., N.A. Muma, Y. Zhang, D.N. D'Souza, F. Garcia, G.A. Carrasco, G.H. Kindel, K.A. Haskins, M. Shankaran, B.R. Petersen et L.D. Van De Kar, 2003, Neuroendocrine evidence that (S)-2-(chloro-5-fluoro-indol-1-yl)-1-methylethylamine fumarate (Ro 60-0175) is not a selective 5-hydroxytryptamine(2C) receptor agonist, *J Pharmacol Exp Ther* 304, 1209.

- Davies, M.F., J. Tsui, J.A. Flannery, X. Li, T.M. DeLorey et B.B. Hoffman, 2004, Activation of alpha2 adrenergic receptors suppresses fear conditioning: expression of c-Fos and phosphorylated CREB in mouse amygdala, *Neuropsychopharmacology* 29, 229.
- Davis, K.D., R.D. Treede, S.N. Raja, R.A. Meyer et J.N. Campbell, 1991, Topical application of clonidine relieves hyperalgesia in patients with sympathetically maintained pain, *Pain* 47, 309.
- Dawson, G.R., S.P. Crawford, K.J. Stanhope, S.D. Iversen et M.D. Tricklebank, 1994, One-trial tolerance to the effects of chlordiazepoxide on the elevated plus maze may be due to locomotor habituation, not repeated drug exposure, *Psychopharmacology (Berl)* 113, 570.
- Dawson, G.R. et M.D. Tricklebank, 1995, Use of the elevated plus maze in the search for novel anxiolytic agents, *Trends Pharmacol Sci* 16, 33.
- Dazzi, L., M. Serra, F. Spiga, M.G. Pisu, J.D. Jentsch et G. Biggio, 2001, Prevention of the stress-induced increase in frontal cortical dopamine efflux of freely moving rats by long-term treatment with antidepressant drugs, *Eur Neuropsychopharmacol* 11, 343.
- De Kock, M., P. Wiederkehr, A. Laghmiche et J.L. Scholtes, 1997, Epidural clonidine used as the sole analgesic agent during and after abdominal surgery. A dose-response study, *Anesthesiology* 86, 285.
- de la Mora, M.P., L. Cardenas-Cachon, M. Vazquez-Garcia, M. Crespo-Ramirez, K. Jacobsen, M. Hoistad, L. Agnati et K. Fuxe, 2005, Anxiolytic effects of intra-amygdaloid injection of the D1 antagonist SCH 23390 in the rat, *Neurosci Lett* 377, 101.
- de Paula Soares, V. et H. Zangrossi, Jr., 2004, Involvement of 5-HT1A 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* 64, 181.
- De Vry, J., 1995, 5-HT1A receptor agonists: recent developments and controversial issues, *Psychopharmacology (Berl)* 121, 1.
- De Vry, J., U. Benz, R. Schreiber et J. Traber, 1993, Shock-induced ultrasonic vocalization in young adult rats: a model for testing putative anti-anxiety drugs, *Eur J Pharmacol* 249, 331.
- De Vry, J., R. Schreiber, C. Melon, M. Dalmus et K.R. Jentsch, 2004, 5-HT1A receptors are differentially involved in the anxiolytic- and antidepressant-like effects of 8-OH-DPAT and fluoxetine in the rat, *Eur Neuropsychopharmacol* 14, 487.

- De Vry, J.M., T. Glaser, T. Schuurmann, R. Schreiber et J. Traber, 1991, 5-HT_{1A} receptors in anxiety., dans: *New concepts in anxiety*, ed. M. Briley (McMillan, London).
- Degroot, A. et M.B. Parent, 2001, Infusions of physostigmine into the hippocampus or the entorhinal cortex attenuate avoidance retention deficits produced by intra-septal infusions of the GABA agonist muscimol, *Brain Res* 920, 10.
- Dekeyne, A., M. Brocco, A. Adhumeau, A. Gobert et M.J. Millan, 2000, The selective serotonin (5-HT)_{1A} receptor ligand, S15535, displays anxiolytic-like effects in the social interaction and Vogel models and suppresses dialysate levels of 5-HT in the dorsal hippocampus of freely-moving rats. A comparison with other anxiolytic agents, *Psychopharmacology (Berl)* 152, 55.
- Del Arco, A. et F. Mora, 2000, Endogenous dopamine potentiates the effects of glutamate on extracellular GABA in the prefrontal cortex of the freely moving rat, *Brain Res Bull* 53, 339.
- Dennis, T., R. L'Heureux, C. Carter et B. Scatton, 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.
- Derbyshire, S.W., A.K. Jones, F. Gyulai, S. Clark, D. Townsend et L.L. Firestone, 1997, Pain processing during three levels of noxious stimulation produces differential patterns of central activity, *Pain* 73, 431.
- Dere, E., B. Topic, M.A. De Souza Silva, M. Srejic, C. Frisch, T. Buddenberg et J.P. Huston, 2002, The graded anxiety test: a novel test of murine unconditioned anxiety based on the principles of the elevated plus-maze and light-dark test, *J Neurosci Methods* 122, 65.
- Deutch, A.Y., 1993, Prefrontal cortical dopamine systems and the elaboration of functional corticostriatal circuits: implications for schizophrenia and Parkinson's disease, *J Neural Transm Gen Sect* 91, 197.
- Deutch, A.Y., S.Y. Tam et R.H. Roth, 1985, Footshock and conditioned stress increase 3,4-dihydroxyphenylacetic acid (DOPAC) in the ventral tegmental area but not substantia nigra, *Brain Res* 333, 143.
- Doherty, M.D. et V.M. Pickel, 2000, Ultrastructural localization of the serotonin 2A receptor in dopaminergic neurons in the ventral tegmental area, *Brain Res* 864, 176.
- Duflo, F., D. Conklin, X. Li et J.C. Eisenach, 2003, Spinal adrenergic and cholinergic receptor interactions activated by clonidine in postincisional pain, *Anesthesiology* 98, 1237.

- Dursun, S.M. et S.L. Handley, 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-HT_{1A} receptor agonists in the mouse, *Br J Pharmacol* 109, 1046.
- Easton, A., J. Arbuzova et F.W. Turek, 2003, The circadian Clock mutation increases exploratory activity and escape-seeking behavior, *Genes Brain Behav* 2, 11.
- Eilam, D. et H. Szechtman, 1989, Biphasic effect of D-2 agonist quinpirole on locomotion and movements, *Eur J Pharmacol* 161, 151.
- Eisenach, J.C., S. DuPen, M. Dubois, R. Miguel et D. Allin, 1995, Epidural clonidine analgesia for intractable cancer pain. The Epidural Clonidine Study Group, *Pain* 61, 391.
- El-Ghundi, M., S.R. George, J. Drago, P.J. Fletcher, T. Fan, T. Nguyen, C. Liu, D.R. Sibley, H. Westphal et B.F. O'Dowd, 1998, Disruption of dopamine D1 receptor gene expression attenuates alcohol-seeking behavior, *Eur J Pharmacol* 353, 149.
- Escarabajal, M.D., C. Torres et C.F. Flaherty, 2003, The phenomenon of one-trial tolerance to the anxiolytic effect of chlordiazepoxide in the elevated plus-maze test is abolished by previous administration of chlordiazepoxide or buspirone, *Life Sci* 73, 1063.
- Espejo, E.F., 1997a, Effects of weekly or daily exposure to the elevated plus-maze in male mice, *Behav Brain Res* 87, 233.
- Espejo, E.F., 1997b, Selective dopamine depletion within the medial prefrontal cortex induces anxiogenic-like effects in rats placed on the elevated plus maze, *Brain Res* 762, 281.
- Fadda, F., A. Argiolas, M.R. Melis, A.H. Tissari, P.L. Onali et G.L. Gessa, 1978, Stress-induced increase in 3,4-dihydroxyphenylacetic acid (DOPAC) levels in the cerebral cortex and in n. accumbens: reversal by diazepam, *Life Sci* 23, 2219.
- Fallon, J.H. et R.Y. Moore, 1978, Catecholamine innervation of the basal forebrain. III. Olfactory bulb, anterior olfactory nuclei, olfactory tubercle and piriform cortex, *J Comp Neurol* 180, 533.
- Falter, U., A.J. Gower et J. Gobert, 1992, Resistance of baseline activity in the elevated plus-maze to exogenous influences, *Behav Pharmacol* 3, 123.
- Fardin, V., J.L. Oliveras et J.M. Besson, 1984, A reinvestigation of the analgesic effects induced by stimulation of the periaqueductal gray matter in the rat. I. The production of behavioral side effects together with analgesia, *Brain Res* 306, 105.
- Feenstra, M.G. et M.H. Botterblom, 1996, Rapid sampling of extracellular dopamine in the rat prefrontal cortex during food consumption, handling and exposure to novelty, *Brain Res* 742, 17.

- Feenstra, M.G., M.H. Botterblom et J.F. van Uum, 1995, Novelty-induced increase in dopamine release in the rat prefrontal cortex in vivo: inhibition by diazepam, *Neurosci Lett* 189, 81.
- Fendt, M., M. Koch et H.U. Schnitzler, 1994, Amygdaloid noradrenaline is involved in the sensitization of the acoustic startle response in rats, *Pharmacol Biochem Behav* 48, 307.
- Feng, J., X. Cai, J. Zhao et Z. Yan, 2001, Serotonin receptors modulate GABA(A) receptor channels through activation of anchored protein kinase C in prefrontal cortical neurons, *J Neurosci* 21, 6502.
- Fernandes, C. et S.E. File, 1996, The influence of open arm ledges and maze experience in the elevated plus-maze, *Pharmacol Biochem Behav* 54, 31.
- Ferre, S., R. Cortes et F. Artigas, 1994, Dopaminergic regulation of the serotonergic raphe-striatal pathway: microdialysis studies in freely moving rats, *J Neurosci* 14, 4839.
- Fibiger, H.C., 1995, Neurobiology of depression: focus on dopamine, *Adv Biochem Psychopharmacol* 49, 1.
- Fielding, S., T.C. Spaulding et H. Lal, 1981, Antinociceptive actions of clonidine, *Prog Clin Biol Res* 71, 225.
- File, S.E., 1990a, New strategies in the search for anxiolytics, *Drug Des Deliv* 5, 195.
- File, S.E., 1990b, One-trial tolerance to the anxiolytic effects of chlordiazepoxide in the plus-maze, *Psychopharmacology (Berl)* 100, 281.
- File, S.E., 1993, The interplay of learning and anxiety in the elevated plus-maze, *Behav Brain Res* 58, 199.
- File, S.E., 2001, Factors controlling measures of anxiety and responses to novelty in the mouse, *Behav Brain Res* 125, 151.
- File, S.E., N. Andrews, P.Y. Wu, A. Zharkovsky et H. Zangrossi, Jr., 1992, Modification of chlordiazepoxide's behavioural and neurochemical effects by handling and plus-maze experience, *Eur J Pharmacol* 218, 9.
- File, S.E., N. Andrews et A. Zharkovsky, 1990a, Handling habituation and chlordiazepoxide have different effects on GABA and 5-HT function in the frontal cortex and hippocampus, *Eur J Pharmacol* 190, 229.
- File, S.E., H.A. Baldwin et K. Aranko, 1987, Anxiogenic effects in benzodiazepine withdrawal are linked to the development of tolerance, *Brain Res Bull* 19, 607.
- File, S.E., S. Cheeta et P.J. Kenny, 2000, Neurobiological mechanisms by which nicotine mediates different types of anxiety, *Eur J Pharmacol* 393, 231.

