

UNIVERSITÉ DE NANTES
FACULTÉ DE MÉDECINE

ÉCOLE DOCTORALE • CHIMIE BIOLOGIE

Année 2007

N° attribué par la bibliothèque

2007 NANT 24VS

.

CARACTERISATION DES FACTEURS SPATIAUX-TEMPORELS ET DES STRUCTURES
CEREBRALES IMPLIQUES DANS LA TOLERANCE AUX BENZODIAZEPINES ET DANS
LA MEMOIRE AVERSIVE, OBSERVEES LORS DU TEST-RETEST DES QUATRE
PLAQUES CHEZ LA SOURIS

THESE DE DOCTORAT

Discipline : Médecine

Spécialité : Neuropsychopharmacologie

Présentée

et soutenue publiquement par

Benoît PETIT-DEMOULIERE

Le 25 octobre 2007, devant le jury ci-dessous

Président Mme FONTAINE-PERUS Josiane, *Directeur de Recherche • CNRS, Nantes*

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

M. JAFFARD Robert, *Professeur • Université de Bordeaux*

M.COQUEREL Antoine, *Professeur de Pharmacologie • CHU, Caen*

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

Co-Directeur de Thèse M. DAILLY Éric, *PHU, HDR • Université de Nantes*

Table des matières

INTRODUCTION	5
MODELES ANIMAUX	5
A. <i>Choix de l'espèce.....</i>	<i>6</i>
B. <i>Labyrinthe en croix surélevée : l'EPM</i>	<i>7</i>
C. <i>Test des quatre plaques : le FPT.....</i>	<i>9</i>
BUT DE CE TRAVAIL.....	11
ANIMAL MODELS OF ANXIETY IN MICE.....	13
MODELS WITH NON CONDITIONNED PROCEDURE	15
MODELS WITH CONDITIONNED PROCEDURE.....	17
THE TEST-RETEST PARADIGM: A NEW CHALLENGE FOR ANIMAL MODEL OF ANXIETY?	18
CONCLUSION	18
REFERENCES.....	19
PROTOCOLES DE TEST-RETEST	21
I. LA « ONE-TRIAL TOLERANCE » OU PHENOMENE DE TOLERANCE LIEE A LA PREMIERE EXPOSITION AU TEST	21
A. <i>Généralités.....</i>	<i>21</i>
B. <i>Benzodiazépines et Anxiété</i>	<i>23</i>
C. <i>Protocole de retest dans le labyrinthe en croix surélevée (EPM)</i>	<i>25</i>
D. <i>Protocole de retest dans le test des quatre plaques (FPT).....</i>	<i>30</i>
II. PHENOMENES DE MEMOIRE AVERSIVE	31
III. STRUCTURES CEREBRALES DE L'ANXIETE	33
A. <i>L'amygdale</i>	<i>34</i>
B. <i>La PAG (Substance Grise Periaqueducule)</i>	<i>37</i>
C. <i>L'hippocampe.....</i>	<i>38</i>
MATERIEL ET METHODES.....	40
A. <i>Animaux et substances utilisées</i>	<i>40</i>
B. <i>Administration des traitements.....</i>	<i>40</i>
C. <i>Modèles comportementaux.....</i>	<i>43</i>
D. <i>Analyses neurochimiques.....</i>	<i>47</i>

E. Analyse statistique.....	49
RESULTATS	55
I. ETUDE 1 : FACTORS TRIGGERING ABOLISHMENT OF BENZODIAZEPINES EFFECTS IN THE FOUR-PLATE TEST-RETEST IN MICE.....	55
A. Objectifs de l'étude 1	56
B. Discussion de l'étude 1.....	65
II. ETUDE 2 : TEMPORAL PARAMETERS OF ONE-TRIAL TOLERANCE TO BENZODIAZEPINES IN FOUR-PLATE TEST-RETEST	68
A. Objectifs de l'étude 2	69
B. Discussion de l'étude 2.....	74
III. ETUDE COMPLEMENTAIRE DES FACTEURS COMPORTEMENTAUX	77
IV. ETUDE 3 : ANXIOLYTIC-LIKE EFFECT OF DOI MICROINJECTIONS INTO THE HIPPOCAMPUS (BUT NOT THE AMYGDALA NOR THE PAG) IN THE MICE FOUR-PLATE TEST.....	86
A. Objectifs de l'étude 3	87
B. Discussion de l'étude 3.....	94
V. ETUDE 4 : DIFFERENCES OF IMPLICATED STRUCTURES IN AVERSIVE LEARNING AND IN ONE-TRIAL TOLERANCE TO BZD, USING INJECTIONS OF DOI AND DIAZEPAM IN FOUR-PLATE TEST-RETEST IN MICE.....	95
A. Objectifs de l'étude 4	96
B. Discussion de l'étude 4 :	107
VI. ETUDE 5 : MODIFICATIONS NEUROCHIMIQUES LORS DU TEST-RETEST DU FPT CHEZ LA SOURIS	111
A. Objectifs de l'étude 5	112
B. Discussion de l'étude 5.....	116
CONCLUSION ET DISCUSSION	119
REFERENCES	131

GLOSSAIRE

μL : microlitre

5-HT : 5-hydroxytryptamine ; sérotonine

aCsf : liquide cérébro-spinal artificiel

ANOVA : analyse globale des variances

Bicuculline : antagoniste compétitif des récepteurs GABA_A

Buspirone : antagoniste des récepteurs sérotoninergiques 5-HT₃

BW 723C86 : agoniste des récepteurs sérotoninergiques 5-HT_{2B}

BZD : benzodiazépine (par ex. : diazépam, alprazolam, midazolam, chlordiazépoxide, etc.)

Cl⁻ : chlore

DOI : agoniste des récepteurs sérotoninergiques 5-HT_{2A/2C}

EPM : labyrinthe en croix surélevé

FG 7142 : β-carboline, agoniste inverse partiel du site aux BZD des récepteurs GABA_A

Fig. : figure

FPT : test des quatre plaques

FPT-R : test-retest des quatre plaques

g : gramme

GABA : acide gamma amino butyrique

HPLC : chromatographie en phase liquide à haute performance

i.p. : intra-péritonéale

min : minute

mL : millilitre

mm : millimètre

NA : noradrénaline

ng : nanogramme

OTT : one-trial tolerance, perte d'effet liée à une première exposition au test

PAG : substance grise périaqueducule

sem : écart standard à la moyenne

Scopolamine : Antagonistes des récepteurs muscariniques

Introduction

L'étude des pathologies humaines ainsi que le développement de nouvelles molécules à visée thérapeutique, nécessitent la mise en place de différentes étapes avant les premiers tests sur le patient. Parmi ces niveaux successifs de validation, les modèles animaux occupent une place prépondérante puisqu'ils sont la première étape utilisant un système biologique complexe. Dans ce cadre, des chercheurs ont tenté de mettre en place des modèles animaux pour différentes pathologies, afin d'obtenir des informations extrapolables à l'Homme. Ainsi, ces modèles permettent d'étudier des mécanismes (neuro-)physiopathologiques et de prédire l'activité potentielle de nouvelles molécules (Bourin, 1997). Cette conception des modèles s'accompagne de nombreuses précautions, afin de s'assurer que les informations recueillies par le biais d'une étude sur l'animal puissent être utilisables comme premier indice de travail chez l'Homme.

Le niveau de complexité des modèles animaux dépend surtout de la cible thérapeutique recherchée. Dans le cadre de pathologies périphériques, l'utilisation de modèles animaux peut être validée par les indices physiologiques connus et communs pour la majorité des mammifères.

Par contre, dans le cadre de pathologies liées au système nerveux central, et encore plus lorsqu'elles sont liées à la psychiatrie, les modèles animaux deviennent plus difficiles à valider. En effet, le patient est susceptible d'être interrogé afin de diagnostiquer la maladie, mais aussi de comprendre son évolution en fonction des thérapeutiques employées. A l'inverse, modéliser ce type de pathologie chez l'animal se limite à percevoir, à l'aide d'indices comportementaux, une réponse à un traitement, dans un cadre extrêmement bien défini et validé. Les résultats obtenus pourraient potentiellement être utilisés chez le patient par anthropomorphisation.

Modèles animaux

Lors de la mise en place d'un modèle d'une pathologie psychiatrique, le but est d'arriver, par un système simple et reproductible, à étudier un fragment d'une maladie multifactorielle et particulièrement complexe. Pour cela, il convient de choisir avec précaution l'espèce animale utilisée, selon ses réponses comportementales et pharmacologiques à une situation donnée, de mettre en place un protocole, puis

de le valider de manière rigoureuse. La validité d'un modèle animal est le plus souvent liée à trois facteurs : la validité prédictive, la validité de construction et la fiabilité (Petit-Demouliere et al., 2005).

Dans le cadre de l'étude de l'anxiété, différents modèles ont été mis en place, notamment le test du labyrinthe en croix surélevée (elevated plus-maze, EPM), le test des quatre plaques (Four-plate test, FPT), les tests de conflit, etc. Une revue plus complète de la validation et des problématiques rencontrées dans la construction des modèles animaux d'anxiété a été publiée dans le journal « *Fundamental and Clinical pharmacology* » (Bourin et al., 2007) et placée à la fin de l'introduction.

Au sein du laboratoire, nous utilisons principalement deux modèles animaux d'anxiété : l'EPM, ainsi que le FPT. A l'aide de ces deux modèles, nous avons pu effectuer des recherches sur les mécanismes d'action de molécules impliquées dans le traitement de l'anxiété, mais aussi sur des interactions entre systèmes de neurotransmission du système nerveux central.

De plus, nous avons pu démontrer que ces deux modèles semblaient déclencher des réponses comportementales voisines, en comparaison avec un autre modèle animal d'anxiété : le test de la double enceinte éclairée. Ainsi, une administration aiguë de DOI, un agoniste des récepteurs sérotoninergiques 5-HT_{2A/2C} ou de BW 723C86, un agoniste des récepteurs sérotoninergiques 5-HT_{2B}, déclenche dans l'EPM et dans le FPT une réponse de type anxiolytique, 30 minutes après l'administration. Ce résultat n'est pas retrouvé dans le test de la double enceinte éclairée (Nic Dhonnchadha et al., 2003a).

A. Choix de l'espèce

Parmi les différentes souches de souris disponibles dans le domaine de l'expérimentation animale, nous avons choisi d'utiliser la souris Swiss (Lab. JANVIER, France). En effet, cette souche répond de manière significative, reproductible et fiable aux traitements utilisés dans notre étude dans le FPT. De plus, son utilisation est simple, du fait de son comportement particulièrement calme et non agressif. Enfin, nous avons eu confirmation par leurs éditeurs que les atlas stéréotaxiques disponibles pour les études structurales, bien qu'ayant été effectué pour des souris d'une autre souche (C57/BL6J), ont été validés pour la souris Swiss et sont parfaitement compatibles avec cette souche (Franklin and Paxinos, 1997). Par ailleurs, la réponse de cette souche au diazépam s'est avérée significative dans plusieurs modèles animaux d'anxiété, l'EPM et le test de la double enceinte éclairée, (Bourin et al., 1992; Griebel et al., 2000), ainsi que dans le FPT (Hascoet et al., 1997). Dans les modèles animaux d'anxiété, la majorité des

études utilisent le Rat comme modèle animal. Si les données doivent être présentées, afin d'émettre des hypothèses et de définir un cadre théorique ; il convient de conserver un certain recul vis-à-vis des résultats obtenus dans ces travaux. Une différence de stratégie comportementale ou de réponse pharmacologique entre ces deux espèces peut tout à fait suffire à expliquer certains résultats qui s'avéreraient contradictoires. Dans le laboratoire, nous avons choisi d'utiliser la Souris plutôt que le Rat pour diverses raisons. La première est liée à la relative simplicité des réponses comportementales observées chez la Souris, en comparaison avec le Rat. De plus, la gestion technique et les coûts liés à l'utilisation du Rat sont des contraintes plus importantes.

B. Labyrinthe en croix surélevée : l'EPM

L'un des tests comportementaux les plus utilisés pour la recherche dans l'anxiété parmi les tests éthologiques et fréquemment utilisé chez la Souris est l'EPM (Lister, 1987), modèle initialement développé pour le Rat (Handley and Mithani, 1984; Pellow et al., 1985). L'EPM a été largement utilisé comme un outil d'étude des bases psychologiques et neurochimiques de l'anxiété, pour la recherche de substances modulant l'anxiété (Belzung and Griebel, 2001; Bourin, 1997; Carola et al., 2002; File, 2001; Hogg, 1996; Holmes, 2001; Holmes et al., 2000).

Ce test est constitué d'une plate-forme carrée dont les bords donnent accès à quatre bras de largeur et longueur identiques. Deux bras sont dits « ouverts » et constitués seulement d'une planche. Deux bras « fermés » sont constitués d'une planche et de murs sur tout leur pourtour. Les bras de même type sont placés en opposition sur la plate-forme. L'ensemble de la croix est situé à 26 cm par rapport au sol, sous une lampe placée à la verticale de la plate-forme. Ce test est basé sur l'aversion naturelle du rongeur face aux espaces nouveaux, ouverts, éclairés et en hauteur. Il utilise le conflit entre le désir d'exploration de l'animal et son aversion pour les espaces ouverts élevés.

La session de test chez la Souris se déroule sur 5 minutes. L'animal naïf, c'est-à-dire n'ayant pas subi de test au préalable, est placé sur la plate-forme centrale face à un bras « ouvert ». Lors de son exploration, les temps passés dans les bras « ouverts » et « fermés », ainsi que sur la plate-forme sont chronométrés, et le nombre de passages d'un bras à l'autre est relevé.

Les souris provenant généralement de leur cage de maintenance montrent un comportement caractérisé par l'évitement des bras « ouverts » avec une nette préférence pour les bras « fermés ». Les animaux

passent d'ordinaire plus de temps dans les bras « fermés », puis sur la plate forme centrale et peu de temps dans les bras « ouverts », indiquant un penchant pour les sections relativement sécurisées du labyrinthe (Espejo, 1997). Ce comportement est supprimé par les anxiolytiques et potentialisé par les substances anxiogènes. Lister (Lister, 1987) a montré que les paramètres comportementaux de l'EPM chez la Souris fournissent des données sur deux facteurs indépendants, l'un reflétant l'anxiété et l'autre l'activité motrice. Le pourcentage d'entrées et le temps passé sur les bras « ouverts » représentent de bons paramètres pour la mesure de l'anxiété dans ce modèle (Rodgers and Johnson, 1995). Par contre, les indices liés à l'activité locomotrice divergent entre les différentes équipes (Espejo, 1997; Fernandes and File, 1996; Lister, 1987; Rodgers and Johnson, 1995). Au sein du laboratoire, la vérification de l'activité d'une molécule sur la locomotion est effectuée à l'aide d'un test d'actimétrie indépendant, afin de consacrer l'EPM à son utilisation seule dans l'étude de l'anxiété.

Le profil comportemental induit par l'EPM semble inclure des facteurs néophobiques et exploratoires, un conflit entre exploration et évitement des bras « ouverts » qui représentent le facteur stressant. Ce modèle est donc souvent classé comme modèle comportemental non conditionné et spontané de conflit (Wall and Messier, 2001).

Plusieurs groupes de chercheurs ont montré que l'utilité et la sensibilité de ce modèle pouvaient être améliorées grâce à une approche éthologique plus adaptée (Rodgers et al., 1992; Shepherd et al., 1994). Très tôt, il y a eu des tentatives pour exploiter des bases de données plus larges tel le travail de Pellow et collaborateurs (Pellow et al., 1985) qui incorporent des mesures d'attitude, d'immobilisme et une quantification de la défécation; Moser (Moser, 1989) enregistre les redressements, les tentatives d'entrée dans un bras par une posture d'étirement (« *stretched attend posture* » ou SAP), les allers-retours, les défécations et mictions. Lee et Rodgers (Lee and Rodgers, 1990) incluent des mesures de redressements et le temps passé sur la plate-forme. Rodgers et Johnson (Rodgers and Johnson, 1995) ont développé et redéfini une version « éthologique » du labyrinthe chez la Souris qui intègre des postures comportementales spécifiques en plus des mesures spatio-temporelles conventionnelles d'évitement des bras « ouverts ». Cependant, au lieu d'éliminer les problèmes rencontrés avec ce modèle, le nombre croissant de paramètres comportementaux pris en compte dans l'EPM peut conduire à la confusion et entraîne des difficultés pour interpréter et comparer les résultats entre les laboratoires (Wall and Messier, 2001).

C. Test des quatre plaques : le FPT

Au sein du laboratoire, nous avons au cours des dernières années plus particulièrement concentré notre travail d'étude de l'anxiété sur un modèle: le FPT.

Ce modèle a été pour la première fois décrit par Slotnick et Jarvik (Slotnick and Jarvik, 1966), puis modifié par Boissier et ses confrères comme un modèle d'étude des effets des anxiolytiques par la suppression d'un comportement exploratoire inné chez la Souris à l'aide de punitions électriques (Aron et al., 1971). Ce modèle est un test simple et rapide qui permet la détection des effets anxiolytiques ou anxiogènes des molécules étudiées. Il s'est montré être répondeur aux deux traitements de choix chez l'Homme, les benzodiazépines (BZDs) et les inhibiteurs de la recapture de la 5-HT (Bourin et al., 1992; Hascoet et al., 2000). L'administration de diazépam à la dose de 1 mg/kg et d'alprazolam à la dose de 0.25 mg/kg (deux BZDs), entraîne une augmentation significative du nombre de passages punis acceptés par les souris par rapport aux souris témoins (Bourin et al., 1992). L'existence de molécules exerçant des effets « faux positifs » telles que la caféine ou la cocaïne rend nécessaire l'utilisation de doses non psychostimulantes dans le FPT. Pour cela, nous testons les produits dans un actimètre au préalable de chaque étude (Crawley, 1985). Dans la même optique, les doses sédatives de traitement doivent être évitées, puisque le modèle est basé sur l'exploration d'un nouvel environnement.

Ainsi, une molécule exerçant des propriétés de type « anxiolytique » entraînera, en comparaison avec des souris « témoins », une augmentation du nombre de passages punis acceptés par les souris durant la minute de test.

Le FPT est resté très peu employé dans d'autres laboratoires ou seulement pour détecter l'effet anxiolytique de nouveaux médicaments (Griebel et al., 2002; Jones et al., 1994; Klodzinska et al., 1999; Klodzinska et al., 2004; Serradeil-Le Gal et al., 2002; Tatarczynska et al., 2001; Ward and Stephens, 1998; Wesolowska et al., 2003).

Durant nos travaux, nous avons décidé d'utiliser fréquemment le FPT afin d'étudier les mécanismes d'action des molécules de type anxiolytique.

Deux raisons nous ont motivées pour cela. La première est que nous avons validé ce modèle, en comparaison avec le modèle de référence que constitue l'EPM. Comme nous l'avons décrit précédemment, même si l'un des modèles fait appel à des stimuli aversifs, le type d'anxiété observé dans ces deux tests semble comporter de fortes similitudes. Ainsi la réponse de type anxiolytique à une

injection d'agoniste des récepteurs 5-HT₂ (DOI ou de BW 723C86) observée dans les tests est similaire entre l'EPM et le FPT ; alors que ces molécules n'exercent aucune activité de type anxiolytique dans le test de la double enceinte éclairée, un autre modèle animal d'anxiété répandu (Nic Dhonnchadha et al., 2003a). De plus, dans ces deux modèles, nous avons pu mettre en évidence un effet facilitateur des ligands 5-HT_{2A} sur le système GABAergique. Des doses non actives d'alprazolam et de diazépam ont entraîné un effet de type anxiolytique significatif lorsqu'elles ont été co-administrées avec des doses sub-actives de DOI (Masse et al., 2007b). Dans le FPT, l'administration aiguë de DOI, déclenche une augmentation importante et significative du nombre de passages punis acceptés par les souris lors du test. L'administration de BW 723C86, dans les mêmes conditions, entraîne également une augmentation significative du nombre de passages punis mais de moindre importance. Par contre le RO 60-0175, un agoniste des récepteurs 5-HT_{2C}, et le mCPP, un agoniste non spécifique des récepteurs 5-HT₂, ne modifient pas le nombre de passages punis des souris traitées par rapport aux souris témoins dans le FPT (Nic Dhonnchadha et al., 2003a).

Par la suite, nous avons pu constater que cet effet du DOI pouvait être modulé par une inter-régulation avec le système noradrénergique. En effet, une injection d'un agoniste alpha2-adrénergique tel que la clonidine ou le guanabenz abolit complètement l'augmentation du nombre de passages provoquée par l'injection de DOI.

A l'aide de déplétions spécifiques du système noradrénergique ou sérotoninergique, nous avons émis l'hypothèse que l'effet du DOI semble s'exercer à travers les récepteurs 5-HT₂ localisés au niveau post-synaptique (Masse et al., 2006). De même, il existe un lien entre l'effet du DOI et le système GABAergique puisque des injections de benzodiazépines telles que l'alprazolam, et le diazépam, ainsi que d'un agoniste des récepteurs GABA_A, le muscimol (à fortes doses) potentialisent les effets de type anxiolytiques du DOI (Masse et al., 2007a)

Enfin, nous nous sommes affranchis des différentes critiques à l'encontre du modèle, qui considéraient que l'effet observé dans le FPT pouvait être lié à une activité analgésique. Nous avons en effet démontré que les effets de type anxiolytique des différentes molécules s'exprimaient à des doses non-analgésiques, et que la morphine, utilisée à des doses analgésiques dans le test de la plaque chauffante, n'entraîne pas de variations significatives du nombre de passages punis acceptés par les souris lors du FPT (Ripoll et al., 2006a).

Par ailleurs, le FPT a l'avantage par rapport à l'EPM d'être fondé sur un seul indice simple : le nombre de passages punis acceptés par une souris. Basé sur l'exploration d'un nouvel environnement aversif, ce test a été validé face aux traitements de référence de l'anxiété et il dispose d'une bonne validité prédictive. Par ailleurs, sa robustesse et sa reproductibilité ont focalisé notre intérêt (Hascoet et al., 1997).

Enfin, il est intéressant de pouvoir travailler sur plusieurs modèles animaux, afin d'aborder les circuits neuronaux sous des approches différentes, selon l'élément stressant et les conditions, bien que les modèles de l'anxiété ne modélisent pas tous le même type d'anxiété (Davis, 1998a, b).

But de ce travail

Au cours de ce travail de thèse, nous avons cherché à mieux caractériser les phénomènes mis en jeu lors d'une réexposition au FPT, aussi bien dans la « one-trial tolerance » aux benzodiazépines, correspondant à la perte de l'effet de type anxiolytique d'une molécule lors de du retest, que dans la mémoire aversive, observée chez la souris n'ayant pas reçu de traitement.

Pour cela, nous avons retenu deux molécules d'intérêt : le diazépam, et le DOI. En effet, ces deux molécules ayant un effet de type anxiolytique sur des souris naïves ont un effet différent lors du retest. Le diazépam n'exerce plus d'effet anti-punitif sur des souris expérimentées, contrairement au DOI (Hascoet et al., 1997; Ripoll et al., 2005).

Puis, à l'aide de plusieurs études, nous avons cherché à comprendre quels étaient les paramètres impliqués dans ces deux processus, notamment liés aux facteurs spatiaux et temporels, ainsi que les structures cérébrales mises en jeu. Nous avons en effet constaté que ces différentes composantes semblaient fortement impliquées dans les processus impliqués lors de la réexposition.

Notre problématique concernant la « one-trial tolerance » était donc de mieux définir la perte de l'effet du diazépam lors du retest. En effet, il convenait de clarifier le rôle et l'importance de la punition électrique infligée lors du passage d'une plaque à l'autre. Certaines critiques considéraient ainsi que les phénomènes observés dans le retest étaient uniquement liés à une aversion envers ces chocs, empêchant alors tout parallèle entre le FPT et l'EPM, puisque liés plutôt à une aversion conditionnée par les chocs qu'à une forme d'anxiété ou de peur.

Afin de définir le rôle de ces punitions sur la « one-trial tolerance » et sur la mémoire aversive, nous avons pratiqué une première étude utilisant des modifications du protocole : avec ou sans chocs,

environnement classique du FPT ou modifié. Dans une seconde étude, nous avons essayé de détailler de manière précise les paramètres temporels nécessaires lors du premier test à l'établissement de la «one-trial tolerance» et de la mémoire aversive. Nous avons ainsi modifié le temps d'exposition au test, ainsi que l'intervalle de temps séparant les deux sessions, normalement de 24h.

En parallèle à ce travail comportemental, nous avons besoin de connaître les structures cérébrales pouvant être impliquées dans les processus de mémoire aversive et de la «one-trial tolerance». Pour cela, nous avons mis en place un protocole d'injection localisée, nous permettant d'injecter une molécule précisément dans une structure sur une souris vigile immédiatement avant l'exposition au test.

Nous avons donc pu, à l'aide de cette méthode, injecter les deux molécules : DOI ou diazépam, dans différentes structures d'intérêt liées à la pathologie anxieuse. L'influence de ces injections sur le nombre de punitions acceptées lors du test, nous a apporté des informations sur les structures impliquées lors de l'action directe de la molécule. Pour connaître l'influence de ces structures lors du prétest sur les résultats obtenus lors du retest, nous avons eu recours à une technique d'inactivation tissulaire réversible. Pour cela, nous avons procédé à une injection localisée de lidocaïne, un anesthésique local, lors de la première exposition, selon un protocole rigoureux permettant de s'assurer que seul le tissu ciblé était inactivé. Cette inactivation est très brève et s'exerce dans une fenêtre temporelle inférieure à 20 minutes. Les résultats obtenus lors des injections de DOI ou de diazépam par voie intra-péritonéale lors du retest nous ont permis d'évaluer l'influence de chaque structure sur les résultats lors du second test.

ANIMAL MODELS OF ANXIETY IN MICE

Michel Bourin*, Benoit Petit-Demouliere, Brid Nic Dhonnchadha, Martine Hascoët
EA 3256 Neurobiologie de l'anxiété et de la dépression Faculté de Médecine
1, rue Gaston Veil, BP 53508, 44035 Nantes cedex 01, France
*Correspondence and reprints :
e-mail : michel.bourin@univ-nantes.fr fax : (+33)240412852

Abstract :

Among the multiple possibilities to study human pathologies, animal models remain one of the most used pathways. They allow to access to unavailable answers in human patients and to learn about mechanisms of action of drugs. Primarily developed with rats, animal models in anxiety have been adapted with a mixed success for mice, an easy-to-use mammal with better genetic possibilities than rats. In this review, we have focused on the most used animal models in anxiety in mice. Both conditioned and unconditioned models are described, in order to represent all types of animal models of anxiety. Behavioural studies require strong care for variable parameters, linked to environment, handling or paradigm; we have discussed about this topic. Finally, we focused on consequences of re-exposure to the apparatus. Test-retest procedures can bring new answers, but should be deeply studied, in order to revalidate the whole paradigm as an animal model of anxiety.

Keywords : anxiety, animal model, mice, behavioural studies, test-retest.

Animal models for psychopathology have become an invaluable tool in the analysis of the multitude of causes, genetic, environmental or pharmacological that can bring about symptoms homologous to those of patients with a specific disorder (Shekhar et al., 2001), despite traditional difficulties in accepting these models that stem from the argument that there is no evidence for concluding that what occurs in the brain of the animal is equivalent to what occurs in the brain of a human.

Currently animal models are sought that have three types of validity:

- Face validity, where the model is phenotypically similar and implies that the response observed in the animal model should be identical to the behavioural and physiological responses observed in humans. The behavioural responses/repertoire of mice is of course very different from the human ethogram, which includes the verbal aspect that is absent in rodents.

- Predictive validity entails that the model should be sensitive to clinically effective pharmacological agents and conversely anxiogenic compounds should elicit opposite effects, while agents that have no effect in the clinic should have no effect in these tests.

- The criterion of construct validity relates to the similarity between the theoretical rationale underlying the animal model and the human behaviour. This requires that the aetiology of the behaviour and the biological factors

underlying the disorder may be similar in animals and humans.

Often researchers fail to specify if they are seeking a correlation model (e.g. predictive validity, a model that is selectivity sensitive to therapeutic agents), an isomorphic model (face validity, a model that implies the behavioural response in the human and animal is the same) or a homologous model (true construct validity, a model that implies the 'cause' of the behavioural response in the animal is sufficient to provoke the same response in humans).

Behaviour can be both an event and a process and observable behaviours are the result of the integration of all of the processes ongoing in underlying organ systems, in interaction with the external social and physical environment. Animal models can allow the study of mechanisms of specific behaviours and their pathophysiology and can aid in developing and predicting therapeutic responses to pharmacological agents.

Fear is a normal reaction to a threatening situation, frequently observed in the life of every day, which involves a behavioural answer making it possible to withdraw itself from the threatening event. The fear can be used as adaptive mechanism of alarm for the organism, however it can also become damage when the anxious feeling persists, involving a negative effect on the life of every day. When this fear becomes more important than the situation requires

it or when it appears in an inappropriate situation or chronically, anxiety appears.

The discovery of benzodiazepines (BDZs) in the early sixties and their considerable commercial success in the treatment of anxiety fuelled the development of numerous animal models of anxiety. Unfortunately, because BDZs were the only anxiolytic agents marketed at that time, the predictive validity of these initial models has been mainly based on their ability to detect the pharmacological action of BDZs. This became evident in the early 1980's when non-BDZ anxiolytics e.g. buspirone (BUS), a 5-HT_{1A} partial agonist, were found inactive in some anxiety tests (Belzung, 2001). Secondly it became evident that anxiety is not a unitary disease but a complex phenomenon that probably involves many different neurochemical systems with varied aetiological origins and may be divided in various forms including state and trait anxiety; normal and pathological anxiety. Animals cannot model every aspect of human anxiety but studies in animals permit detailed investigations of neurobiological and psychological processes in states in which fear might be inferred, such as responses to acute and repeated aversive stressors. The clinical acceptance of the heterogeneity of anxiety disorder suggests that there are distinct neurobiological substrates for each and it is therefore necessary to examine whether different animal tests might reflect those differences. Conferring particular tests of anxiety to particular anxiety disorders is an extremely difficult task. Thus various animal models may be more appropriate for one type of anxiety disorder than for another, as it is inappropriate to assume that any one model may serve to detect compounds for a disease that is mediated through multiple and diverse mechanisms.

Handley tried to classify animal models of anxiety according to the nature of the aversive stimulus and of the response elicited, suggesting that the neuronal control of anxiety may differ according to whether the interpretation of an aversive signal is innate or learned and whether it causes the emission of a response or conversely inhibits an ongoing, rewarded behaviour. Animal models of anxiety can be grouped into two main subclasses (Table1): the first involves the animal's conditioned responses to stressful and often painful events (e.g. exposure to electric foot shock), the second includes ethologically based paradigms and involves the animal's spontaneous or natural reactions (e.g. flight, avoidance, freezing) to stress stimuli that do not

explicitly involve pain or discomfort (e.g. exposure to a novel highly illuminated test chamber or to a predator).

Ethologically based animal models of fear and anxiety attempt to approximate the natural conditions under which such emotional states are elicited. By employing non-painful aversive stimuli to induce fear and anxiety, ethological tests are thought to minimise possible confounding effects of motivational or perceptual states arising from interference with learning/memory, hunger/thirst or nociceptive mechanisms and allow for a truly comprehensive 'behavioural profiling' of experimental interventions. When compared to conditioned models, ethologically based tests seem to be better qualified analogs of human anxiety. Ethological models, however, present individual differences, variable behavioural baseline levels. Nonetheless, ethological stimuli are diverse in nature.

Producing conditioned fear in animals requires the pairing of a previously neutral stimulus with an electric shock, excepted for the four plates test. Subsequent presentations of the stimulus disrupt ongoing behaviour and produce avoidance or defence.

Models of rodent behaviour have been optimised in the rat over the past century. Yet the mouse is far more studied as a genetic organism, because it is more easily housed (many more mice can be housed in a given space), it breeds more quickly, homologue recombination techniques are now standard for the mouse (and not yet generally available for the rat) and the mouse genome is more completely characterised. Further, genetic modifications to create knock-out mice are easier than in rats. The developmental impairment elicited by the mutation remains a source of discussion, but this barrier is going to disappear with the design of inducible knock-out mice. The behavioural field has responded to this paradox by trying to adapt tests developed in rat to the mouse, with mixed success. Some tests have been easily retooled and validated for the mouse, whereas many others remain less reliable and less robust in this species. Most models involve exposure of subjects to external (e.g. cues either paired with foot-shock, bright light, predator) or internal (e.g. drug states) stimuli that are assumed to be capable of inducing anxiety in animals.