- File, S.E., L.E. Gonzalez et N. Andrews, 1996, Comparative study of pre- and postsynaptic 5-HT_{1A} receptor modulation of anxiety in two ethological animal tests, *J Neurosci* 16, 4810.
- File, S.E., L.E. Gonzalez et N. Andrews, 1998a, Endogenous acetylcholine in the dorsal hippocampus reduces anxiety through actions on nicotinic and muscarinic₁ receptors, *Behav Neurosci* 112, 352.
- File, S.E., L.E. Gonzalez et R. Gallant, 1998b, Role of the basolateral nucleus of the amygdala in the formation of a phobia, *Neuropsychopharmacology* 19, 397.
- File, S.E., L.E. Gonzalez et R. Gallant, 1999, Role of the dorsomedial hypothalamus in mediating the response to benzodiazepines on trial 2 in the elevated plus-maze test of anxiety, *Neuropsychopharmacology* 21, 312.
- File, S.E. et P.K. Hitchcott, 1990, A theory of benzodiazepine dependence that can explain whether flumazenil will enhance or reverse the phenomena, *Psychopharmacology (Berl)* 101, 525.
- File, S.E., P.S. Mabbutt et P.K. Hitchcott, 1990b, Characterisation of the phenomenon of "one-trial tolerance" to the anxiolytic effect of chlordiazepoxide in the elevated plus-maze, *Psychopharmacology (Berl)* 102, 98.
- File, S.E. et H. Zangrossi, Jr., 1993, "One-trial tolerance" to the anxiolytic actions of benzodiazepines in the elevated plus-maze, or the development of a phobic state?, *Psychopharmacology (Berl)* 110, 240.
- File, S.E., H. Zangrossi, Jr., F.L. Sanders et P.S. Mabbutt, 1994, Raised corticosterone in the rat after exposure to the elevated plus-maze, *Psychopharmacology (Berl)* 113, 543.
- File, S.E., H. Zangrossi, Jr., M. Viana et F.G. Graeff, 1993, Trial 2 in the elevated plus-maze: a different form of fear?, *Psychopharmacology (Berl)* 111, 491.
- Flores, J.A., F. El Banoua, B. Galan-Rodriguez et E. Fernandez-Espejo, 2004, Opiate anti-nociception is attenuated following lesion of large dopamine neurons of the periaqueductal grey: critical role for D1 (not D2) dopamine receptors, *Pain* 110, 205.
- Fontana, D.J., D.M. Schefke et R.L. Commissaris, 1989, Acute versus chronic clonidine treatment effects on conflict behavior in the rat, *Behav Pharmacol* 1, 201.
- Forster, E.A., I.A. Cliffe, D.J. Bill, G.M. Dover, D. Jones, Y. Reilly et A. Fletcher, 1995, A pharmacological profile of the selective silent 5-HT_{1A} receptor antagonist, WAY-100635, *Eur J Pharmacol* 281, 81.

- Fraser, C.M., M.J. Cooke, A. Fisher, I.D. Thompson et T.W. Stone, 1996, Interactions between ifenprodil and dizocilpine on mouse behaviour in models of anxiety and working memory, *Eur Neuropsychopharmacol* 6, 311.
- Frick, K.M., L.A. Burlingame, J.A. Arters et J. Berger-Sweeney, 2000, Reference memory, anxiety and estrous cyclicity in C57BL/6NIA mice are affected by age and sex, *Neuroscience* 95, 293.
- Fritschy, J.M. et R. Grzanna, 1989, Immunohistochemical analysis of the neurotoxic effects of DSP-4 identifies two populations of noradrenergic axon terminals, *Neuroscience* 30, 181.
- Frussa-Filho, R., H. Barbosa-Junior, R.H. Silva, C. Da Cunha et C.F. Mello, 1999, Naltrexone potentiates the anxiolytic effects of chlordiazepoxide in rats exposed to novel environments, *Psychopharmacology (Berl)* 147, 168.
- Frussa-Filho, R. et A. Ribeiro Rde, 2002, One-trial tolerance to the effects of chlordiazepoxide in the elevated plus-maze is not due to acquisition of a phobic avoidance of open arms during initial exposure, *Life Sci* 71, 519.
- Fuchs, S.A. et A. Siegel, 1984, Neural pathways mediating hypothalamically elicited flight behavior in the cat, *Brain Res* 306, 263.
- Fuxe, K., M. Nystrom, M. Tovi, R. Smith et S.O. Ogren, 1974, Central catecholamine neurons, behavior and neuroleptic drugs: an analysis to understand the involvement of catecholamines in schizophrenia, *J Psychiatr Res* 11, 151.
- Galeotti, N., A. Bartolini et C. Ghelardini, 2004, Alpha-2 agonist-induced memory impairment is mediated by the alpha-2A-adrenoceptor subtype, *Behav Brain Res* 153, 409.
- Galeotti, N., C. Ghelardini et A. Bartolini, 2000, Role of 5-HT1A receptors in a mouse passive avoidance paradigm, *Jpn J Pharmacol* 84, 418.
- Gao, B. et M.G. Cutler, 1993, Effects of quinpirole on the behaviour shown by mice in the light-dark box and during social interactions, *Neuropharmacology* 32, 93.
- Gardner, E.L. et C.R. Ashby, Jr., 2000, Heterogeneity of the mesotelencephalic dopamine fibers: physiology and pharmacology, *Neurosci Biobehav Rev* 24, 115.
- Geller, I., 1964, Relative Potencies of Benzodiazepines as Measured by Their Effects on Conflict Behavior, *Arch Int Pharmacodyn Ther* 149, 243.
- Gendreau, P.L., J.L. Garipey, J.M. Petitto et M.H. Lewis, 1997, D1 dopamine receptor mediation of social and nonsocial emotional reactivity in mice: effects of housing and strain difference in motor activity, *Behav Neurosci* 111, 424.

- Gendreau, P.L., J.M. Petitto, J.L. Gariépy et M.H. Lewis, 1998, D2-like dopamine receptor mediation of social-emotional reactivity in a mouse model of anxiety: strain and experience effects, *Neuropsychopharmacology* 18, 210.
- Gerfen, C.R., K.A. Keefe et E.B. Gauda, 1995, D1 and D2 dopamine receptor function in the striatum: coactivation of D1- and D2-dopamine receptors on separate populations of neurons results in potentiated immediate early gene response in D1-containing neurons, *J Neurosci* 15, 8167.
- Gervais, J. et C. Rouillard, 2000, Dorsal raphe stimulation differentially modulates dopaminergic neurons in the ventral tegmental area and substantia nigra, *Synapse* 35, 281.
- Giros, B., P. Sokoloff, M.P. Martres, J.F. Riou, L.J. Emorine et J.C. Schwartz, 1989, Alternative splicing directs the expression of two D2 dopamine receptor isoforms, *Nature* 342, 923.
- Glaser, T. et J.M. De Vry, 1992, Neurobiology of 5-HT_{1A} receptors, dans: *Serotonin 1A receptors in Depression and Anxiety*, eds. S.M. Stahl, M. Gastpar, J.M. Keppel Hesselink and J. Traber (Raven Press, New York) p. 35.
- Gobert, A. et M.J. Millan, 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.
- Gonzalez, L.E., N. Andrews et S.E. File, 1996, 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* 732, 145.
- Gonzalez, L.E. et S.E. File, 1997, A five minute experience in the elevated plus-maze alters the state of the benzodiazepine receptor in the dorsal raphe nucleus, *J Neurosci* 17, 1505.
- Grace, A.A. et J.A. Rosenkranz, 2002, Regulation of conditioned responses of basolateral amygdala neurons, *Physiol Behav* 77, 489.
- Graeff, F.G., 2002, On serotonin and experimental anxiety, *Psychopharmacology (Berl)* 163, 467.
- Graeff, F.G., M.C. Silveira, R.L. Nogueira, E.A. Audi et R.M. Oliveira, 1993, Role of the amygdala and periaqueductal gray in anxiety and panic, *Behav Brain Res* 58, 123.
- Graeff, F.G., M.B. Viana et P.O. Mora, 1997, Dual role of 5-HT in defense and anxiety, *Neurosci Biobehav Rev* 21, 791.

- Greba, Q., A. Gifkins et L. Kokkinidis, 2001, Inhibition of amygdaloid dopamine D2 receptors impairs emotional learning measured with fear-potentiated startle, *Brain Res* 899, 218.
- Greba, Q. et L. Kokkinidis, 2000, Peripheral and intraamygdalar administration of the dopamine D1 receptor antagonist SCH 23390 blocks fear-potentiated startle but not shock reactivity or the shock sensitization of acoustic startle, *Behav Neurosci* 114, 262.
- Grenhoff, J. et T.H. Svensson, 1989, Clonidine modulates dopamine cell firing in rat ventral tegmental area, *Eur J Pharmacol* 165, 11.
- Griebel, G., 1995, 5-Hydroxytryptamine-interacting drugs in animal models of anxiety disorders: more than 30 years of research, *Pharmacol Ther* 65, 319.
- Griebel, G., C. Belzung, R. Misslin et E. Vogel, 1993, The free-exploratory paradigm: an effective method for measuring neophobic behaviour in mice and testing potential neophobia-reducing drugs, *Behav Pharmacol* 4, 637.
- Griebel, G., R.J. Rodgers, G. Perrault et D.J. Sanger, 2000, The effects of compounds varying in selectivity as 5-HT(1A) receptor antagonists in three rat models of anxiety, *Neuropharmacology* 39, 1848.
- Griebel, G., J. Simiand, R. Steinberg, M. Jung, D. Gully, P. Roger, M. Geslin, B. Scatton, J.P. Maffrand et P. Soubrie, 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.
- Griffiths, J.L. et T.A. Lovick, 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.
- Grillon, C., S.M. Southwick et D.S. Charney, 1996, The psychobiological basis of posttraumatic stress disorder, *Mol Psychiatry* 1, 278.
- Grisel, J.E., M. Fleshner, L.R. Watkins et S.F. Maier, 1993, Opioid and nonopioid interactions in two forms of stress-induced analgesia, *Pharmacol Biochem Behav* 45, 161.
- Guan, X.M. et W.J. McBride, 1989, Serotonin microinfusion into the ventral tegmental area increases accumbens dopamine release, *Brain Res Bull* 23, 541.

- Guarraci, F.A., R.J. Frohardt, W.A. Falls et B.S. Kapp, 2000, The effects of intra-amygdaloid infusions of a D2 dopamine receptor antagonist on Pavlovian fear conditioning, *Behav Neurosci* 114, 647.
- Guarraci, F.A., R.J. Frohardt et B.S. Kapp, 1999, Amygdaloid D1 dopamine receptor involvement in Pavlovian fear conditioning, *Brain Res* 827, 28.
- Haddjeri, N., P. Blier et C. de Montigny, 1996, Effect of the alpha-2 adrenoceptor antagonist mirtazapine on the 5-hydroxytryptamine system in the rat brain, *J Pharmacol Exp Ther* 277, 861.
- Haddjeri, N., C. de Montigny et P. Blier, 1997, Modulation of the firing activity of noradrenergic neurones in the rat locus coeruleus by the 5-hydroxytryptamine system, *Br J Pharmacol* 120, 865.
- Hagelberg, N., S.K. Jaaskelainen, I.K. Martikainen, H. Mansikka, H. Forssell, H. Scheinin, J. Hietala et A. Pertovaara, 2004, Striatal dopamine D2 receptors in modulation of pain in humans: a review, *Eur J Pharmacol* 500, 187.
- Hall, J., K.L. Thomas et B.J. Everitt, 2001, Fear memory retrieval induces CREB phosphorylation and Fos expression within the amygdala, *Eur J Neurosci* 13, 1453.
- Hall, M.D., S. el Mestikawy, M.B. Emerit, L. Pichat, M. Hamon et H. Gozlan, 1985, [³H]8-hydroxy-2-(di-n-propylamino)tetralin binding to pre- and postsynaptic 5-hydroxytryptamine sites in various regions of the rat brain, *J Neurochem* 44, 1685.
- Hamon, M., 1994, Neuropharmacology of anxiety: perspectives and prospects, *Trends Pharmacol Sci* 15, 36.
- Hamon, M., 1997, The main features of central 5-HT_{1A} receptors., dans: Serotonergic neurons and 5-HT receptors in the CNS, *Handbook of experimental pharmacology*, Vol. 129, eds. H.G. Baumgarten and M. Göthert (Springer, Berlin) p. 239.
- Handley, S.L. et J.W. McBlane, 1993, 5HT drugs in animal models of anxiety, *Psychopharmacology (Berl)* 112, 13.
- Handley, S.L. et S. Mithani, 1984, Effects of alpha-adrenoceptor agonists and antagonists in a maze-exploration model of 'fear'-motivated behaviour, *Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol* 327, 1.
- Harari, D., 2002, Intermediate care--where are we now?, *Clin Med* 2, 477.
- Harder, J.A., C.J. Maclean, J.T. Alder, P.T. Francis et R.M. Ridley, 1996, The 5-HT_{1A} antagonist, WAY 100635, ameliorates the cognitive impairment induced by fornix transection in the marmoset, *Psychopharmacology (Berl)* 127, 245.
- Harvey, J.A., 2003, Role of the serotonin 5-HT_{2A} receptor in learning, *Learn Mem* 10, 355.

- Hascoët, M. et M. Bourin, 1997, Anticonflict effect of alpidem as compared with the benzodiazepine alprazolam in rats, *Pharmacol Biochem Behav* 56, 317.
- Hascoët, M., M. Bourin, M.C. Colombel, A.J. Fiocco et G.B. Baker, 2000a, Anxiolytic-like effects of antidepressants after acute administration in a four-plate test in mice, *Pharmacol Biochem Behav* 65, 339.
- Hascoët, M., M. Bourin et A. Couetoux du Tertre, 1997, Influence of prior experience on mice behavior using the four-plate test, *Pharmacol Biochem Behav* 58, 1131.
- Hascoët, M., M. Bourin et B.A. Nic Dhonnchadha, 2000b, The influence of buspirone, and its metabolite 1-PP, on the activity of paroxetine in the mouse light/dark paradigm and four plates test, *Pharmacol Biochem Behav* 67, 45.
- Hayes, A.G., M. Skingle et M.B. Tyers, 1986, Antagonism of alpha-adrenoceptor agonist-induced antinociception in the rat, *Neuropharmacology* 25, 397.
- Hebb, A.L., R.M. Zacharko, M. Gauthier, F. Trudel, S. Laforest et G. Drolet, 2004, Brief exposure to predator odor and resultant anxiety enhances mesocorticolimbic activity and enkephalin expression in CD-1 mice, *Eur J Neurosci* 20, 2415.
- Hefco, V., K. Yamada, A. Hefco, L. Hritcu, A. Tiron et T. Nabeshima, 2003, Role of the mesotelencephalic dopamine system in learning and memory processes in the rat, *Eur J Pharmacol* 475, 55.
- Herve, D., V.M. Pickel, T.H. Joh et A. Beaudet, 1987, Serotonin axon terminals in the ventral tegmental area of the rat: fine structure and synaptic input to dopaminergic neurons, *Brain Res* 435, 71.
- Hjorth, S. et A. Carlsson, 1982, Buspirone: effects on central monoaminergic transmission--possible relevance to animal experimental and clinical findings, *Eur J Pharmacol* 83, 299.
- Hjorth, S. et A. Carlsson, 1988, In vivo receptor binding, neurochemical and functional studies with the dopamine D-1 receptor antagonist SCH 23390, *J Neural Transm* 72, 83.
- Hogg, S., N. Andrews et S.E. File, 1994, Contrasting behavioural effects of 8-OH DPAT in the dorsal raphe nucleus and ventral hippocampus, *Neuropharmacology* 33, 343.
- Hogg, S. et S.E. File, 1994, Responders and nonresponders to cat odor do not differ in other tests of anxiety, *Pharmacol Biochem Behav* 49, 219.
- Holmes, A., 2001, Targeted gene mutation approaches to the study of anxiety-like behavior in mice, *Neurosci Biobehav Rev* 25, 261.

- Holmes, A., T.R. Hollon, T.C. Gleason, Z. Liu, J. Dreiling, D.R. Sibley et J.N. Crawley, 2001, Behavioral characterization of dopamine D5 receptor null mutant mice, *Behav Neurosci* 115, 1129.
- Holmes, A., S. Parmigiani, P.F. Ferrari, P. Palanza et R.J. Rodgers, 2000, Behavioral profile of wild mice in the elevated plus-maze test for anxiety, *Physiol Behav* 71, 509.
- Holmes, A. et R.J. Rodgers, 1998, Responses of Swiss-Webster mice to repeated plus-maze experience: further evidence for a qualitative shift in emotional state?, *Pharmacol Biochem Behav* 60, 473.
- Holmes, A. et R.J. Rodgers, 1999, Influence of spatial and temporal manipulations on the anxiolytic efficacy of chlordiazepoxide in mice previously exposed to the elevated plus-maze, *Neurosci Biobehav Rev* 23, 971.
- Holmes, A. et R.J. Rodgers, 2003, Prior exposure to the elevated plus-maze sensitizes mice to the acute behavioral effects of fluoxetine and phenelzine, *Eur J Pharmacol* 459, 221.
- Howe, J.R., J.Y. Wang et T.L. Yaksh, 1983, Selective antagonism of the antinociceptive effect of intrathecally applied alpha adrenergic agonists by intrathecal prazosin and intrathecal yohimbine, *J Pharmacol Exp Ther* 224, 552.
- Hutson, P.H., G.S. Sarna, M.T. O'Connell et G. Curzon, 1989, Hippocampal 5-HT synthesis and release in vivo is decreased by infusion of 8-OHDPAT into the nucleus raphe dorsalis, *Neurosci Lett* 100, 276.
- Hyttel, J., 1994, Pharmacological characterization of selective serotonin reuptake inhibitors (SSRIs), *Int Clin Psychopharmacol* 9 Suppl 1, 19.
- Iadarola, M.J., K.F. Berman, T.A. Zeffiro, M.G. Byas-Smith, R.H. Gracely, M.B. Max et G.J. Bennett, 1998, Neural activation during acute capsaicin-evoked pain and allodynia assessed with PET, *Brain* 121 (Pt 5), 931.
- Imhof, J.T., Z.M. Coelho, M.L. Schmitt, G.S. Morato et A.P. Carobrez, 1993, Influence of gender and age on performance of rats in the elevated plus maze apparatus, *Behav Brain Res* 56, 177.
- Inoue, T., T. Izumi, Y. Maki, I. Muraki et T. Koyama, 2000, Effect of the dopamine D(1/5) antagonist SCH 23390 on the acquisition of conditioned fear, *Pharmacol Biochem Behav* 66, 573.
- Irwin, J., P. Ahluwalia, R.M. Zacharko et H. Anisman, 1986, Central norepinephrine and plasma corticosterone following acute and chronic stressors: influence of social isolation and handling, *Pharmacol Biochem Behav* 24, 1151.

- Izidio, G.S., D.M. Lopes, L. Spricigo, Jr. et A. Ramos, 2005a, Common variations in the pretest environment influence genotypic comparisons in models of anxiety, *Genes Brain Behav* 4, 412.
- Izidio, G.S., L. Spricigo, Jr. et A. Ramos, 2005b, Genetic differences in the elevated plus-maze persist after first exposure of inbred rats to the test apparatus, *Behav Processes* 68, 129.
- Jacob, J.J., E.C. Tremblay et M.C. Colombel, 1974, [Enhancement of nociceptive reactions by naloxone in mice and rats (author's transl)], *Psychopharmacologia* 37, 217.
- Jakab, R.L. et P.S. Goldman-Rakic, 1998, 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* 95, 735.
- Jeffs, S.A., J.E. Hall et S. Morris, 2002, Comparison of morphine alone with morphine plus clonidine for postoperative patient-controlled analgesia, *Br J Anaesth* 89, 424.
- Jimerson, D.C., B.E. Wolfe, E.D. Metzger, D.M. Finkelstein, T.B. Cooper et J.M. Levine, 1997, Decreased serotonin function in bulimia nervosa, *Arch Gen Psychiatry* 54, 529.
- Jolas, T., R. Schreiber, A.M. Laporte, M. Chastanet, J. De Vry, T. Glaser, J. Adrien et M. Hamon, 1995, 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* 272, 920.
- Jones, A.K., W.D. Brown, K.J. Friston, L.Y. Qi et R.S. Frackowiak, 1991, Cortical and subcortical localization of response to pain in man using positron emission tomography, *Proc R Soc Lond B Biol Sci* 244, 39.
- Jones, N. et S.M. King, 2001, Influence of circadian phase and test illumination on pre-clinical models of anxiety, *Physiol Behav* 72, 99.
- Kable, J.W., L.C. Murrin et D.B. Bylund, 2000, In vivo gene modification elucidates subtype-specific functions of alpha(2)-adrenergic receptors, *J Pharmacol Exp Ther* 293, 1.
- Kaesermann, H.P., 1986, Stretched attend posture, a non-social form of ambivalence, is sensitive to a conflict-reducing drug action, *Psychopharmacology (Berl)* 89, 31.
- Kamei, H., T. Kameyama et T. Nabeshima, 1995, Activation of both dopamine D₁ and D₂ receptors necessary for amelioration of conditioned fear stress, *Eur J Pharmacol* 273, 229.
- Kamei, J. et A. Saitoh, 1996, Involvement of dopamine D₂ receptor-mediated functions in the modulation of morphine-induced antinociception in diabetic mouse, *Neuropharmacology* 35, 273.