Since none of these models involves pathological anxiety-related behaviours, Lister has described them as animal models of 'state' anxiety (Lister, 1990). State anxiety is that seen in a response to the level of stress and to the way that

Table I:

Classification of
animal models of
anxiety

Conditioned Responses	Unconditioned Responses
Geller-Seifter Conflict(GS) Vogel Conflict Four Plate Test (FPT) Conditioned emotional response (CER) Conditioned taste aversion (CTA) Fear potentiated startle Defensive burying Active/passive avoidance Electrical brain stimulation (dPAG)	Elevated plus maze (zero/T maze) Light/dark exploration (L/D) Social interaction Open field Ultrasonic vocalisation (pain or separation) Fear/anxiety-defence test batteries Staircase test Holeboard Predator

stress is (Belzung and Griebel, 2001). In such procedures subjects experience anxiety at a particular moment in time and it is increased by the presence of anxiogenic stimulus. Models of 'pathological' anxiety are often referred to as 'trait' anxiety tests. Trait anxiety is the persistent and durable feature of the individual personality that reflects the way they interact with their physical and social environment. Unlike 'state' anxiety 'trait' anxiety does not vary from moment to moment and is considered to be an enduring feature of an individual (Millan, 2003). However few true "trait anxiety" animal models are used, it rather concern genetic models such as transgenic and knock-out mice, chronic exposure to fear-provoking stimuli, rodent strains displaying high or low anxiety and inter-individual differences within a defined strain.

We choose the most used models in mice (state anxiety) instead of have an exhaustive review of all anxiety models in mice.

MODELS WITH NON CONDITIONNED PROCEDURE

• OPEN FIELD

This test, originally designed by Hall on rats, consists in placing an animal in an unknown environment with surrounding walls, so as to observe a number of behaviour patterns including, the tendency to stay on the periphery of the field without entering the center (called thigmotaxis and often interpreted as anxious behaviour), levels of defecation and urination (Hall, 1934). At present, the open field floor is often divided into squares. Animals are tested individually; always being placed in the same position. Anxiety behaviour in the open field is triggered by two factors: individual testing and agoraphobia. Higher levels of anxiety should mainly lead to decreases in the ratio "number of squares visited in center / number of squares visited on periphery".

The main criticism which one can formulate against this model relates to the implication of the anxiety in the results obtained. Indeed, some laboratories use this test for its locomotor component, comparable with an actimeter test. Other laboratories use this model as a test of anxiety. In experiments involving rodents, observers are not measuring the effects of treatments on exploration, but the reaction to a stressful event. Therefore, anxiolytic treatments do not themselves increase exploration in the open field but they decrease the stress-induced inhibition of exploration behaviour. Open field test may be a rodent model of normal anxiety, sensitive to the anxiolytic-like effects of BZD and 5-HT_{1A} receptor agonists but not to the effects of compounds displaying anxiolytic-like effects in the clinical entity termed "anxiety disorders" (Prut and Belzung, 2003). Another main concern about this model is the lack of standardization between the different laboratories. Some are

square and others circular; some are clear and others opaque; some are brightly and others totally dark; some have tops and others are open. Presence of objects within the arena, placement of the animal (center or close to the walls), recording period (2 to 20 min., usually 5 min.) and items recorded are the main variations observed across the literature (Prut and Belzung, 2003).

• Elevated Plus Maze (EPM)

One of the most popular behavioural tests for research on anxiety and frequently used mouse models of anxiety is the EPM (Lister, 1987) initially developed for rats (Pellow et al., 1985) and more recently, for other species such as guinea pigs, voles, hamsters and gerbils. There have also been the development of several derivatives of the EPM including the elevated T-maze, zero maze and the unstable elevated exposed plus maze (UEEPM) (Jones and King, 2001), a recently established model of extreme anxiety in rats which has all four arms exposed and oscillated in the horizontal plane.

The EPM has been widely used as a tool in the investigation of the psychological and neurochemical basis of anxiety, for screening anxiety-modulating drugs or mouse genotypes (Belzung and Griebel, 2001; Bourin, 1997; File, 2001; Holmes, 2001). The EPM is in the form of a "plus" with two open elevated arms facing opposite to each other and separated by a central square and two arms of the same dimensions, but enclosed by walls. The maze is raised off the ground so that the open arms combine elements of unfamiliarity, openness and elevation. The EPM is based on the natural aversion of rodents for open spaces and uses conflict between exploration and aversion to elevated open places. Provoked behaviour profiles in the EPM appear to include elements of neophobia, exploration and approach/avoidance conflict, thus the apparatus is often referred to as an unconditioned spontaneous behavioural conflict model.

Mice generally taken from their home cages will show a pattern of behaviour characterised by open-arm avoidance with a consistent preference for the closed arms. The rank order preference profile is closed > centre > open, indicative of a penchant for relatively secured sections of the maze. This tendency is suppressed by anxiolytics and potentiated by anxiogenic agents. The measures of anxiety are the number of open arm entries and the number of open arm entries expressed as a percentage of the total number of arm entries and the amount of time spent on the open arms. Although automated plus-maze apparatus (e.g. photo beam-based, video tracking systems) is now used in a few laboratories, most research groups still observe the behaviour of their animals during testing. As such, the plus maze test has traditionally been scored either live or from a video-image by a trained observer. Some authors also added ethological measures to provide a more comprehensive behavioural profile of mice on the maze.

These measures included rearing, stretched attend posture (SAP; an exploratory posture in which the mouse stretches forwards and retracts to its original position without locomotion forward), closed arms returns (exiting a closed arm with only two paws, and returning or doubling back into the same arm), head dipping (exploratory movement of the head or shoulders over the sides of the open arms). In view of the importance of thigmotactic cues in the maze, SAP, and head-dips were further differentiated as protected (i.e. occurring in or from the relative security of the closed arm or central plate form) or unprotected (occurring on or from the open arms).

Lister (Lister, 1987) showed that the behavioural parameters in the mouse plus maze provided measures of two independent factors, one reflecting anxiety and one reflecting motor activity. The percentage of open arm entries and the time spent on the open arms are extremely good measures of anxiety generated by this test. In contrast, the total arm entries, the measure of activity that was originally proposed, is a contaminated measure and changes in this parameter could reflect changes in anxiety or in activity. In later factor analyses of data the same factor structure was confirmed and it was found that the number of closed arm entries provided a better measure of motor activity. However agreement as to the ‘pure’ indicator of locomotor activity index of the EPM remains ambiguous. Some investigators report total entries as a locomotor activity indicator (Lister, 1987), total entries as a mixed anxiety/locomotor activity indicator (Rodgers and Johnson, 1995) and closed entries as an index of protected exploration. The factor structure of the plus maze parameters in rats is changed by sex: for the male rat the strongest factor was anxiety, with motor activity being relatively unimportant. For the females, the situation was reversed with activity being the more important factor. This has important implications for experiments, since females may be less sensitive to manipulations that change anxiety in this test and more sensitive to those that influence motor activity. It would be important to determine whether the same sex differences in factor structure found in rats also apply in mice, as with studies of genetically modified mice, where animal numbers are limited and groups may comprise both males and females, there could be a loss of sensitivity to genetic effects.

The EPM permits a rapid screening of anxiety-modulating drugs or mouse genotypes (e.g. CCK2 KO, 5-HT1A KO) without training or involvement of complex schedules. The test offers a number of advantages over other paradigms used to assess anxiety that involve food or water deprivation or shock administration. In particular drug effects on appetite or sensitivity to pain are unlikely to interfere with experimental results. Unfortunately the plus maze behaviour patterns may be influenced by variability in test conditions that contribute to discrepancies among results, including a wide range of experimental animals

used (age, gender, strain (Griebel et al., 2000; Wahlsten et al., 2003) and procedures adopted (housing conditions, handling, time of testing, prior exposure to other tests (Rodgers and Shepherd, 1993), illumination (Jones and King, 2001) , method of scoring, routes of drug administration, maze construction among others (File, 2001). It is thus probably true to say, that there are as many variants of plus maze methodology as there are laboratories employing this model. As such, the between-laboratory variation in findings using this procedure becomes very much more understandable.

• *Light/Dark paradigm (L/D)*

The L/D exploration test is another commonly used murine model of anxiety (Bourin and Hascoet, 2003). Devised by Crawley and colleagues 20 years ago (Crawley, 1981), this test is based on the innate aversion of rodents to brightly illuminated areas and on the spontaneous exploratory behaviour of rodents in response to mild stressors, i.e. novel environment and light. This model permits mice to freely explore two inter-connected compartments that vary in size (2:1), colour (white: black) and illumination (bright: dim). Thus control mice placed into the brightly lit section will rapidly move into the dark area. After anxiolytic (BDZ) drug treatment the apparent apprehension of remaining in or moving to the light area is abolished. Since then the L/D test has been widely adopted as an anxiolytic screening test in mice (Costall et al., 1989), extended for use with rats and has been subject to several modifications. The size of the box and compartments has been adjusted. Another model included the addition of a tunnel between the two compartments and the transformation of the paradigm into a corridor-type runway.

In parallel with these developments, additional indices of anxiolytic activity have been championed e.g. relative behavioural activity/time spent in each compartment (Costall et al., 1989; Hascoet and Bourin, 1998). Five main parameters are now available to assess the anxiolytic profile of drug treatment: the latency time for the first passage from the light compartment to the dark one, the number of transitions between the two compartments, the movement in each compartment and the time spent in each compartment. Sometimes rearing and grooming are measured. Griebel and colleagues introduced the parameter “attempt at entry into the lit compartment followed by avoidance responses”, which include SAPs. BDZs decrease the number of attempts at entry in the aversive area as mice pass directly into the lit compartment without hesitation, a profile suggested of being indicative of anxiolytic-like activity. A parameter suggested by Lapin as an index of the effect of anxiogenics is the “leanings out” or “peeking out” of the dark chamber by the mouse (Lapin, 1999), where a decrease in the rate of leanings out appears to be a constant effect of standard anxiety-inducing drugs. However these behaviours are invariably ignored in favour of a simple

spatiotemporal index and the measurement found to be most consistent and useful for assessing anxiolytic-like activity action is the time spent in the lit compartment, as this parameter provides the most consistent dose-effect responses with different compounds (Hascoet and Bourin, 1998).

The choice of strain and age of the animal is also an important factor. Studies by Hascoët and colleagues (Hascoet and Bourin, 1998; Hascoet et al., 1999) indicate the preference for the Swiss mouse strain of 4 weeks of age, as an age-related effect was observed.

MODELS WITH CONDITIONNED PROCEDURE

• Four Plate Test (FPT)

The four plate test introduced by Boissier and co-workers (Boissier et al., 1968) is based on the suppression of a simple innate ongoing behaviour i.e. the exploration of novel surroundings, of the mouse. The apparatus consists of a floor made of four identical rectangular metal plates. This exploration behaviour is suppressed by the delivery of mild electric foot shock contingent on quadrant crossings. Every time the mouse crosses from one plate to another, the experimenter electrifies the whole floor evoking a clear flight-reaction of the animal. BDZs increase the number of punished crossings accepted by the animal. Before any conclusion can be drawn for a drug tried in this test, it is necessary to verify that this drug has no analgesic effects. This is verified utilising a hot-plate apparatus, employing morphine as the control compound.

This paradigm is not commonly used in behavioural studies, making it difficult to formulate inter-laboratory comparisons. As such the various factors potentially influencing the behavioural response of mice has not been profoundly studied. However, its success in our laboratory and the demonstration of an anxiolytic-like effect of ADs in this model (in comparison to many of the traditional paradigms employed) emphasises the validity of this model (Hascoet et al., 2000). In addition the FPT allows the exploration of anxiety underlying mechanism such as an inter-regulation between 5-HT₂ subtype receptors and $\square$ 2 noradrenergic receptors (Masse et al., 2005). Our laboratory equally reported that a single prior undrugged exposure to the FPT reduces punished responding on retest at intervals ranging from 24 h to 42 days. Furthermore, prior experience attenuates the anxiolytic response to the benzodiazepines diazepam and lorazepam, similar to results observed in the EPM and L/D.

However, the FPT is now being increasingly used for the detection of the anti-anxiety activity of potentially new anxiolytics.

• Fear potentiated startle

Originally designed by Brown in 1951, this pavlovian fear conditioning procedure involves two different distinctive steps (Brown et al., 1951). Firstly, the animals are trained to associate a neutral stimulus, generally a light, with an aversive stimulus such as an electric foot-shock. After training, animals are submitted to an intense sound. The startle response to this unconditioned stimulus is potentiated by simultaneous presentation of the previously conditioned light stimulus. This potentiation can be found even one month after the training. Anxiolytics produce a dose-dependent reduction of the startle amplitude with no change in the baseline level of startle (observed in absence of the conditioned stimulus). A decrease of the baseline would reveal a non-specific locomotor impairment.

Main results on this model have been published by Davis and co-workers, for review, see (Davis et al., 1993). Overall, benzodiazepines, as well as buspirone-like drugs decrease fear-potentiated startle, often without any change in the baseline response. Administration of some antidepressants (imipramine, fluvoxamine or amitriptyline), acutely or chronically, seems to exert no effect in this model. This model has little predictive value for anxiogenic treatments, as yohimbine and FG-7142 reduced startle response and these data corroborate the recent hypothesis that systems mediating fear-potentiated startle are independent from systems mediating increased startle from unconditioned and putatively anxiogenic stimuli.

• Vogel water-lick conflict test

This test is a well-know method used in rats, designed by Vogel and co-workers (Vogel et al., 1971). Only few studies tried to apply the test to other species, but recently, this test has been reported to successfully detect anxiolytic-like action of diazepam and to be appropriate as a screening method for drugs that have apparent anti-anxiety actions.

In this test, thirsty animals gain water reward through a water spout but at the expense of receiving a mild electric

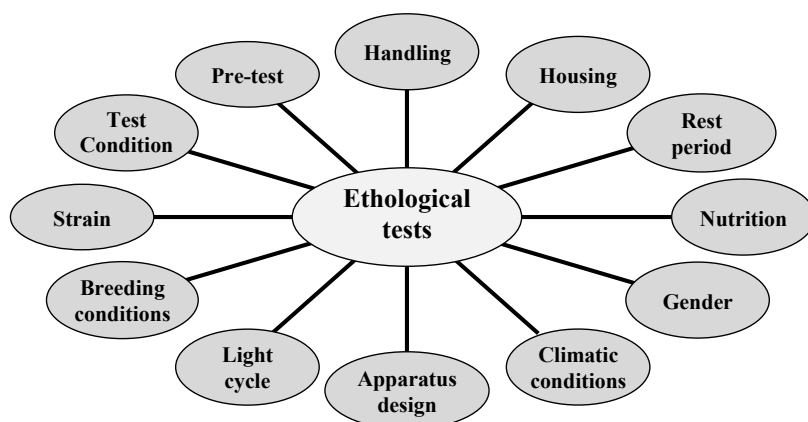


Figure 1: Factors influencing the behavioural response of mice in the EPM

shock delivered to the tongue (Vogel et al., 1971). Control licking in controls is suppressed, anxiolytics release this suppressed behaviour while non-specific effects are assessed on non-punished water drinking. Diazepam, pentobarbital produced significant anti-conflict effect, which means that these drugs increased the number of electric shocks mice received during the test session. Yohimbine, caffeine, scopolamine, cyclazocine, cimetidine, baclofen, MK-801, buspirone, chlorpromazine and haloperidol all did not produce anticonflict effects in this test using ICR mice. L838, 417, a novel GABAA was anxiolytic in this mouse model, using C57BL/6. Nevertheless, it seems difficult to set up control experiments for locomotor activity, nociception, learning, memory, etc... Different strains of mice have been validated with this task.

The test-retest paradigm: A new challenge for animal model of anxiety?

There are a number of non-genetic non-pharmacological manipulations that lead to modulate the general stress levels of animals, which when performed before testing have profound effects on behaviour in the L/D model. Prior exposure of mice to the EPM eliminates the anxiolytic response to diazepam in the L/D paradigm (Rodgers and Shepherd, 1993), whereas tail suspension acute stress immediately before the test can increase the sensitivity to anxiolytic-like responses. Forced swimming suppresses general behavioural activity and increased the disinhibition effect of diazepam in both compartments whereas foot shocks given immediately before the test significantly reduced the activity in the dark compartment and did not affect the behaviour in the light compartment (Holmes et al., 2001). Exposure of CD-1 mice to predator odour (mimicked by 2, 5-dihydro-2, 4, 5-trimethylthiazoline or TMT) or control odour (mimicked by butyric acid or BA) induced anxiety in the L/D test relative to saline treated mice. Mice exposed to either TMT or BA took longer to re-enter the light section of the apparatus and also spent less time in the light division relative to mice exposed to saline (Hebb et al., 2002). Data indicate that prior test experience seriously compromises the anxiolytic efficacy of chloradiazepoxide (CDP) in the mouse L/D test without significantly altering behavioural baselines (Holmes et al., 2001). Although early findings suggested good test-retest stability for the elevated plus-maze test, a substantive literature now indicates that a single prior un-drugged exposure to the maze usually results in increased open arm avoidance on subsequent trials; perhaps indicating increased anxiety. The anxiolytic efficacy of BDZs is either markedly reduced or completely abolished by prior un-drugged test experience. In addition to these observations, prior test experience (Holmes and Rodgers, 1998; Lister, 1987; Silveira et al., 1993) also appears to

fundamentally alter the nature of future emotional responses to the plus maze.

In our lab we performed test-retest using the four-plates test demonstrating that benzodiazepine diazepam lost its efficacy on the retest but not DOI which is a 5-HT₂ receptors agonist (Ripoll et al., 2006b). The test-retest could be efficient to discriminate through desinhibition and true anxiolytic activity of the drugs. For the moment, the pharmacological characterisation of the effects of retesting in mice have largely been restricted to the effects of prior experience on the anxiolytic efficacy of BZDs, and little attention has been paid to the effects of experience to other anxiolytic drugs such as those acting via the 5-HT system.

CONCLUSION

The behavioural tests of anxiety are useful to better know the potential activity in human and to better understand the mechanism of action of the drugs. However, as many models have been based on benzodiazepine pharmacology and validated with BZD, their sensibility on drugs acting on other system remains questionable. Face to the lack of reproducibility and sensibility of non BZD drugs in animals models of anxiety, tests have been subject to an abundance of variation and a plethora of parameters of measurement. This would also suggest problems with the test's sensitivity and reproducibility to anxiolytic and potential anxiolytic compounds in other laboratories also.

Recent interest in standardisation of tests has been spurred by investigations of different mice genotypes to various stresses and anxiety regulating compounds. Standardisation represents a way to ensure the reproducibility of both qualitative and quantitative aspects of a measure and is suggested to lead to more reproducible or interpretable results of complex experiments performed in different laboratories or within the same laboratory.

Our results and a review of literature suggest that ethological models of anxiety like the EPM (in comparison with the FPT), are more susceptible to climate/environmental changes, even though all experiments were carried out in the same experimental conditions. The reasons for this remain, in great part, unknown and indicate that mice exposed to these tests are sensitive to factors under poor experimental control.

One main strategy in using animal models of anxiety is first to use independent locomotor activity test (in actimeter chambers for example) in order to avoid false positive anxiolytic due to sedative or psychostimulant properties of the drugs tested. Second, the experimenters must control the maximum of environmental factors influencing the behavioural response of mice. KO mice for different receptors could be used as well but the difficulty is to hypothesise previously which receptors could be implicated on the test used, as well as the compensatory possibilities during the developmental period. At least, it could be of interest to use a test-retest procedure, as this procedure is

insensible to BZD but permit the discrimination of the anxiolytic compounds DOI (a 5-HT₂ agonist). This modified model can thus constitute a new tool to investigate other neuronal pathways implicated in anxiety.

REFERENCES

- [1] Shekhar A, McCann UD, Meaney MJ, Blanchard DC, Davis M, Frey KA, Liberzon I, Overall KL, Shear MK, Tecott LH, Winsky L. Summary of a National Institute of Mental Health workshop: developing animal models of anxiety disorders. *Psychopharmacology (Berl)*, 2001;157: 327-339.
- [2] Belzung C. Rodent models of anxiety-like behaviors: are they predictive for compounds acting via non-benzodiazepine mechanisms? *Curr Opin Investig Drugs*, 2001;2: 1108-1111.
- [3] Lister RG. Ethologically-based animal models of anxiety disorders. *Pharmacol Ther*, 1990;46: 321-340.
- [4] Belzung C, Griebel G. Measuring normal and pathological anxiety-like behaviour in mice: a review. *Behav Brain Res*, 2001;125: 141-149.
- [5] Millan MJ. The neurobiology and control of anxious states. *Prog Neurobiol*, 2003;70: 83-244.
- [6] Hall CS. Emotional behavior in the rat: I. Defecation and urination as measures of individual differences in emotionality. *J Comp Psychol*, 1934;18: 385-403.
- [7] Prut L, Belzung C. The open field as a paradigm to measure the effects of drugs on anxiety-like behaviors: a review. *Eur J Pharmacol*, 2003;463: 3-33.
- [8] Lister RG. The use of a plus-maze to measure anxiety in the mouse. *Psychopharmacology (Berl)*, 1987;92: 180-185.
- [9] Pellow S, Chopin P, File SE, Briley M. Validation of open:closed arm entries in an elevated plus-maze as a measure of anxiety in the rat. *J Neurosci Methods*, 1985;14: 149-167.
- [10] Jones N, King SM. Influence of circadian phase and test illumination on pre-clinical models of anxiety. *Physiol Behav*, 2001;72: 99-106.
- [11] Bourin M. Animal models of anxiety: are they suitable for predicting drug action in humans? *Pol J Pharmacol*, 1997;49: 79-84.
- [12] File SE. Factors controlling measures of anxiety and responses to novelty in the mouse. *Behav Brain Res*, 2001;125: 151-157.
- [13] Holmes A. Targeted gene mutation approaches to the study of anxiety-like behavior in mice. *Neurosci Biobehav Rev*, 2001;25: 261-273.
- [14] Rodgers RJ, Johnson NJ. Factor analysis of spatiotemporal and ethological measures in the murine elevated plus-maze test of anxiety. *Pharmacol Biochem Behav*, 1995;52: 297-303.
- [15] Griebel G, Belzung C, Perrault G, Sanger DJ. Differences in anxiety-related behaviours and in sensitivity to diazepam in inbred and outbred strains of mice. *Psychopharmacology (Berl)*, 2000;148: 164-170.
- [16] Wahlsten D, Metten P, Phillips TJ, Boehm SL, 2nd, Burkhart-Kasch S, Dorow J, Doerksen S, Downing C, Fogarty J, Rodd-Henricks K, Hen R, McKinnon CS, Merrill CM, Nolte C, Schalomon M, Schlumbohm JP, Sibert JR, Wenger CD, Dudek BC, Crabbe JC. Different data from different labs: lessons from studies of gene-environment interaction. *J Neurobiol*, 2003;54: 283-311.
- [17] Rodgers RJ, Shepherd JK. 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)*, 1993;113: 237-242.
- [18] Bourin M, Hascoet M. The mouse light/dark box test. *Eur J Pharmacol*, 2003;463: 55-65.
- [19] Crawley JN. Neuropharmacologic specificity of a simple animal model for the behavioral actions of benzodiazepines. *Pharmacol Biochem Behav*, 1981;15: 695-699.
- [20] Costall B, Jones BJ, Kelly ME, Naylor RJ, Tomkins DM. Exploration of mice in a black and white test box: validation as a model of anxiety. *Pharmacol Biochem Behav*, 1989;32: 777-785.
- [21] Hascoet M, Bourin M. A new approach to the light/dark test procedure in mice. *Pharmacol Biochem Behav*, 1998;60: 645-653.
- [22] Lapin IP. [A decreased frequency of peeking out from the dark compartment--the only constant index of the effect of anxiogens on the behavior of mice in a "light-darkness" chamber]. *Zh Vyssh Nerv Deiat Im I P Pavlova*, 1999;49: 521-526.
- [23] Hascoet M, Colombel MC, Bourin M. Influence of age on behavioural response in the light/dark paradigm. *Physiol Behav*, 1999;66: 567-570.
- [24] Boissier JR, Simon P, Aron C. A new method for rapid screening of minor tranquilizers in mice. *Eur J Pharmacol*, 1968;4: 145-151.
- [25] Hascoet M, Bourin M, Colombel MC, Fiocco AJ, Baker GB. Anxiolytic-like effects of antidepressants after acute administration in a four-plate test in mice. *Pharmacol Biochem Behav*, 2000;65: 339-344.
- [26] Masse F, Hascoet M, Bourin M. alpha2-Adrenergic agonists antagonise the anxiolytic-like effect of antidepressants in the four-plate test in mice. *Behav Brain Res*, 2005;164: 17-28.
- [27] Brown JS, Kalish HI, Farber IE. Conditioned fear as revealed by magnitude of startle response to an auditory stimulus. *J Exp Psychol*, 1951;41: 317-328.

[28] Davis M, Falls WA, Campeau S, Kim M. Fear-potentiated startle: a neural and pharmacological analysis. *Behav Brain Res*, 1993;58: 175-198.

[29] Vogel JR, Beer B, Clody DE. A simple and reliable conflict procedure for testing anti-anxiety agents. *Psychopharmacologia*, 1971;21: 1-7.

[30] Holmes A, Iles JP, Mayell SJ, Rodgers RJ. Prior test experience compromises the anxiolytic efficacy of chlordiazepoxide in the mouse light/dark exploration test. *Behav Brain Res*, 2001;122: 159-167.

[31] Hebb AL, Zacharko RM, Dominguez H, Trudel F, Laforest S, Drolet G. Odor-induced variation in anxiety-like behavior in mice is associated with discrete and differential effects on mesocorticolimbic cholecystokinin mRNA expression. *Neuropsychopharmacology*, 2002;27: 744-755.

[32] Holmes A, Rodgers RJ. Responses of Swiss-Webster mice to repeated plus-maze experience: further evidence for a qualitative shift in emotional state? *Pharmacol Biochem Behav*, 1998;60: 473-488.

[33] Silveira MC, Sandner G, Graeff FG. Induction of Fos immunoreactivity in the brain by exposure to the elevated plus-maze. *Behav Brain Res*, 1993;56: 115-118.

[34] Ripoll N, Hascoet 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*, 2005

Protocoles de test-retest

Les protocoles de réexposition à un test se sont développés en parallèle de la recherche sur les modèles animaux d'anxiété.

Afin de simplifier la sémantique utilisée, nous appellerons le premier test, avec les animaux naïfs : « prétest », et le second test, lors de la réexposition : « retest ». Par ailleurs, dans les articles joints, les termes anglais sont « Trial 1 » pour prétest et « Trial 2 » pour le retest.

Depuis de nombreuses années, les chercheurs ont tenté de sensibiliser les modèles en plaçant l'animal plusieurs fois dans le même environnement de test. Il a été constaté en effet que lors d'un retest, il y avait une augmentation du niveau « d'anxiété », mais pas de variation de l'activité locomotrice. Ce résultat a été démontré dans l'EPM chez la Souris. Les indices comportementaux relevés pour connaître l'activité locomotrice de l'animal (« sniffing », « rearing », entrée dans les bras « ouverts » et entrées totales dans les bras) sont restés stables au cours des différentes expositions à l'EPM (Espejo, 1997). Cette modification de la réponse liée à la première exposition, en l'absence de traitement est vraisemblablement liée à une mémoire aversive développée envers le modèle lors de la première exposition, s'exprimant par une diminution du nombre de passages punis (FPT) ou des paramètres d'exploration indicateurs de l'effet anxiolytique (EPM).

De manière inattendue, les résultats ont montré que l'exposition répétée au test n'augmentait pas l'efficacité des traitements, et même la diminuait. Ainsi, en travaillant sur l'efficacité des traitements de référence que sont les benzodiazépines, l'équipe de S. File a mis en évidence une perte de l'effet de type anxiolytique de ces molécules chez des animaux précédemment exposés au test (File, 1990; Lister, 1987).

I. La « One-trial tolerance » ou phénomène de tolérance liée à la première exposition au test

A. Généralités

Ce phénomène de « one-trial tolerance » consiste en une perte d'effet pharmacologique d'un produit déclenchée par l'exposition préalable à un modèle sans traitement, apparaissant lors d'une réexposition dès le jour suivant. Décrit initialement dans l'EPM pour les BZDs (File, 1990), ce phénomène persiste sur une durée supérieure à deux semaines (File

et al., 1990). Cette perte d'effet a ensuite été rapportée dans d'autres modèles animaux, tels que le test de la double enceinte éclairée (Holmes et al., 2001), le FPT (Hascoet et al., 1997) ou dans le test d'exposition à l'odeur d'un prédateur (Carobrez and Bertoglio, 2005). Dans le test de punition liée à la boisson (Geller-Seifter), aucune perte d'effet des benzodiazépines n'a été observée au cours du retest (File, 1993; File and Zangrossi, 1993).

Par la suite, de nombreuses équipes se sont intéressées à ce phénomène, principalement à l'aide du test de l'EPM. Parmi les explications apportées par ces travaux, différentes hypothèses ressortent majoritairement.

Ainsi, plusieurs articles suggèrent que le prétest au test d'anxiété entraînerait une augmentation du niveau basal d'anxiété de l'animal, et ainsi une perte de l'effet de type anxiolytique (Rodgers and Shepherd, 1993). D'autres avancent l'idée d'une habituation locomotrice liée à l'environnement (Dawson et al., 1994), d'une modification de l'état des sites de liaison et / ou du récepteur GABA_A impliqué dans l'effet des benzodiazépines (Gonzalez and File, 1997). Quelques auteurs ont décrit cette tolérance comme un changement qualitatif dans la nature de l'anxiété ressentie par l'animal, qui pourrait ainsi modifier la réponse pharmacologique de différents traitements (Bertoglio and Carobrez, 2003; File and Zangrossi, 1993). Ainsi, il est suggéré à plusieurs reprises que la nature de l'anxiété subie par les animaux est différente entre le prétest et le retest (Cruz-Morales et al., 2002; File, 1993; File et al., 1993; Rodgers et al., 1992), avec l'apparition possible au cours du prétest, d'une phobie envers la zone stressante (bras ouvert pour l'EPM) (Holmes and Rodgers, 1999).

Enfin, il a été émis l'hypothèse que le prétest déclenchait une sensibilisation de la peur/anxiété (Bertoglio and Carobrez, 2000). Récemment, une autre hypothèse s'est avérée intéressante, puisqu'elle suppose que lors du prétest, il existe un équilibre dans le conflit entre motivation d'explorer et appréhension liée à la néophobie. Cette balance serait sensible aux traitements anxiolytiques. Au cours de la découverte de l'environnement, les animaux développeraient puis adopteraient durant le retest, des comportements non conflictuels, insensibles aux traitements anxiolytiques (Bertoglio and Carobrez, 2003). Ce type de comportement peut être lié à un apprentissage de l'évitement des facteurs aversifs, ou à une modification des réponses défensives utilisées. Il rejoint le concept d'équilibre entre deux facteurs motivationnels, décidant du comportement à exercer face à une situation, et de la prise de risque qui en découle (Augustsson et al., 2005).

B. Benzodiazépines et Anxiété

1) L'acide γ -amino butyrique : le GABA

L'acide gamma amino butyrique ou GABA (γ -AminoButyric Acid) est le principal neurotransmetteur inhibiteur du système nerveux central des vertébrés. Il possède par ailleurs un rôle neurotrophique, c'est-à-dire qu'il favorise la croissance de certains neurones. Le GABA est synthétisé à partir de l'acide glutamique par une enzyme : la GAD (Glutamic Acid Decarboxylase) et est catabolisé par une autre enzyme : la GABA transaminase (GABA T). Lorsque le GABA se fixe à son récepteur, il active un canal chlore (Cl^-). À ce jour, trois types de récepteurs de ce neurotransmetteur ont été identifiés : GABA_A , GABA_B et GABA_C . Les récepteurs GABA_A sont d'une importance capitale dans la régulation de l'excitabilité du cerveau, et de nombreuses molécules telles que les benzodiazépines, les barbituriques, les neurostéroïdes ou l'éthanol interagissent avec ces récepteurs pour déclencher leurs effets pharmacologiques. La molécule de GABA ne peut pas traverser la barrière hémato-encéphalique, donc le rôle de neurotransmetteur ne peut être accompli que par le GABA du système nerveux central et non par celui apporté par l'alimentation (Mehta and Ticku, 1999).