- Kamei, Y., J. Urata, M. Uchiyaya, T. Hayakawa, S. Ozaki, K. Shibui et M. Okawa, 1998, Clinical characteristics of circadian rhythm sleep disorders, *Psychiatry Clin Neurosci* 52, 234.
- Karper, P.E., A. Nazarian, C.A. Crawford, J. Drago et S.A. McDougall, 2000, Role of dopamine D(1) receptors for kappa-opioid-mediated locomotor activity and antinociception during the preweanling period: a study using D(1) receptor knockout mice, *Physiol Behav* 68, 585.
- Kelliher, P., T.J. Connor, A. Harkin, C. Sanchez, J.P. Kelly et B.E. Leonard, 2000, Varying responses to the rat forced-swim test under diurnal and nocturnal conditions, *Physiol Behav* 69, 531.
- Kellogg, C.K., R.J. Primus et D. Bitran, 1991, Sexually dimorphic influence of prenatal exposure to diazepam on behavioral responses to environmental challenge and on gamma-aminobutyric acid (GABA)-stimulated chloride uptake in the brain, *J Pharmacol Exp Ther* 256, 259.
- Kennett, G.A., F. Bright, B. Trail, G.S. Baxter et T.P. Blackburn, 1996, Effects of the 5-HT_{2B} receptor agonist, BW 723C86, on three rat models of anxiety, *Br J Pharmacol* 117, 1443.
- Kenny, P.J., S. Cheeta et S.E. File, 2000, Anxiogenic effects of nicotine in the dorsal hippocampus are mediated by 5-HT_{1A} and not by muscarinic M1 receptors, *Neuropharmacology* 39, 300.
- Killcross, S., T.W. Robbins et B.J. Everitt, 1997, Different types of fear-conditioned behaviour mediated by separate nuclei within amygdala, *Nature* 388, 377.
- Kilpatrick, L. et L. Cahill, 2003, Amygdala modulation of parahippocampal and frontal regions during emotionally influenced memory storage, *Neuroimage* 20, 2091.
- Koek, W., B. Vacher, C. Cosi, M.B. Assie, J.F. Patoiseau, P.J. Pauwels et F.C. Colpaert, 2001, 5-HT_{1A} receptor activation and antidepressant-like effects: F 13714 has high efficacy and marked antidepressant potential, *Eur J Pharmacol* 420, 103.
- Koeltzow, T.E., J.D. Austin et P. Vezina, 2003, Behavioral sensitization to quinpirole is not associated with increased nucleus accumbens dopamine overflow, *Neuropharmacology* 44, 102.
- Konstandi, M., E. Johnson, M.A. Lang, M. Malamas et M. Marselos, 2000, Noradrenaline, dopamine, serotonin: different effects of psychological stress on brain biogenic amines in mice and rats, *Pharmacol Res* 41, 341.

- Kreiss, D.S. et I. Lucki, 1995, Effects of acute and repeated administration of antidepressant drugs on extracellular levels of 5-hydroxytryptamine measured in vivo, *J Pharmacol Exp Ther* 274, 866.
- Kulka, P.J., 1996, [Alpha 2-adrenoceptor agonists for the treatment of chronic pain], *Schmerz* 10, 65.
- Kuraishi, Y., Y. Harada, S. Aratani, M. Satoh et H. Takagi, 1983, Separate involvement of the spinal noradrenergic and serotonergic systems in morphine analgesia: the differences in mechanical and thermal algesic tests, *Brain Res* 273, 245.
- Labar, K.S., C.A. Cook, D.C. Torpey et K.A. Welsh-Bohmer, 2004, Impact of healthy aging on awareness and fear conditioning, *Behav Neurosci* 118, 905.
- Lamont, E.W. et L. Kokkinidis, 1998, Infusion of the dopamine D1 receptor antagonist SCH 23390 into the amygdala blocks fear expression in a potentiated startle paradigm, *Brain Res* 795, 128.
- Lamprea, M.R., F.P. Cardenas, R. Silveira, S. Morato et T.J. Walsh, 2000, Dissociation of memory and anxiety in a repeated elevated plus maze paradigm: forebrain cholinergic mechanisms, *Behav Brain Res* 117, 97.
- Lapin, I.P., 1995, Only controls: effect of handling, sham injection, and intraperitoneal injection of saline on behavior of mice in an elevated plus-maze, *J Pharmacol Toxicol Methods* 34, 73.
- Le Moal, M. et H. Simon, 1991, Mesocorticolimbic dopaminergic network: functional and regulatory roles, *Physiol Rev* 71, 155.
- Lecci, A., F. Borsini, G. Volterra et A. Meli, 1990, Pharmacological validation of a novel animal model of anticipatory anxiety in mice, *Psychopharmacology (Berl)* 101, 255.
- LeDoux, J.E., 2000, Emotion circuits in the brain, *Annu Rev Neurosci* 23, 155.
- LeDoux, J.E., J. Iwata, P. Cicchetti et D.J. Reis, 1988, Different projections of the central amygdaloid nucleus mediate autonomic and behavioral correlates of conditioned fear, *J Neurosci* 8, 2517.
- Lee, C. et R.J. Rodgers, 1990, Antinociceptive effects of elevated plus-maze exposure: influence of opiate receptor manipulations, *Psychopharmacology (Berl)* 102, 507.
- Lejeune, F. et M.J. Millan, 1998, Induction of burst firing in ventral tegmental area dopaminergic neurons by activation of serotonin (5-HT)_{1A} receptors: WAY 100,635-reversible actions of the highly selective ligands, flesinoxan and S 15535, *Synapse* 30, 172.

- Lesch, K.P., Y. Zeng, A. Reif et L. Gutknecht, 2003, Anxiety-related traits in mice with modified genes of the serotonergic pathway, *Eur J Pharmacol* 480, 185.
- Leszczuk, M.H. et C.F. Flaherty, 2000, Interaction between the anxiolytic effect of morphine and chlordiazepoxide in the elevated plus-maze., in: *Society for Neuroscience Abstracts*.
- Liang, K.C., 1999, Pre- or post-training injection of buspirone impaired retention in the inhibitory avoidance task: involvement of amygdala 5-HT_{1A} receptors, *Eur J Neurosci* 11, 1491.
- Lin, M.T., J.J. Wu, A. Chandra et B.L. Tsay, 1981, Activation of striatal dopamine receptors induces pain inhibition in rats, *J Neural Transm* 51, 213.
- Lista, A., P. Blier et C. de Montigny, 1990, Benzodiazepine receptors modulate 5-hydroxytryptamine neurotransmission in the rat hippocampus: in vivo electrophysiological evidence, *J Pharmacol Exp Ther* 254, 318.
- Lister, R.G., 1987, The use of a plus-maze to measure anxiety in the mouse, *Psychopharmacology (Berl)* 92, 180.
- Lokhandwala, M.F. et M.L. Steenberg, 1984, Evaluation of the effects of SKF 82526 and LY 171555 on presynaptic (DA₂) and postsynaptic (DA₁) dopamine receptors in rat kidney, *J Auton Pharmacol* 4, 273.
- Lopez-Rubalcava, C., 1996, Pre- or postsynaptic activity of 5-HT_{1A} compounds in mice depends on the anxiety paradigm, *Pharmacol Biochem Behav* 54, 677.
- Lopez-Rubalcava, C. et A. Fernandez-Guasti, 1994, Noradrenaline-serotonin interactions in the anxiolytic effects of 5-HT_{1A} agonists, *Behav Pharmacol* 5, 42.
- Lu, J.Q. et H. Nagayama, 1996, Circadian rhythm in the response of central 5-HT_{1A} receptors to 8-OH-DPAT in rats, *Psychopharmacology (Berl)* 123, 42.
- Lu, J.Q. et H. Nagayama, 1997, Circadian rhythm in the function of central 5-HT_{1A} receptors is endogenous in nature, *Cell Mol Life Sci* 53, 224.
- Lucas, G. et U. Spampinato, 2000, Role of striatal serotonin_{2A} and serotonin_{2C} receptor subtypes in the control of in vivo dopamine outflow in the rat striatum, *J Neurochem* 74, 693.
- Magnusson, J.E. et K. Fisher, 2000, The involvement of dopamine in nociception: the role of D(1) and D(2) receptors in the dorsolateral striatum, *Brain Res* 855, 260.
- Malinge, M., M.C. Colombel et M. Bourin, 1989, [Mechanism of action of clonidine in the forced-swimming test in mice], *Encephale* 15, 37.

- Manuel-Apolinar, L. et A. Meneses, 2004, 8-OH-DPAT facilitated memory consolidation and increased hippocampal and cortical cAMP production, *Behav Brain Res* 148, 179.
- Marino, M.D., B.N. Bourdelat-Parks, L. Cameron Liles et D. Weinschenker, 2005, Genetic reduction of noradrenergic function alters social memory and reduces aggression in mice, *Behav Brain Res* 161, 197.
- Markowska, A.L., E.L. Spangler et D.K. Ingram, 1998, Behavioral assessment of the senescence-accelerated mouse (SAM P8 and R1), *Physiol Behav* 64, 15.
- Martijena, I.D., N. Calvo, M. Volosin et V.A. Molina, 1997, Prior exposure to a brief restraint session facilitates the occurrence of fear in response to a conflict situation: behavioral and neurochemical correlates, *Brain Res* 752, 136.
- Martin-Ruiz, R., L. Ugedo, M.A. Honrubia, G. Mengod et F. Artigas, 2001, Control of serotonergic neurons in rat brain by dopaminergic receptors outside the dorsal raphe nucleus, *J Neurochem* 77, 762.
- Masse, F., M. Hascoët et M. Bourin, 2005, alpha2-adrenergic agonists antagonise the anxiolytic-like effect of antidepressants in the four-plate test in mice, *Behav Brain Res* 164, 17.
- Masse, F., M. Hascoët, E. Dailly et M. Bourin, 2006, Effect of noradrenergic ligands on the anxiolytic-like effect of DOI (5-HT2A/2C agonist) in the Four-plate test, *Psychopharmacology (Berl)* 183, 471.
- Matsuda, T., P. Somboonthum, M. Suzuki, S. Asano et A. Baba, 1995, Antidepressant-like effect by postsynaptic 5-HT1A receptor activation in mice, *Eur J Pharmacol* 280, 235.
- Matsumoto, K., M. Mizowaki, T. Suchitra, Y. Murakami, H. Takayama, S. Sakai, N. Aimi et H. Watanabe, 1996, Central antinociceptive effects of mitragynine in mice: contribution of descending noradrenergic and serotonergic systems, *Eur J Pharmacol* 317, 75.
- Matsumoto, K., M. Mizowaki, S. Thongpraditchote, Y. Murakami et H. Watanabe, 1997, alpha2-Adrenoceptor antagonists reverse the 5-HT2 receptor antagonist suppression of head-twitch behavior in mice, *Pharmacol Biochem Behav* 56, 417.
- McGregor, I.S. et R.A. Dielenberg, 1999, Differential anxiolytic efficacy of a benzodiazepine on first versus second exposure to a predatory odor in rats, *Psychopharmacology (Berl)* 147, 174.
- McKinney, W.T., 1984, Animal models of depression: an overview, *Psychiatr Dev* 2, 77.

- McMillen, B.A., R.T. Matthews, M.K. Sanghera, P.D. Shepard et D.C. German, 1983, Dopamine receptor antagonism by the novel antianxiety drug, buspirone, *J Neurosci* 3, 733.
- McNaughton, N., 2004, The conceptual nervous system of J.A. Gray: anxiety and neuroticism, *Neurosci Biobehav Rev* 28, 227.
- Mendlin, A., F.J. Martin et B.L. Jacobs, 1998, Involvement of dopamine D2 receptors in apomorphine-induced facilitation of forebrain serotonin output, *Eur J Pharmacol* 351, 291.
- Meneses, A., 2002, Involvement of 5-HT(2A/2B/2C) receptors on memory formation: simple agonism, antagonism, or inverse agonism?, *Cell Mol Neurobiol* 22, 675.
- Michael-Titus, A., R. Boussemame et J. Costentin, 1990, Stimulation of dopamine D2 receptors induces an analgesia involving an opioidergic but non enkephalinergic link, *Eur J Pharmacol* 187, 201.
- Micheau, J. et B. Van Marrewijk, 1999, Stimulation of 5-HT1A receptors by systemic or medial septum injection induces anxiogenic-like effects and facilitates acquisition of a spatial discrimination task in mice, *Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry* 23, 1113.
- Milani, H. et F.G. Graeff, 1987, GABA-benzodiazepine modulation of aversion in the medial hypothalamus of the rat, *Pharmacol Biochem Behav* 28, 21.
- Millan, M.J., 2002, Descending control of pain, *Prog Neurobiol* 66, 355.
- Millan, M.J., 2003, The neurobiology and control of anxious states, *Prog Neurobiol* 70, 83.
- Millan, M.J., F. Lejeune, A. Gobert, M. Brocco, A. Auclair, C. Bosc, J.M. Rivet, J.M. Lacoste, A. Cordi et A. Dekeyne, 2000, 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* 295, 1206.
- Mizuki, Y., M. Suetsugi, I. Ushijima et M. Yamada, 1997, Differential effects of dopaminergic drugs on anxiety and arousal in healthy volunteers with high and low anxiety, *Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry* 21, 573.
- Molewijk, H.E., A.M. van der Poel et B. Olivier, 1995, The ambivalent behaviour "stretched approach posture" in the rat as a paradigm to characterize anxiolytic drugs, *Psychopharmacology (Berl)* 121, 81.
- Moller, C., O. Bing et M. Heilig, 1994, c-fos expression in the amygdala: in vivo antisense modulation and role in anxiety, *Cell Mol Neurobiol* 14, 415.

- Morien, A., V.M. Cassone et P.J. Wellman, 1999, Diurnal changes in paraventricular hypothalamic alpha1 and alpha2-adrenoceptors and food intake in rats, *Pharmacol Biochem Behav* 63, 33.
- Moser, P.C., 1989, An evaluation of the elevated plus-maze test using the novel anxiolytic buspirone, *Psychopharmacology (Berl)* 99, 48.
- Moukhles, H., O. Bosler, J.P. Bolam, A. Vallee, D. Umbriaco, M. Geffard et G. Doucet, 1997, Quantitative and morphometric data indicate precise cellular interactions between serotonin terminals and postsynaptic targets in rat substantia nigra, *Neuroscience* 76, 1159.
- Munro, L.J. et L. Kokkinidis, 1997, Infusion of quinpirole and muscimol into the ventral tegmental area inhibits fear-potentiated startle: implications for the role of dopamine in fear expression, *Brain Res* 746, 231.
- Nagayama, H. et J.Q. Lu, 1998, Circadian and circannual rhythms in the function of central 5-HT1A receptors in laboratory rats, *Psychopharmacology (Berl)* 135, 279.
- Nakamura, M. et S.H. Ferreira, 1988, Peripheral analgesic action of clonidine: mediation by release of endogenous enkephalin-like substances, *Eur J Pharmacol* 146, 223.
- Ng, G.Y., B.F. O'Dowd et S.R. George, 1994, Genotypic differences in brain dopamine receptor function in the DBA/2J and C57BL/6J inbred mouse strains, *Eur J Pharmacol* 269, 349.
- Nguyen, T.T., K. Matsumoto et H. Watanabe, 1997, Involvement of supraspinal GABA-ergic systems in clonidine-induced antinociception in the tail-pinch test in mice, *Life Sci* 61, 1097.
- Nic Dhonnchadha, B.A., M. Bourin et M. Hascoët, 2003a, Anxiolytic-like effects of 5-HT2 ligands on three mouse models of anxiety, *Behav Brain Res* 140, 203.
- Nic Dhonnchadha, B.A., M. Hascoët, P. Jolliet et M. Bourin, 2003b, Evidence for a 5-HT2A receptor mode of action in the anxiolytic-like properties of DOI in mice, *Behav Brain Res* 147, 175.
- Nic Dhonnchadha, B.A., N. Ripoll, F. Clenet, M. Hascoët et M. Bourin, 2005, Implication of 5-HT(2) receptor subtypes in the mechanism of action of antidepressants in the four plates test, *Psychopharmacology (Berl)* 179, 418.
- Nico, P.B., F. de-Paris, E.R. Vinade, O.B. Amaral, I. Rockenbach, B.L. Soares, R. Guarnieri, L. Wichert-Ana, F. Calvo, R. Walz, I. Izquierdo, A.C. Sakamoto, R. Brentani, V.R. Martins et M.M. Bianchin, 2005, Altered behavioural response to acute stress in mice lacking cellular prion protein, *Behav Brain Res* 162, 173.

- Nocjar, C., B.L. Roth et E.A. Pehek, 2002, Localization of 5-HT(2A) receptors on dopamine cells in subnuclei of the midbrain A10 cell group, *Neuroscience* 111, 163.
- Nogueira, R.L. et F.G. Graeff, 1995, Role of 5-HT receptor subtypes in the modulation of dorsal periaqueductal gray generated aversion, *Pharmacol Biochem Behav* 52, 1.
- Numazawa, R., M. Yoshioka, M. Matsumoto, H. Togashi, O. Kemmotsu et H. Saito, 1995, Pharmacological characterization of alpha 2-adrenoceptor regulated serotonin release in the rat hippocampus, *Neurosci Lett* 192, 161.
- Nunes-de-Souza, R.L., A. Canto-de-Souza et R.J. Rodgers, 2002, Effects of intra-hippocampal infusion of WAY-100635 on plus-maze behavior in mice. Influence of site of injection and prior test experience, *Brain Res* 927, 87.
- Nuti, A., R. Ceravolo, A. Piccinni, G. Dell'Agnello, G. Bellini, G. Gambaccini, C. Rossi, C. Logi, L. Dell'Osso et U. Bonuccelli, 2004, Psychiatric comorbidity in a population of Parkinson's disease patients, *Eur J Neurol* 11, 315.
- Nutt, D.J., P. Glue, C. Lawson et S. Wilson, 1990, Flumazenil provocation of panic attacks. Evidence for altered benzodiazepine receptor sensitivity in panic disorder, *Arch Gen Psychiatry* 47, 917.
- Nutt, D.J. et A.L. Malizia, 2001, New insights into the role of the GABA(A)-benzodiazepine receptor in psychiatric disorder, *Br J Psychiatry* 179, 390.
- Oades, R.D. et G.M. Halliday, 1987, Ventral tegmental (A10) system: neurobiology. 1. Anatomy and connectivity, *Brain Res* 434, 117.
- Olijslagers, J.E., T.R. Werkman, A.C. McCreary, R. Siarey, C.G. Kruse et W.J. Wadman, 2004, 5-HT2 receptors differentially modulate dopamine-mediated auto-inhibition in A9 and A10 midbrain areas of the rat, *Neuropharmacology* 46, 504.
- Ouagazzal, A.M., P.J. Kenny et S.E. File, 1999, Modulation of behaviour on trials 1 and 2 in the elevated plus-maze test of anxiety after systemic and hippocampal administration of nicotine, *Psychopharmacology (Berl)* 144, 54.
- Overstreet, D.H., R.C. Commissaris, R. De La Garza, 2nd, S.E. File, D.J. Knapp et L.S. Seiden, 2003, Involvement of 5-HT1A receptors in animal tests of anxiety and depression: evidence from genetic models, *Stress* 6, 101.
- Pache, D.M., S. Fernandez-Perez et R.D. Sewell, 2003, Buspirone differentially modifies short-term memory function in a combined delayed matching/non-matching to position task, *Eur J Pharmacol* 477, 205.

- Packard, M.G. et J.L. McGaugh, 1996, Inactivation of hippocampus or caudate nucleus with lidocaine differentially affects expression of place and response learning, *Neurobiol Learn Mem* 65, 65.
- Pan, S.Y. et Y.F. Han, 2000, Learning deficits induced by 4 belladonna alkaloids are preferentially attenuated by tacrine, *Acta Pharmacol Sin* 21, 124.
- Pandossio, J.E., V.A. Molina et M.L. Brandao, 2000, Prior electrical stimulation of the inferior colliculus sensitizes rats to the stress of the elevated plus-maze test, *Behav Brain Res* 109, 19.
- Parent, M.B. et M.G. Baxter, 2004, Septohippocampal acetylcholine: involved in but not necessary for learning and memory?, *Learn Mem* 11, 9.
- Parks, C.L., P.S. Robinson, E. Sibille, T. Shenk et M. Toth, 1998, Increased anxiety of mice lacking the serotonin1A receptor, *Proc Natl Acad Sci U S A* 95, 10734.
- Pazos, A. et J.M. Palacios, 1985, Quantitative autoradiographic mapping of serotonin receptors in the rat brain. I. Serotonin-1 receptors, *Brain Res* 346, 205.
- Pehek, E.A., H.G. McFarlane, K. Maguschak, B. Price et C.P. Pluto, 2001, M100,907, a selective 5-HT(2A) antagonist, attenuates dopamine release in the rat medial prefrontal cortex, *Brain Res* 888, 51.
- Pehek, E.A., C. Nocjar, B.L. Roth, T.A. Byrd et O.S. Mabrouk, 2005, Evidence for the Preferential Involvement of 5-HT2A Serotonin Receptors in Stress- and Drug-Induced Dopamine Release in the Rat Medial Prefrontal Cortex, *Neuropsychopharmacology*.
- Pellow, S., P. Chopin, S.E. File et M. Briley, 1985, Validation of open:closed arm entries in an elevated plus-maze as a measure of anxiety in the rat, *J Neurosci Methods* 14, 149.
- Peng, W.H., C.R. Wu, C.S. Chen, C.F. Chen, Z.C. Leu et M.T. Hsieh, 2004, Anxiolytic effect of berberine on exploratory activity of the mouse in two experimental anxiety models: interaction with drugs acting at 5-HT receptors, *Life Sci* 75, 2451.
- Pereira, J.K., R.J. Vieira, C.T. Konishi, R.A. Ribeiro et R. Frussa-Filho, 1999, The phenomenon of "one-trial tolerance" to the anxiolytic effect of chlordiazepoxide in the elevated plus-maze is abolished by the introduction of a motivational conflict situation, *Life Sci* 65, PL101.
- Pereira, L.O., I.C. da Cunha, J.M. Neto, M.A. Paschoalini et M.S. Faria, 2005, The gradient of luminosity between open/enclosed arms, and not the absolute level of Lux, predicts the behaviour of rats in the plus maze, *Behav Brain Res* 159, 55.
- Pessia, M., Z.G. Jiang, R.A. North et S.W. Johnson, 1994, Actions of 5-hydroxytryptamine on ventral tegmental area neurons of the rat in vitro, *Brain Res* 654, 324.