2) Le récepteur GABA_A et les BZD dans le traitement de l'anxiété

Ce récepteur est transmembranaire et est exprimé au niveau du système nerveux périphérique et central. Il est pentamérique et composé de différentes sous-unités. Il existe au moins 19 isoformes au sein de ces unités composant le récepteur, dont l'arrangement le plus répandu est $2\alpha 2\beta 1\gamma$, formant un canal Cl^- . La fixation du GABA sur son récepteur, situé entre les sous-unités β et α , déclenche l'ouverture du canal Cl^- . Les ions Cl^- vont pénétrer dans le neurone cible, ce qui va hyperpolariser la membrane et inhiber tout déclenchement d'un influx nerveux. Le récepteur possède six sites de liaisons pour diverses molécules sur la face extracellulaire. Parmi ces sites, il existe un site primaire pour le GABA et cinq sites secondaires régulateurs pour des molécules modulatrices de l'effet du GABA sur le récepteur GABA_A . Ces sites secondaires régulateurs sont liés : aux benzodiazépines, aux barbituriques, aux convulsivants, aux stéroïdes et à l'alcool.

Le site de fixation des benzodiazépines est situé à l'interface des sous-unités α - et γ -. La fixation des benzodiazépines sur ce site entraîne une modulation allostérique augmentant l'affinité du récepteur pour le GABA, ainsi qu'une élévation de la fréquence d'ouverture des canaux Cl^- . Cette hyperpolarisation rend la cellule plus difficilement excitable (Gutierrez et al., 1994; Mehta and Ticku, 1999). Le diazépam ne peut se lier à des récepteurs GABA_A incluant des sous-unités $\alpha 4$ - ou $\alpha 6$ - ; en effet, elles sont affectées d'une variation d'un acide aminé (His->Arg) empêchant la fixation de la benzodiazépine. Différents travaux ont permis de constater que parmi les sous-unités γ -, γ_2 semble être indispensable à la formation du site aux BZD. Ainsi, à l'aide d'altération du gène codant cette sous-unité, il a été constaté une diminution de 94% du nombre de sites aux BZD chez des souris nouveau-nés, alors que le nombre de récepteurs GABA était légèrement altéré. De plus, ces souriceaux sont morts très rapidement malgré des paramètres physiologiques normaux (Gutierrez et al., 1994).

L'effet anxiolytique des benzodiazépines est aboli chez des souris mutantes pour le récepteur GABA_A portant la sous-unité $\alpha 2$ mais pas pour les mutants $\alpha 3$, ni $\alpha 1$. Ces différents travaux indiquent que l'effet de type anxiolytique des benzodiazépines serait lié à des récepteurs GABA_A portant les sous-unités $\alpha 2$, qui prédominent dans les aires limbiques du cerveau (Nemeroff, 2003).

Les benzodiazépines ont un grand spectre d'action : myorelaxants, hypnotiques, anticonvulsivants, anxiolytiques, sédatifs, anti-conflit, etc. Ces molécules sont largement utilisées pour traiter les troubles anxieux, que ce soit pour des symptômes anxieux à court terme, ou des troubles spécifiques tels que l'anxiété généralisée ou les troubles paniques. Le consensus actuel préconise d'utiliser les BZD en combinaison avec des inhibiteurs spécifiques de la recapture de la sérotonine, pour gérer rapidement les symptômes critiques. Par contre, leur utilisation à long terme est inappropriée chez certains patients, à cause de problèmes de dépendance, de tolérance ou d'abus.

Afin d'élucider les mécanismes sous-jacents de ces phénomènes de dépendance et de tolérance, différentes hypothèses ont été émises : un découplage entre le site de fixation des BZD et le récepteur GABA_A , des variations dans le renouvellement du récepteur GABA_A ou des changements dans la transcription du gène codant pour le récepteur GABA_A (Nemeroff, 2003).

Bien que l'anxiolyse induite par les BZD semble être une conséquence directe de la transmission GABAergique, il serait cependant simpliste de dire que les troubles anxieux résultent d'une altération primaire du complexe GABA_A/canal chlore. En effet, l'effet des BZD pourrait s'exercer par des voies indirectes, peut-être via les systèmes noradrénergiques ou sérotoninergiques qui interagissent avec le système GABAergique. Cela pourrait expliquer par ailleurs l'effet de type anxiolytique de certains déprimeurs dans le traitement de l'anxiété généralisée (Bourin and Hascoet, 2001).

Dans notre travail, nous nous sommes intéressés plus particulièrement au diazépam, l'une des benzodiazépines les plus répandues, et dont l'utilisation clinique est courante sous la forme du VALIUM®. En effet, il s'agit du témoin standard utilisé dans le laboratoire, et nous disposons de nombreux résultats de référence avec les différents modèles animaux d'anxiété pour cette molécule. De plus, celle-ci a été rapportée pour être plus particulièrement active sur les situations de prise de risque, liée aux conflits (Blanchard et al., 1990). L'effet du diazépam sur la mémoire a été discuté dans plusieurs études. Toutes les données basées sur l'acquisition ou l'encodage ne concernent pas ce travail, puisque notre traitement n'est effectué que sur la dernière exposition au test. Par contre, l'influence du diazépam sur l'utilisation de la mémoire acquise est importante. De manière générale, même si des troubles rétrogrades ont été rapportés dans certaines tâches spatiales, ces effets ont eu lieu dans des études au cours desquelles le diazépam était administré rapidement après la phase d'acquisition (Beracochea, 2006).

C. Protocole de retest dans le labyrinthe en croix surélevée (EPM)

De nombreux travaux se sont intéressés au phénomène de la «one-trial tolerance» sur l'EPM. Des modifications du protocole de test-retest, de l'appareillage ou de l'injection de certaines molécules ont permis de discerner quelques paramètres vraisemblablement impliqués dans l'apparition de cette tolérance aux benzodiazépines lors du retest. Les résultats suivant nous ont permis de déterminer les facteurs prépondérants dans ce travail d'étude de la «one-trial tolerance».

1) Modifications du protocole

Dans le protocole de test-retest, plusieurs études ont été réalisées afin de comprendre les paramètres critiques qui pouvaient entraîner l'apparition de cette tolérance. Ainsi, des modifications des facteurs temporels comme le temps d'exposition au cours du premier test, ou du retest ou encore l'intervalle entre les deux expositions, permettent de constater que ces paramètres sont critiques dans l'établissement de la tolérance.

Par exemple, la tolérance aux BZD persiste sur un intervalle de temps entre les deux expositions supérieur à 2 semaines (File et al., 1990).

En s'intéressant à la durée du prétest dans l'EPM chez le Rat non traité, des chercheurs ont constaté qu'en diminuant cette durée d'exposition, l'effet anxiolytique du midazolam était modifié lors du retest. Ainsi, une durée de 5 minutes entraînait une disparition complète de l'effet, une durée de 2 minutes altérait l'effet et une durée de 1 minute ne déclenchait pas de perte d'effet du traitement (Dal-Col et al., 2003). A l'inverse, S. File et son équipe ont mis en évidence chez le Rat, une perte d'effet du diazépam lorsque les deux expositions ont une durée de 5 minutes, mais un effet anxiolytique conservé lorsque les deux sessions de tests duraient 10 minutes (File et al., 1993). Les chercheurs ont ici utilisé une analyse multifactorielle et ont conclu qu'il existait une différence qualitative entre l'état d'anxiété dans lequel se situe l'animal durant le prétest ou le retest. En revanche, une autre équipe a constaté que la perte d'effet de la benzodiazépine s'observait lorsque les animaux subissaient un prétest de 10 minutes, puis un retest en EPM de 5 minutes le lendemain (Holmes and Rodgers, 1999). Cette différence de résultat semble liée à la durée de chacune des expositions. Ainsi, une diminution du temps de prétest peut annuler l'apparition de la «one-trial tolerance» (OTT)($5' + 5' = \text{OTT}$, $1' + 5' = \text{pas d'OTT}$). Une augmentation de la durée du retest (10 minutes), lorsque le prétest a été de 10 minutes suffit à empêcher la «one-trial tolerance» ($10' + 10' = \text{pas d'OTT}$, $10' + 5' = \text{OTT}$).

Ces études permettent de constater l'importance majeure du paramètre temporel dans l'étude du phénomène de «one-trial tolerance».

2) Modifications de l'environnement ou du modèle

Afin de comprendre quelles étaient les informations utilisées par les animaux lors de la réexposition au test, des chercheurs ont modifié les repères spatiaux par rapport au modèle lors d'un retest dans l'EPM chez la Souris. Ainsi, ils ont constaté qu'une rotation de 90° du

test dans la même pièce, ou qu'un changement de pièce entre les deux sessions ne modifiaient pas l'effet d'une première exposition (Rodgers et al., 1997). Ainsi, ces chercheurs ont conclu que les repères utilisés par les souris lors de l'apprentissage spatial étaient liés à l'environnement proche, probablement acquis par thigmotaxie (liée au contact physique).

Par ailleurs, une étude a été réalisée sur l'apprentissage spatial comparé entre le rat Long-Evans et la souris C57/BL6J dans une « tâche de mémoire spatiale » liée à la recherche et à l'apprentissage de la position de nourriture dans un labyrinthe. Les auteurs ont constaté que les rats, contrairement aux souris, utilisaient des repères visuels lointains afin d'accomplir la tâche demandée, et qu'ils étaient plus efficaces et flexibles dans cette activité (Cressant et al., 2007).

En se basant sur l'hypothèse de l'existence d'un conflit motivationnel durant le prétest de l'EPM chez le Rat, des chercheurs ont testé l'effet de l'ajout d'un conflit motivationnel. Ainsi, ils ont rendu les bras « fermés » aversifs durant le prétest à l'EPM, à l'aide de lumière et d'air chaud pulsé. Dans cette situation, le chlordiazépoxyde exerçait un effet de type anxiolytique lors du retest dans un EPM classique (Pereira et al., 1999).

La perte de l'effet anxiolytique du chlordiazépoxyde persiste chez des animaux exposés à deux EPM construits avec des matériaux différents dans le prétest et le retest (File et al., 1990). De même, l'effet anxiolytique du midazolam a été comparé chez des rats soumis à un EPM classique ou à un EPM disposant de murs transparents. L'OTT persiste quel que soit le type d'EPM testé (Albrechet-Souza et al., 2005).

En s'intéressant à la découverte de l'environnement par l'animal, une étude a révélé qu'un confinement de l'animal dans un bras « ouvert » ou dans un bras « fermé » pendant 5 minutes n'est pas suffisant pour déclencher une «one-trial tolerance» lors d'un retest avec un EPM complet. L'ensemble de l'EPM doit être découvert par l'animal afin d'observer ce phénomène (Bertoglio and Carobrez, 2002) ; une autre équipe a acquis des résultats similaires (Frussa-Filho and Ribeiro Rde, 2002). Par contre, ils n'ont pas été obtenus lors d'un travail différent qui a observé qu'un confinement dans un bras « fermé » durant les 5 minutes du test suffisait à déclencher l'apparition de la «one-trial tolerance» durant le retest. Leurs résultats sont par contre identiques pour un confinement dans un bras « ouvert », qui ne s'avère pas être un stimulus suffisant pour observer une «one-trial tolerance» lors du retest (Holmes and Rodgers, 1999).

Par ailleurs, une étude a décrit l'importance de la perception de la hauteur du labyrinthe lors du prétest et du retest. Ainsi, l'ajout de bords autour des bras « ouverts », diminuant la perception du vide, permet d'observer un effet de type anxiolytique du chlordiazépoxide lors du retest chez le Rat. Les auteurs supposent alors que lors du retest, la réponse comportementale est liée à une phobie de la hauteur plutôt qu'à une anxiété due à la peur des espaces ouverts, observée lors du prétest (Fernandes and File, 1996).

Plusieurs points doivent être pourtant relevés dans cette étude. En effet, la mesure de l'anxiété a été effectuée sur plus de 25 paramètres, puis étudiée par une analyse multifactorielle. Les conclusions obtenues lors de ce type d'étude peuvent dépendre fortement des facteurs choisis et de leur interprétation dans l'analyse statistique. De plus, aucun effet de type anxiolytique du chlordiazépoxide n'a été relevé chez les souris naïves lors du prétest, en présence des bords relevés. Les auteurs n'ont pas testé l'impact de la présence de bords uniquement lors du retest, afin de confirmer leur hypothèse. Dans ce contexte, il n'est pas aisé de conclure sur les paramètres influençant la réponse comportementale lors du retest dans l'EPM classique.

L'ensemble des travaux s'intéressant à la découverte et à l'utilisation de l'environnement et de repères acquis lors du prétest, permet de constater que la «one-trial tolerance» est fortement dépendante de la dimension spatiale du test, des indices mémorisés ainsi que des émotions ressenties lors de l'exploration.

3) Etudes pharmacologiques

En étudiant les effets d'un traitement subchronique de BZD, il a été constaté que des injections quotidiennes de diazépam (2 - 4 mg/kg, 8 jours) n'entraînent pas d'effets anxiolytiques chez la souris expérimentée, alors qu'elles s'avèrent actives chez la souris naïve (Rodgers et al., 1992).

Il est intéressant de constater que la perte d'efficacité des traitements observée lors du retest dans l'EPM n'est pas liée à une habituation aux aspects anxiogènes du test. En effet, les élévations des concentrations d'hormones de stress sont identiques pour les animaux testés, quelle que soit leur connaissance du test. Il n'y a pas de diminution de ces concentrations avec des tests répétés (Holmes and Rodgers, 2003).

De plus dans l'EPM, l'effet anxiogène du FG 7142, un agoniste inverse du site aux BZD des récepteurs GABA_A, est aboli chez les souris ayant déjà subi le test. Cela peut suggérer une

altération au niveau de ce site (Holmes and Rodgers, 2003). Ce résultat s'oppose à ceux retrouvés dans l'étude de File et Zangrossi dans laquelle des injections de FG 7142 ont entraîné un effet anxiogène chez le Rat dans l'EPM et qui a persisté chez des animaux prétestés (File and Zangrossi, 1993).

Certains auteurs ont émis l'hypothèse que la tolérance observée dans l'EPM chez le Rat avec le chlordiazépoxyde n'était pas liée à une réelle tolérance aux effets du traitement, mais plutôt à une habitude du comportement exploratoire. En effet, ils ont constaté que le temps passé sur les bras « ouverts » était augmenté chez des animaux expérimentés mais non traités dans le premier test (Dawson et al., 1994).

Afin de tester l'hypothèse selon laquelle la «one-trial tolerance» serait une réponse d'évitement apprise, des chercheurs ont analysé l'effet d'une injection de scopolamine, un bloqueur cholinergique antagoniste des récepteurs muscariniques empêchant l'apprentissage, avant d'exposer les rats pour la première fois à l'EPM. Lors du retest, 48 heures plus tard, ils ont constaté que le midazolam conservait son effet anxiolytique sans modifier l'activité exploratoire globale. L'injection de la scopolamine avait donc empêché l'acquisition d'une stratégie comportementale susceptible d'entraîner la mise en place de la «one-trial tolerance» (Bertoglio and Carobrez, 2004). Ce résultat n'est pas retrouvé dans une seconde étude dans laquelle la scopolamine injectée lors du prétest ne permettait pas de restaurer l'effet du chlordiazépoxyde durant le retest (Calzavara et al., 2005). Dans ce cadre d'étude de la mémoire, une équipe a mis en place un protocole d'injection d'amphétamine ou de pentylènetétrazole, molécules qui semblent « améliorer la mémoire », immédiatement après une exposition de la souris à l'EPM durant 1 minute. Les animaux recevaient ensuite du diazépam 30 minutes avant le retest. Comme attendu, aucun phénomène de «one-trial tolerance» au diazépam n'a été observé lors du retest avec des souris exposées moins de 2 minutes (Dal-Col et al., 2003). Mais les fortes doses de ces deux molécules favorisant la mémoire, ont entraîné l'apparition de la «one-trial tolerance». Cette donnée permet de supposer que la mémoire est malgré tout impliquée dans l'apparition d'une «one-trial tolerance» (Vargas et al., 2006).

4) En résumé

Le test de l'EPM a été abondamment utilisé dans l'étude du phénomène de la « one-trial tolerance ». Validé comme modèle animal d'anxiété, il devient dans ces nouveaux travaux,

un protocole d'étude d'un phénomène dont le rapport avec l'anxiété n'est pas établi. A l'aide de variations du protocole, de l'environnement ou d'études pharmacologiques, les différentes équipes travaillant sur ce sujet ont pu établir certains résultats de façon assez claire et non dépendante de l'espèce. Alors que les premiers résultats de réexposition signalaient une stabilité dans le comportement lors de la réexposition (Holmes and Rodgers, 1999), nous pouvons constater que toutes les études récentes s'accordent sur l'existence d'une aversion, d'un effet anxiogène du modèle. De plus, la perte d'effet des benzodiazépines a été largement rapportée et étudiée. Il semble ainsi que les facteurs spatiaux et temporels aient une forte importance dans cette abolition de l'effet anxiolytique. En parallèle de cela, le rôle de la mémoire n'a pas été clairement démontré ni écarté. Il reste encore de nombreuses questions qui semblent difficiles à résoudre avec l'EPM, surtout à cause de la variabilité des résultats obtenus entre les différentes équipes. L'EPM, modèle animal d'anxiété réputé pour sa sensibilité, pourrait alors se montrer inadapté dans la recherche de processus s'exprimant en second plan, lors du retest. Ce constat ainsi que certains résultats préliminaires justifient la mise en place de recherches sur un autre modèle animal d'anxiété, conservant une spécificité liée à la peur de la nouveauté et une réponse pharmacologique aux benzodiazépines. Le FPT est pour ces raisons un candidat idéal pour une étude des phénomènes observés lors du retest.

D. Protocole de retest dans le test des quatre plaques (FPT)

Au sein du laboratoire, nous utilisons principalement l'EPM et le FPT comme test d'anxiété chez la Souris. En 1997, afin d'étudier les phénomènes de mémoire aversive, le Dr. Hascoët et ses collègues ont mis en évidence une diminution du nombre de passages punis acceptés par les animaux lors du retest dans le FPT. Dans ce protocole de réexposition au test, les souris subissaient à 24 heures d'intervalle deux sessions de FPT, mais ne recevaient un traitement qu'au cours de la seconde session. Cette mémoire aversive persistait sur une durée importante puisqu'elle était observée avec un intervalle de 42 jours entre les deux expositions. Ce travail a aussi démontré une perte d'effet de l'activité des benzodiazépines, notamment du diazépam, lors du retest au FPT. Ainsi, le diazépam n'exerce plus d'action de type anxiolytique pour des doses comprises entre 0.25 mg/kg et 2 mg/kg (Hascoët et al., 1997). Cette mise en évidence d'un phénomène observé jusqu'à présent principalement dans l'EPM, a soulevé de nombreuses questions, principalement sur la cause de ce

phénomène pharmacologique et sur le parallèle à effectuer avec les travaux sur les autres modèles.

Par la suite, nous avons cherché à comprendre quels pouvaient être les mécanismes impliqués dans ces deux résultats : la diminution du nombre de passages acceptés chez les souris non injectées, et la perte d'effet de type anxiolytique des benzodiazépines lors du retest. En effet, nous sommes en présence de deux phénomènes vraisemblablement liés à deux dimensions comportementales indépendantes, l'exploration d'un nouvel environnement et la peur de la punition. Ces deux composantes exploration et peur semblent être impliquées dans toute situation au cours de laquelle un rongeur découvre un environnement nouveau (Whimbey and Denenberg, 1967) (Crusio, 2001). Vis-à-vis de l'exploration, des traitements ayant un effet hyperlocomoteur chez la Souris, ne semblent pas augmenter le nombre de passages punis acceptés dans le FPT lors du retest, comme nous l'avons démontré par exemple avec un psychostimulant agoniste alpha-1 adrénergique : l'adrafenil injecté 30 minutes avant le retest. Malgré cela, toutes les molécules et protocoles testés lors d'un retest sont soumis préalablement à un test d'actimétrie.

En testant différents types de molécules anxiolytiques, notre laboratoire a réussi à en isoler une qui exerce une activité de type anxiolytique dans le FPT, et conserve cette activité anti-punitrice lors du protocole de test-retest. Il s'agit du DOI (Nic Dhonnchadha et al., 2003a).

II. Phénomènes de mémoire aversive

Lors d'un retest dans le FPT, une forte diminution du nombre de passages punis acceptés est observée. Cette modification du comportement exploratoire est appelée « mémoire aversive » (Hascoet et al., 1997). L'animal a adapté sa réponse à l'environnement, à l'aide des éléments mémorisés lors du prétest.

Au cours de nos travaux, nous avons pu montrer que cette mémoire aversive était légèrement altérée lors de l'injection avant le retest, de sulfate d'atropine, une molécule aux propriétés amnésiantes (Ripoll et al., 2005). De plus, notre équipe a aussi mis en évidence un effet faible de la scopolamine, injectée avant le retest sur la mémoire aversive (Hascoet et al., 1997). Par contre dans l'EPM, la scopolamine, utilisée à dose amnésique peut

annuler la modification de la réponse comportementale lors du retest, si elle est administrée avant ou après le premier test (Bertoglio and Carobrez, 2004). Ce résultat n'a pas été retrouvé lors d'une injection de scopolamine après le prétest dans l'EPM (Rodgers et al., 1996). Ces résultats tendent à montrer qu'il existe bien une mémoire aversive, mais que son étude est difficile, notamment du fait de sa cinétique rapide puisqu'en 24 heures, nous observons une modification de la réponse comportementale.

De plus, le niveau de base observé lors du retest dans le FPT ne permet pas d'étudier les molécules promnésiques, afin de déterminer leur effet sur le nombre de passages, de même que pour les molécules entraînant un effet de type anxiogène. Il a été conclu par notre équipe que le protocole de test-retest dans le FPT ne permettait pas d'étudier la mémoire (Hascoet et al., 1997).

Dans une étude récente, une équipe a testé l'effet de l'exposition à trois chocs électriques inévitables sur les constantes physiologiques chez la Souris, ainsi que le comportement dans un test d'EPM effectué 5 minutes ou 24 heures après ce stress. Ils ont constaté une forte stimulation de l'axe hypothalamo-hypophysaire dès 5 minutes après les chocs, mis en évidence par une élévation de la concentration plasmatique de corticostérone chez la souris, qui revenait au niveau basal 2 heures après ce stress. Par ailleurs, ils ont démontré que le stress produit par les chocs électriques n'entraînait pas de modifications de l'utilisation des données spatiales acquises 24 heures auparavant, mais diminuait celle des données contextuelles et variables (Celerier et al., 2004b). Chez le Rat, une étude similaire a permis de démontrer que la quantité de corticostérone augmentait après une exposition au test, chez des animaux naïfs ou expérimentés. Les auteurs ont ainsi constaté qu'il n'existait pas d'habituation chez les animaux pré-exposés (File et al., 1994).

Toutes ces données tendent à prouver qu'il existe une mémoire de l'aversion envers le modèle. Elle semble être soumise à une cinétique complexe, puisqu'en fonction de l'instant de l'injection (avant ou après le prétest), elle peut être annulée ou non par la scopolamine ou le sulfate d'atropine. Par contre, elle semble potentialisable, comme cela a été démontré dans l'EPM. Ce résultat n'est pas reproductible dans le FPT, à cause de la trop faible valeur de base des témoins retestés non traités.

Il est important de retenir qu'il existe une information, stockée dans une structure, qui est disponible lors du retest et semble responsable de la modification du comportement, et

peut-être en partie de la «one-trial tolerance». Cette information est conservée à long terme et son utilisation dépend des facteurs temporels et environnementaux lors du prétest et du retest. Il est possible que les indices, récoltés par l'animal lors de la découverte du test, conservent une forte composante émotionnelle, liée à l'aversion envers cet environnement à la néophobie. Cette dimension émotionnelle pourrait utiliser une forme de mémoire insensible aux traitements amnésiants classiques.

III. Structures cérébrales de l'anxiété

Les troubles anxieux semblent impliquer en grande partie le système cérébral de la peur (LeDoux, 1996; LeDoux, 2000; Ohman, 1992). Grâce à différents modèles animaux, les chercheurs commencent à comprendre les structures anatomiques influençant l'anxiété. Deux théories englobent ces résultats : la première est qu'il existe un système particulier pour chaque type d'anxiété. La seconde suppose que la gestion de l'anxiété soit hiérarchisée entre différents niveaux d'organisation. Par exemple, les réponses automatiques simples sont traitées par des structures inférieures comme la substance périaqueducale grise (PAG), le locus coeruleus ou l'hypothalamus, alors que les réponses plus complexes font intervenir des structures intermédiaires (amygdale et système septo-hippocampique) (Graeff, 2004). Dans des situations nécessitant des capacités cognitives plus importantes, les régions corticales plus hautes (cortex paralimbique) seraient utilisées (Sandford et al., 2000).

A l'aide de lésions cholinergiques chez le Rat dans l'EPM, une équipe a mis en évidence que les structures telles que l'hippocampe ou le cortex frontal étaient plutôt impliquées dans la mise en place des comportements exploratoires, afin d'acquérir et de conserver des informations spatiales. Au contraire, ces structures paraissent moins liées à l'expression de l'anxiété dans ce test (Lamprea et al., 2000).

Dans notre travail, nous nous sommes focalisés sur trois structures : l'amygdale, la PAG et l'hippocampe (Fig. 1).

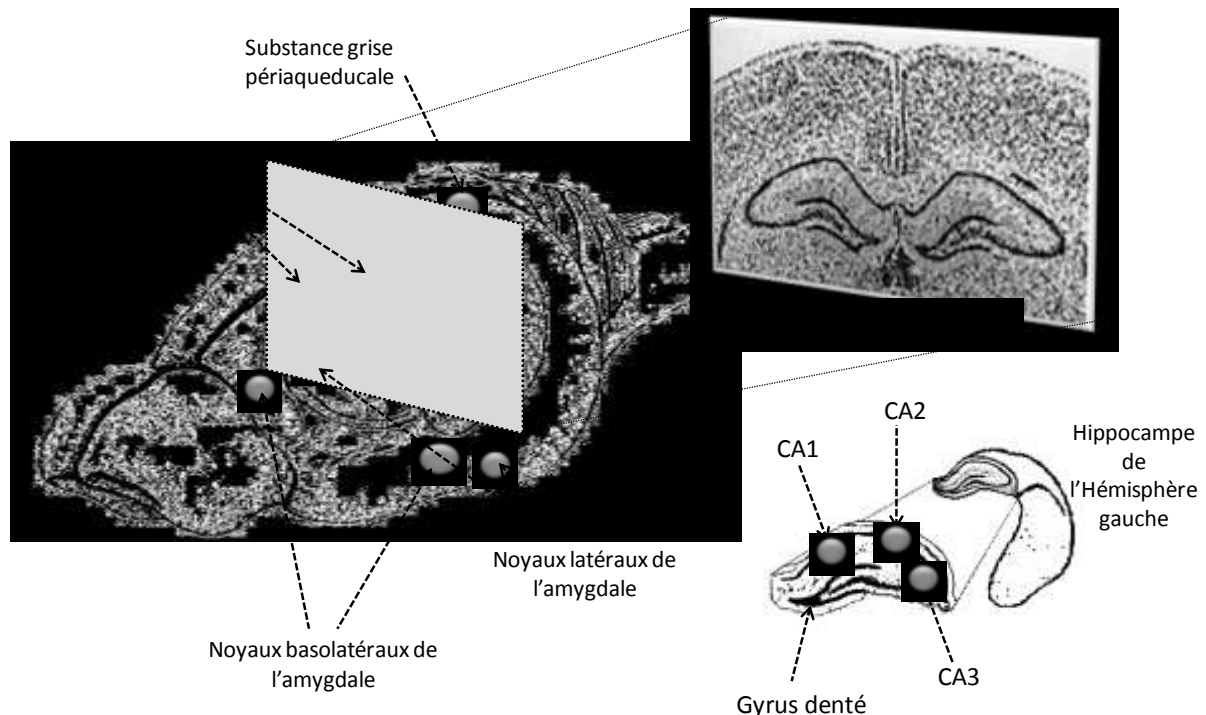


Figure 1 : Représentation schématique du cerveau de rongeur, permettant de localiser les zones d'injections localisées dans les structures étudiées. Les noyaux de l'amygdale, ainsi que la PAG ne sont pas représentés dans leur intégralité, seuls les points d'injections ont été placés sur la figure.

modifié d'après (Amaral and Witter, 1995; Paxinos and Watson, 1998)

A. L'amygdale

Cette structure complexe est composée de 13 noyaux recevant des afférences de différentes aires cérébrales et semble capable d'intervenir dans l'acquisition rapide de comportements basés sur des événements ayant un impact sur l'organisme et un impact émotionnel (McDonald and White, 1993). Parmi ces différents noyaux, trois sont plus particulièrement impliqués dans les circuits de la peur conditionnée : le noyau basal, le noyau latéral et le noyau central (Garakani et al., 2006). L'amygdale semble fortement impliquée dans la gestion des situations imprévisibles, ainsi que dans la peur conditionnée. De plus, elle semble capable de réagir proportionnellement à l'intensité du stimulus perçu. Ainsi, des chercheurs ont constaté une augmentation du comportement d'immobilisation (« freezing »), ainsi que de la quantité d'ARM *egr-1* (early growth response gene, un gène induit par les situations de peur conditionnée), de manière corrélée à l'intensité des chocs

électriques plantaires reçus par le Rat (Hasunuma et al., 1991). Des informations sensorielles provenant de différentes aires corticales aboutissent au noyau latéral et au noyau basolatéral de l'amygdale, qui en retour, projettent vers le noyau central de l'amygdale (Garakani et al., 2006). Le noyau latéral semble être responsable de la consolidation de la mémoire et de la plasticité dans la mémoire conditionnée (Garakani et al., 2006). Cet ensemble de noyaux forme un système complexe régulant la peur et impliquant l'expression et l'acquisition de la peur conditionnée (Davis 1997). Le noyau basolatéral sert, par ailleurs, de connexion entre le noyau latéral et le noyau central. Ce dernier projette vers plusieurs aires intervenant dans l'expression de l'anxiété et de la peur. De plus, cette structure semble constituer une interface entre les stimuli sensoriels externes et la réponse motrice nécessaire à l'apprentissage et aux réponses comportementales induites par la peur. Ce noyau semble donc lié à la détection et à la validation des stimuli menaçants (Moreira et al., 2007). Des lésions du noyau latéral ou central peuvent modifier l'acquisition de peur conditionnée, et des lésions du noyau basolatéral peuvent aussi affecter les réponses de peur, ou l'aspect sensoriel d'événements neutres d'un point de vue émotionnel (Dwyer and Killcross, 2006; Garakani et al., 2006). Lors d'expositions à des stimuli stressants, une formation de nouveaux pics dendritiques est apparemment possible dans le noyau basolatéral, qui peut-être considéré comme un lieu de stockage des mémoires liées à la peur, pourtant il ne semble pas y avoir de formation efficace 24 heures après l'exposition à un stress d'immobilisation aigu chez le Rat (Mitra et al., 2005). L'exposition à un stimulus auditif non prédictible paraît activer le noyau baso-latéral et déclencher une augmentation des comportements anxieux dans l'EPM chez le Rat (Lowry et al., 2005). Le noyau central et basolatéral semblent fortement impliqués dans l'acquisition et l'expression de la peur envers des stimuli conditionnés à l'aide de chocs électriques (Waddell et al., 2006).

Il existe de nombreuses relations entre l'amygdale et les systèmes impliqués dans la réaction face à un stimulus déclenchant la peur (Fig. 2). Ainsi, il existe un lien entre l'amygdale et le système nerveux sympathique (hypothalamus) (LeDoux, 2000), les paramètres hémodynamiques (nerf vague, tractus solitaire, moelle ventrale) (Gray et al., 1989; Schwaber et al., 1982; Takeuchi et al., 1983; Veening et al., 1984), le système respiratoire (noyau parabrachial) (Takeuchi et al., 1982), le système endocrine (noyau paraventriculaire ou strie terminale) (Gray et al., 1989).

Dans le cadre de l'étude des processus anxieux, nous nous intéressons plus particulièrement aux monoamines. Il est important de constater qu'il existe des projections directes de l'amygdale vers le locus coeruleus (système noradrénergique), ou indirectes par l'intermédiaire des neurones sérotoninergiques du raphé (système sérotoninergique), impliquées dans les performances motrices durant la peur (McCall and Aghajanian, 1979; White and Neuman, 1980). Enfin il existe des projections entre certaines aires de l'hippocampe ventral (CA1 et le subiculum) et les noyaux basolatéral et basomédian de l'amygdale (Canteras and Swanson, 1992).

Afin de mettre en évidence l'influence d'une structure sur le comportement d'un animal, deux possibilités peuvent être envisagées : la lésion ou la stimulation. En travaillant par le biais de lésions de l'amygdale, l'ensemble des résultats concorde pour constater une diminution de l'anxiété chez différentes espèces. Ainsi, cette lésion chez le Rat abolit complètement la réponse défensive innée face à un chat (Blanchard and Blanchard, 1972). Une absence de néophobie a été rapportée chez la Souris lésée, lors de son introduction dans un environnement nouveau (Misslin, 2003).