- Pezze, M.A. et J. Feldon, 2004, Mesolimbic dopaminergic pathways in fear conditioning, *Prog Neurobiol* 74, 301.
- Pich, E.M. et R. Samanin, 1986, Disinhibitory effects of buspirone and low doses of sulpiride and haloperidol in two experimental anxiety models in rats: possible role of dopamine, *Psychopharmacology (Berl)* 89, 125.
- Pierce, P.A. et S.J. Peroutka, 1989, Hallucinogenic drug interactions with neurotransmitter receptor binding sites in human cortex, *Psychopharmacology (Berl)* 97, 118.
- Pineyro, G. et P. Blier, 1999, Autoregulation of serotonin neurons: role in antidepressant drug action, *Pharmacol Rev* 51, 533.
- Pitchot, W., M. Anseau, A. Gonzalez Moreno, M. Hansenne et R. von Frenckell, 1992, Dopaminergic function in panic disorder: comparison with major and minor depression, *Biol Psychiatry* 32, 1004.
- Pitsikas, N., S. Tsitsirigou, S. Zisopoulou et N. Sakellaridis, 2005, The 5-HT_{1A} receptor and recognition memory. Possible modulation of its behavioral effects by the nitregeric system, *Behav Brain Res* 159, 287.
- Pollack, A., 2004, Coactivation of D1 and D2 dopamine receptors: in marriage, a case of his, hers, and theirs, *Sci STKE* 2004, pe50.
- Pompeiano, M., J.M. Palacios et G. Mengod, 1992, Distribution and cellular localization of mRNA coding for 5-HT_{1A} receptor in the rat brain: correlation with receptor binding, *J Neurosci* 12, 440.
- Popova, N.K., D.F. Avgustinovich, A. Skrinskaia Iu et E.M. Nikulina, 1996, [The genotypic correlations of the expression of anxiety and dopamine metabolism in the mouse brain], *Zh Vyssh Nerv Deiat Im I P Pavlova* 46, 904.
- Porsolt, R.D., 1989, Modèles animaux des maladies mentales : apport de la psychopharmacologie, dans: *Confrontations psychiatriques* (Editions médicales, p. 151.
- Porter, R.H., K.R. Benwell, H. Lamb, C.S. Malcolm, N.H. Allen, D.F. Revell, D.R. Adams et M.J. Sheardown, 1999, 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* 128, 13.
- Prado-Alcala, R.A., R. Solana-Figueroa, L.E. Galindo, A.C. Medina et G.L. Quirarte, 2003, Blockade of striatal 5-HT₂ receptors produces retrograde amnesia in rats, *Life Sci* 74, 481.
- Proudfit, H.K., 1988, Pharmacologic evidence for the modulation of nociception by noradrenergic neurons, *Prog Brain Res* 77, 357.

- Puglisi-Allegra, S. et S. Cabib, 1988, Pharmacological evidence for a role of D2 dopamine receptors in the defensive behavior of the mouse, *Behav Neural Biol* 50, 98.
- Puglisi-Allegra, S., E. Kempf, C. Schleeff et S. Cabib, 1991, Repeated stressful experiences differently affect brain dopamine receptor subtypes, *Life Sci* 48, 1263.
- Rahman, S. et W.J. McBride, 2000, Feedback control of mesolimbic somatodendritic dopamine release in rat brain, *J Neurochem* 74, 684.
- Ramos, A., O. Berton, P. Mormede et F. Chaouloff, 1997, A multiple-test study of anxiety-related behaviours in six inbred rat strains, *Behav Brain Res* 85, 57.
- Ramos, A., A.L. Kangerki, P.F. Basso, J.E. Da Silva Santos, J. Assreuy, L.F. Vendruscolo et R.N. Takahashi, 2002, Evaluation of Lewis and SHR rat strains as a genetic model for the study of anxiety and pain, *Behav Brain Res* 129, 113.
- Ramos, A., Y. Mellerin, P. Mormede et F. Chaouloff, 1998, A genetic and multifactorial analysis of anxiety-related behaviours in Lewis and SHR intercrosses, *Behav Brain Res* 96, 195.
- Ramos, C., R. Leite-Panissi, R. Monassi et L. Menescal-De-Oliveira, 1999, Role of the amygdaloid nuclei in the modulation of tonic immobility in guinea pigs, *Physiol Behav* 67, 717.
- Ravard, S., P. Carnoy, D. Herve, J.P. Tassin, M.H. Thiébot et P. Soubrié, 1990, Involvement of prefrontal dopamine neurones in behavioural blockade induced by controllable vs uncontrollable negative events in rats, *Behav Brain Res* 37, 9.
- Redrobe, J.P., M. Bourin, M.C. Colombel et G.B. Baker, 1998, Dose-dependent noradrenergic and serotonergic properties of venlafaxine in animal models indicative of antidepressant activity, *Psychopharmacology (Berl)* 138, 1.
- Reis, F.L., S. Masson, A.R. de Oliveira et M.L. Brandao, 2004, Dopaminergic mechanisms in the conditioned and unconditioned fear as assessed by the two-way avoidance and light switch-off tests, *Pharmacol Biochem Behav* 79, 359.
- Remy, S.M., R. Schreiber, M. Dalmus et J. De Vry, 1996, Somatodendritic 5-HT_{1A} receptors are critically involved in the anxiolytic effects of 8-OH-DPAT, *Psychopharmacology (Berl)* 125, 89.
- Renard, C.E., A.J. Fiocco, F. Clenet, M. Hascoët et M. Bourin, 2001, Is dopamine implicated in the antidepressant-like effects of selective serotonin reuptake inhibitors in the mouse forced swimming test?, *Psychopharmacology (Berl)* 159, 42.
- Rinaldi-Carmona, M., C. Congy, V. Santucci, J. Simiand, B. Gautret, G. Neliat, B. Labeuw, G. Le Fur, P. Soubrie et J.C. Breliere, 1992, Biochemical and pharmacological

- properties of SR 46349B, a new potent and selective 5-hydroxytryptamine₂ receptor antagonist, *J Pharmacol Exp Ther* 262, 759.
- Rodgers, R.J., E. Boullier, P. Chatzimichalaki, G.D. Cooper et A. Shorten, 2002, Contrasting phenotypes of C57BL/6JOLA_{Hsd}, 129S2/Sv_{Hsd} and 129/SvEv mice in two exploration-based tests of anxiety-related behaviour, *Physiol Behav* 77, 301.
- Rodgers, R.J., B.J. Cao, A. Dalvi et A. Holmes, 1997a, Animal models of anxiety: an ethological perspective, *Braz J Med Biol Res* 30, 289.
- Rodgers, R.J. et J.C. Cole, 1993a, Anxiety enhancement in the murine elevated plus maze by immediate prior exposure to social stressors, *Physiol Behav* 53, 383.
- Rodgers, R.J. et J.C. Cole, 1993b, Influence of social isolation, gender, strain, and prior novelty on plus-maze behaviour in mice, *Physiol Behav* 54, 729.
- Rodgers, R.J. et J.C. Cole, 1994, Anxiolytic-like effect of (S)-WAY 100135, a 5-HT_{1A} receptor antagonist, in the murine elevated plus-maze test, *Eur J Pharmacol* 261, 321.
- Rodgers, R.J., J. Haller, J. Halasz et E. Mikics, 2003, 'One-trial sensitization' to the anxiolytic-like effects of cannabinoid receptor antagonist SR141716A in the mouse elevated plus-maze, *Eur J Neurosci* 17, 1279.
- Rodgers, R.J., J. Haller, A. Holmes, J. Halasz, T.J. Walton et P.F. Brain, 1999, Corticosterone response to the plus-maze: high correlation with risk assessment in rats and mice, *Physiol Behav* 68, 47.
- Rodgers, R.J. et N.J. Johnson, 1995, Factor analysis of spatiotemporal and ethological measures in the murine elevated plus-maze test of anxiety, *Pharmacol Biochem Behav* 52, 297.
- Rodgers, R.J., N.J. Johnson, J. Carr et T.P. Hodgson, 1997b, Resistance of experientially-induced changes in murine plus-maze behaviour to altered retest conditions, *Behav Brain Res* 86, 71.
- Rodgers, R.J., N.J. Johnson, J.C. Cole, C.V. Dewar, G.R. Kidd et P.H. Kimpson, 1996, Plus-maze retest profile in mice: importance of initial stages of trail 1 and response to post-trail cholinergic receptor blockade, *Pharmacol Biochem Behav* 54, 41.
- Rodgers, R.J., C. Lee et J.K. Shepherd, 1992, Effects of diazepam on behavioural and antinociceptive responses to the elevated plus-maze in male mice depend upon treatment regimen and prior maze experience, *Psychopharmacology (Berl)* 106, 102.
- Rodgers, R.J., E.M. Nikulina et J.C. Cole, 1994, Dopamine D₁ and D₂ receptor ligands modulate the behaviour of mice in the elevated plus-maze, *Pharmacol Biochem Behav* 49, 985.