Chez les primates, des observations similaires ont été rapportées. La période d'évaluation d'un nouvel objet placé dans la cage d'un singe, ainsi que les réactions d'évitement face à un serpent, réactions normalement observées chez le singe, sont abolies chez les animaux lésés (Amaral, 2002).

A l'inverse, chez le Rat, la stimulation électrique du noyau basolatéral entraîne un effet de type anxiolytique, dans un modèle d'EPM ou d'enfouissement défensif (Saldivar-Gonzalez et al., 2003). De même, l'activation des récepteurs GABA_A par une injection localisée de BZD, de buspirone, un agoniste partiel des récepteurs 5-HT_{1A}, d'antagonistes des récepteurs 5-HT₃, d'alcool, de nicotine, de morphine et de SCH23390 (antagoniste D1 dopaminergique) dans l'amygdale induit des effets de type anxiolytique dans le test de la double enceinte illuminée chez la Souris (Costall et al., 1989). Dans le test de Vogel, d'interaction sociale et dans l'EPM, cet effet apparaît après une administration locale de BZD dans le noyau latéral et le noyau basolatéral (Gonzalez et al., 1996; Thomas et al., 1985; Zangrossi Junior and Graeff, 1994). A l'inverse, en injectant des antagonistes des récepteurs GABA_A, picrotoxine et bicuculline, dans le noyau basolatéral antérieur de l'amygdale, un effet de type anxiogène est observé dans le test d'interaction social, alors qu'aucun effet de ce type n'est apparu en ciblant le noyau central (Sanders and Shekhar, 1995).

L'injection d'agonistes du sous type de récepteurs 5-HT_{2C} à ce même niveau semble, à l'opposé, avoir des effets de type anxiogène dans l'« open field » (Campbell and Merchant, 2003), toutefois ce test apparaît comme peu à même de distinguer des effets de ce type.

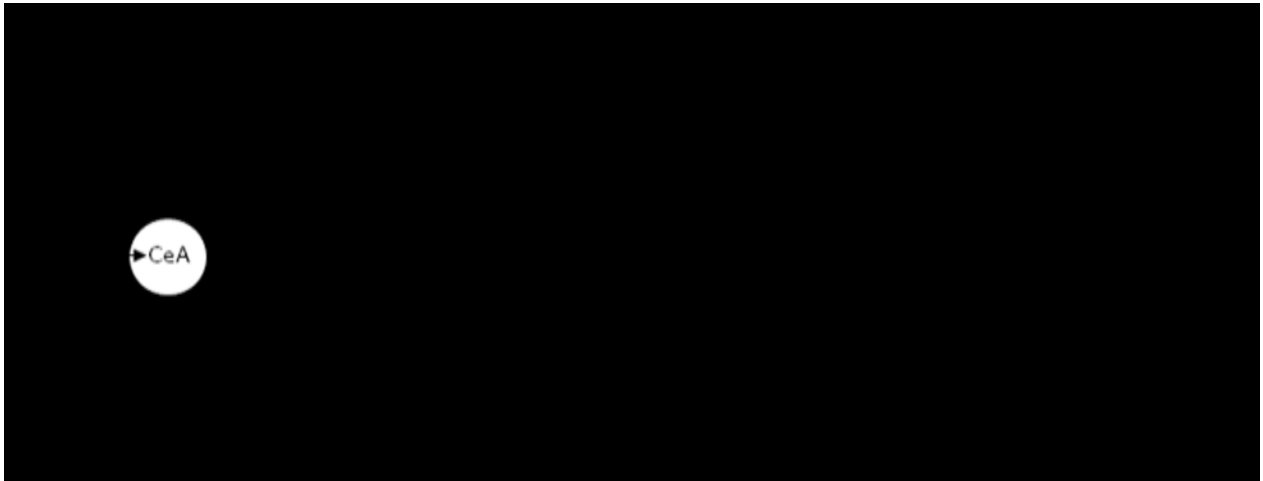


Figure 2 : Représentation des nombreuses projections du noyau central de l'amygdale vers des aires pouvant intervenir dans les conséquences comportementales, autonomiques et électrophysiologiques de la peur et de l'anxiété. (BLA = noyau basolatéral de l'amygdale ; CeA = noyau central de l'amygdale).

d'après (Walker et al., 2003)

B. La PAG (Substance Grise Periaqueducule)

De nombreuses études ont mis en évidence une implication majeure de la PAG dans les réactions d'anxiété et de peur (Bertoglio et al., 2005).

La PAG contient une grande quantité de neurones GABAergiques, ce qui présuppose un rôle dans l'aversion et l'anxiété. Ainsi, en administrant localement un agoniste du site benzodiazépinique des récepteurs GABA_A, le midazolam, nous observons un effet de type anti-panique dans le labyrinthe en T surélevé ainsi qu'un effet de type anxiolytique dans l'EPM. De plus, le FG 7142 entraîne des effets de type anxiogène lors de son injection localisée dans la PAG (Bueno et al., 2005; Russo et al., 1993). De même, l'injection d'antagonistes du site au BZD des récepteurs GABA_A produit une augmentation de la décharge des neurones de la PAG (Behbehani et al., 1990). De plus, il a été observé des relations étroites entre l'amygdale et la PAG dans les mécanismes impliqués dans la gestion des stimuli liés à la peur (Fanselow, 1991; Martinez et al., 2007).

Chez l'Homme, la stimulation de la PAG engendre de la peur (Nashold et al., 1969). En stimulant la zone rostrale de la PAG, des comportements de fuite et des vocalisations ont

été observées chez le Rat et le Chat (Behbehani, 1995). Dans la zone caudale, une stimulation entraîne une immobilisation chez l'animal (Bandler and Carrive, 1988).

Il a été suggéré que dans une situation dangereuse, les régions de l'amygdale sont activées et stimulent la PAG à l'aide de leurs projections directes, processus entraînant des réactions de défense (Fanselow, 1991). Behbehani et son équipe ont émis l'hypothèse qu'en présence de signaux de danger, les projections de l'amygdale activent la région ventrale de la PAG, déclenchant alors une posture de prostration. Par contre, en présence d'un danger immédiat (un rat se retrouve face à un chat), c'est la région latérale de la PAG qui serait activée par l'amygdale et produiraient une réaction de fuite souvent associée à des vocalisations (Behbehani, 1995).

Une étude de la «one-trial tolerance» a consisté en une injection de lidocaïne dans la PAG, afin d'inactiver temporairement ce tissu. Cette injection a été pratiquée chez le Rat avant ou après le prétest, ou avant le retest. Lors du retest, les animaux ont reçu une injection de midazolam. Dans ce contexte, les auteurs ont constaté que seules les injections précédant le retest modifiaient la «one-trial tolerance» au midazolam. Ils ont conclu qu'une augmentation de l'activité de la PAG durant le retest pouvait être responsable de la perte d'effet de type anxiolytique du midazolam (Bertoglio et al., 2005).

C. L'hippocampe

L'hippocampe est constitué de différentes régions formant une structure fonctionnellement hétérogène, vraisemblablement à cause de leurs connectivités respectives et de leurs étroites interconnexions (Moser and Moser, 1998). Nous pouvons distinguer principalement la corne d'Ammon (en rappel de la forme des cornes de bélier du dieu gréco-égyptien Ammon), constituée de 3 aires : CA1, CA2 et CA3, ainsi que le gyrus denté. Parmi les nombreuses connections avec d'autres structures, l'hippocampe est relié à l'amygdale, au noyau du raphé et au locus coeruleus (File et al., 1999). Cette structure appartient au circuit neural responsable de l'expression des états aversifs, proposé par Graeff, avec l'amygdale, la substance grise périventriculaire grise et la PAG (Graeff, 1981).

Il semble d'ailleurs qu'il existe une relation étroite entre l'hippocampe et l'amygdale dans les tâches de discriminations spatiales (Gaskin and White, 2006). Dans le cadre des interactions entre ces structures, l'hippocampe semble supprimer ou interférer avec les comportements stimulus-récompense et d'exploration qui sont en partie médiés par le noyau latéral de

l'amygdale (White and McDonald, 1993). Certains chercheurs émettent ainsi l'hypothèse qu'il existe une compétition entre les structures cérébrales impliquées dans la mise en place d'une réponse comportementale ; par exemple l'hippocampe et l'amygdale lors d'un test de conditionnement préférentiel à l'aide d'indices spatiaux, dans l'acquisition et le traitement de l'information extérieure en rapport avec la situation (McDonald and White, 1995).

Des lésions effectuées par injections d'acide iboténique ont permis de mettre en évidence un rôle majeur de l'hippocampe dorsal dans la peur conditionnée et les tâches liées à une mémoire spatiale (utilisation d'indices visuels et spatiaux) (Celerier et al., 2004a).

Apparemment, il existe une opposition entre l'hippocampe et l'amygdale dans la réponse au stress ; en effet, alors que le premier inhibe l'axe hypothalamo-hypophysaire lors d'un processus aversif, l'amygdale a plutôt tendance à le stimuler (Govindarajan et al., 2006).

Par ailleurs, l'hippocampe dorsal exerce un rôle important dans l'anxiété. Ainsi, il semble impliqué lors du retest dans l'EPM chez le Rat, alors qu'il ne paraît pas agir sur la réponse comportementale déclenchée par l'exposition au nouvel environnement lors du prétest. Il peut néanmoins avoir un effet indirect lors de la découverte du test (File et al., 2000).

Matériel et Méthodes

A. Animaux et substances utilisées

1) Animaux

Les animaux utilisés tout au long de ce travail sont des souris mâles de souche Swiss issus de l'élevage JANVIER, Le Genest, France. Les animaux sont réceptionnés et hébergés dans l'animalerie du laboratoire pendant 4 à 7 jours avant les expérimentations, par groupe de 18 animaux dans des cages de dimensions 40 × 28 × 17 cm, avec eau et nourriture distribués ad libitum. La température de l'animalerie est maintenue à 21 ± 1 °C et le cycle d'éclairage est un cycle standard (lumière entre 7h et 19h).

Chaque groupe expérimental est constitué de 12 animaux naïfs au test dont la masse à la réception est homogène (14 ± 2 g). Lors du premier test, les animaux ont une masse de 20 ± 2 g, et un âge de 4 semaines. Les expérimentations sont réalisées le matin entre 7 et 13h.

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

2) Molécules utilisées

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

Agonistes du site aux benzodiazépines des récepteurs GABA_A : diazépam [(7-chloro-1-méthyl-5-phényl-3H-1,4-benzodiazépine-2[1H]-one)] (Sigma, France).

Anesthésique local, inhibiteur réversible des canaux sodiques des tissus neuronaux : lidocaïne, HCl 2-(diéthylamino)-N-(2,6-diméthylphényl) acétamide.

B. Administration des traitements

1) Injections intra-péritonéales

Lors des études par injections intra-péritonéales (i.p.), les ligands sont administrés sous un volume de 0.5ml/20g de poids corporel, 30 minutes avant le début du test. Les animaux témoins reçoivent le même nombre d'injections que les animaux traités, mais uniquement avec de l'eau distillée. Ce choix du véhicule a été effectué par commodité, suite à des études

préliminaires (non publiées) révélant une absence d'effet de l'injection d'eau distillée comparée à du liquide physiologique ou une solution aqueuse contenant 5% de Tween 80 (Merck, Allemagne) ou même une absence d'injection lors du prétest ou du retest.

Le DOI est dissout dans de l'eau distillée, à l'inverse du diazépam qui est mis en suspension dans une solution aqueuse contenant 5% de Tween 80 (Merck, Allemagne).

2) Injections locales au niveau de structures cérébrales

(a) Anesthésie

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

(b) Dispositif d'injection

Le dispositif d'injection est constitué d'un guide-canule (tube en acier inoxydable de 0,60 mm de diamètre externe et de 0,35 mm de diamètre interne, de 7 à 11 mm de long selon la structure cérébrale visée) (UNIMED, Suisse). Les canules d'injection sont constituées d'un tube d'acier inoxydable (0,30 de diamètre externe et 0,15 de diamètre interne, 18 à 25 mm de long selon la structure cérébrale visée) coulissant parfaitement dans le guide canule. La longueur de la canule est ajustée de façon à ce qu'elle ne dépasse pas du guide-canule lors de l'injection. Ainsi, le produit injecté est libéré précisément à l'emplacement de la terminaison du guide-canule.

Après l'implantation du guide canule, un fil d'acier (0,28 mm de diamètre) est placé à l'intérieur du guide-canule afin d'éviter son obstruction. Celui-ci est adapté précisément à la longueur du guide-canule, et est retiré 30 minutes avant l'insertion de la canule d'injection, le jour du test.

(c) Chirurgie stéréotaxique

Les animaux sont fixés au cadre stéréotaxique à l'aide de barres d'oreilles. Le crâne est incisé et mis à nu. Les tissus conjonctifs qui le recouvrent sont éliminés par application d'eau oxygénée. L'emplacement du ou des guide-canules (selon la latéralisation de la structure) est déterminé grâce aux repères stéréotaxiques que constituent les sutures de la boîte crânienne. Les coordonnées des structures sont déterminées à partir de l'atlas stéréotaxique

(Franklin and Paxinos, 1997). Pour assurer la fixation du guide-canule, un ciment dentaire verre ionomère GC Fuji IX (Henri Shein, France) est appliqué sur la boîte crânienne de l'animal. Enfin le guide-canule est obturé par le fil d'acier. L'animal est ensuite placé dans une cage individuelle pendant 3 jours pour la récupération puis replacé par groupes de 6 animaux. Le passage dans le test comportemental se fait 7 jours après l'opération.

Les coordonnées utilisées pour le positionnement du guide-canule sont :

- pour l'hippocampe CA1 (Corne d'Ammon) : antéro-postérieurité - 2 mm, latéralité +/- 1 mm, profondeur 1,5 mm
- pour l'hippocampe CA2 : antéro-postérieurité - 2,5 mm, latéralité +/- 1,75 mm, profondeur 2 mm
- pour l'hippocampe CA3 : antéro-postérieurité - 2,5 mm, latéralité +/- 2,9 mm, profondeur 2,5 mm
- pour l'amygdale noyau baso-latéral (BLA) : antéro-postérieurité - 1,4 mm, latéralité +/- 2,9 mm, profondeur 4,9 mm
- pour l'amygdale noyau latéral (LA) : antéro-postérieurité - 2 mm, latéralité +/- 3,25 mm, profondeur 4,25 mm
- pour la PAG : antéro-postérieurité - 4,6 mm, latéralité 0 mm, profondeur 2 mm

(d) Préparation de la solution

Le DOI est dissous dans une solution de fluide cérébro-spinal artificiel (aCSF). Les souris témoins reçoivent une injection locale d'aCSF. Le diazépam est utilisé sous sa forme injectable, disponible en ampoule à la concentration de 5mg/mL (Renaudin, France).

(e) Procédure d'injection

La canule d'injection est reliée à une seringue Hamilton de 2 µl par un cathéter. La seringue et le cathéter sont remplis soit d'aCSF pour les souris témoins, soit de la solution à injecter pour les souris injectées. Le fil d'acier obturant le guide-canule est retiré 30 minutes avant l'injection. La canule d'injection est placée au dernier moment sur la souris isolée et vigile. Le volume et la vitesse d'injections dépendent du produit et de la structure considérée. Pour l'amygdale, toutes les injections ont un volume de 0,3 µL par côté à une vitesse de 0,2 µL/minute. Pour l'hippocampe, le DOI est injecté avec un volume de 0,5 µl par côté avec une vitesse d'injection de 0,5 µl/minute, le diazépam à un volume de 0,3 µl par côté avec une

vitesse de 0,2 µl/minute. Dans la PAG, les paramètres sont identiques à ceux de l'hippocampe, mais une seule injection est pratiquée. Les souris sont exposées au test comportemental immédiatement après la fin de l'injection.

(f) Contrôle histologique

Une dizaine de souris après chaque expérimentation sont injectées avec du bleu de méthylène à volume et vitesse identiques à ceux utilisés pendant l'expérimentation puis sont sacrifiées par dislocation cervicale. Les animaux sont ensuite décapités, les cerveaux sont extraits et plongés pendant 1 minute dans de l'isopentane (Sigma, France) maintenu à -35°C à l'aide de carboglace afin de fixer les tissus. Les cerveaux sont coupés au cryostat avec une épaisseur de 40 µm. Ceci permet la vérification du protocole d'opération et d'injection.

C. Modèles comportementaux

1) Procédure générale

Les tests sont réalisés entre 7h et 13h dans des pièces calmes. Les souris sont placées dans la salle d'expérimentation au moins 1h avant le début du test dans des cages par groupe de 6 souris. En cas de traitement par voie intra-péritonéale, les souris sont replacées dans la même cage après chaque piqûre afin que les animaux s'acclimatent à ce nouvel environnement et que la réponse néophobique soit minimisée au maximum. Chaque groupe de traitement est constitué de 12 souris.

2) Test d'actimétrie (Boissier and Simon, 1965)

L'activité locomotrice spontanée des animaux naïfs de chaque molécule utilisée est déterminée dans un actimètre (Boissier and Simon, 1965). L'appareil est composé de compartiments munis de cellules photoélectriques qui constituent deux faisceaux (Fig. 3). Les ruptures de ces faisceaux sont comptabilisées pour témoigner de l'activité horizontale de l'animal. Cette activité est classiquement enregistrée sur une durée de 10 minutes. Pour les vérifications d'activité locomotrice liée aux opérations et injections, la durée est réduite à 75 secondes, correspondant à celle du test comportemental, ceci afin de limiter les effets de diffusion du produit dans les tissus cérébraux. Le test d'actimétrie est réalisé indépendamment du FPT, sur des souris différentes, ce qui permet de supprimer les doses trop sédatives ou trop stimulantes.



Figure 3 : Test d'actimétrie

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

L'appareillage (BIOSEB, Chaville, France) est constitué d'une cage (18 cm × 25 cm × 16 cm) dont le sol est composé de quatre plaques en métal (8 cm × 11 cm) séparées les unes des autres par un espace de 8 mm (Fig. 4). Ces quatre plaques sont reliées à un générateur de chocs électriques. Les chocs administrés ont une intensité de 0.6 mA et une durée de 0,5 secondes.

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

Concernant le test-retest, le FPT est appliqué sur des souris naïves lors du premier jour, appelé « Test ». Les souris sont ensuite replacées dans les mêmes groupes de 6 individus. Après un intervalle de 24 heures, un second FPT est pratiqué sur les souris. Par ailleurs, des souris naïves témoins sont utilisées durant ce second jour de test, appelé « Retest ».

Dans certaines études de ce travail, des protocoles modifiés ont été utilisés pour le test et / ou pour le retest. Afin de déterminer l'importance relative des facteurs punitions et environnement, nous avons pratiqué des expérimentations en test-retest avec ou sans chocs électriques lors d'une ou des deux sessions, ou en modifiant l'environnement du test. Dans une seconde étude, nous avons modifié les paramètres temporels du test ou du retest, avec ou sans punitions électriques. Ainsi, nous avons exposé les souris à des durées de prétest variant de 15 secondes à 135 secondes. Le paramètre intervalle de temps entre test et retest a aussi été testé, afin de connaître la chronologie des phénomènes observés.

Protocole de test-retest : Dans le protocole classique de test-retest, les souris sont marquées et mises en cage par 6 animaux, une heure avant le test. Elles reçoivent une injection de véhicule, 30 minutes avant le test, puis subissent un FPT. Le lendemain, les animaux sont replacés dans la pièce d'expérimentation une heure avant le retest, injectés avec les traitements 30 minutes avant le test, puis retestés dans le FPT.

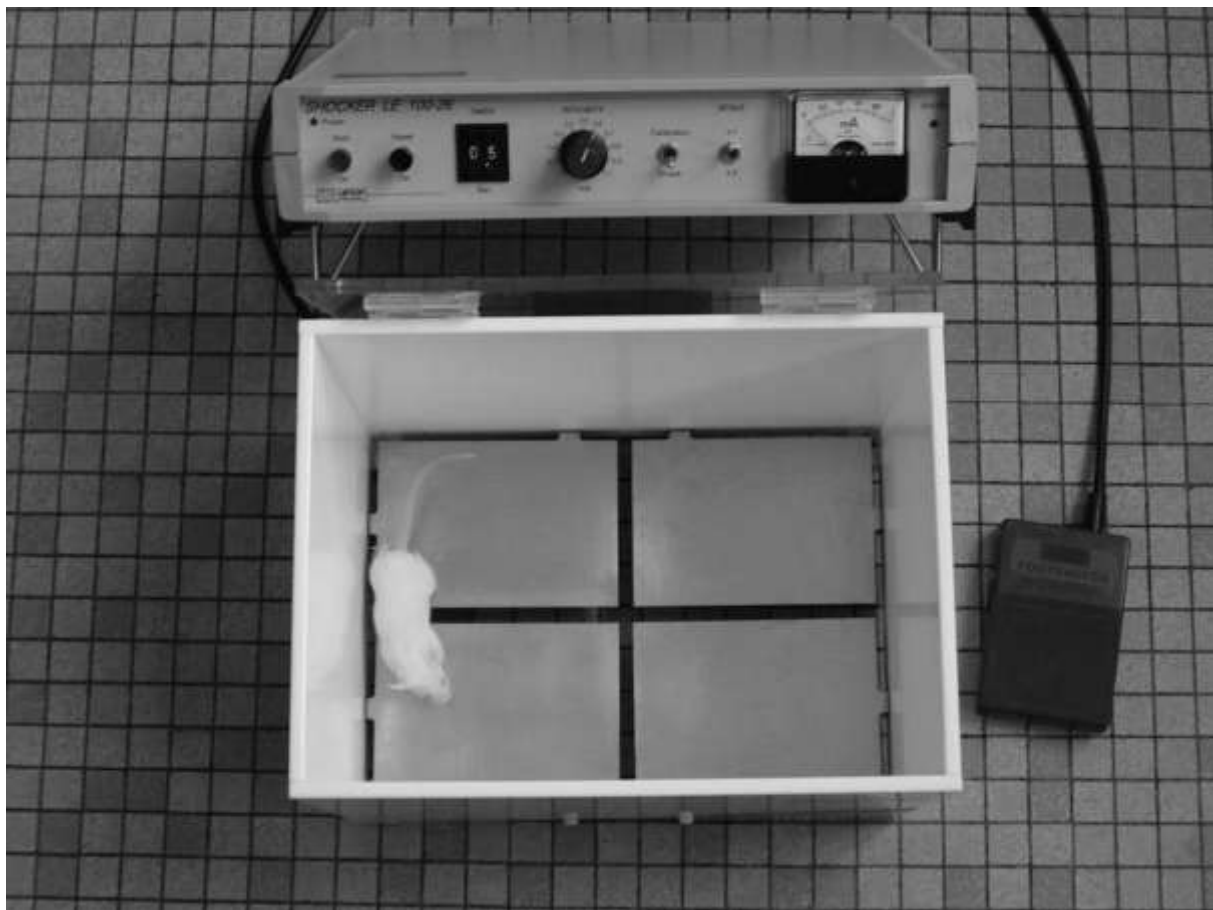


Figure 4 : Test des quatre Plaques

D. Analyses neurochimiques

1) Prélèvement des structures

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



Figure 5 : Plaque réfrigérante

2) Mesure de la concentration de neurotransmetteurs cérébraux

Chaque structure est placée dans un tube de polypropylène d'une capacité de 1,5 mL préalablement pesé. Dans chacun des tubes, nous ajoutons une solution acide contenant 8,8 mg d'acide ascorbique et 122mg d'EDTA (éthylène diamine tétracétate) dans 1 litre d'acide perchlorique 0,1 M. Pour les tubes contenant l'hypothalamus et l'hippocampe, 600 µL sont ajoutés, et 1200µL pour les tubes contenant le striatum et le cortex. Les tissus sont ensuite broyés par ultra-sonication (Branson Sonifer) puis centrifugés à 12000g pendant 10 minutes à une température de + 4°C (Hareus Biofuge). Le surnageant est enfin prélevé puis stocké à – 80°C avant l'analyse HPLC (chromatographie en phase liquide à haute performance).

Le système de chromatographie liquide haute performance est constitué d'une pompe isocratique Thermo Separation Product (Fremont, CA, USA) modèle P100, d'un injecteur automatique réfrigéré Varian (Sunnyvale, CA, USA) Prostar modèle 400, d'un détecteur ampérométrique Hewlett Packard (Palo Alta, CA, USA) modèle 1049A et d'une colonne C18 (Nucleosil, taille des particules 5 µm, 15 cm, Colochrom , Gagny , France). Le débit de la pompe est de 1,0 mL/minute, la durée d'analyse est de 35 minutes (les temps de rétention sont 4,9 minutes, 11 minutes et 30 minutes pour respectivement la noradrénaline, la dopamine et la sérotonine).

La phase mobile est composée de 4,2 g/L d'acide citrique monohydraté, 6,8 g/L d'acétate de sodium trihydraté, 0,8 g/L d'acide octane sulfonique, 0,05 g/L d'EDTA, 0,02 % (v/v) de dibutyl amine, 7%(v/v) de méthanol. Le volume injecté par l'injecteur est de 50 µL et le potentiel de détection est de 0,5 Volt. Pour chaque série d'analyse, une gamme constituée d'un mélange de noradrénaline, dopamine, sérotonine est préparée dans la solution d'homogénéisation. Les courbes de calibration sont calculées par régression linéaire. Les concentrations cérébrales sont exprimées selon le rapport entre la concentration en amine extraite dans le surnageant et la masse de la structure cérébrale.

Les méthodes de dosage ont été mises en place dans le cadre d'une étude de l'impact de déplétions pharmacologiques sur les monoamines, et ont donné lieu à la publication d'un article auquel j'ai participé (Dailly et al., 2006), et placé à la fin de ce chapitre.

E. Analyse statistique

Les analyses statistiques sont réalisées grâce au programme SPSS. Les résultats sont exprimés sous forme de moyenne des valeurs observées (nombre de coupures de faisceau) dans le test d'actimétrie. Dans le FPT, les résultats sont exprimés sous forme de moyenne $\pm$ écart standard à la moyenne (sem). Le paramètre étudié dans ce test est le nombre de passages punis acceptés par les souris. La normalité et l'homoscédasticité des données ont été vérifiées préalablement sur les résultats de chaque étude.

1) Etudes comportementales : Test des quatre plaques

Les données des études sont analysées grâce à une ANOVA à deux facteurs (traitement au premier essai x traitement au second essai). Lorsque l'ANOVA révélait une interaction significative entre les deux facteurs ($p < 0.05$), un test à posteriori de Sidak a été utilisé pour comparer l'effet des facteurs indépendamment et en interaction. En l'absence de résultat significatif au niveau de l'interaction des deux facteurs de l'ANOVA, une nouvelle ANOVA deux-facteurs a été effectuée, en suivant un modèle additif. Ce test permet de supprimer la valeur d'interaction, afin de connaître les effets de chacun des facteurs indépendamment. Dans le cas d'une différence significative entre les deux facteurs, un test à posteriori de Sidak a été utilisé afin de connaître les effets de chaque facteur.

2) Etudes comportementales : Actimétrie

Les données des études sont analysées grâce à une ANOVA à un facteur. Lorsqu'un résultat significatif était trouvé, un test à posteriori de Sidak a été utilisé, afin de déterminer les groupes dont les résultats sont significativement différents des autres.

3) Etudes neurochimiques

Pour comparer les concentrations de chaque neurotransmetteur dans chacune des structures étudiées, nous avons utilisé une ANOVA à 1 facteur, suivie d'un test à posteriori de Sidak dans le cas d'une différence significative.

Specificity and efficacy of noradrenaline, serotonin depletion in discrete brain areas of Swiss mice by neurotoxins

Eric Dailly*, Franck Chenu, Benoit Petit-Demoulière, Michel Bourin

EA Neurobiologie de l'Anxiété et la Dépression, Faculté de Médecine de Nantes, Laboratoire de Pharmacologie Clinique,
Institut de Biologie, Centre Hospitalier Universitaire, 9 quai Moncousu, 44093 Nantes Cedex 1, France

Received 3 May 2005; received in revised form 6 June 2005; accepted 8 June 2005

Abstract

The aim of this work is to define neurotoxins doses to have efficient and specific depletion of noradrenaline (NA), serotonin (5-HT) neurotransmission in cortex, striatum, hippocampus and hypothalamus of Swiss mice after intraperitoneal administration of, respectively, *N*-(2-chloroethyl)-*N*-ethyl-2-bromobenzylamine hydrochloride (DSP-4) and *para*-chlorophenylalanine methyl ester hydrochloride (PCPA). The neurotransmitters concentrations were determined by high performance liquid chromatography with amperometric detection. The minimal single dose necessary to produce a highly significant decrease of NA levels ($p < 0.01$ in comparison with control group) in hypothalamus (–44%), hippocampus (–91%), striatum (–40%) and cortex (–68%) was 50 mg/kg but DA and 5-HT levels were modified, respectively, in hypothalamus and striatum. Three doses of PCPA 300 mg/kg over 3 consecutive days involve a profound depletion of 5-HT transmission in all discrete brain areas but NA and DA levels were also significantly reduced. In conclusion, DSP-4 has a different efficacy in discrete brain areas with a noradrenergic specificity which is not absolute, PCPA has a similar efficacy in all brain areas but is unspecific of 5-HT transmission.

© 2005 Elsevier B.V. All rights reserved.

Keywords: Noradrenaline; Serotonin; Swiss mice; Depletion

1. Introduction

The depletion of noradrenaline (NA) or serotonin (5-HT) neurotransmission in brain by neurotoxins are methods commonly used in particular to investigate models of neuropsychiatric diseases in rodents. Thus, Srinivasan and Schmidt (2004) showed the importance of noradrenergic pathophysiology in Parkinson's disease thanks to a Parkinson's animal model with additional noradrenergic lesions. Recently, Slattery et al. (2005) demonstrated that the antidepressant-like properties of GABA (B) receptor antagonists in the forced swim test was abolished by 5-HT depletion. In our laboratory, depletion of NA and 5-HT systems by neurotoxins is used to investigate the mechanism of action of drug in animal models of anxiety, such as the four-plate

test (Bourin et al., 2005). However, the specificity of depletion for a monoamine system is frequently not absolute and the degree of depletion is variable between discrete brain areas, strains and species of rodents which affects the interpretation of results obtained with neurotransmitters depleted animals (Fornai et al., 1996). Moreover, most of these studies which investigated the specificity and efficacy of depletion by neurotoxins were conducted in rats. Swiss mice are a commonly used strain of mice and detailed studies describing the efficacy and specificity of neurotoxins in discrete brain areas in this strain of mice are lacking. The aim of this work is to define optimal doses of neurotoxins to obtain the more efficient and specific depletion of NA or 5-HT system by neurotoxins in Swiss mice. The neurotoxins which were investigated are *para*-chlorophenylalanine methyl ester hydrochloride (PCPA) which crosses blood brain barrier better than *para*-chlorophenylalanine, a serotonergic neurotoxin (Fratta et al., 1973) and *N*-(2-chloroethyl)-*N*-ethyl-2-bromobenzylamine hydrochloride (DSP-4) (Hallman and

* Corresponding author. Tel.: +33 2 40084087; fax: +33 2 40083996.
E-mail address: eric.dailly@chu-nantes.fr (E. Dailly).

Jonsson, 1984) which is usually presented as a selective noradrenergic neurotoxin. Efficacy and specificity of depletion in hippocampus, hypothalamus, striatum and cortex were evaluated by a biochemical approach after intraperitoneal (i.p.) administration of PCPA and DSP-4.

2. Materials and methods

2.1. Chemicals

Ascorbic acid, citric acid monohydrate and sodium acetate trihydrate were purchased from Merck (Darmstadt, Germany). DA, 5-HT, NA, octanesulfonic acid sodium salt, PCPA and DSP-4 were from Sigma (Saint Louis, USA), ethylenediaminetetraacetic acid tetrasodium salt (EDTA) and dibutylamine were from Fluka Chemie (Buchs, Germany) and methyl alcohol for analysis from Carlo Erba (Val de Reuil, France).

2.2. Animals

Experiments were carried out on male Swiss mice (Centre d'élevage Janvier, Le Genest, France) 4 weeks old and weighing 18–20 g. Mice were housed in groups of 18 per cage (40 cm × 28 cm × 17 cm), in the standard conditions of the animal room (20 ± 1 °C, standard light/dark cycle light on at 7 a.m., off at 7 p.m.) with free access to food and water for a period of 1 week before use. Each experimental group consisted of naive randomly grouped mice of the same weight, which were used only once.

2.3. NA and 5-HT depletions

PCPA and DSP-4 were dissolved extemporaneously in distilled water. PCPA (100, 300, 500, 700 and 900 mg/kg) and DSP-4 (10, 30, 50, 70 and 90 mg/kg) were administered i.p., respectively, 72, 48 and 24 h for PCPA and 168 h for DSP-4 before brain dissection under a volume of 25 ml/kg. According to neurotoxins solubility in water, ranges of PCPA and DSP-4 doses were selected to try to reach, respectively, a total depletion of 5-HT and NA systems in brain sections. The control group received only distilled water (three injections for PCPA control group and one injection for DSP-4 control group). For control groups and for each dose of PCPA or DSP-4, the group was composed of 10 animals.

2.4. Preparation of samples

Mice were killed by cervical dislocation without anaesthesia. The brain was rapidly removed from the cranium and dissected on a cooled aluminium apparatus. The brain sections (cortex, striatum, hippocampus and hypothalamus) were weighed into a 1.5 ml polypropylene tube. Six hundred microlitres (for tubes containing hippocampus or hypothala-

mus) of an acid solution (8.8 mg of ascorbic acid and 122 mg of EDTA in 1000 ml of perchloric acid 0.1 M) and 1200 µl (for tubes containing cortex and striatum) were added to each tube. Tissue was then disrupted by sonication. After sonication, the solution was centrifuged at 12,000 × g for 10 min at +4 °C. The supernatant was stored at –80 °C before use.

2.5. HPLC analysis

The HPLC system was composed of an isocratic Varian Prostar model 210 pump (Sunnyvale, USA), a cooled Waters Wisp model 717 autosample injector (Milford, USA), a Decade amperometric detector (Leiden, The Netherlands) with an electrochemical Antec Leyden model VT-03 Flow cell (Zolterwoude, The Netherlands) and a C18 column (Nucleosil, 5 µm particule size, 15 cm, Colochrom, Gagny, France). The chromatographic conditions were (i) a mobile phase composed of 4.2 g/l of citric acid monohydrate, 6.8 g/l of sodium acetate trihydrate, 0.8 g/l of octanesulphonic acid sodium salt, 0.05 g/l of EDTA, 0.02% (v/v) dibutyl amine, 7% (v/v) methyl alcohol (ii) a rate flow of 1.6 ml/min (iii) a total runtime of 25 min, (iv) 20 µl of the supernatant (half diluted in the acid solution for striatum and cortex to avoid the saturation of the detector by DA) were injected into the HPLC system and (v) the potential of detection was 0.48 V. For each analysis, a set of standards containing various concentrations of each compound (NA, DA and 5-HT) was prepared in the acid solution. The calibration curves were calculated by a linear regression. The concentrations of compounds in the supernatant were determined from the peak area of each compound and compared with the standard curve.

2.6. Statistical analysis

Statistical comparisons of the average monoamines levels were performed initially via an one-way analysis of variance (ANOVA) for independent groups, after verifying the normality of distribution by a Kolmogorof–Smirnov non-parametric test. If any statistical change was observed, data was further analysed using post hoc comparisons, with a Fisher test, to detect eventual differences between control and depleted groups.

3. Results

The results of NA, DA and 5-HT depletion by DSP-4 are present in Fig. 1 and Table 1. The minimal dose necessary to produce a highly significant decrease ($p < 0.01$) of NA levels in all discrete brain areas is 50 mg/kg. NA levels decrease in comparison with controls of 44% in hypothalamus, 91% in hippocampus, 40% in striatum and 68% in cortex after administration of DSP-4 50 mg/kg. With this dose, a significant decrease of DA level (–38%) was observed in

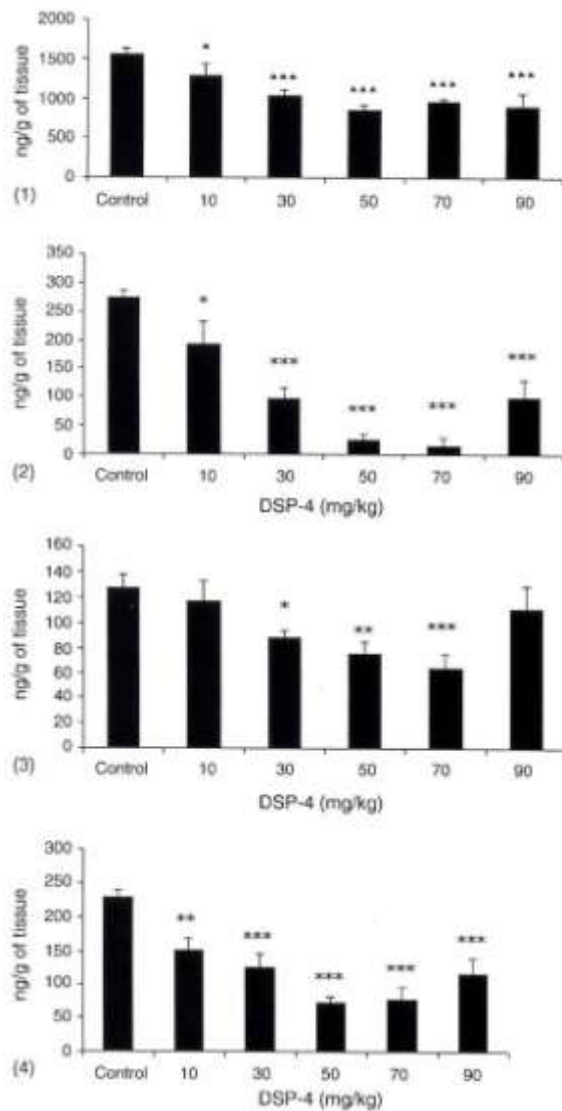


Fig. 1. Effect of DSP-4 (10, 30, 50, 70 and 90 mg/kg, i.p.) on NA levels in hypothalamus (1), hippocampus (2), striatum (3) and cortex (4) of Swiss mice: bar and error bar correspond with mean and S.E. mean. Differences between groups were analysed via a one-way ANOVA followed by a Fisher test if ANOVA was significant: * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$ and *** $p < 0.001$ in comparison with control.

hypothalamus and an increase of 5-HT level was observed in striatum (+81%). The effect of PCPA on NA, DA and 5-HT depletions are present in Fig. 2 and Table 2. With PCPA 300 mg/kg, a total 5-HT depletion was obtained in hypothalamus, hippocampus and an almost total depletion in striatum (−95%) and in cortex (−83%); moreover, significant decreases of NA levels (−30% in hypothalamus) and DA levels (−62% in hypothalamus and −17% in striatum) were also observed.

Table 1

Effect of DSP-4 (10, 30, 50, 70 and 90 mg/kg, i.p.) on DA and 5-HT levels in hypothalamus, hippocampus, striatum and cortex of Swiss mice

Tissues	Dopamine (ng/g of tissue)					
	Control	10	30	50	70	90
Hypothalamus	363.39 ± 22.47	283.53 ± 43.76	288.79 ± 37.22	224.81 ± 17.50**	228.44 ± 28.56**	271.24 ± 27.42
Hippocampus	454.30 ± 29.63	3803.04 ± 441.12	4816.08 ± 382.73	5254.53 ± 585.37	4674.18 ± 540.86	5220.62 ± 593.81
Striatum	5614.34 ± 217.32	570.27 ± 46.08	551.98 ± 51.86	597.66 ± 49.64	549.03 ± 57.73	563.65 ± 81.27
Cortex	542.68 ± 44.27	570.27 ± 46.08	551.98 ± 51.86	597.66 ± 49.64	549.03 ± 57.73	563.65 ± 81.27

Values are expressed as the mean ± S.E. M. of 10 animals per group. Differences between groups were analysed via a one-way ANOVA followed by a Fisher test if ANOVA was significant. Dopamine levels are under the limit of detection in hippocampus.

* Differences between groups were analysed via a one-way ANOVA followed by a Fisher test if ANOVA was significant: $p < 0.05$ in comparison with control.

** Differences between groups were analysed via a one-way ANOVA followed by a Fisher test if ANOVA was significant: $p < 0.01$ in comparison with control.

*** Differences between groups were analysed via a one-way ANOVA followed by a Fisher test if ANOVA was significant: $p < 0.001$ in comparison with control.

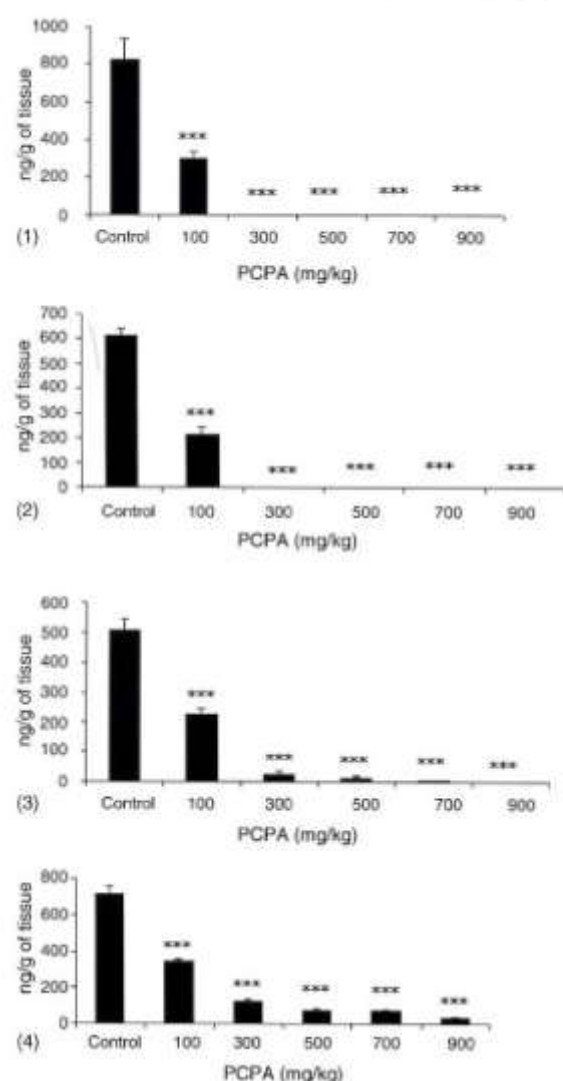


Fig. 2. Effect of PCPA (100, 300, 500, 700 and 900 mg/kg, i.p.) on 5-HT levels in hypothalamus (1), hippocampus (2), striatum (3) and cortex (4) of Swiss mice: bar and error bar correspond with mean and S.E. mean. Differences between groups were analysed via a one-way ANOVA followed by a Fisher test if ANOVA was significant: *** $p < 0.001$ in comparison with control.

4. Discussion

According to previous studies in mice and rats (Fornai et al., 1996), the minimal doses of DSP-4 necessary to have a highly significant depletion of NA is a single i.p. injection of 50 mg/kg in Swiss mice. However, the selectivity of DSP-4 on noradrenergic neurons is not absolute since a significant increase of 5-HT was observed in striatum and a significant decrease of DA level was observed in hypothalamus. According to Fornai et al. (1996), a variable extent of NA depletion was observed in discrete brain

Table 2
Effect of PCPA (100, 300, 500, 700 and 900 mg/kg, i.p.) on NA and DA levels in hypothalamus, hippocampus, striatum and cortex of Swiss mice

Tissues	PCPA (mg/kg, i.p.)					
	Control	100	300	500	700	900
Hypothalamus	1170.19 ± 85.52	1112.91 ± 73.69	827.31 ± 63.83 ^{***}	523.18 ± 32.55 ^{***}	373.06 ± 43.90 ^{***}	272.69 ± 37.52 ^{***}
Hippocampus	209.95 ± 18.88	223.15 ± 22.99	226.38 ± 11.82	172.97 ± 8.55	140.42 ± 15.32 [*]	177.08 ± 16.72
Striatum	86.12 ± 10.27	88.59 ± 6.30	103.95 ± 9.60	86.88 ± 7.24	76.87 ± 4.68	88.57 ± 7.32
Cortex	240.64 ± 16.18	211.78 ± 10.85	216.61 ± 16.37	197.29 ± 14.21 [*]	160.53 ± 6.79 ^{***}	142.08 ± 8.83 ^{***}

Values are expressed as the mean ± S.E.M. of 10 animals per group. Dopamine levels are under the limit of detection in hypothalamus (PCPA 700 and 900 mg/kg, i.p.) and hippocampus.

* Differences between groups were analysed via a one-way ANOVA followed by a Fisher test if ANOVA was significant: $p < 0.05$ in comparison with control.

** Differences between groups were analysed via a one-way ANOVA followed by a Fisher test if ANOVA was significant: $p < 0.01$ in comparison with control.

*** Differences between groups were analysed via a one-way ANOVA followed by a Fisher test if ANOVA was significant: $p < 0.001$ in comparison with control.

areas. A dramatic (over –90%) NA depletion occurred in hippocampus, a significant depletion in cortex and a limited depletion in striatum and hypothalamus. The variation of NA decrease between brain areas could be the consequence of a higher affinity for DSP-4 of noradrenergic axons arising from locus coeruleus compared with extra-coeruleus noradrenergic terminals and a higher relative amount of coeruleus versus extra-coeruleus noradrenergic axons in the hippocampus arising from locus coeruleus compared with extra-coeruleus noradrenergic terminals (Zacsek et al., 1990). The dramatic decrease in the hippocampus is consistent with previous results obtained with C57 Black mice (over –90%). However, this depletion is higher than depletion obtained in Swiss-Webster mice (–71%) (Fornai et al., 1996). Similarly, these differences between strains could be explained by a relative higher amount of coeruleus versus extra-coeruleus noradrenergic axons in the hippocampus of C57 Black and Swiss mice in comparison with Swiss-Webster mice.

PCPA, which is usually presented as a 5-HT synthesis inhibitor induced a decrease of 5-HT level in discrete brain areas. This result is consistent with the decrease of 5-HT (–71.7%) observed by Dursun and Handley (1993) in the whole brain of Aston Bred male MFI mice treated with three doses of PCPA (300 mg/kg, i.p.) 24, 48 and 72 before killing mice. However, no detailed study describing the effects of PCPA on 5-HT, NA and DA in different brain areas of mice was available. Our study showed that the specificity of this depletion was not absolute in Swiss mice. A significant decrease of NA in hypothalamus, DA in hypothalamus and striatum was found with three doses of PCPA 300 mg/kg. This result in Swiss mice is consistent with a previous study in Long-Evans rats: Dringenberg et al. (1995) showed that PCPA could induce a profound depletion (over –90%) of 5-HT level and a significant decrease of NA and DA levels in the whole brain of rats treated with 500 mg/kg PCPA 2 consecutive days.

In conclusion, our study (i) showed that DSP-4 (a single 50 mg/kg administration i.p.) had a different efficacy in discrete brain areas with a noradrenergic specificity which was not absolute and (ii) showed that PCPA (300 mg/kg, i.p., 3 consecutive days) had a similar efficacy in all brain areas and was an unspecific neurotoxin of 5-HT system in Swiss mice.

References

- Bourin M, Masse F, Dailly E, Hascoët M. Anxiolytic-like effect of minalcipran in the four-plate test in mice: mechanism of action. *Pharmacol Biochem Behav* 2005;81:645–56.
- Dringenberg HC, Hargreaves EL, Baker GB, Cooley RK, Vanderwolf CH. *p*-Chlorophenylalanine-induced serotonin depletion: reduction in exploratory locomotion but no obvious sensory-motor deficits. *Behav Brain Res* 1995;68:229–37.
- Dursun SM, Handley SL. 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* 1993;109:1046–52.
- Fornai F, Bassi L, Torracca MT, Alessandri MG, Scalori V, Corsini GU. Region- and neurotransmitter-dependent species and strain differences in DSP-4-induced monoamine depletion in rodents. *Neurodegeneration* 1996;5:241–9.
- Fratta W, Biggio G, Mercurio G, Di Vittorio P, Tagliamonte A, Gessa GL. Letter: the effect of *D* and *L*-*p*-chlorophenylalanine on the metabolism of 5-hydroxytryptamine in brain. *J Pharm Pharmacol* 1973;25:908–9.
- Hallman H, Jonsson G. Pharmacological modifications of the neurotoxic action of the noradrenaline neurotoxin DSP4 on central noradrenaline neurons. *Eur J Pharmacol* 1984;103:269–78.
- Slattery DA, Desrayaud S, Cryan JF. GABAB receptor antagonist-mediated antidepressant-like behavior is serotonin-dependent. *J Pharmacol Exp Ther* 2005;312:290–6.
- Srinivasan J, Schmidt WJ. Behavioral and neurochemical effects of noradrenergic depletions with *N*-(2-chloroethyl)-*N*-ethyl-2-bromobenzylamine in 6-hydroxydopamine-induced rat model of Parkinson's disease. *Behav Brain Res* 2004;151:191–9.
- Zacsek R, Fritschy JM, Culp S, De Souza EB, Grzanna R. Differential effects of DSP-4 on noradrenaline axons in cerebral cortex and hypothalamus may reflect heterogeneity of noradrenaline uptake sites. *Brain Res* 1990;522:308–14.

Résultats

I. Etude 1 : Factors triggering abolishment of benzodiazepines effects in the four-plate test-retest in mice

Facteurs déclencheurs du phénomène de « one-trial tolerance », ou tolérance liée à la première exposition au test, dans le test-retest des quatre plaques.

« Factors triggering abolishment of benzodiazepines effects in the four-plate test-retest », publié dans le journal *European Neuropsychopharmacology*, 2007

Petit-Demouliere, B., Hascoët, M., Bourin, M.

A. Objectifs de l'étude 1

La validité prédictive des modèles animaux d'anxiété est fondée sur l'utilisation des benzodiazépines, qui ont longtemps constitué le traitement de référence dans l'ensemble des troubles anxieux.

Détrônées depuis par certains types d'antidépresseurs, notamment les inhibiteurs du recaptage de la sérotonine, les benzodiazépines ont conservé une place importante dans la partie expérimentale de l'étude des pathologies anxieuses. Ainsi, pour être considéré comme valide, un nouveau modèle animal d'anxiété doit avoir une réponse significative pour ces molécules.

L'étude des mécanismes d'action des benzodiazépines a conduit à la découverte d'un phénomène de tolérance observé lors de la réexposition d'un animal à un même modèle d'anxiété. Appelé phénomène de « one-trial tolerance » par l'équipe de S. File (File, 1990), cet événement a été démontré en premier lieu dans le modèle de l'EPM. Il a été initialement décrit comme une forte atténuation, ou une perte complète de l'effet d'une molécule anxiolytique induite par l'exposition préalable à l'EPM sans traitement, observée lors de la réexposition au même modèle (File, 1990; Lister, 1987). Par la suite, d'autres travaux ont mis en évidence des résultats similaires dans des modèles animaux d'anxiété différents, tel que le test de la double enceinte éclairée (Holmes et al., 2001) ou le FPT (Hascoet et al., 1997).

Dans ce dernier modèle, la perte de l'effet anxiolytique lors du retest est vraisemblablement assimilable à une « one-trial tolerance ». Pourtant, il convenait de vérifier que cette perte d'effet n'était pas liée à d'autres facteurs, notamment la présence de punition par choc électrique. Cette étude cherchait donc à mieux caractériser ce protocole de test-retest dans le FPT chez la Souris.

Nous avons considéré le test-retest du FPT selon deux facteurs principaux : l'environnement et la punition. En effet, ces deux paramètres produisent un conflit de motivation entre exploration et évitement (Ohl, 2005). Nous avons ainsi cherché à mettre en évidence l'influence de ces deux facteurs sur la diminution du nombre de passages punis observée dans le retest, chez des souris expérimentées non traitées, autrement appelé mémoire aversive ; ainsi que sur la « one-trial tolerance », chez des animaux ayant reçu une administration unique de diazépam.

Pour répondre à ces questions, nous avons établi plusieurs protocoles, isolant l'un ou l'autre des deux facteurs. La première partie consistait à retirer les punitions lors du prétest, la seconde, les punitions dans les deux tests. Ensuite, nous avons modifié l'environnement du FPT durant le prétest, en plaçant une enceinte ronde à l'intérieur de la boîte de test, conservant ainsi la possibilité d'envoyer des décharges électriques lors des passages d'une plaque à l'autre. Enfin, nous avons soumis les souris à un test d'anxiété différent lors du prétest : l'EPM, suivi le lendemain d'un FPT.

Dans cette étude, nous avons utilisé le diazépam comme molécule contrôle du phénomène de « one-trial tolerance », dont la perte d'effet avait été mise en évidence préalablement (Hascoet et al., 1997). Par ailleurs, nous avons conjointement étudié l'effet de type anxiolytique du DOI, un agoniste des récepteurs sérotoninergiques de type 5-HT_{2A/2C}. En effet, cette molécule conserve son effet lors du retest, comme nous l'avons mis en évidence précédemment (Ripoll et al., 2005). Les variations observées lors du retest sur l'efficacité du DOI et sur le nombre de passages punis acceptés par les souris « témoins », injectées uniquement avec du véhicule, ciblaient l'étude des facteurs susceptibles d'entraîner un apprentissage aversif. Au contraire, les études conjointes des effets du diazépam et des souris « témoins » se focalisaient plus précisément sur le phénomène pharmacologique de « one-trial tolerance ».

Factors triggering abolishment of benzodiazepines effects in the four-plate test–retest in mice

B. Petit-Demoulière, M. Hascoët, M. 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

Received 4 January 2007; received in revised form 28 March 2007; accepted 24 April 2007

KEYWORDS

Four-plate test;
Test–retest;
DOI;
Diazepam;
Anxiety;
One-trial tolerance

Abstract Abolishment of anxiolytic-like effects of diazepam occurs during re-exposure to some animal tests of anxiety. We investigated the loss of anxiolytic-like effects of diazepam during Trial 2 on previously undrugged mice, namely one-trial tolerance (OTT). Swiss mice were subjected to 1) Four-Plate Test (FPT) without punishments in Trial 1 or 2) FPT without punishments in both Trials or 3) FPT with spatial modifications in Trial 1 or 4) Elevated Plus Maze (EPM), then 24 h later to FPT, with saline, diazepam (1 mg/kg) or DOI (1 mg/kg). Removing punishments in Trial 1 does not counteract the effect reduction of diazepam in Trial 2, but spatial modifications of the aversive environment. Previous exposure to EPM does not trigger a loss of efficacy of diazepam in FPT. Electric punishments do not trigger OTT to benzodiazepines; whilst knowledge of the environment seems to be responsible for this phenomenon. FPT may be useful to study OTT because punishments potentiate OTT in this model of anxiety.

© 2007 Elsevier B.V. and ECNP. All rights reserved.

1. Introduction

Benzodiazepines (BZD) have been used to design most animal models of anxiety. Predictive validity of these models is typically linked to the efficacy of these compounds, but their clinical effectiveness is limited to generalized anxiety disorders or acute panic attacks (Borsini et al., 2002).

Used as positive controls in animal models of anxiety, researchers have found a reduction in the efficiency of BZD if used on experienced mice in some animal models of anxiety. This phenomenon, called one-trial tolerance (OTT) to BZD substances, has been initially described as a marked attenuation, or even an abolition of the response to an

anxiolytic compound, induced by a previous single undrugged experience of the elevated plus maze (EPM) (File, 1990; Lister, 1987). Same results have been obtained when administering barbiturates, alcohol, serotonin 1A receptor agonists, and glutamatergic antagonists; but also further to septal lesions in mice (Vargas et al., 2006).

Mainly reported in EPM, loss of BZD effects has been found in other animal models of anxiety, e.g. light/dark transition (Holmes et al., 2001), four-plate test (Hascoët et al., 1997; Ripoll et al., 2005). In punished drinking, no diminution of the anxiolytic effect of BZD has been found after repeated trial (File and Zangrossi, 1993).

To explain OTT, some authors suggest that prior exposure to the test could increase baseline anxiety leading to the elimination of the anxiolytic-like effect of BZD (Cruz-Morales et al., 2002; File et al., 1992; Holmes and Rodgers, 1999). OTT could result from locomotor habituation (Dawson et al.,

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

1994), from an altered state of the binding-sites and/or of the GABA_A receptor complex (Bertoglio and Carobrez, 2002). Other authors have described this phenomenon as a qualitative shift in the nature of the anxiety response that could trigger changes in pharmacological responses with retesting (File and Zangrossi, 1993; Holmes and Rodgers, 1998). Learning has been studied in this context, in order to evaluate the influence of memory on OTT. It has been shown that the use of amnesic agents such as scopolamine does not modify the OTT observed when administering chlordiazepoxide in the plus maze (Calzavara et al., 2005). Atropine sulphate, a muscarinic cholinergic receptor antagonist known for its amnesic properties, did not significantly raise the number of punished crossings in retest mice in the FPT (Ripoll et al., 2005). On the contrary, other studies concluded that OTT implies an aversive learning within Trial 1 that is transferred to Trial 2 (Vargas et al., 2006).

In animal models of anxiety using conflict procedure, an immediate threat causes escape behaviour, while a potential threat generates a conflict between approach and risk assessment. Furthermore, BZD seem to have an influence on risk assessment in rodents (Blanchard et al., 1991, 1990). OTT appears to be linked to a balance between two opposite goals: investigating the threat stimulus and simultaneously remaining as protected as possible from it (Augustsson et al., 2005). Motivational conflict situation has been related to the phenomenon of OTT, and the anxiolytic effect of chlordiazepoxide in the EPM mainly depends on the presence of a motivational conflict situation (Pereira et al., 1999).

Four-plate test is a model of anxiety based on exploration of a new environment and passive avoidance of electric punishments (Boissier et al., 1968). We have previously described a test–retest procedure and found an attenuation of anxiolytic responses to diazepam and lorazepam (Hascoët et al., 1997).

The role of punishments in the loss of BZD effects in the test–retest procedure in FPT has to be known in order to link the loss of effect of BZD with OTT, and not with an aversive learning against punishments. Indeed, this model of anxiety combines two motivational drives: exploration of a new area and aversion of electrical punishments. Exploration has been described as behavioural acts and postures, permitting to collect informations about new objects and unfamiliar parts of the environment (Crusio, 2001). In FPT, it can mainly involve the motivation for the mice to find some 'life necessities', as escape routes for example. The exploratory behaviour has been explained as multi-factorial, with exploration and fear/stress being main motivations underlying observed behavioural variations (Crusio, 2001; Whimbey and Denenberg, 1967). The threat stimulus in FPT is elicited by electric foot-shocks received when animals cross from one plate to another, and by neophobia.

As the investigation of the open area leads to receiving electric foot-shocks, the best way to remain safe is to stay on a plate without exploring the area, namely a freezing behaviour. We previously reported that drug-induced anti-punishment effects in the FPT are not related to modifications of the pain threshold but to a pure anxiolytic-like effect (Ripoll et al., 2006).

These opposite drives (fear against exploration) have already been discussed in the EPM. It has been suggested that the cholinergic innervations of forebrain structures modu-

late the initiation of exploratory activity which results in the acquisition or retention of spatial information, but does not affect the expression of anxiety (Lamprea et al., 2000). In the present study, four experiments were designed, in order to assess the role of these two motivational drives in test–retest with FPT. Firstly, in Trial 1, we have observed the impact of removing electric punishments during Trial 1 on the behaviour of mice during Trial 2. Secondly, we have considered the consequences of removing electric punishments during both trials. Thirdly, we have used a modified FPT (spatial modifications) during Trial 1 followed 24 h later by a classic FPT. In the fourth experiment, Trial 1 took place in an EPM followed 24 h later by a FPT. These four experiments helped us to compare influences of environmental versus aversive drives on the loss of effect of BZD, and on the decrease of accepted punishments in Trial 2 with control mice. DOI, a selective 5-HT 2A/C agonist was used in all these experiments, as a control treatment (1 mg/kg), because its anxiolytic-like effect is maintained during Trial 2 with experienced mice. DOI does not suffer from OTT in FPT (Nic Dhonnchadha et al., 2003; Ripoll et al., 2005).

These four paradigms inform us whether the loss of the effect of BZD during test–retest in FPT is mainly linked to a kind of aversive learning i.e. to punishments, or to pre-exposure to the apparatus. The latter hypothesis would describe the loss of effect of BZD as a true OTT.

2. Materials and methods

2.1. Animals

Male mice (Swiss strain) (Centre d'élevage Janvier, France) weighing 20–24 g were used in this study. They were housed in groups of 18 per cage (40 cm × 28 cm × 17 cm) on 12-h light: 12-h dark cycle (light on 07:00 h) and had free access to food and water. The ambient temperature of the room was maintained at 21 ± 1 °C. Experimental groups were composed of 12 mice. All experiments were performed within the guidelines of the French Ministry of Agriculture for experiments with laboratory animals (law no. 87 848). Testing was performed between 08:00 and 12:00 h.

2.2. Drugs

DOI-hydrochloride [(±)-2,5-dimethoxy-4-iodoamphetamine] (RBI, Sigma, France) was dissolved in distilled water. Diazepam (RBI, Sigma, France) was mixed in a 5% concentration of Tween-80 with distilled water. Controls received vehicle treatment only. 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. Apparatus and general procedure

2.3.1. Experiment 1: Test–retest protocol on a Four-plate test apparatus (FPT, BIOSEB, France) with or without punishments during Trial 1

2.3.1.1. Apparatus. This apparatus consists of a cage (18 cm × 25 cm × 16 cm) floored by four identical rectangular metal plates (8 cm × 11 cm) separated from one another by a gap of 4 mm. The plates are connected to a device that 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 when crossing from one plate to another. The number of punishments is recorded during a 1-min test period.

In order to reduce any neophobic response to the situation other than the one linked to the test, the FPT was previously dirtied by mice other than those used during the test. Mice were always tested in a soiled apparatus and there was no cleaning between trials. Every test session was made by the same experimenter in the same room with the same apparatus.

2.3.1.2. Protocol 1. Testing mice in the FPT consisted of two separate trials over 2 consecutive days (interval between the two tests: 24 h) with electric shocks in both trials. The two trials were called "test or Trial 1" and "retest or Trial 2". Concerning the test, the mice were only injected with vehicle. When retested, the mice (exposed 24 h previously to the test) received i.p. vehicle solution or drugs 30 min before the trial. For Trial 2, mice were individually placed and tested in the FPT randomly for drug treatment and test experience. Control groups of naive mice (which received vehicle, diazepam (1 mg/kg) or DOI (1 mg/kg)) were also submitted to the test the same day. The chosen and studied doses of each drug modify neither locomotor activity nor pain perception (Ripoll et al., 2006).

2.3.1.3. Protocol 2. Test-retest protocol on an FPT apparatus without punishment during trial 1. The only difference took place during the first test, where no electric punishments were given when crossing from one plate to another. The number of punishments was recorded during a 1-min test period after a 15 s period of habituation in Trial 2.

2.3.2. Experiment 2: Test-retest protocol on an FPT apparatus, without punishment during Trial 2 or during both trials

2.3.2.1. Apparatus. This experiment used the same apparatus as Experiment 1.

2.3.2.2. Protocol. The control group received punishments in Trial 1 only. In Trial 2, no electric punishments were given after crossing from one plate to another. The number of crossings was recorded during a 1-min test period after a 15 s period of habituation. Naive mice did not receive any shock in Trial 2.

2.3.3. Experiment 3: Day 1: Modified FPT—Day 2: FPT

2.3.3.1. Apparatus. In Trial 1, we used both a classic FPT and a modified FPT apparatus in a different room, in order to change the environment of the mice during the test. A glass cylinder (13 cm×17 cm) was covered with Kraft paper on the outer side and placed into the modified FPT on a border of the apparatus, so that two plates were available for mice. Kraft paper was put under this modified apparatus to fill the gap between plates, and the box was cleaned between each animal with an industrial detergent (Anios, Induspray SR6, 0.676 g/L potassium sorbate, ethanol 50% v/v). We had previously assured that this cleaning did not modify test-retest results (data not shown). Trial 2 consisted in a classic FPT, as previously described in Experiment 1.

2.3.3.2. Protocol. During Trial 1, mice were placed in the modified FPT. Following a 5-second habituation period, the animal was subjected to an electric shock after crossing from one plate to another. The number of punishments was recorded during a 1-min test period. Trial 2 was made in a classic FPT (Experiment 1/Protocol 1).

2.3.4. Experiment 4: Day 1: Elevated plus maze (EPM)—Day 2: FPT

2.3.4.1. Apparatus. The EPM apparatus consists of two elevated (26 cm high) and open arms (16 cm×5 cm) positioned opposite to one another and separated by a central platform (5 cm×5 cm) and two arms of the same dimension, but enclosed by walls (16 cm×5 cm×10 cm) forming a cross. The maze is raised off the ground so that open arms combine elements of unfamiliarity, openness and

elevation. The arms and walls are painted black. The maze is lit by a dim light placed above the central platform. The test was carried out in a calm, tempered and dark room. In order to reduce any neophobic response to the situation other than the one linked to open and high arms, the EPM was previously dirtied by mice other than those used during the test. Mice were always tested in a soiled apparatus and there was no cleaning between trials.

2.3.4.2. Protocol. In this experiment, trial 1 was made in an EPM apparatus, the mouse was placed on the platform, facing an open arm and allowed to explore for 5 min. On the consecutive day, trial 2 was made in a classic FPT (Experiment 1/Protocol 1).