- Rodgers, R.J. et J.K. Shepherd, 1993, Influence of prior maze experience on behaviour and response to diazepam in the elevated plus-maze and light/dark tests of anxiety in mice, *Psychopharmacology (Berl)* 113, 237.
- Rollema, H., Y. Lu, A.W. Schmidt, J.S. Sprouse et S.H. Zorn, 2000, 5-HT(1A) receptor activation contributes to ziprasidone-induced dopamine release in the rat prefrontal cortex, *Biol Psychiatry* 48, 229.
- Rooney, K.F. et R.D. Sewell, 1989, Evaluation of selective actions of dopamine D-1 and D-2 receptor agonists and antagonists on opioid antinociception, *Eur J Pharmacol* 168, 329.
- Rosa, V.P., N. Vandresen, A.V. Calixto, D.F. Kovaleski et M.S. Faria, 2000, Temporal analysis of the rat's behavior in the plus-maze: effect of midazolam, *Pharmacol Biochem Behav* 67, 177.
- Roy-Byrne, P.P., T.W. Uhde, D.A. Sack, M. Linnoila et R.M. Post, 1986, Plasma HVA and anxiety in patients with panic disorder, *Biol Psychiatry* 21, 849.
- Salamone, J.D., 1994, The involvement of nucleus accumbens dopamine in appetitive and aversive motivation, *Behav Brain Res* 61, 117.
- Salinas, J.A., M.G. Packard et J.L. McGaugh, 1993, Amygdala modulates memory for changes in reward magnitude: reversible post-training inactivation with lidocaine attenuates the response to a reduction in reward, *Behav Brain Res* 59, 153.
- Sanchez, C., 1997, Acute stress enhances anxiolytic-like drug responses of mice tested in a black and white test box, *Eur Neuropsychopharmacol* 7, 283.
- Sanchez, C. et E. Meier, 1997, Behavioral profiles of SSRIs in animal models of depression, anxiety and aggression. Are they all alike?, *Psychopharmacology (Berl)* 129, 197.
- Sanchez, C. et A. Mork, 1999, N-ethoxycarbonyl-2-ethoxy-1,2-dihydroquinoline studies on the role of 5-HT1A and 5-HT2 receptors in mediating foot-shock-induced ultrasonic vocalisation in adult rats, *Eur Neuropsychopharmacol* 9, 287.
- Sarter, M. et J.P. Bruno, 1999, Abnormal regulation of corticopetal cholinergic neurons and impaired information processing in neuropsychiatric disorders, *Trends Neurosci* 22, 67.
- Scheggi, S., B. Leggio, F. Masi, S. Grappi, C. Gambarana, G. Nanni, R. Rauggi et M.G. De Montis, 2002, Selective modifications in the nucleus accumbens of dopamine synaptic transmission in rats exposed to chronic stress, *J Neurochem* 83, 895.
- Schmidt, C.J., C.K. Black, V.L. Taylor, G.M. Fadayel, T.M. Humphreys, T.R. Nieduzak et S.M. Sorensen, 1992, The 5-HT2 receptor antagonist, MDL 28,133A, disrupts the

- serotonergic-dopaminergic interaction mediating the neurochemical effects of 3,4-methylenedioxymethamphetamine, *Eur J Pharmacol* 220, 151.
- Schneier, F.R., M.R. Liebowitz, A. Abi-Dargham, Y. Zea-Ponce, S.H. Lin et M. Laruelle, 2000, Low dopamine D(2) receptor binding potential in social phobia, *Am J Psychiatry* 157, 457.
- Schreiber, R. et J. De Vry, 1993, 5-HT_{1A} receptor ligands in animal models of anxiety, impulsivity and depression: multiple mechanisms of action?, *Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry* 17, 87.
- Schreiber, R., C. Melon et J. De Vry, 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.
- Seemann, P., 1995, Dopamine receptors., dans: *Psychopharmacology*, eds. F.E. Bloom and D.J. Kupfer (Raven Press, New York) p. 295.
- Semenchuk, M.R., S. Sherman et B. Davis, 2001, Double-blind, randomized trial of bupropion SR for the treatment of neuropathic pain, *Neurology* 57, 1583.
- Sevy, S., G.N. Papadimitriou, D.W. Surmont, S. Goldman et J. Mendlewicz, 1989, Noradrenergic function in generalized anxiety disorder, major depressive disorder, and healthy subjects, *Biol Psychiatry* 25, 141.
- Sewards, T.V. et M.A. Sewards, 2002, The medial pain system: neural representations of the motivational aspect of pain, *Brain Res Bull* 59, 163.
- Shi, W.X., P.L. Smith, C.L. Pun, B. Millet et B.S. Bunney, 1997, D₁-D₂ interaction in feedback control of midbrain dopamine neurons, *J Neurosci* 17, 7988.
- Shimada, T., K. Matsumoto, M. Osanai, H. Matsuda, K. Terasawa et H. Watanabe, 1995, The modified light/dark transition test in mice: evaluation of classic and putative anxiolytic and anxiogenic drugs, *Gen Pharmacol* 26, 205.
- Siemiakowski, M., D. Rokicki, A.I. Czlonkowska, H. Sienkiewicz-Jarosz, A. Bidzinski et A. Plaznik, 2000, Locomotor activity and a conditioned fear response: correlation with cortical and subcortical binding of the dopamine D₁ receptor antagonist, *Neuroreport* 11, 3953.
- Sim, L.J., R. Xiao et S.R. Childers, 1997, In vitro autoradiographic localization of 5-HT_{1A} receptor-activated G-proteins in the rat brain, *Brain Res Bull* 44, 39.
- Simon, P., C. Panissaud et J. Costentin, 1993, Anxiogenic-like effects induced by stimulation of dopamine receptors, *Pharmacol Biochem Behav* 45, 685.

- Soderpalm, A.K., O. Blomqvist, J.A. Engel et B. Soderpalm, 1995, Characterization of the anticonflict effect of MK-801, a non-competitive NMDA antagonist, *Pharmacol Toxicol* 76, 122.
- Sokal, D.M., A.S. Giarola et C.H. Large, 2005, 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* 1031, 141.
- Soubrié, P., M.H. Thiébot, A. Jobert et M. Hamon, 1981, Serotonergic control of punished behavior: effects of intra-raphé microinjections of chlordiazepoxide, GABA and 5-HT on behavioral suppression in rats, *J Physiol (Paris)* 77, 449.
- Spedding, M., T. Jay, J. Costa e Silva et L. Perret, 2005, A pathophysiological paradigm for the therapy of psychiatric disease, *Nat Rev Drug Discov* 4, 467.
- Sprouse, J.S. et G.K. Aghajanian, 1987, Electrophysiological responses of serotonergic dorsal raphe neurons to 5-HT1A and 5-HT1B agonists, *Synapse* 1, 3.
- Stahl, S.M., 2003, Antidepressants and somatic symptoms: therapeutic actions are expanding beyond affective spectrum disorders to functional somatic syndromes, *J Clin Psychiatry* 64, 745.
- Standish-Barry, H.M., N. Bouras, P.K. Bridges et J.P. Watson, 1983, A randomized double blind group comparative study of sulpiride and amitriptyline in affective disorder, *Psychopharmacology (Berl)* 81, 258.
- Steenbergen, H.L., R.P. Heinsbroek, A. Van Hest et N.E. Van de Poll, 1990, Sex-dependent effects of inescapable shock administration on shuttlebox-escape performance and elevated plus-maze behavior, *Physiol Behav* 48, 571.
- Stein, D.J., H.G. Westenberg et M.R. Liebowitz, 2002, Social anxiety disorder and generalized anxiety disorder: serotonergic and dopaminergic neurocircuitry, *J Clin Psychiatry* 63 Suppl 6, 12.
- Stern, W.C., A. Johnson, J.D. Bronzino et P.J. Morgane, 1981, Neuropharmacology of the afferent projections from the lateral habenula and substantia nigra to the anterior raphe in the rat, *Neuropharmacology* 20, 979.
- Stiasny-Kolster, K., W. Magerl, W.H. Oertel, J.C. Moller et R.D. Treede, 2004, Static mechanical hyperalgesia without dynamic tactile allodynia in patients with restless legs syndrome, *Brain* 127, 773.
- Strauss, C.V., S.S. Maisonnette, N.C. Coimbra et H. Zangrossi, Jr., 2003, Effects of N-methyl-D-aspartate-induced amygdala lesion in rats submitted to the elevated T-maze test of anxiety, *Physiol Behav* 78, 157.

- Strobel, A., L. Gutknecht, C. Rothe, A. Reif, R. Mossner, Y. Zeng, B. Brocke et K.P. Lesch, 2003, Allelic variation in 5-HT_{1A} receptor expression is associated with anxiety- and depression-related personality traits, *J Neural Transm* 110, 1445.
- Swanson, L.W., 1982, The projections of the ventral tegmental area and adjacent regions: a combined fluorescent retrograde tracer and immunofluorescence study in the rat, *Brain Res Bull* 9, 321.
- Swanson, L.W., 1987, The hypothalamus, dans: *Handbook of Chemical Neuroanatomy*, Vol. vol. 5, eds. A. Bjorklund, T. Hokfelt and L.W. Swanson (Elsevier Science Publishers, Amsterdam, The Netherlands) p. 1.
- Swerdlow, N.R., J.M. Shoemaker, P.P. Auerbach, L. Pitcher, J. Goins et A. Platten, 2004, Heritable differences in the dopaminergic regulation of sensorimotor gating. II. Temporal, pharmacologic and generational analyses of apomorphine effects on prepulse inhibition, *Psychopharmacology (Berl)* 174, 452.
- Szabo, S.T., C. de Montigny et P. Blier, 1999, Modulation of noradrenergic neuronal firing by selective serotonin reuptake blockers, *Br J Pharmacol* 126, 568.
- Tang, X. et L.D. Sanford, 2005, Home cage activity and activity-based measures of anxiety in 129P3/J, 129X1/SvJ and C57BL/6J mice, *Physiol Behav* 84, 105.
- Tasker, R.A. et R. Melzack, 1989, Different alpha-receptor subtypes are involved in clonidine-produced analgesia in different pain tests, *Life Sci* 44, 9.
- Tatarczynska, E., A. Klodzinska, E. Chojnacka-Wojcik, A. Palucha, F. Gasparini, R. Kuhn et A. Pilc, 2001, Potential anxiolytic- and antidepressant-like effects of MPEP, a potent, selective and systemically active mGlu₅ receptor antagonist, *Br J Pharmacol* 132, 1423.
- Taylor, B.K., C. Joshi et H. Uppal, 2003, Stimulation of dopamine D₂ receptors in the nucleus accumbens inhibits inflammatory pain, *Brain Res* 987, 135.
- Tehrani, M.H., C.A. Tate et M.I. al-Dahan, 1995, Age-related levels of GABA/benzodiazepine binding sites in cerebrum of F-344 rats: effects of exercise, *Neurobiol Aging* 16, 199.
- Tessitore, A., A.R. Hariri, F. Fera, W.G. Smith, T.N. Chase, T.M. Hyde, D.R. Weinberger et V.S. Mattay, 2002, Dopamine modulates the response of the human amygdala: a study in Parkinson's disease, *J Neurosci* 22, 9099.
- Thiébot, M.H., M. Hamon et P. Soubrié, 1982, Attenuation of induced-anxiety in rats by chlordiazepoxide: role of raphe dorsalis benzodiazepine binding sites and serotonergic neurons, *Neuroscience* 7, 2287.

- Thiel, C.M. et R.K. Schwarting, 2001, Dopaminergic lateralisation in the forebrain: relations to behavioural asymmetries and anxiety in male Wistar rats, *Neuropsychobiology* 43, 192.
- Thorre, K., S. Sarre, I. Smolders, G. Ebinger et Y. Michotte, 1998, Dopaminergic regulation of serotonin release in the substantia nigra of the freely moving rat using microdialysis, *Brain Res* 796, 107.
- Tiihonen, J., J. Kuikka, K. Bergstrom, U. Lepola, H. Koponen et E. Leinonen, 1997, Dopamine reuptake site densities in patients with social phobia, *Am J Psychiatry* 154, 239.
- Titeler, M., R.A. Lyon et R.A. Glennon, 1988, Radioligand binding evidence implicates the brain 5-HT₂ receptor as a site of action for LSD and phenylisopropylamine hallucinogens, *Psychopharmacology (Berl)* 94, 213.
- Toth, M., 2003, 5-HT_{1A} receptor knockout mouse as a genetic model of anxiety, *Eur J Pharmacol* 463, 177.
- Treit, D., J. Menard et C. Royan, 1993a, Anxiogenic stimuli in the elevated plus-maze, *Pharmacol Biochem Behav* 44, 463.
- Treit, D., A. Robinson, S. Rotzinger et C. Pesold, 1993b, Anxiolytic effects of serotonergic interventions in the shock-probe burying test and the elevated plus-maze test, *Behav Brain Res* 54, 23.
- Trullas, R. et P. Skolnick, 1993, Differences in fear motivated behaviors among inbred mouse strains, *Psychopharmacology (Berl)* 111, 323.
- Uehara, T., T. Sumiyoshi, H. Itoh et M. Kurachi, 2003, Modulation of stress-induced dopamine release by excitotoxic damage of the entorhinal cortex in the rat, *Brain Res* 989, 112.
- Vaswani, M., F.K. Linda et S. Ramesh, 2003, Role of selective serotonin reuptake inhibitors in psychiatric disorders: a comprehensive review, *Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry* 27, 85.
- Vermetten, E. et J.D. Bremner, 2002, Circuits and systems in stress. I. Preclinical studies, *Depress Anxiety* 15, 126.
- Vertes, R.P., W.J. Fortin et A.M. Crane, 1999, Projections of the median raphe nucleus in the rat, *J Comp Neurol* 407, 555.
- Voorn, P., B. Jorritsma-Byham, C. Van Dijk et R.M. Buijs, 1986, The dopaminergic innervation of the ventral striatum in the rat: a light- and electron-microscopical study with antibodies against dopamine, *J Comp Neurol* 251, 84.

- Wall, P.M., R.J. Blanchard, C. Markham, M. Yang et D.C. Blanchard, 2004, Infralimbic D1 receptor agonist effects on spontaneous novelty exploration and anxiety-like defensive responding in CD-1 mice, *Behav Brain Res* 152, 67.
- Wall, P.M., R.J. Blanchard, M. Yang et D.C. Blanchard, 2003, Infralimbic D2 receptor influences on anxiety-like behavior and active memory/attention in CD-1 mice, *Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry* 27, 395.
- Wall, P.M., J. Flinn et C. Messier, 2001, Infralimbic muscarinic M1 receptors modulate anxiety-like behaviour and spontaneous working memory in mice, *Psychopharmacology (Berl)* 155, 58.
- Wall, P.M. et C. Messier, 2000a, Ethological confirmatory factor analysis of anxiety-like behaviour in the murine elevated plus-maze, *Behav Brain Res* 114, 199.
- Wall, P.M. et C. Messier, 2000b, U-69,593 microinjection in the infralimbic cortex reduces anxiety and enhances spontaneous alternation memory in mice, *Brain Res* 856, 259.
- Wall, P.M. et C. Messier, 2002, Infralimbic kappa opioid and muscarinic M1 receptor interactions in the concurrent modulation of anxiety and memory, *Psychopharmacology (Berl)* 160, 233.
- Weick, B.G. et J.R. Walters, 1987, Effects of D1 and D2 dopamine receptor stimulation on the activity of substantia nigra pars reticulata neurons in 6-hydroxydopamine lesioned rats: D1/D2 coactivation induces potentiated responses, *Brain Res* 405, 234.
- Weikop, P., J. Kehr et J. Scheel-Kruger, 2004, 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* 18, 395.
- Weinert, D. et J. Waterhouse, 1999, Daily activity and body temperature rhythms do not change simultaneously with age in laboratory mice, *Physiol Behav* 66, 605.
- Weizman, T., C.G. Pick, M.M. Backer, T. Rigai, M. Bloch et S. Schreiber, 2003, The antinociceptive effect of amisulpride in mice is mediated through opioid mechanisms, *Eur J Pharmacol* 478, 155.
- Wesolowska, A., M.H. Paluchowska, K. Golembiowska et E. Chojnacka-Wojcik, 2003, Pharmacological characterization of MP349, a novel 5-HT1A-receptor antagonist with anxiolytic-like activity, in mice and rats, *J Pharm Pharmacol* 55, 533.
- White, F.J. et R.Y. Wang, 1984, Pharmacological characterization of dopamine autoreceptors in the rat ventral tegmental area: microiontophoretic studies, *J Pharmacol Exp Ther* 231, 275.

- Wigdor, S. et G.L. Wilcox, 1987, Central and systemic morphine-induced antinociception in mice: contribution of descending serotonergic and noradrenergic pathways, *J Pharmacol Exp Ther* 242, 90.
- Wikinski, S.I., G.B. Acosta, M.C. Gravielle, C.D. Bonavita, V. Bisagno, S. Fiszer de Plazas et M.C. Rubio, 2001, Diazepam fails to potentiate GABA-induced chloride uptake and to produce anxiolytic-like action in aged rats, *Pharmacol Biochem Behav* 68, 721.
- Willner, P., 1984, The validity of animal models of depression, *Psychopharmacology (Berl)* 83, 1.
- Witjas, T., E. Kaphan, J.P. Azulay, O. Blin, M. Ceccaldi, J. Pouget, M. Poncet et A.A. Cherif, 2002, Nonmotor fluctuations in Parkinson's disease: frequent and disabling, *Neurology* 59, 408.
- Xu, T. et S.C. Pandey, 2000, Cellular localization of serotonin(2A) (5HT(2A)) receptors in the rat brain, *Brain Res Bull* 51, 499.
- Yaksh, T.L., D.L. Hammond et G.M. Tyce, 1981, Functional aspects of bulbospinal monoaminergic projections in modulating processing of somatosensory information, *Fed Proc* 40, 2786.
- Yan, Q.S., 2000, Activation of 5-HT_{2A/2C} receptors within the nucleus accumbens increases local dopaminergic transmission, *Brain Res Bull* 51, 75.
- Yan, Z., 2002, Regulation of GABAergic inhibition by serotonin signaling in prefrontal cortex: molecular mechanisms and functional implications, *Mol Neurobiol* 26, 203.
- Yokogawa, F., Y. Kiuchi, Y. Ishikawa, N. Otsuka, Y. Masuda, K. Oguchi et A. Hosoyamada, 2002, An investigation of monoamine receptors involved in antinociceptive effects of antidepressants, *Anesth Analg* 95, 163.
- Yoshikawa, T., Z. Wajima, A. Ogura, T. Inoue et R. Ogawa, 2001, Orally administered clonidine significantly reduces pain during injection of propofol, *Br J Anaesth* 86, 874.
- Yu, P.H., B.A. Davis, J. Fang et A.A. Boulton, 1994, Neuroprotective effects of some monoamine oxidase-B inhibitors against DSP-4-induced noradrenaline depletion in the mouse hippocampus, *J Neurochem* 63, 1820.
- Zangrossi, H., Jr. et S.E. File, 1992, Behavioral consequences in animal tests of anxiety and exploration of exposure to cat odor, *Brain Res Bull* 29, 381.
- Zarrindast, M.R., A. Bakhsha, P. Rostami et B. Shafaghi, 2002, Effects of intrahippocampal injection of GABAergic drugs on memory retention of passive avoidance learning in rats, *J Psychopharmacol* 16, 313.

Zhang, C., Y.Q. Guo, J.T. Qiao et N. Dafny, 1998, Locus coeruleus modulates thalamic nociceptive responses via adrenoceptors, *Brain Res* 784, 116.

Zifa, E. et G. Fillion, 1992, 5-Hydroxytryptamine receptors, *Pharmacol Rev* 44, 401.

LE TEST-RETEST DANS UN MODELE ANIMAL D'ANXIETE CHEZ LA SOURIS : SENSIBILISATION, DISCRIMINATION DANS LE TEST DES QUATRE-PLAQUES

Une procédure de test-retest dans un modèle animal d'anxiété entraîne une augmentation du comportement anxieux et une perte de l'activité anxiolytique des benzodiazépines (BZDs). L'objectif principal de ce travail était d'évaluer la capacité d'un protocole de test-retest dans le modèle des quatre-plaques (FPT) à mettre en évidence des différences d'activité entre diverses substances anxiolytiques, possédant des mécanismes d'action distincts et d'essayer d'apporter une explication à ces modifications comportementales et pharmacologiques observées lors d'une 2^{ème} confrontation des souris au modèle. Contrairement aux BZDs et aux antidépresseurs [la paroxétine, un inhibiteur sélectif de la recapture de la sérotonine (5-HT) et la venlafaxine, un inhibiteur mixte de la recapture de la 5-HT et de la noradrénaline] étudiés, le DOI, un agoniste des récepteurs 5-HT_{2A/2C} conserve son effet de type anxiolytique chez des souris confrontées une 2^{ème} fois au FPT. Son effet s'exerce par l'intermédiaire des récepteurs 5-HT_{2A}. Chez les souris naïves, l'effet anti-punitif du DOI est supprimé par un prétraitement par la clonidine (un agoniste des récepteurs α_2), le sulpiride (un antagoniste des récepteurs D₂), le SCH 23390 (un antagoniste des récepteurs D₁) et la buspirone (un agoniste partiel des récepteurs 5-HT_{1A} et antagoniste des récepteurs D₂). Chez les souris pré-testées, seuls le sulpiride et le SCH 23390 s'opposent à l'activité du DOI. La lésion des neurones dopaminergiques abolit l'effet du DOI chez les souris pré-testées, mais pas chez les souris naïves. Contrairement au DOI, le diazépam perd son effet de type anxiolytique chez les souris naïves déplétées en 5-HT.

Mots Clés : Test des quatre-plaques, Sensibilisation, Anxiété, Souris, Récepteurs 5-HT₂

THE TEST-RETEST IN AN ANIMAL MODEL OF ANXIETY IN THE MOUSE: SENSIBILISATION, DISCRIMINATION ON THE FOUR-PLATES TEST

A test-retest protocol in animal models of anxiety induces an increase of anxious behaviour and a loss of benzodiazepines (BZD)-induced effect. The aim of this study was to evaluate if the test-retest protocol in the four-plates-test is able to discriminate between anxiolytic compounds with distinct mechanism of action and tried to explain the changes in behaviour and pharmacological response in retested mice. In contrast to BZDs and antidepressants [paroxetine, a selective serotonin (5-HT) reuptake inhibitor and venlafaxine, a 5-HT and noradrenaline reuptake inhibitor], the 5-HT_{2A/2C} receptor agonist DOI, conserves its anxiolytic-like effect in mice when retested on FPT. DOI exerts its anxiolytic-like effect in the FPT test-retest paradigm through 5-HT_{2A} receptors. In naive mice, DOI-induced anti-punishment effect was abolished by pretreatment with clonidine (an α_2 receptor agonist), sulpiride (a D₂ receptor antagonist), SCH 23390 (a D₁ receptor antagonist) and buspirone (a 5-HT_{1A} partial agonist and D₂ receptor antagonist). Only sulpiride and SCH 23390 antagonized the DOI-induced activity in experienced mice. The Lesion of dopaminergic neurons suppress the DOI-induced effect in retested mice, but not in naive mice. In contrast to DOI, diazepam lost its anxiolytic-like effect in 5-HT depleted naive mice.

Keywords : Four-plates test, Sensitization, Anxiety, Mouse, 5-HT₂ receptors

Nadège RIPOLL
Laboratoire de Pharmacologie
Faculté de Médecine ; 1 rue Gaston Veil
44035 NANTES cedex 1