2.4. Statistics

Results were expressed as a mean of the number of punished passages ($\pm$ SEM) for the FPT. A two-way ANOVA (trial 1×treatment in trial 2) was employed. If the ANOVA showed a significant difference, a Sidak's test was performed to compare the effect of Trial 1 on treatment in Trial 2. Data were tested for homogeneity of the variance and normal distribution. All analyses were conducted using the SPSS program for IBM compatible computer.

3. Results

In this experiment, two-way ANOVA revealed significant protocol [$F_{(2,143)}=173.31$; $p<0.001$], treatment [$F_{(2,143)}=84.01$; $p<0.001$] and interaction factors [$F_{(4,143)}=19.46$; $p<0.001$] (Fig. 1).

As previously described, DOI 1 mg/kg and diazepam 1 mg/kg both increased punished crossings in control naive mice [$p<0.001$ after post-hoc analysis]. In protocol 1, punished crossings were significantly decreased in the three groups (Vehicle, DOI 1 mg/kg and diazepam 1 mg/kg) in trial 2 compared to naive control groups [$p<0.001$ after post-hoc analysis]. But DOI 1 mg/kg still

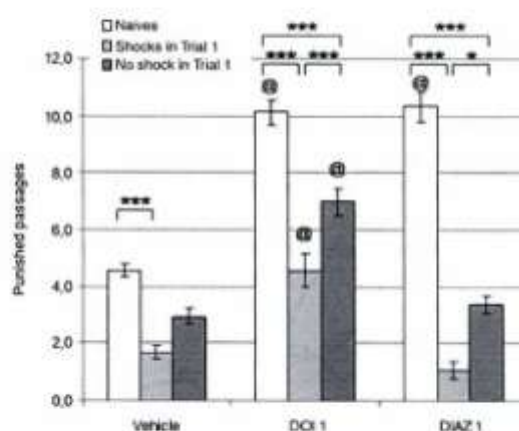


Figure 1 Influence of electric punishments during trial 1 on the anti-punishment effects of diazepam (1 mg/kg) and DOI (1 mg/kg) administered on trial 2 30 min before the test. All data are shown as means $\pm$ S.E.M., $n=16$ per group. The symbol ** indicates significant differences between groups; * $p<0.05$, ** $p<0.01$, *** $p<0.001$ by Sidak's post-hoc test. The symbol @ indicates significant differences between drug and vehicle groups with the same protocol; @ $p<0.001$. Mice in protocol 1 groups received punishment in Trial 1 and Trial 2. Mice in protocol 2 groups received electric punishment only in Trial 2.

increased significantly punished crossings in Trial 2 in comparison with mice that received vehicle [$p < 0.001$ after post-hoc analysis]. Diazepam 1 mg/kg did not increase punished crossing on Trial 2 in comparison with mice that received vehicle [$p > 0.05$ after post-hoc analysis].

In protocol 2, DOI 1 mg/kg and diazepam 1 mg/kg increased significantly punished crossings in comparison with mice punished in trial 1 [$p < 0.01$]. But punished crossings were significantly less important in comparison with control naive mice for mice that received DOI or diazepam [$p < 0.001$]. Only mice treated with DOI had an anti-punishment effect in protocol 2, diazepam had no effect in this group. Mice that received vehicle accepted as much punishment as naive mice or as mice shocked in Trial 1 with no statistical difference [$p > 0.05$ after post-hoc analysis].

In this experiment, two-way ANOVA revealed significant protocol [$F_{(2,87)} = 106.21$; $p < 0.001$] and treatment factors [$F_{(2,87)} = 7.97$; $p < 0.01$], but no interaction factors were found [$F_{(4,85)} = 1.51$; $p > 0.05$]. As we had a strong F value, we used one-way ANOVA to better describe the data. It shows the differences for one fixed factor. Mice shocked during Trial 1 made significantly less crossings during Trial 2 than naives or non shocked mice ($p < 0.001$). Diazepam increased the number of crossings only in naive mice ($p < 0.05$). In experienced mice, drugs had no effect on the number of crossings during Trial 2 (Fig. 2).

In this experiment, two-way ANOVA revealed significant protocol [$F_{(2,143)} = 114.50$; $p < 0.001$], treatment [$F_{(2,143)} = 70.87$; $p < 0.001$] and interaction factors [$F_{(4,143)} = 6.31$; $p < 0.001$] (Fig. 3).

Naive and control animals had the same response to treatments as in Experiment 1. In naive group, DOI and diazepam had both strong anti-punishment effects compared with vehicle ($p < 0.001$). In control group, DOI kept its anti-punishment effect compared with vehicle control animals ($p < 0.001$)

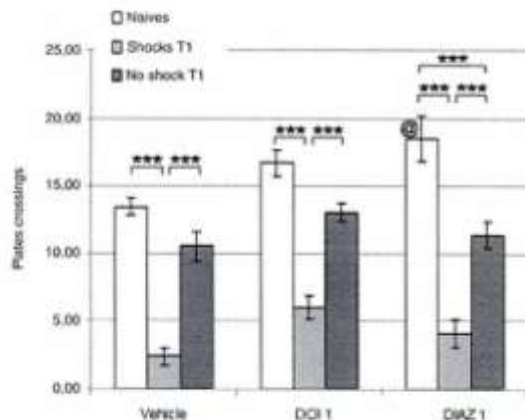


Figure 2 Influence of electric punishments during Trial 1 on the number of plate crossings in mice treated with diazepam (1 mg/kg) or DOI (1 mg/kg) administered on Trial 2 30 min before the test. All data are shown as means $\pm$ S.E.M., $n = 12$ per group. The symbol * indicates significant differences between groups; * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$ by one-way ANOVA. The symbol @ indicates significant differences between drug and vehicle groups; @ $p < 0.05$. Naive mice received no punishment. 'Shock T1' mice received punishments only in Trial 1. 'No shock T1' received no punishment in both trials.

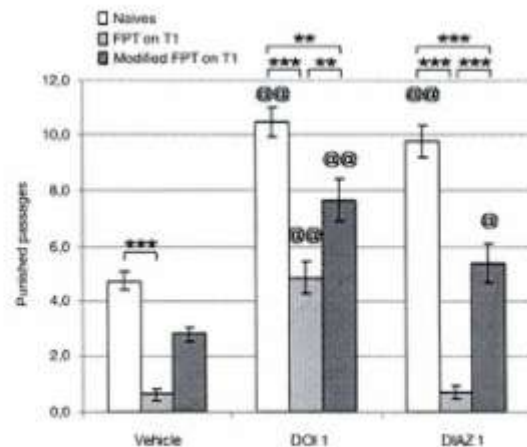


Figure 3 Influence of an environmental modification of the FPT apparatus in Trial 1 on the number of punished passages in mice treated with diazepam (1 mg/kg) or DOI (1 mg/kg) administered on Trial 2 30 min before the test. All data are shown as means $\pm$ S.E.M., $n = 16$ per group. The symbol @ indicates significant differences between drug and vehicle groups; @ $p < 0.05$, @@ $p < 0.001$.

and maintained a punishment level similar to naive vehicle animals. Diazepam had no anti-punishment effect in control group, as previously observed in Experiment 1.

Animals that had been subjected to a modified FPT in Trial 1, accepted more punishments than control animals but less than naive animals when treated with DOI ($p < 0.01$) or diazepam ($p < 0.001$).

Diazepam had a significant anti-punishment effect on animals subjected to a modified FPT on Trial 1 compared to animals treated with vehicle ($p < 0.05$).

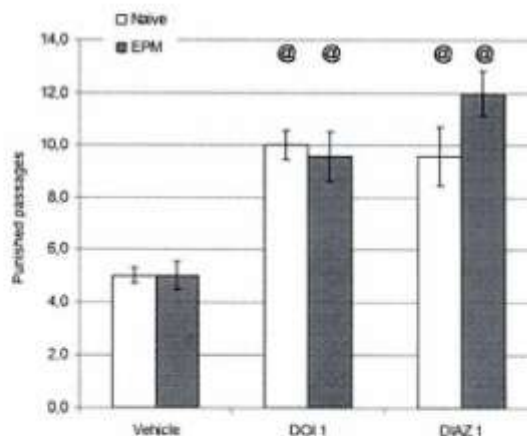


Figure 4 Influence of the exposure to an EPM in Trial 1 on the number of punished passages in mice treated with diazepam (1 mg/kg) or DOI (1 mg/kg) administered on Trial 2 30 min before the test. All data are shown as means $\pm$ S.E.M., $n = 12$ per group. The symbol @ indicates significant differences between group and control vehicle mice; @ $p < 0.001$.

Animals treated with vehicle, and shocked in a modified FPT apparatus during Trial 1 accepted a number of punishments midway between naive and control animals without any significant difference.

In this experiment, exposure to EPM in Trial 1 did not modify treatment effects on animals, compared to naive animals. DOI and diazepam had an anti-punishment effect in naive animals and in EPM exposed animals ($p < 0.001$ for both treatments) (Fig. 4).

4. Discussion

In the present study, we have firstly tried to better describe the behaviour of mice in an animal model of anxiety: the FPT, in order to explain the decrease of punished passages accepted during a second trial 24 h later with previously undrugged animals. Moreover, we wanted to define the motivational drives triggering the loss of BZD effect during Trial 2. The adequate definition of behavioural drives applied on mice during Trial 2 would lead us to put side by side the loss of effect observed with an OTT, as previously defined in EPM.

Our experimental plan was performed to determine the weight of two drives: exploration and fear, in the elaboration of the behaviour of the mice in the test. To consider these two pressures applied on the mice, we chose four experiments that could help us figure out their respective influences.

By removing electric punishments during Trial 1, we cancelled a potential association between the exploration of environment and the fear of punishments during Trial 1. The only stressful situation was linked to the unknown apparatus.

A comparison between mice of protocol 1 and protocol 2, respectively with or without electric stimulations during Trial 1, showed us a raise of the number of punishments accepted by mice subjected to protocol 2, only in DOI and diazepam treated groups. Nonetheless, there was still a strong difference between naive mice and treated mice that had visited the test without punishments in Trial 1. Removing the punishments during Trial 1 was not sufficient to restore the anxiolytic-like effect of treatments and to have a number of accepted punishments similar to naive mice. There was still a decrease of the number of accepted punishments, that could be explained by a diminution of exploratory drives. That would result in a shift of the balance of the two drives fear/exploration and a diminution of the number of accepted punishments. Moreover, we observed a complete loss of the anxiolytic-like effect of diazepam on treated mice in comparison with naive mice, simply by exposing them to the apparatus. This unexpected result is the first step to further describe the behaviour of mice in the FPT during a test-retest protocol.

Previously, we thought that the decrease of punished passages observed in Trial 2 was mainly due to a sort of aversive memory against electric stimulations, even if amnesic compounds did not cancel this decrease with experienced mice (Ripoll et al., 2005). This experiment shows us that exploration of the compartment without painful stimuli in Trial 1 is sufficient to lower the number of punishments accepted during Trial 2 and to cancel the anxiolytic-like effect of BZD.

With these results, the next question is about the role of punishments in the second trial and about its importance in the loss of effect of diazepam and the reduction of passages in Trial 2. To answer this question, we have examined the influence of punishments exposure only in Trial 1 on the number of plate crossings during Trial 2 (in Experiment 2). Under such conditions, we have observed an increase in crossings in Trial 2 only with diazepam treated mice in naive group; maybe due to disinhibition. Shocked mice during Trial 1 made significantly less crossings during Trial 2 than naive or non-shocked experienced mice. There were no differences between the crossings of naive mice and non-shocked mice, except for diazepam treated mice that had a decreased number of crossings with experienced mice, compared to naive mice.

These results demonstrated a strong effect of punishments of Trial 1 in the exploration during Trial 2. The environment discovered during Trial 1 kept its aversive role in Trial 2, and mice did not recover their motivation to explore the box, even if no shock was delivered during the first 15 s of Trial 2. After the first experiment, we wondered whether a reduced exploratory drive during Trial 2, could explain the decrease of the number of punished passages accepted by experienced mice. It seemed to be only one part of the explanation, as no significant diminution of the exploration could be seen between naive mice and mice that had already explored the apparatus without punishments with vehicle and DOI groups. For diazepam, the rise of explorations in naive mice triggered a significant difference in comparison with the experienced mice with no shock in Trial 1. Diazepam effects on naive and experienced mice during this experiment may be interpreted as a decrease in neophobic reaction, triggered by the anxiolytic-like effect of diazepam for naive mice.

Electric stimulation may trigger a kind of fear or phobic state, linked to the environment. To discuss further about the link established between environment and punishments, we made a third experiment modulating the aversive area during Trial 1. Using a spatially modified apparatus during Trial 1 carried out a rise of the number of punishments accepted by mice in Trial 2 in the FPT, compared to mice placed in the typical FPT during Trial 1 for mice treated with DOI and diazepam at 1 mg/kg. DOI kept its anxiolytic-like effect in both groups, with a stronger effect in mice exposed to two different apparatus across trials.

The fear drive has been raised by the previous exploration of the environment, but without any association with the environment. This fear drive would exert a pressure against the exploration drive and limit the number of crossings shifting the global balance between fear and exploration, with a kind of aversive memory. Naive mice have a strong exploration drive, as they have never been exposed to the test; experienced mice have a lower one, it is especially true for mice that have been placed in the same apparatus during both trials. But in Experiment 2, we have shown that no diminution of this drive was observed when mice were placed twice in the same environment. The true question is now focused on the evidence of such kind of aversive memory that could appear with experienced mice. We have previously shown in Experiments 1 and 2 that some aversive memory could be involved in the decrease of exploration, crossings or punishments accepted, but not in the loss of effect of diazepam.

The anti-punishment effect of diazepam was restored without re-exposition to the same apparatus, but with electric shocks in both trials. The last experiment was useful to discuss the impact of environment on the response to treatments: exposure to a completely different apparatus, used for its anxiety-provoking design: the EPM. Exposition to this stressful apparatus without punishments, totally different from FPT, did not modify the effects of treatments on punished passages in FPT, on DOI effects, and did not trigger a loss of effects of diazepam. All these results lead us to conclude the major role of spatial knowledge, potentiated by fear of electric shocks.

Two fields have been explored in this study: the decrease of punished passages after re-exposure by using vehicle and DOI, and a possible OTT to BZD with diazepam.

The decrease of accepted punishments by mice on Trial 2 could be explained on the basis of a shift of the balance exploratory/fear. A reduce of the exploratory drive could be sufficient to have this shift, because even if no punishment is given in Trial 1, a diminution of accepted shocks can be observed in DOI treated group (Experiment 1). There is no significant result in vehicle groups to conclude about this exclusive role of exploratory drive on the decrease of punishments in Trial 2. On the contrary, mice already exposed to the apparatus seemed to maintain their exploration drives when no shocks were given in the two trials. At this point, aversive memory can be involved, as mice shocked in Trial 1 did not recover their motivation to explore freely the apparatus (Experiment 2). The association of fear of electric shocks and environment seems to be the strongest combination to decrease punishments accepted by mice. In these conditions, it is difficult to classify the two drives; environment may be the main element and fear of the shocks could act as a potentiator.

OTT in EPM develops independently of extra-maze cues (Rodgers et al., 1997), is independent of drug state on Trial 1, the material from which the maze is constructed and the specific inter-test interval employed (Espejo, 1997; File, 1990; Lister, 1987; Rodgers et al., 1992), is evident by the second minute of Trial 1 (Rodgers et al., 1996), but is dependent on the length of Trial 1 (Dal-Col et al., 2003) and both trials (File et al., 1993).

Moreover, the experience of open arm, or closed arm, isolation during Trial 1 has been related to the loss of BZD efficacy on retest (File et al., 1990, 1994; Holmes and Rodgers, 1999).

The main information of these experiments is that punishment is not the cause of the loss of anxiolytic-like effect of BZD in this model. This information allows us to consider the loss of effects of diazepam as a true OTT. Another result to consider is the fact that, in EPM, the OTT does not depend upon initial open-arm experience (Frussa-Filho and Ribeiro Rde, 2002). This absence of anxiolytic-like effect of BZD without exposure to the most aversive situation can be found in our model. In FPT, even if no electric stimuli are delivered, the diazepam loses its effect. Moreover, we can conclude that an aversive environment is not the first reason to have OTT.

Knowledge of the environment seems to be the main factor in the appearance of OTT. In EPM, naive mice treated with vehicle and experienced mice treated with BZD have the same results. But in FPT, we saw that the number of

punishments was deeply decreased by the previous exposure to the test, in any case. This difference between the two models is due to electric shocks acting as a reinforcing stimulus.

This loss of effect does not seem to be linked to an increase of baseline anxiety, to a diminution of exploratory drive or to a locomotor habituation. The alteration of the binding site of diazepam does not seem to be implicated, because the only exposure to the apparatus triggered OTT, but exposure to EPM did not modify the effect of diazepam.

With all these results, it seems clear that OTT is linked to a type of knowledge or learning of the environment. Mainly discussed with the EPM, the aversive learning seems to be of great interest with FPT too. Even if no effect of amnesic compounds were found in the test-retest with FPT (Ripoll et al., 2005), we have to conclude that there is an aversive learning, as shown with EPM (Vargas et al., 2006). This kind of memory would not be linked to far spatial clues, but may be to the limited area of the test. Our study shows that information is kept about the environment. These spatial data are sufficient to trigger OTT with mice treated with BZD. This confirms the structural dissociation between exploratory activity, which gives spatial information and expression of anxiety (Lamprea et al., 2000).

Together, these results show us that test-retest paradigm in the FPT model clearly highlights an OTT phenomenon for BZD, but with a secondary level exerted by electric punishments acting as re-inforcement.

Role of the funding source

There was no study sponsor for this study.

Contributors

Author 1 (Petit-Demouliere B.) designed the study and wrote the protocol. He and Authors 2 and 3 managed the literature searches and analysis. Author 1 undertook the statistical analysis, and wrote the first draft of the manuscript. All authors contributed to and have approved the final manuscript.

Conflict of interest

The authors certify that they have no conflict of interest. I certify hereby that this work has never been published elsewhere and that it is not in current process publication.

Acknowledgments

We wish to thank Kira Kleaveland and Morgane Chenu for assistance.

References

- Augustsson, H., Dahlborn, K., Meyerson, B.J., 2005. Exploration and risk assessment in female wild house mice (*Mus musculus musculus*) and two laboratory strains. *Physiol. Behav.* 84, 265–277.
- Bertoglio, L.J., Carobrez, A.P., 2002. Anxiolytic effects of ethanol and phenobarbital are abolished in test-experienced rats submitted to the elevated plus maze. *Pharmacol. Biochem. Behav.* 73, 963–969.

- Blanchard, D.C., Blanchard, R.J., Tom, P., Rodgers, R.J., 1990. Diazepam changes risk assessment in an anxiety/defense test battery. *Psychopharmacology (Berl)* 101, 511–518.
- Blanchard, D.C., Blanchard, R.J., Rodgers, R.J., 1991. Risk assessment and animal models of anxiety. In: Olivier, B., Mos, J., Slangen, J.L. (Eds.), *Animal Models in Psychopharmacology*. Birkhauser, Boston, pp. 117–234.
- 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.
- Borsini, F., Podhorna, J., Marazziti, D., 2002. Do animal models of anxiety predict anxiolytic-like effects of antidepressants? *Psychopharmacology (Berl)* 163, 121–141.
- Calzavara, M.B., Patti, C.L., Lopez, G.B., Abilio, V.C., Silva, R.H., Frussa-Filho, R., 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, 2235–2246.
- Crusio, W.E., 2001. Genetic dissection of mouse exploratory behaviour. *Behav. Brain Res.* 125, 127–132.
- Cruz-Morales, S.E., Santos, N.R., Brandao, M.L., 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, 973–978.
- Dal-Col, M.L., Pereira, L.O., Rosa, V.P., Calixto, A.V., Carobrez, A.P., Faria, M.S., 2003. Lack of midazolam-induced anxiolysis in the plus-maze Trial 2 is dependent on the length of Trial 1. *Pharmacol. Biochem. Behav.* 74, 395–400.
- Dawson, G.R., Crawford, S.P., Stanhope, K.J., Iversen, S.D., Tricklebank, M.D., 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, 570–572.
- Espejo, E.F., 1997. Effects of weekly or daily exposure to the elevated plus-maze in male mice. *Behav. Brain Res.* 87, 233–238.
- File, S.E., 1990. One-trial tolerance to the anxiolytic effects of chlordiazepoxide in the plus-maze. *Psychopharmacology (Berl)* 100, 281–282.
- File, S.E., Zangrossi Jr., H., 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, 240–244.
- File, S.E., Mabbutt, P.S., Hitchcott, P.K., 1990. Characterisation of the phenomenon of "one-trial tolerance" to the anxiolytic effect of chlordiazepoxide in the elevated plus-maze. *Psychopharmacology (Berl)* 102, 98–101.
- File, S.E., Andrews, N., Wu, P.Y., Zharkovsky, A., Zangrossi Jr., H., 1992. Modification of chlordiazepoxide's behavioural and neurochemical effects by handling and plus-maze experience. *Eur. J. Pharmacol.* 218, 9–14.
- File, S.E., Zangrossi Jr., H., Viana, M., Graeff, F.G., 1993. Trial 2 in the elevated plus-maze: a different form of fear? *Psychopharmacology (Berl)* 111, 491–494.
- File, S.E., Zangrossi Jr., H., Sanders, F.L., Mabbutt, P.S., 1994. Raised corticosterone in the rat after exposure to the elevated plus-maze. *Psychopharmacology (Berl)* 113, 543–546.
- Frussa-Filho, R., Ribeiro Rde, A., 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, 519–525.
- Hascoët, M., Bourin, M., Couetoux du Tertre, A., 1997. Influence of prior experience on mice behavior using the four-plate test. *Pharmacol. Biochem. Behav.* 58, 1131–1138.
- Holmes, A., Rodgers, R.J., 1998. Responses of Swiss-Webster mice to repeated plus-maze experience: further evidence for a qualitative shift in emotional state? *Pharmacol. Biochem. Behav.* 60, 473–488.
- Holmes, A., Rodgers, R.J., 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, 971–980.
- Holmes, A., Iles, J.P., Mayell, S.J., Rodgers, R.J., 2001. Prior test experience compromises the anxiolytic efficacy of chlordiazepoxide in the mouse light/dark exploration test. *Behav. Brain Res.* 122, 159–167.
- Lamprea, M.R., Cardenas, F.P., Silveira, R., Morato, S., Walsh, T.J., 2000. Dissociation of memory and anxiety in a repeated elevated plus maze paradigm: forebrain cholinergic mechanisms. *Behav. Brain Res.* 117, 97–105.
- Lister, R.G., 1987. The use of a plus-maze to measure anxiety in the mouse. *Psychopharmacology (Berl)* 92, 180–185.
- Nic Dhonnchadha, B.A., Bourin, M., Hascoët, M., 2003. Anxiolytic-like effects of 5-HT₂ ligands on three mouse models of anxiety. *Behav. Brain Res.* 140, 203–214.
- Pereira, J.K., Vieira, R.J., Konishi, C.T., Ribeiro, R.A., Frussa-Filho, R., 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–PL107.
- Ripoll, N., Nic Dhonnchadha, B.A., Sebillie, V., Bourin, M., Hascoët, M., 2005. The four-plates test–retest paradigm to discriminate anxiolytic effects. *Psychopharmacology (Berl)* 180, 73–83.
- Ripoll, N., Hascoët, M., Bourin, M., 2006. The four-plates test: anxiolytic or analgesic paradigm? *Prog. Neuro-Psychopharmacol. Biol. Psychiatry* 30, 873–880.
- Rodgers, R.J., Lee, C., Shepherd, J.K., 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, 102–110.
- Rodgers, R.J., Johnson, N.J., Cole, J.C., Dewar, C.V., Kidd, G.R., Kimpson, P.H., 1996. Plus-maze retest profile in mice: importance of initial stages of trial 1 and response to post-trail cholinergic receptor blockade. *Pharmacol. Biochem. Behav.* 54, 41–50.
- Rodgers, R.J., Johnson, N.J., Carr, J., Hodgson, T.P., 1997. Resistance of experientially-induced changes in murine plus-maze behaviour to altered retest conditions. *Behav. Brain Res.* 86, 71–77.
- Vargas, K.M., Da Cunha, C., Andreatini, R., 2006. Amphetamine and pentylentetrazole given post-trial 1 enhance one-trial tolerance to the anxiolytic effect of diazepam in the elevated plus-maze in mice. *Prog. Neuro-Psychopharmacol. Biol. Psychiatry* 30, 1394–1402.
- Whimbe, A.E., Denenberg, V.H., 1967. Two independent behavioral dimensions in open-field performance. *J. Comp. Physiol. Psychol.* 63, 500–504.

B. Discussion de l'étude 1

Dans cette étude, nous avons cherché à mettre en évidence, par l'utilisation de différents protocoles, les influences de deux facteurs de motivation chez la souris : l'exploration de l'environnement et la peur de la punition électrique.

Dans le premier protocole, la suppression de la punition lors du prétest a entraîné une faible augmentation du nombre de passages punis acceptés par les souris lors du retest. Malgré tout, ces résultats n'atteignaient pas les niveaux observés chez les souris naïves. Ce même effet se retrouve chez les souris ayant reçu du DOI, avec une augmentation similaire du nombre de punitions acceptées lors du retest, en absence de chocs pendant le prétest. Cette variation du nombre de punitions acceptées par les animaux pourrait être liée à la « mémoire aversive », elle-même liée aux chocs lors du prétest. Par ailleurs, l'effet de type anxiolytique du diazépam a disparu lors du retest chez les souris non-choquées lors du prétest. Le phénomène de « one-trial tolerance » ne semble donc pas lié à la punition électrique lors du prétest.

Dans le second protocole, nous avons supprimé les chocs lors des deux expositions au test, afin de connaître l'influence de l'exposition au test durant le premier jour, sur la motivation à explorer le même appareil lors du retest. Avec des injections de DOI ou de diazépam au cours du retest, aucune différence n'a pu être mise en évidence sur l'exploration de l'environnement, en comparaison avec des souris naïves; en isolant un léger effet du diazépam sur les souris naïves vraisemblablement lié à une diminution de la néophobie chez ces animaux. Il semble donc qu'il n'y a pas d'habituation ou de diminution de la motivation à explorer l'environnement lors du retest.

Pour le troisième protocole, nous avons modifié l'environnement de prétest, avec un cylindre de verre opacifié. Les souris ont été exposées à ce test modifié puis ont subi une exposition au FPT classique le lendemain. Les souris subissaient des chocs électriques lors des deux sessions. Nous avons constaté une augmentation du nombre de passages punis acceptés lors du retest, quels que soient les traitements injectés (DOI ou diazépam), en comparaison avec des souris naïves. De plus, l'effet de type anxiolytique du diazépam a été significativement rétabli dans ces conditions, avec un nombre de passages punis équivalent à celui de souris naïves.

Ce résultat permet de considérer que la connaissance de l'environnement est un facteur décisif dans l'apparition du phénomène de « one-trial tolerance » dans le FPT lors d'un test-retest. Le facteur « punishment » n'intervenant qu'en renforçant l'aversion contre l'environnement. Vis-à-vis de cette aversion, il convient de noter que la connaissance de l'environnement intervient aussi, puisque les souris recevant du DOI ont accepté un nombre plus élevé de punitions lors du changement d'environnement pendant le test.

Nous avons ensuite confirmé ce résultat en exposant les souris à un modèle d'anxiété complètement différent lors du prétest : l'EPM. Pour les différents traitements, les groupes ont reçu un nombre similaire de punition, en comparaison avec les souris naïves lors du retest dans le FPT. Cette dernière étude est particulièrement intéressante, puisqu'elle permet de critiquer certaines théories concernant la mise en place de la « one-trial tolerance » dans l'EPM. Ainsi, la modification de conformation du récepteur GABA_A liée à l'exposition à l'EPM, rendant inopérant les benzodiazépines (Gonzalez and File, 1997), paraît peu probable puisqu'une telle exposition n'entraîne pas de variation de l'effet du diazépam dans le FPT.

Cette étude nous a donc permis de connaître les influences respectives de deux facteurs de motivation de la souris: la connaissance de l'environnement et la peur de la punition, sur les phénomènes de « one-trial tolerance » et de mémoire aversive. Nous pouvons constater que la connaissance de l'environnement lors de la réexposition au test est d'une importance majeure pour l'expression de l'effet de type anxiolytique du diazépam, mais qu'elle exerce aussi un effet sur la diminution du nombre de passages lors du retest. De plus, nous avons observé que l'incidence de la punition électrique sur les résultats obtenus est minime et qu'elle n'intervient en rien sur le phénomène de « one-trial tolerance ». Elle n'exerce qu'un effet en second plan et uniquement sur la diminution de passages punis acceptés lors du retest. Cette dernière conclusion permet de mettre en relation directe nos résultats avec ceux obtenus sur d'autres modèles d'anxiété dans le cadre de l'étude de la « one-trial tolerance ». Nous pouvons sans ambiguïté étudier ce phénomène sur le FPT, puisque seule l'exposition à l'environnement détermine l'efficacité de la molécule anxiolytique.

Cette étude a donc apporté la preuve que le protocole de test-retest dans le FPT peut constituer un modèle d'étude de la tolérance aux benzodiazépines liée à une première exposition. Ce constat permet de rapprocher les résultats obtenus dans le test-retest du FPT, de ceux rapportés dans l'EPM. Nous avons ainsi constaté dans la littérature que différents

facteurs sont susceptibles d'intervenir dans la mise en place de la «one-trial tolerance» : des facteurs spatiaux et temporels.

Dans cette étude, nous avons pu constater que la «one-trial tolerance» observée dans le test-retest du FPT dépendait fortement de facteurs spatiaux, à savoir de l'acquisition de repères spatiaux lors du prétest. Pour poursuivre cette étude, il convient donc de s'intéresser au second facteur d'intérêt constitué par une analyse des paramètres temporels impliqués dans la mise en place de la «one-trial tolerance». La durée de l'exposition et l'intervalle de temps entre les deux expositions sont deux paramètres qui se sont avérés critiques dans l'établissement de la «one-trial tolerance» dans l'EPM. Une étude de ces deux données peut apporter de nouvelles réponses, notamment du fait de la plus grande rapidité du test de FPT, diminuant ainsi la durée d'exposition et donc d'apprentissage.

Ce travail permet par ailleurs de caractériser de manière plus fine le protocole étudié sur ce modèle. En effet, il pourrait être intéressant de comprendre si ce modèle peut être utile non seulement pour l'étude de la tolérance aux benzodiazépines, mais aussi pour d'autres pathologies.

Le test-retest du FPT pourrait constituer un modèle d'étude de pathologie dans laquelle les benzodiazépines ne sont pas actives, ainsi que certains antidépresseurs, comme nous l'avons constaté pour la paroxétine, un inhibiteur du recaptage de la sérotonine et pour la venlafaxine, un inhibiteur mixte du recaptage de la noradrénaline et de la sérotonine (Ripoll et al., 2005). La phobie sociale ou le syndrome de stress post-traumatique pourrait constituer des pathologies susceptibles d'intégrer les composantes étudiées par ce nouveau modèle. Des études supplémentaires sont bien évidemment nécessaires pour poursuivre cette caractérisation.

Ainsi, nous nous sommes intéressés aux conditions chronologiques nécessaires pour l'apparition de ces phénomènes, ceci afin de déterminer plus précisément les conditions d'apparition de l'aversion envers les punitions, ainsi que celles de la tolérance aux benzodiazépines. Ce travail a constitué l'étude 2.

II. Etude 2 : Temporal parameters of one-trial tolerance to benzodiazepines in four-plate test-retest

Paramètres temporels du phénomène de « one-trial tolerance », ou tolérance liée à la première exposition au test, dans le test-retest du FPT.

« Temporal parameters of one-trial tolerance to benzodiazepines in four-plate test-retest », publié dans le journal Behavioural Brain Research, 2007.

Petit-Demouliere, B., Bourin, M.

A. Objectifs de l'étude 2

Décrit initialement dans l'EPM, le phénomène de « one-trial tolerance » a été ensuite reproduit dans d'autres modèles d'anxiété, tel que le FPT. Notre précédente étude a démontré que le test-retest dans le FPT permettait l'étude de la « one-trial tolerance ». Dans ce modèle, nous avons récemment mis en évidence l'importance relative de deux facteurs de motivation : la connaissance de l'environnement et la peur de la punition électrique. Ainsi, nous avons pu constater qu'une souris exposée préalablement à un test ne présentait pas de modification du comportement, susceptible d'exprimer un effet de type anxiolytique après une injection de diazépam, une benzodiazépine de référence, lors de la réexposition à ce même modèle. Cette perte d'effet serait liée à la connaissance de l'environnement spatial, mais nous ignorons les modalités d'exposition nécessaires pour observer le phénomène de « one-trial tolerance ». De plus, nous avons pu conclure que les punitions électriques ne seraient pas impliquées dans cette perte d'effet.

Par ailleurs, nous avons pu constater que la mémoire aversive, s'exprimant par une diminution du nombre de passages punis acceptés lors du retest, était liée à la connaissance de l'environnement ainsi qu'à la présence de chocs électriques.

Dans cette seconde étude, nous nous sommes intéressés aux paramètres temporels responsables de l'apparition de la « one-trial tolerance » et de la mémoire aversive. En effet, le facteur temporel semble tenir une place importante dans l'apparition de la « one-trial tolerance », dans l'ensemble des études menées dans l'EPM.

Pour cela, nous avons utilisé plusieurs protocoles, en variant la durée du prétest, en présence ou non de chocs électriques ; le retest ayant lieu selon le protocole classique, avec une administration unique de véhicule ou de diazépam. Cette première partie de l'étude visait à connaître le temps d'exposition nécessaire lors du prétest pour obtenir des modifications comportementales et pharmacologiques lors du retest. Dans une seconde partie, nous avons modifié l'intervalle de temps séparant les deux sessions de test. En effet, nous avons constaté dans un travail précédent, que la diminution du nombre de passages observée lors du retest persistait après un intervalle de 42 jours suivant le prétest. Cette fois, nous avons diminué l'intervalle de temps entre les deux tests, de 15 secondes jusqu'à 2 heures. Nous n'avons pas pu injecter de traitement lors de la seconde session dans cette seconde étude, puisque nous travaillions sur des intervalles de temps trop courts.



Short communication

Temporal parameters of one-trial tolerance to benzodiazepines in four-plate test–retest

Benoit Petit-Demouliere, 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

Received 18 April 2007; received in revised form 4 June 2007; accepted 8 June 2007

Abstract

Anxiolytic-like effect of diazepam is abolished by a previous exposure to four-plate test (FPT). Variations of temporal parameters: interval between trials and duration of Trial 1, with or without electric punishments allow characterizing factors which are responsible for this loss phenomenon. Complete spatial representation of FPT seems to be responsible of this one-trial tolerance, and needs at least a 30 s exposure to the apparatus to be completed, with or without punishments.

© 2007 Published by Elsevier B.V.

Keywords: FPT; Neophobia; OTT

Four-plate test (FPT) is a useful mice model of anxiety to characterize mechanisms of action of drugs with anxiolytic-like effects [1]. Utilizing different behavioural drives, it distinguishes itself from the elevated plus-maze (EPM) and brings a different point of view and other answers that those brought by this widespread model [2]. Another similar characteristic is the emergence of one-trial tolerance (OTT) to benzodiazepines during re-exposure to the apparatus [3]. FPT can bring a new way to study OTT, as it uses a totally different method and has only one behavioural indicator: the number of accepted punishments. Many hypotheses have been proposed to explain this pharmacological phenomenon [4]. Firstly described in EPM [5,6], it has been observed in FPT and we managed to isolate the main cause of this abolishment of effect of diazepam during Trial 2. Even if memory seems not to be implied in this process [7], spatial knowledge of the environment appears to be essential to observe this loss of effect [4]. We had already shown that electric punishments only potentiate the OTT observed and linked to spatial knowledge. OTT is not observed in Trial 2 in mice that did receive electric punishment but in a spatially modified apparatus during Trial 1, but OTT appears in Trial 2 with mice that did not receive any shocks during Trial 1 [4]. In EPM with

rats, a study has revealed that one-trial tolerance to benzodiazepines was dependant of exposure time to apparatus during Trial 1 [8,9]. In the present study, we wanted to assess temporal parameters involved in the emergence of OTT during Trial 2. The duration of Trial 1 and time intervals between trials have been studied in order to describe the evolution of mice behaviour during this period and the response to diazepam intra-peritoneal injection.

Naïve male Swiss mice (Janvier, France), of 20 ± 2 g were used. They were divided into cages of 18 animals, 1 week before the experimentation, at 20°C and lights on between 07:00 and 19:00 h with free access to food and water. One hour before experiments, mice were placed into cages of six animals. All experiments followed ethical rules of the French Ministry of Agriculture (No. 87.848). Diazepam (RBI, Sigma, France) was dissolved in a 5% concentration of Tween-80 with distilled water. Controls received vehicle treatment only. Diazepam and vehicle were administered intraperitoneally (i.p.) 30 min before Trial 2 in a volume of 0.5 ml/20 g of body weight. Diazepam does not modify locomotor activity of mice at used dose.

The four-plate test (FPT) [10] (Bioseb, Chaville, France) consists of a cage ($25\text{ cm} \times 18\text{ cm} \times 16\text{ cm}$) floored by four identical rectangular plates ($11\text{ cm} \times 8\text{ cm}$) each separated by a gap of 4 mm. Plates are connected to an electric generator (0.6 mA; 0.5 s). Following a 15 s habituation period, the animal is subjected to an electric foot-shock when crossing from one plate to

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

another. The number of punished crossings is recorded during 60 s, for a total of 75 s. This score is raised by anxiolytic-like substances. Two control groups were used with naive mice during Trial 2: one using vehicle, and one using diazepam 1 mg/kg injected i.p. as internal standard in anxiety models. The usual paradigm of test–retest in FPT is made with two sessions of FPT separated by 24 h. In the following protocols, we have modified duration of exposure to FPT or time interval between the two test sessions.

The following protocols were used for the present study:

Experiment 1: Modifications of exposure time to FPT in presence of electric foot-shocks. Each group was submitted to one of these predefined periods: 30 s, 45 s, 60 s, 90 s or 135 s. One group was exposed only until mice received their first shock (labelled 1st shock). Three groups were submitted to a 75 s period: one had shocks during 75 s without habituation (labelled as 75 s shocked), the second received only one shock during the whole period (labelled as 75 s 1 shock) and the last group was a control and used the classic test–retest in FPT paradigm (labelled 75 s). All groups had a 15 s latency time without shocks, except two groups (75 s shocked and 1 shock).

Experiment 2: Modifications of exposure time to FPT in absence of electric foot-shocks. Mice groups were exposed to FPT with no punishments during Trial 1 during different period: 15 s, 30 s, 45 s, 60 s, 75 s, 90 s or 135 s.

Experiment 3: Modifications of time interval between Trials 1 and 2. Mice groups had different time intervals between trials. Trials 1 and 2 were made using the classic protocol, with a 15 s habituation time and a 60 s period of punishments.

For the statistical analysis, results were expressed as a mean of the number of punished passages ($\pm$ S.E.M.) for the FPT. For experiments 1 and 2, a two-way ANOVA (Trial 1 $\times$ treatment in Trial 2) was employed. If the ANOVA showed a significant difference, a Sidak's post hoc test was performed to compare the effect of Trial 1 on treatment effects in Trial 2. For experiment 3, a one-way ANOVA was performed with a Sidak's post hoc test. Data were tested for homogeneity of the variance and normal distribution. All analyses were conducted using the SPSS program for IBM compatible computer.

We have obtained the following results:

Experiment 1 (Fig. 1). Two-way ANOVA showed significant Trial 1 [$F_{(9,220)} = 44.8$, $p < 0.001$], drug [$F_{(1,220)} = 22.0$, $p < 0.001$] and Trial 1 $\times$ drug effects [$F_{(9,220)} = 6.2$, $p < 0.001$]. Sidak's post hoc test gave us the following results. Diazepam anxiolytic-like effect, evaluated with the raise of the number of accepted punishments, is significantly present only in two groups during Trial 2: naive ($p < 0.001$) and first shock ($p < 0.01$). In other groups, diazepam did not modify the number of punishments accepted by mice, compared to respective vehicle-treated group. Receiving only one shock (first shock group) or 30 s exposure to FPT during Trial 1 does not decrease the number of punishments accepted by mice during Trial 2, compared to naive mice. First shock group had a mean time exposure to FPT during Trial 1 of 12.4 ± 1.2 s. 30 s exposure of time, i.e. 15 s habituation and 15 s punished exploration, is sufficient to abolish the anxiolytic-like effect of diazepam at 1 mg/kg. All groups that have been exposed a longer time to FPT during Trial 1 did

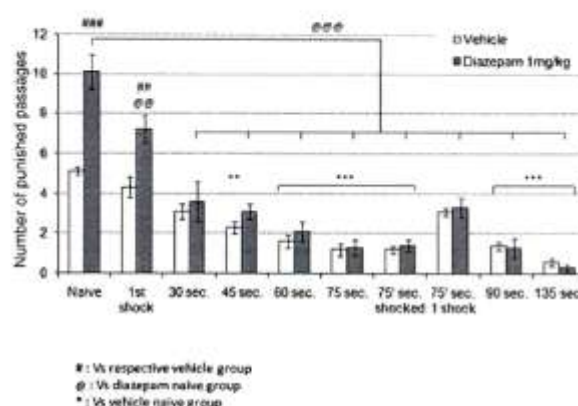


Fig. 1. Consequences of modifications of the duration of Trial 1 on Trial 2 results in presence of electric foot-shocks. All data are shown as means $\pm$ S.E.M., $n = 12$ per group. The symbol @ indicates a significant difference with the naive group. The symbol # indicates a significant difference with respective vehicle group. The symbol * indicates a significant difference with the vehicle naive group. The number of symbol explains the level of significance (e.g. @ $p < 0.05$, @@ $p < 0.01$, @@@ $p < 0.001$).

not show any effect of diazepam. Considering vehicle-treated groups (75 s 1 shock excepted), mice exposed at least 45 s to FPT during Trial 1 accepted significantly fewer punishments than naive mice during Trial 2 ($p < 0.01$ for 45 s group, $p < 0.001$ for other groups). Group exposed to Trial 1 during 75 s with only the first shock (labelled 75 s 1 shock) was not significantly different from naive mice during Trial 2 for both vehicle and diazepam treatments.

If we compare groups during Trial 2 by taking 75 s group as control, only naive and first shock groups are significantly different ($p < 0.01$). All groups exposed during at least 30 s during Trial 1 in FPT are not significantly different from 75 s control group.

Experiment 2 (Fig. 2). Two-way ANOVA showed significant Trial 1 [$F_{(8,198)} = 34.7$, $p < 0.001$], drug [$F_{(1,198)} = 39.1$, $p < 0.001$] and Trial 1 $\times$ drug effects [$F_{(8,198)} = 7.7$, $p < 0.001$]. Sidak's post hoc test gave us the following results: 75 s control made significantly less punished passages than naive mice ($p < 0.001$). This retest control was different from both 15 s, 30 s, 45 s groups for vehicle and diazepam treatments ($p < 0.01$). Diazepam had a significant effect only in naive and 15 s groups ($p < 0.001$). In other groups, it did not modify the number of accepted punishments. In vehicle treated groups, a difference of accepted punishments was observed in 60 s, 90 s and 135 s in comparison with naive mice, these groups made fewer passages than naive inexperienced mice.

Experiment 3 (Fig. 3). One-way ANOVA showed a significant difference between groups [$F_{(12,143)} = 19.245$, $p < 0.001$]. Using the Sidak's post hoc test, we obtained the following results. All experienced mice accepted significantly fewer punishments than naive mice ($p < 0.05$ for 4.5 min group; $p < 0.001$ for other groups). A tendency of decreasing in the number of accepted punished passages was observed when raising the time interval between trials, but without statistical confirmation. 4.5 min time interval was the only group that was different from 1440 min

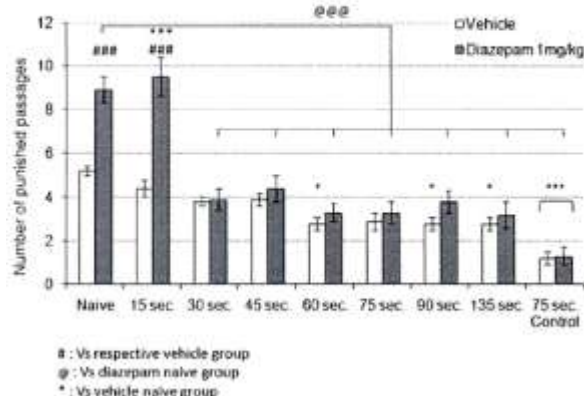


Fig. 2. Consequences of modifications of the duration of Trial 1 on Trial 2 results in absence of electric foot-shocks. All data are shown as means $\pm$ S.E.M., $n = 12$ per group. The symbol # indicates a significant difference with the naive group. The symbol @ indicates a significant difference with the vehicle group. The symbol * indicates a significant difference with the vehicle naive group. The number of symbol explains the level of significance (e.g. @ $p < 0.05$, @ @ $p < 0.01$, @ @ @ $p < 0.001$).

retest group ($p < 0.001$) and different from the next time interval (6 min, $p < 0.01$).

In the present study, we have modified the time parameters of the test–retest paradigm in FPT, in order to find which parameter could be implicated in the loss of effect of diazepam during Trial 2, namely one-trial tolerance [4]. Previously, we had shown that the decrease in accepted punished passages during Trial 2 was observed at intervals ranging from 24 h to 42 days [3]. Using three experiments, we have isolated parameters of the test–retest paradigm: duration of Trial 1 with or without shocks and time interval. The first major result is the abolishment of anxiolytic-like effect of diazepam when mice explore more than 15 s the FPT. Even in absence of electric punishments, this complete loss of diazepam effect is found, confirming that exploration is the only behavioural drive that cancels the effect of diazepam during Trial 1 [4]. A 15 s exposure to FPT with or without pun-

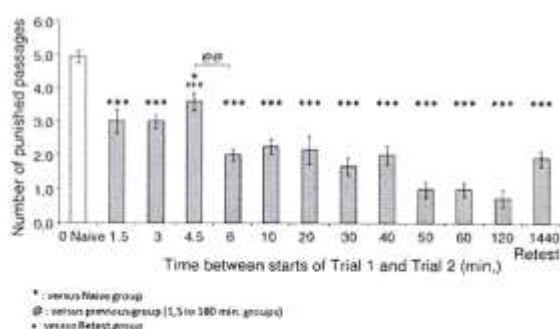


Fig. 3. Modifications of time interval between Trials 1 and 2 in FPT. All data are shown as means $\pm$ S.E.M., $n = 12$ per group. The symbol @ indicates a significant difference with the previous group (inferior time interval). The symbol # indicates a significant difference with retest group. The symbol * indicates a significant difference with the naive group. The number of symbol explains the level of significance (e.g. @ $p < 0.05$, @ @ $p < 0.01$, @ @ @ $p < 0.001$).

ishments (15 s or first shock groups) is not sufficient to cancel the anxiolytic-like effect of diazepam during Trial 2. It is possible that mice did not have enough time to make a complete representation of this new environment in such a short time. Diazepam could exert its effect on a preserved neophobic state, which could have disappeared in mice exposed during a longer time. With groups exposed during more than 15 s to FPT in Trial 1, a switch of balance between exploration and fear may occur, leading to a new state against which diazepam appears to be ineffective. Spatial representation of the FPT apparatus could be acquired during the first 30 s elapsed in FPT during Trial 1. This mapping of the environment leads to a new anxiety-like state, different from neophobia and resistant against diazepam. Environmental knowledge does not itself strongly decrease the number of punished passages accepted during Trial 2, as observed with vehicle treated mice without shock during Trial 1. Only a small decrease in punished crossings is detected during Trial 2, with 3 groups which were able to explore FPT at least 60 s without shock during Trial 1. This decrease may be due to a diminution of the exploratory drive linked to a complete knowledge of the environment. Influence of punishments on the effect of diazepam cannot be known; as the anxiolytic-like effect is lost with all groups exposed more than 15 s. Furthermore we could not check the effect of modifying time intervals between trials on the effect of diazepam, as drug administration must occur 30 min before the test and the decrease of punished crossings appears as soon as 1.5 min after the start of Trial 1. Punishments seem to potentiate the decreased in punished crossings accepted by mice during Trial 2. Fifteen seconds of habituation followed by 30 s of punished passages are sufficient to trigger this decrease. On the contrary, there is only a small decrease in punishments during Trial 2 with mice which did not receive electric foot-shocks during Trial 1. Moreover, the 75 s 1 shock group reveal effects of punishments during Trial 1 on behaviour during Trial 2. No difference between this group and naive mice was observed during Trial 2. One shock is not sufficient to decrease the exploratory drive of mice during re-exposure to FPT. With all these data, we can conclude that the loss of effect of diazepam during retest in FPT is due to a previous 30 s exposure. During this period, a complete spatial representation seems to achieve, and converts the neophobic state to a new anxiety-like state resistant to diazepam. Spatial knowledge is the main information kept by mice, cloaking the fear of electric punishments. This mapping of the environment takes 30 s to complete and is available as of the end of Trial 1. Indeed, a significant reduction in the number of punished passages accepted by the mice is observed as of the interval of 1.5 min between trials. A regular decrease in the number of punishments accepted during Trial 2 can be observed with the raise of time interval, which can be linked to a transfer of the spatial information to a kind of long-term memory. Another hypothesis could be linked to the stress-induced analgesia. The stressed animals could be less sensitive to the electric punishment shortly after the first exposure and, therefore, perform more punished crossings. Previously assessed [7], the topic of memory in the test–retest process seems to hide some answers, mainly in the retention of spatial mapping, that last for at least 42 days. In EPM, the anxiolytic-like effect of midazolam is respectively

present submitted during 1 min, impaired in 2 min and absent in 5 min in Trial 1 [8], but this study was made with rats. It is interesting to consider that the time-course of abolishment of anxiolytic-like effect of the benzodiazepine is not similar in both models. In FPT, only 30 s of exploration are sufficient to trigger one-trial tolerance to BZD in mice; in EPM, 1 min of exposure during Trial 1 is sufficient [11]. Shorter time exposures have not been tested with EPM. The time necessary to have OTT in the model may depend of the complexity of the new environment, one single closed box could be simpler to analyze and memorize than four arms with or without walls.

Even if amnesic compounds seem to be inefficient to cancel OTT during Trial 2 [7], it has to be concluded that there is a learning process that influence anxiolytic-like effect of diazepam during Trial 2. The spatial component of this learning may be insensitive to this type of drug-induced amnesia.

Spatial manipulations had also been assessed in EPM. The authors revealed that confinement to an open arm did not compromise chlordiazepoxide efficacy, and closed arm confinement during initial exposure abolished it. They concluded that anxiolytic-like effect of the drug in Trial 2 depends on prior discovery and exploration of relatively safe areas of the maze (i.e. closed arms) [12]. We can suppose that during Trial 1, mice are looking for a safe place in FPT, and that the spatial acquisition during this time does not only keep aversive data (electric punishments), but also what is the best behaviour to have against the threat (decrease of exploration). This suggestion is close to Rodgers and Shepherd's hypothesis, explained by Pereira as "prior knowledge of the maze (e.g. escape is not possible via open arms) would reduce the tendency to explore these natural aversive areas, thereby reducing conflict and eliminating a possible response to diazepam" [13,14].

We can conclude that FPT allowed to study OTT with a different point of view, but permitted to obtain similar results as studies in EPM. We now have a temporal scale for the establishment of OTT in FPT, which is not affected by punishments. The main advantage of FPT is the ease of use, the rapidity and the robustness of the model. It is less sensitive to environmental variations in our laboratory than EPM, and the use of electric punishments allows to potentate OTT and aversive memory studies.

Acknowledgment

We thank Nicolas Cogrel for the technical assistance brought during this work.

References

- [1] 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;166:131–9.
- [2] Masse F, Nic Dhonnchadha BA, Hascoët M, Bourin M. Anxiolytic-like effect of 5-HT₂ ligands and benzodiazepines co-administration: comparison of two animal models of anxiety (the four-plate test and the elevated plus maze). *Behav Brain Res* 2007;177:214–26.
- [3] Hascoët M, Bourin M, Couetoux du Tertre A. Influence of prior experience on mice behavior using the four-plate test. *Pharmacol Biochem Behav* 1997;58:1131–8.
- [4] Petit-Demoulière B, Hascoët M, Bourin M. Factors triggering abolishment of benzodiazepines effects in the four-plate test–retest. *Eur Neuropsychopharmacol* 2007 May 31; [Epub ahead of print].
- [5] File SE. One-trial tolerance to the anxiolytic effects of chlordiazepoxide in the plus-maze. *Psychopharmacology (Berl)* 1990;100:281–2.
- [6] Lister RG. The use of a plus-maze to measure anxiety in the mouse. *Psychopharmacology (Berl)* 1987;92:180–5.
- [7] Ripoll N, Nic Dhonnchadha BA, Sebillé V, Bourin M, Hascoët M. The four-plates test–retest paradigm to discriminate anxiolytic effects. *Psychopharmacology (Berl)* 2005;180:73–83.
- [8] Dal-Col ML, Pereira LO, Rosa VP, Calixto AV, Carobrez AP, Faria MS. Lack of midazolam-induced anxiolysis in the plus-maze Trial 2 is dependent on the length of Trial 1. *Pharmacol Biochem Behav* 2003;74:395–400.
- [9] File SE, Zangrossi Jr H, Viana M, Graeff FG. Trial 2 in the elevated plus-maze: a different form of fear? *Psychopharmacology (Berl)* 1993;111:491–4.
- [10] Aron C, Simon P, Larousse C, Boissier JR. Evaluation of a rapid technique for detecting minor tranquilizers. *Neuropharmacology* 1971;10:459–69.
- [11] Calzavara MB, Patti CL, Lopez GB, Abilio VC, Silva RH, Frussa-Filho R. Role of learning of open arm avoidance in the phenomenon of one-trial tolerance to the anxiolytic effect of chlordiazepoxide in mice. *Life Sci* 2005;76:2235–46.
- [12] Holmes A, Rodgers RJ. Influence of spatial and temporal manipulations on the anxiolytic efficacy of chlordiazepoxide in mice previously exposed to the elevated plus-maze. *Neurosci Biobehav Rev* 1999;23:971–80.
- [13] Rodgers RJ, Shepherd JK. 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)* 1993;113:237–42.
- [14] Pereira JK, Vieira RJ, Konishi CT, Ribeiro RA, Frussa-Filho R. 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* 1999;65:PL101–7.

B. Discussion de l'étude 2

Dans ce travail, nous avons cherché à connaître les modalités nécessaires en termes de temps d'exposition et d'intervalle inter-tests pour constater l'apparition d'une « one-trial tolerance », ainsi que l'apparition d'une mémoire aversive, en comparaison avec des souris naïves. A l'aide de ces deux protocoles, nous avons pu déceler plusieurs résultats intéressants.

Dans un premier temps, nous avons pu observer que le phénomène de « one-trial tolerance » s'exprimait lorsque les souris avaient été exposées 30 secondes au FPT lors du prétest. Ce résultat est retrouvé chez des souris exposées ou non à des chocs électriques durant ce prétest. Cela confirme bien que la perte d'effet du diazépam dans le FPT n'est pas liée à la présence de chocs électriques, comme nous l'avons démontré dans l'étude précédente.

Une exposition de 15 secondes n'est pas suffisante pour déclencher ce phénomène. Cela peut être attribué au fait que la souris n'a pas suffisamment de temps pour se faire une représentation complète de l'espace de test. Dans ce contexte, le diazépam conserve son activité de type anxiolytique lors du retest. Cette activité pourrait être liée à l'activité de la benzodiazépine sur la néophobie, qui ne serait pas diminuée lors du retest, du fait d'une trop courte exposition préalable.

La représentation spatiale effectuée par la souris semblerait donc nécessiter une exposition supérieure à 15 secondes. Les animaux seraient alors placés dans un état différent de la néophobie et contre lequel le diazépam serait inefficace. Dans l'EPM chez le Rat, le temps maximum d'exposition lors du prétest pour ne pas observer de la «one-trial tolerance» était de 1 minute. Dès 2 minutes d'exposition, une altération de l'effet du midazolam était mise en évidence (Dal-Col et al., 2003). Ces deux données permettent de conclure qu'il y a un fort effet du facteur temporel lors du prétest sur l'apparition de la «one-trial tolerance». Nous ne pouvons pas comparer de manière plus aboutie les deux modèles selon ce critère puisqu'aucune étude n'a été réalisée dans l'EPM chez la Souris, avec du diazépam. Ces deux données sont en effet indispensables pour autoriser une comparaison entre les modèles.

En considérant le déroulement du test d'un point de vue comportemental, nous pouvons penser qu'une souris naïve est extrêmement motivée lors de cette première exposition pour

découvrir son environnement proche, vraisemblablement pour en connaître tous les intérêts et risques potentiels.

Nous constatons que la connaissance de l'environnement n'est pas suffisante pour entraîner une forte diminution du nombre de punitions acceptées lors du retest. En l'absence de punitions lors du prétest, les souris conservent un niveau de punitions acceptées similaire aux souris naïves, malgré une exposition prolongée au test. Les animaux sont en présence d'un environnement spatial identique et qui présente pourtant de nouveaux risques liés aux chocs électriques. La motivation à explorer ces différences pourrait être ainsi expliquée.

Par contre, après avoir découvert l'environnement pendant 30 secondes en subissant les punitions lors du test, la connaissance de l'environnement et de son aversion est acquise.

Dès lors, la motivation prépondérante lors du retest n'est plus liée à l'appropriation de données spatiales. En effet le lendemain, la souris réexposée n'a plus le même équilibre entre motivation d'exploration et peur envers l'environnement. Les punitions lors du retest constituent un phénomène aversif connu et assimilé à l'environnement initialement découvert. Si la motivation à explorer l'environnement est diminuée par une connaissance des repères spatiaux suffisante, la souris n'a plus intérêt à passer d'une plaque à l'autre. Cela pourrait expliquer alors, la diminution du nombre de punitions acceptées par les souris lors du retest, chez des souris exposées 30 secondes en présence de chocs électriques durant le prétest.

Dans les deux cas, un changement d'équilibre entre motivation d'explorer et peur des punitions lors du retest pourrait placer les souris dans un état dans lequel les benzodiazépines s'avéreraient inefficaces.

L'étude de l'intervalle de temps nous permet de constater que les informations acquises par l'animal lors de la première exposition peuvent modifier la réponse comportementale dès la fin du prétest, puisqu'une souris réexposée immédiatement au test ne continue pas à explorer l'environnement. Ceci persiste pendant les deux heures suivant le test.

Malgré cela, nous ne pouvons savoir si cette diminution observée quel que soit l'intervalle de temps (0 secondes – 2 heures) est liée à une cause unique ou plutôt à plusieurs phénomènes successifs d'habituation puis de mémorisation progressive. En effet, nous pouvons constater une diminution régulière du nombre de punitions acceptées lors du retest, au fur et à mesure de l'augmentation de l'intervalle de temps entre les deux sessions.

Concernant l'effet du diazépam, celui-ci étant testé 30 minutes après injection, nous ne pouvions pas tester la « one-trial tolerance » sur ce même intervalle de temps (0 secondes – 2 heures). Pour pouvoir étudier cet intervalle de temps, il faudrait effectuer une cinétique de l'effet de type anxiolytique du diazépam sur des souris naïves ayant reçu du diazépam dans cet intervalle de temps. Ensuite, si le traitement a montré un effet durant cette période, nous pourrions essayer de tester des intervalles de test-retest plus courts que 30 minutes avec des injections de diazépam.

III. Etude complémentaire des facteurs comportementaux

Résultats de différentes expérimentations sur l'effet du diazépam lors du retest

- Etude de l'effet anti-punitif du diazépam avec un intervalle de 30 ou 60 minutes entre test et retest
- Cinétique de l'effet de type anxiolytique du diazépam entre 5 et 25 minutes dans le FPT chez la souris naïve
- Effet anti-punitif du diazépam lors du retest avec un intervalle de temps inférieur à 30 minutes entre test et retest
- Augmentation de l'intervalle de temps entre test et retest, jusqu'à 42 jours, avec une injection de diazépam lors du retest : Etude de la persistance de la « one-trial tolerance »

Dans notre précédente étude, nous avons constaté que le facteur temporel était fortement impliqué dans l'apparition de la «one-trial tolerance». Pourtant, nous n'avons pu étudier que le facteur « durée du prétest ». En effet, nous ne pouvions pas travailler sur une diminution de l'intervalle de temps entre prétest et retest, car nous ne disposions pas de la cinétique de l'effet du diazépam dans le FPT sur une durée inférieure à 30 minutes.

Dans les deux protocoles qui suivent, nous avons initié un travail sur l'effet du diazépam lors d'une diminution de l'intervalle de temps. Une première expérimentation a été menée sur l'effet du diazépam lors d'un retest 30 ou 60 minutes après le prétest. Nous avons conservé la latence classique pour l'injection du diazépam, qui est de 30 minutes, mais nous souhaitons déterminer si les processus déclenchant la «one-trial tolerance» étaient mis en place sur une durée inférieure à 24 heures.

- Etude de l'effet anti-punitif du diazépam avec un intervalle de 30 ou 60 minutes entre test et retest

Dans cette expérience, nous nous sommes intéressés à l'effet anti-punitif que le diazépam pouvait exercer sur des souris retestées 30 ou 60 minutes après le prétest. Le temps « 30 minutes » correspond à la latence classique entre l'injection et le test dans le protocole du FPT et au maximum d'effet observé du diazepam chez des souris naïves. Le temps « 60 minutes » a été choisi à l'aide des résultats de l'étude 2. En effet, lors d'un retest 60 minutes après le prétest, nous avons observé les plus faibles valeurs de nombre de passages punis acceptés chez les souris non traitées. Cette forte diminution du nombre de passages punis acceptés pour un intervalle de 60 minutes augmentait la possibilité de mettre en évidence un effet anti-punitif du diazépam, même si il était relativement faible.

Les souris ont subi un FPT, puis ont été replacées dans les mêmes cages. Pour le groupe « 30 minutes », les souris ont été injectées immédiatement après le prétest, puis retestées 30 minutes après. Pour le groupe 60 minutes, les souris ont été remises en cage après le prétest pendant 30 minutes, injectées puis retestées 30 minutes après l'injection. Les souris ont reçu soit du diazépam à la dose de 1 mg/kg, soit du véhicule, par voie intrapéritonéale. Elles ont été comparées avec des souris naïves injectées avec les mêmes produits, 30 minutes avant le test.

La figure suivante (fig. 6) représente les résultats obtenus :

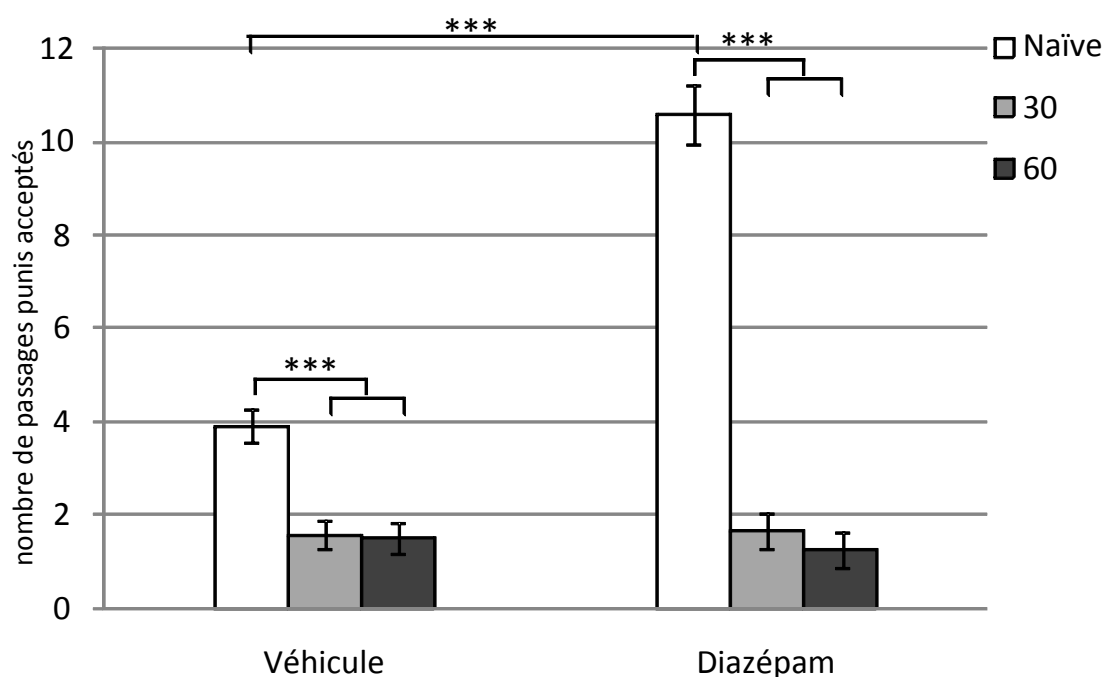


Figure 6 : Influence de l'intervalle de temps entre le prétest et le retest sur la perte d'effet anti-punitif du diazépam (1 mg/kg) lors du retest dans le FPT. Les données sont représentées en moyenne +/- sem (n=12). Le sigle * représente une différence significative (* p<0.05, **<0.01, ***<0.001).

Nous pouvons constater que le diazépam n'entraîne pas d'augmentation significative du nombre de passages punis acceptés lors d'un retest effectué 30 ou 60 minutes après le prétest. L'ANOVA à deux facteurs montre un effet significatif du test [$F_{(2,66)}=129.82$, $p<0.001$] et du traitement [$F_{(1,66)}=41.42$, $p<0.001$], ainsi qu'une interaction significative entre ces deux facteurs [$F_{(2,66)}=44.74$, $p<0.001$]. Le test à posteriori de Sidak révèle qu'il existe une différence significative entre les souris naïves injectées avec du diazépam, en comparaison des souris ayant reçu uniquement le véhicule ($p<0.001$). Cet effet anti-punitif n'est pas retrouvé chez les souris retestées, aussi bien à 30 qu'à 60 minutes après le prétest ($p<0.001$ pour toutes les comparaisons).

Ce premier résultat a permis de constater que la mise en place des processus entraînant une perte d'effet du diazépam lors du retest est très rapide. Pour un intervalle de temps de 30 minutes entre le prétest et le retest, le diazépam n'induit pas d'effet d'augmentation du nombre de passages punis acceptés par les animaux expérimentés lors du retest.

Néanmoins, cette chronologie est assez large, en effet nous avons montré, chez les souris injectées avec du véhicule, que l'information aversive et que la diminution du nombre de punitions acceptées étaient mesurables dès la fin du prétest. C'est pourquoi nous avons réalisé une cinétique de l'effet de type anxiolytique du diazépam à la dose de 1 mg/kg, dose présentant le maximum d'effet à 30 minutes, en fonction de la latence entre injection et test comportemental dans le FPT.

- Cinétique de l'effet de type anxiolytique du diazépam entre 5 et 25 minutes dans le FPT chez la souris naïve

Dans ce protocole, nous avons diminué l'intervalle de temps entre l'injection et le retest. Nous avons cherché à déterminer le temps minimal auquel nous pourrions observer un effet de type anxiolytique du diazépam injecté en i.p. à la dose de 1 mg/kg. Grâce à cette donnée, nous projetons de tester la chronologie d'apparition du phénomène de « one-trial tolerance » sur une durée inférieure à 30 minutes entre le prétest et le retest.

La figure sur la page suivante (fig. 7) représente les résultats obtenus :

Nous pouvons constater que le diazépam exerce un effet de type anxiolytique dès 5 minutes après son administration par voie intrapéritonéale dans le FPT. En effet, l'ANOVA à un facteur montre un effet significatif du facteur temps [$F_{(5,66)}=5.91$, $p<0.001$]. Le test à posteriori de Sidak révèle une différence significative entre chacun des groupes traités au diazépam et le groupe traité avec du véhicule. Aucune différence n'est apparue entre chacun des groupes diazépam.

A la suite de cette expérimentation, nous pouvons conclure que l'effet de type anxiolytique du diazépam est significatif dès 5 minutes après l'injection i.p.chez la souris naïve dans le FPT. La diffusion, puis l'action du diazépam sur les récepteurs GABA_A intervient rapidement. Le résultat de cette cinétique permet de tester l'effet du diazépam lors du retest, avec un intervalle de temps compris entre 5 et 30 minutes, puisqu' il exerce un effet de type anxiolytique dans le FPT dans cet intervalle de temps chez la souris naïve.

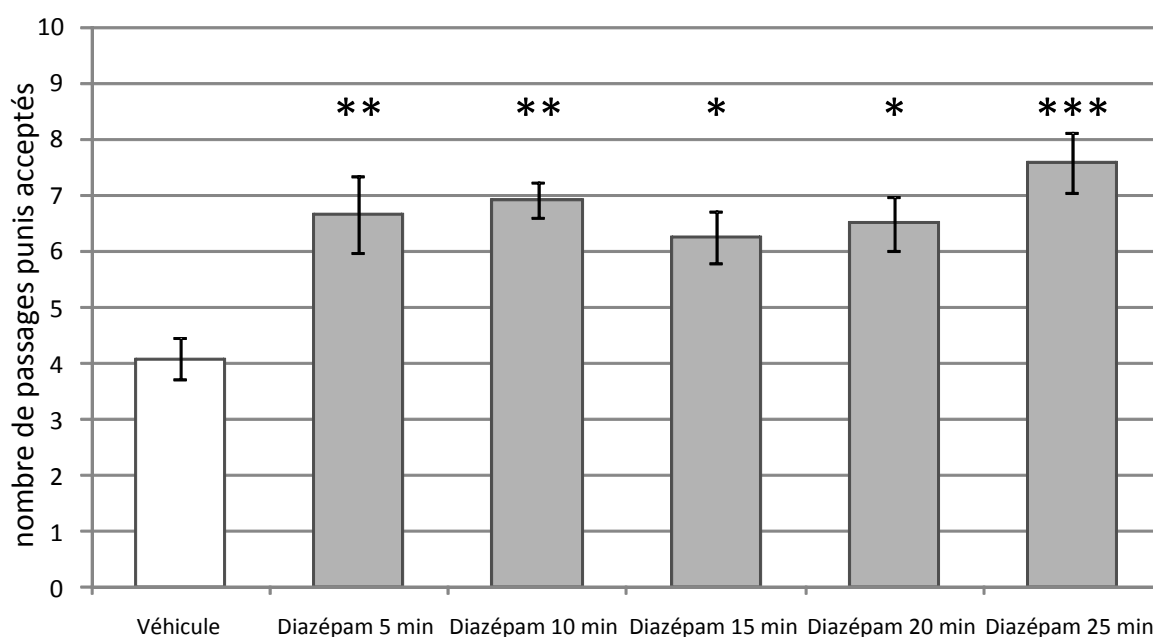


Figure 7 : Cinétique de l'effet d'une injection du diazépam (1 mg/kg) dans le FPT chez des souris naïves. Les données sont représentées en moyenne $\pm$ sem (n=12). Le sigle * représente une différence significative par rapport aux souris « témoins », ayant reçu du véhicule (* p<0.05, **<0.01, ***<0.001).

- Effet anti-punitif du diazépam lors du retest avec un intervalle de temps inférieur à 30 minutes entre test et retest

Afin de compléter l'étude 2 sur les facteurs temporels impliqués dans la mise en place de la mémoire aversive et de la « one-trial tolerance », nous avons testé l'effet anti-punitif du diazépam sur des intervalles de temps test-retest compris entre 5 et 30 minutes. Sur cette plage chronologique, nous avons démontré qu'une injection de diazépam à la dose de 1 mg/kg amenait un effet de type anxiolytique chez des souris naïves dans le FPT.

Dans ces conditions, nous avons voulu connaître la vitesse de mise en place du processus de perte d'effet du diazépam, afin de mettre ce résultat en parallèle de la chronologie effectuée pour des souris injectées avec du véhicule seulement, lors de l'étude 2.

La figure suivante (fig. 8) représente les résultats obtenus :

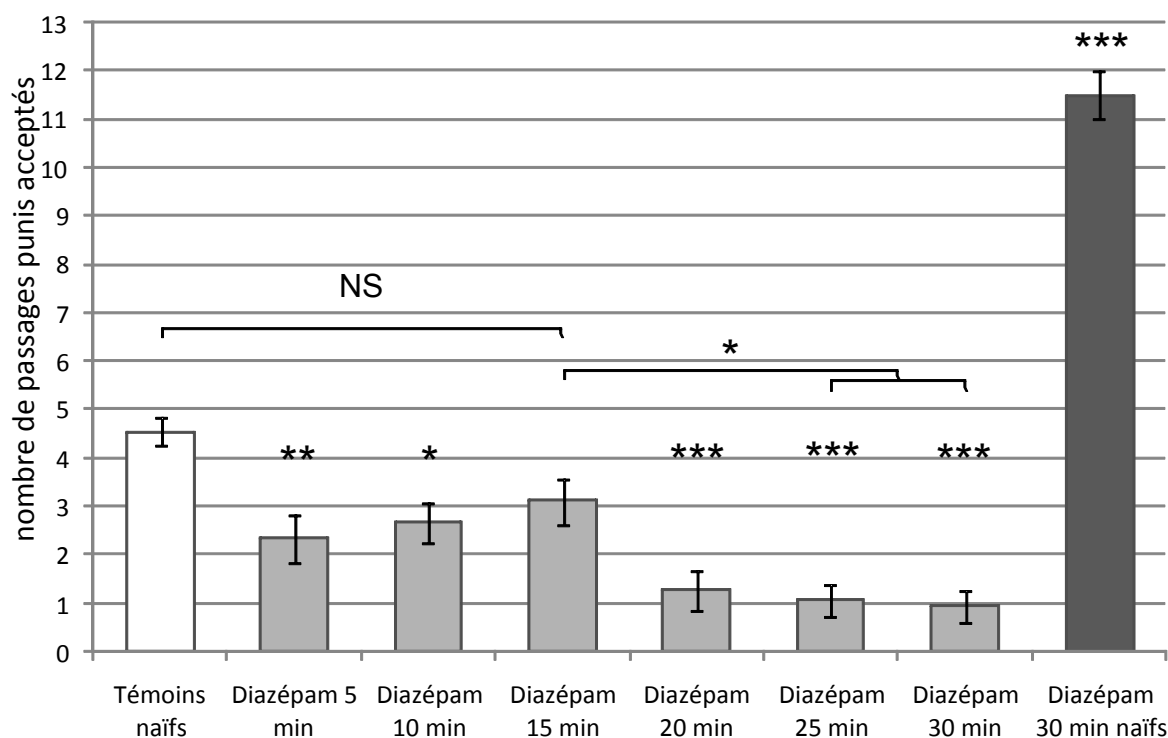


Figure 8 : Cinétique de l'effet d'une injection du diazépam (1 mg/kg) dans le FPT chez des souris naïves et expérimentées. Les données sont représentées en moyenne +/- sem (n=12). Le sigle * représente une différence significative (* p<0.05, **<0.01, ***<0.001).

L'analyse statistique des résultats obtenus démontre qu'il existe des différences significatives entre les groupes étudiés [$F_{(7,136)}=71.19$, $p<0.001$]. Le diazépam exerce un effet de type anxiolytique chez les souris naïves ($p<0.001$). La cinétique d'effet du diazépam lors du retest révèle que l'injection de diazépam chez les souris prétestées ne provoque aucune augmentation du nombre de passages punis acceptés suffisamment élevée pour dépasser le niveau du groupe contrôle naïf. L'absence de groupe « témoin retest » ne permet pas de définir l'effet de type anxiolytique du diazépam dans cet intervalle de temps. Néanmoins, nous pouvons constater qu'il existe deux phases dans la cinétique observée : une phase pour un intervalle inférieur ou égal à 15 minutes, et une phase pour un intervalle supérieur à 15 minutes.

Nous pouvons émettre l'hypothèse que durant les 15 premières minutes, la souris subit l'influence du diazépam et du stress suivant le prétest. Le stress diminue progressivement

sur cet intervalle pour être absent 15 minutes après le prétest. Pour cet intervalle de 15 minutes, aucune différence n'est constatée entre les souris témoins ayant reçu du véhicule, et les souris ayant reçu du diazépam. Nous pouvons supposer que le nombre de passages punis acceptés a été significativement augmenté par le diazépam, pour atteindre la valeur des souris témoins naïves. Lorsque l'intervalle entre prétest et retest dépasse 15 minutes, le profil est complètement différent, avec un nombre de passages punis acceptés très faible et identique à 20, 25 et 30 minutes. Pour ces groupes, aucun effet du diazépam ne semble s'exercer.

Bien que nous ne disposons pas de l'ensemble des contrôles adéquats, nous pouvons néanmoins constater que le profil de la cinétique de l'effet du diazépam dans le retest du FPT est différent de celui des souris traitées uniquement avec du véhicule. En effet, dans l'étude 2, nous avons pu observer une diminution du nombre de passages punis acceptés dès 1,5 minute après le prétest, en comparaison avec de souris naïves. Cette diminution était fortement significative pour un intervalle de temps entre prétest et retest supérieur à 6 minutes. Cette différence de profil nous amène à supposer que la mise en place des processus entraînant la perte d'effet du diazépam ne suit pas la même cinétique que l'apparition de la mémoire aversive.

Cette information corrobore notre conclusion selon laquelle les phénomènes de la «one-trial tolerance» et de mémoire aversive sont dépendants de processus différents et suivent une cinétique différente. Cela nous permet de supposer que les structures impliquées dans ces deux phénomènes peuvent elles-aussi être différentes ou impliquées d'une manière différente.

- Augmentation de l'intervalle de temps entre test et retest, jusqu'à 42 jours, avec une injection de diazépam ou de véhicule lors du retest, pour constater la persistance ou non de la « one-trial tolerance »

Dans une précédente étude au sein du laboratoire, nous avons démontré que la mémoire aversive observée lors d'une réexposition au FPT perdurait au moins jusqu'à 42 jours après la première exposition. Dans cette nouvelle étude, nous avons voulu tester la persistance de

la perte d'effet du diazépam dans ce même intervalle de temps, ceci afin de savoir si la « one-trial tolerance » demeurerait sur une telle période.

Ainsi, nous avons prétesté des animaux dans le FPT, puis nous les avons réexposés 24 heures, 3 jours, 7 jours, 14 jours, 21 jours, 28 jours ou 42 jours après le premier test. Lors de ce retest, les animaux recevaient soit une dose de 1 mg/kg de diazépam, soit le véhicule. De plus, nous avons testé à chacune des sessions de retest des animaux naïfs issus de la même cohorte, avec chacun des traitements.

La figure suivante (fig. 9) représente les résultats obtenus :

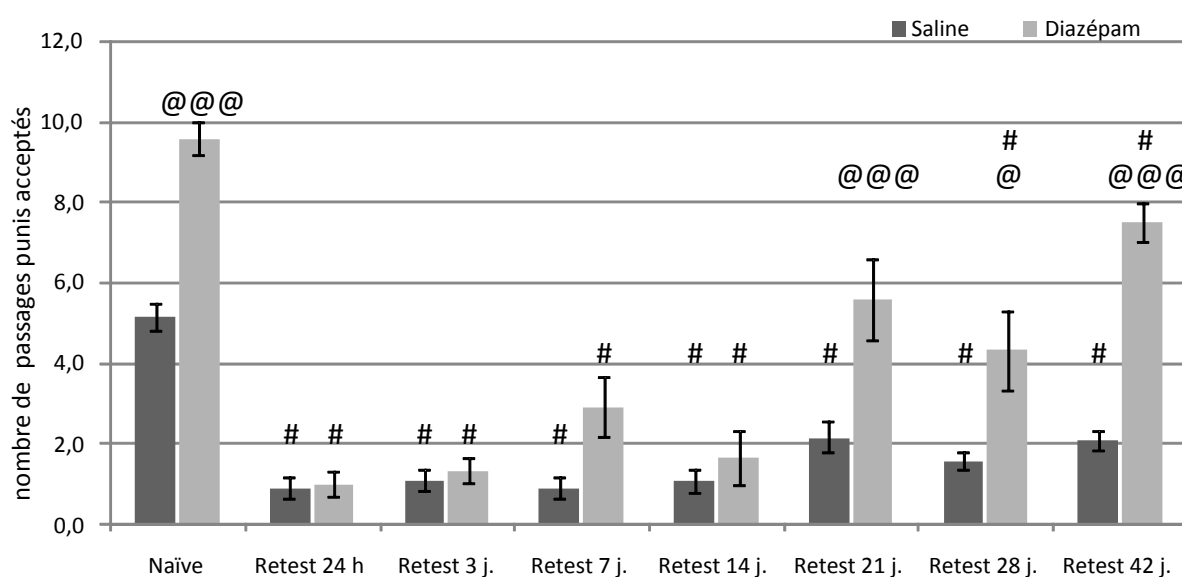


Figure 9 : Augmentation de l'intervalle de temps entre test et retest, jusqu'à 42 jours, avec une injection de diazépam (1 mg/kg) ou de véhicule lors du retest. Les données sont représentées en moyenne +/- sem (n=12). Le sigle @ représente une différence significative entre le groupe diazépam et son témoin véhicule pour un même intervalle de temps (@ p<0.05, @@@ p<0.001). Le sigle # représente une différence significative entre le groupe considéré, et son témoin naïf issu de la même cohorte, et non représenté sur le graphique. (# p<0.001, excepté pour « retest 42 j. » # p<0.05).

L'analyse statistique révèle que des différences significatives existent selon le traitement [$F_{(1,176)}=84.56$, $p<0.001$] ou l'intervalle de temps [$F_{(7,176)}=37.04$, $p<0.001$] et que l'interaction entre ces facteurs est significative [$F_{(7,176)}=7.50$, $p<0.001$]. Sur la figure 9, nous n'avons pas représenté les groupes témoins naïfs issus de la même cohorte, utilisés comme témoins du jour pour chaque intervalle de temps. Une différence significative existe pour tous les groupes ayant reçu du véhicule entre les souris naïves et les souris retestées ($p<0.001$), pour un intervalle de temps compris entre 24 heures et 42 jours. Nous pouvons donc constater, comme nous l'avons publié précédemment, que la mémoire aversive lors du retest est conservée sur cette période (Hascoet et al., 1997). Par ailleurs, nous observons qu'aucune

augmentation du nombre de passages punis acceptés n'est retrouvée pour les groupes ayant reçu une dose de 1 mg/kg de diazépam, sur des intervalles de temps compris entre 24 heures et 14 jours. Par contre, pour un intervalle de temps entre prétest et retest supérieur à 14 jours, nous avons constaté une différence significative entre les animaux ayant reçu le diazépam et ceux ayant reçu du véhicule. La persistance de la « one-trial tolerance » est donc inférieure à celle de la mémoire aversive, puisqu'elle n'est plus observée au-delà de 14 jours.

Ce résultat confirme, une fois de plus, que les deux phénomènes observés lors du retest, la mémoire aversive et la « one-trial tolerance, ne sont pas supportés par des mécanismes et par une cinétique équivalente. Cela permet de supposer que l'implication de la mémoire spatiale, disponible chez la Souris souris jusqu'à 42 jours après le prétest, n'est pas prépondérante dans l'apparition de la « one-trial tolerance ».

IV. Etude 3 : Anxiolytic-like effect of DOI microinjections into the hippocampus (but not the amygdala nor the PAG) in the mice four-plate test

Effets de type anxiolytique de micro-injections de DOI dans l'hippocampe (mais pas dans l'amygdale ou la PAG) dans le FPT chez la Souris

« Anxiolytic-like effect of DOI microinjections into the hippocampus (but not the amygdala nor the PAG) in the mice four-plate test » soumis au journal European Neuropsychopharmacology.

Massé, F., Petit-Demouliere, B., Dubois, I., Hascoët, M., Bourin, M.

A. Objectifs de l'étude 3

Dans cette étude, nous avons mis au point un protocole d'injection localisée au niveau de structures cérébrales. Conjointement avec le Dr. F. Massé, nous avons procédé à l'injection d'un agoniste des récepteurs sérotoninergiques 5-HT_{2A/2C} : le DOI, ou de liquide céphalo-rachidien artificiel dans l'hippocampe, l'amygdale ou la PAG. En effet, ces trois structures semblent jouer un rôle important dans l'anxiété, ainsi que dans l'élaboration des effets de type anxiolytique des traitements.

Cette étude s'inscrivait aussi dans le cadre de la recherche des mécanismes d'action du DOI dans le FPT, afin de déterminer les structures impliquées dans l'apparition de l'effet de type anxiolytique observé lors d'une injection intra-péritonéale dans le FPT.

Au cours de cette étude, nous n'avons pas étudié le modèle du test-retest. Ce travail a été effectué sur le FPT avec une seule exposition. L'étude cherchait à déterminer des structures impliquées dans l'élaboration d'un effet de type anxiolytique dans le FPT. De plus, nous avons mis au point et validé dans le laboratoire la méthodologie nécessaire pour ce travail, à partir d'une technique développée dans l'équipe du Pr. C. Belzung par une doctorante (S. Coubard).

Dans ce protocole, la validation de la technique d'injection a été effectuée par le biais d'une étude histologique et de l'observation des résultats comportementaux. Nous nous sommes intéressés aux effets d'injections de DOI dans différentes structures liées à l'anxiété, dans le FPT. Par ailleurs, nous avons vérifié que le protocole d'opération et d'injection n'entraînait pas de modifications de l'activité locomotrice chez les animaux. Pour cela, nous avons utilisé un test d'actimétrie et avons ainsi pu connaître l'activité exploratrice horizontale des animaux.

Anxiolytic-like effect of DOI microinjections into the hippocampus (but not the amygdala nor the PAG) in the mice four-plate test

Fabienne MASSE, Benoit PETIT- DEMOULIERE, Isabelle DUBOIS, Martine HASCOËT and Michel BOURIN

EA 3256 « Neurobiologie de l'anxiété et de la dépression »
Faculté de Médecine
BP 53508
1 rue Gaston Veil,
F44035 Nantes cedex 01, France
e-mail: michel.bourin@univ-nantes.fr
Phone: +33-2-40412852
Fax: +33-2-40412856

ABSTRACT

Anxiolytic-like effects of DOI, a 5-HT_{2A/2C} agonist have been observed in elevated plus-maze and four-plate test (FPT). In the present study, we have targeted three structures involved in anxiety in mice and injected three quantities (1µg, 2µg or 5µg per mice) of DOI into hippocampus, amygdala and periaqueductal gray matter (PAG). Tests were carried out immediately after injections. At 1-2 µg/mice, DOI did not modify the number of punished passages accepted by mice. Injections of 5 µg DOI/mice did modify behaviours of mice in FPT. In amygdala and PAG, DOI exerts an anxiogenic-like effect. In dorsal hippocampus, a strong anxiolytic-like effect was found when injecting DOI, comparable to the anxiolytic-like effect of diazepam 1mg/kg injected intraperitoneally and used as positive control. DOI or vehicle injections did not affect locomotor activity. These results help us to understand mechanisms of action of DOI in animal models of anxiety

INTRODUCTION

The four-plate test (FPT) is an animal model of anxiety in mice, which is used in many laboratories to evaluate the anxiolytic-like effect of new molecules. This model is based on the suppression of novel surrounding exploration by the delivery of mild electric foot shock contingent to quadrant crossing (Aron et al., 1971). A compound exerts an anxiolytic-like effect when its administration triggers a raise of the number of punished passages accepted by mice. In our laboratory, FPT has demonstrated a sensibility for the acute administration of benzodiazepines and antidepressants (selective serotonin reuptake inhibitors, SSRIs and noradrenaline/serotonin reuptake inhibitors, SNRIs) inducing an anxiolytic-like effect in this test (Bourin et al., 1992; Hascoet et al., 2000).

There is evidence now that 5-HT₂ receptors are implicated in the anxiolytic-like properties of antidepressant drugs (Bourin and Nic Dhonnchadha, 2005). Precedent studies have demonstrated that the stimulation of 5-HT₂ receptors induced an anxiolytic-like effect in the FPT (Nic Dhonnchadha et al., 2003a). An acute i.p. administration of DOI (a 5-HT_{2A/2C} agonist) generated an anxiolytic-like effect in the FPT. This effect is due to the stimulation of 5-HT_{2A} receptors and not to the stimulation of 5-HT_{2C} receptors because a 5-HT_{2A} antagonist only inhibited the punishment increase induced by DOI (Nic Dhonnchadha et al., 2003b). Moreover, this subtype of receptors seems to be implicated in the anxiolytic-like effect of antidepressants (Nic

Dhonnchadha et al., 2005). A recent study demonstrated that the 5-HT_{2A} receptors stimulated by acute administration of DOI are present on GABA neurons (Masse et al., 2006).

In order to localize the 5-HT_{2A} receptor activated after DOI administration at the cerebral structure level, we have measured the DOI activity in three brain structures widely implicated in the neurobiology of anxiety: dorsal hippocampus, amygdala and periaqueductal gray matter (PAG).

The first structure studied is the dorsal hippocampus. This structure is implicated in the mechanism of fear conditioning (Antoniadis and McDonald, 2000; Gerlai, 2001; Sanders et al., 2003). Hippocampal lesions lead to behavioural alterations in particular circumstances as fear conditioning (Young et al., 1994). Moreover, many studies have demonstrated that, in the hippocampus, a local administration of benzodiazepines (midazolam or diazepam) induced an anxiolytic-like effect in the Vogel conflict test (Kataoka et al., 1991; Plaznik et al., 1994; Stefanski et al., 1993). The role of serotonergic transmission in hippocampus has been studied by the local infusion of 5-HT_{1A} agonists and 5-HT₃ antagonists. The administration of these drugs induced anxiolytic-like effects in the elevated plus maze and in the Vogel conflict test (Menard and Treit, 1998; Menard and Treit, 1999).

The amygdala has been also described as a significant structure in the mediation of fear conditioning and anxiety. Different studies have demonstrated that lesion of amygdala

induce disruptions of neurochemical indications (e.g. adrenocortical activation) and expressions of behaviours (e.g. freezing behaviour) of fear conditioning (Blanchard and Blanchard, 1972; Goldstein et al., 1996). Moreover, Campeau et al., 1991 have shown an elevation of c-fos ARNm in amygdala after administration of mild footshocks in rat (Campeau et al., 1991). The amygdala possesses an important 5-HT innervation from dorsal raphe nucleus (Azmitia and Segal 1978; Vertes 1991). 5-HT local administrations seem to induce anxiogenic-like effects in many animal models (Higgins et al., 1991; Hodges et al., 1987).

The third structure studied is the PAG. This structure integrates behavioural and autonomic expressions of defensive reactions and then plays an important role in fear and anxiety (Bandler and Shipley, 1994; Brandao et al., 2003; Graeff, 1990; Lovick, 1993). In human, dorsal PAG (dPAG) stimulation induces feelings of fear and marked autonomic changes comparable to the symptoms of panic attacks (Amano et al., 1978; Nashold et al., 1969). In animals, PAG stimulation evokes an aversive emotional response (fear and escape behaviour) and stress physiological changes (increase of defecation) (Schutz et al., 1985). Many evidences demonstrate that PAG stimulation implicates the 5-HT neurotransmission (de Bortoli et al., 2006; de Paula Soares and Zangrossi, 2004; Jacob et al., 2002; Jenck et al., 1989; Schutz et al., 1985). Moreover, the PAG and the amygdala possess 5-HT innervations from the dorsal raphe. These 5-HT neurons possess varicosities which have preferential contacts with 5-HT₂ receptors (Mamounas et al., 1991). This observation demonstrates that serotonergic activities of the PAG and the amygdala mainly implicate the activation of 5-HT₂ receptors.

In summary, this work tries to localize the cerebral structure implicated in the anxiolytic-like effect of DOI in the FPT.

The aim of the present study is so to evaluate the anxiolytic-like effect of the 5-HT_{2A/2C} agonist DOI in the FPT in three cerebral structures: hippocampus, amygdala and PAG. For this purpose, a local infusions paradigm has been used and validated.

EXPERIMENTAL PROCEDURE

Animals

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

Experimental design

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

This apparatus (Bioseb, Chaville, France) consists of a cage (25×18×16cm) floored by four identical rectangular plates (11×8 cm) each separated by a gap of 4 mm. The plates are connected to a device that can generate electric foot shocks (0.6 mA; 0.5 seconds, s). Following a 15 s habituation

period, the animal is subjected to an electric foot shock when crossing (transition) from one plate to another i.e. two legs on one plate and two legs on another. The number of punished crossings is calculated for a period of 60 s. An anxiolytic substance is capable of augmenting the number of punished passages accepted by mice. Two standards groups were used in the study: a control group using vehicle, and an internal standard in the anxiety model using diazepam 1mg/kg injected i.p..

Locomotor activity

Using an actimeter, we checked if surgery or infusion would modify or not the locomotor activity of mice, in order to isolate potential false positive in the study. Locomotor activity was recorded during 75 sec. just after the infusion of LCR or DOI, to be concordant with the FPT protocol. Controls were made with mice which were not operated.

Surgical procedure

Surgery: Animals were anaesthetized with chloral hydrate (400 mg/kg) and placed in a stereotaxic apparatus (ASI Instruments). Stainless steel cannula guides (0.60 mm external and 0.35 mm internal diameters) were implanted bilaterally in hippocampus and amygdala or unilaterally in periaqueductal gray matter (PAG) according to atlas (Franklin and Paxinos, 1997). Stereotaxic coordinates were: for dorsal hippocampus -2.5 mm posterior to bregma, +/- 1.75 mm lateral to the midline and -2 mm ventral to the dorsal surface of the skull; for amygdala -1.5 mm : +/- 2.75 mm : -5 mm; for PAG -4.6 mm : +/- 0 mm : -2 mm. Cannula guides were fixed to the skull with radiopaque posterior glass ionomer restorative cement GC Fuji IX (Henri Schein, France). Animals were allowed to rest 7 days before the behavioural test to recover from surgery. A metallic cannula dummy was placed in the cannula guide after surgery to avoid blood clots. After behavioural tests, mice received injections of methylene blue into cannula guide, they were sacrificed and brains were removed and placed 1 min. in 2-methyl-butane at -35°C. Localizations of the implantation of cannula guides were checked by histological way on cryostat sections.

Local infusion: Hippocampus and amygdala and PAG were infused with vehicle or with DOI, a 5-HT_{2A/2C} agonist (Sigma, France) with an internal cannula (0.30 mm external and 0.15 mm internal diameter) connected by polyethylene tubing to 2 µl Hamilton Syringe. For hippocampus, 0.5 µl solution was injected on each side (1 µl/ mouse) over a 60 s period. For amygdala and PAG, 0.2 µl solution was injected on each side (0.4 µl/mouse for amygdala, 0.2 µl/mouse for PAG) over a 60 s period. Immediately after the intra-structure injection, animals were placed in the behavioural test, FPT or actimeter. Behavioural tests were performed between 09:00 and 13:00 hours in a quiet room. The mice were kept in this room at least 1 h before the test. Artificial cerebro-spinal fluid (aCSF) was used to dissolve DOI, and to inject in control-operated mice. For Amygdala and PAG, three groups were made: 1 µg/mice, 2µg/mice and 5 µg/mice. For Hippocampus, two groups of DOI infusions were made: 1 µg/mice and 5 µg/mice (mortality of mice after surgery forced us to remove the 2µg/mice group).

Statistical analysis

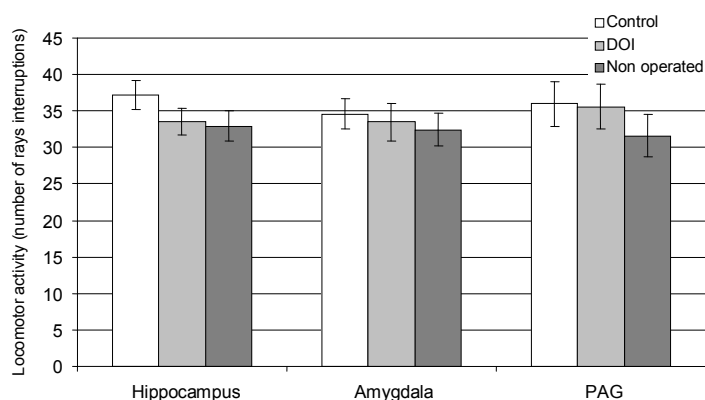


Figure 1: Effect of vehicle and DOI injections on locomotor activity recorded by an actimeter. The results are cited as mean $\pm$ SEM (n=10) of number of rays interruptions. Statistical analysis was performed by a one-way ANOVA to know effects of local administration of DOI and local administration of artificial cerebro-spinal fluid (aCSF) on locomotor activity. To compare operated mice with non operated mice and non operated mice with diazepam group, a student's *t* test was performed (@@@ $p < 0.001$).

Results were expressed as a mean of the number of punished passages ($\pm$ SEM) for the FPT.

For actimeter, results were expressed as a mean of the number of ray interruptions. One-way ANOVA was employed, if the ANOVA showed a significant difference, a Dunnett's test was performed to compare the effect of treatments. The effect of diazepam, included as internal standard in the anxiety model, was compared to the control group via a student's *t* test ($p < 0.05$). All analyses were conducted using the SPSS program for IBM compatible computers.

RESULTS

Effect of Vehicle and DOI local administrations on locomotor activity

In all studied structures, surgery, vehicle or drugs infusions did not modify the locomotor activity recorded during 75 sec (Fig. 1). One-way ANOVA did not show any significant differences, for drugs, structures or interactions between these parameters.

Effect of Vehicle and DOI local administrations in the FPT

In the hippocampus, the amygdala and the PAG,

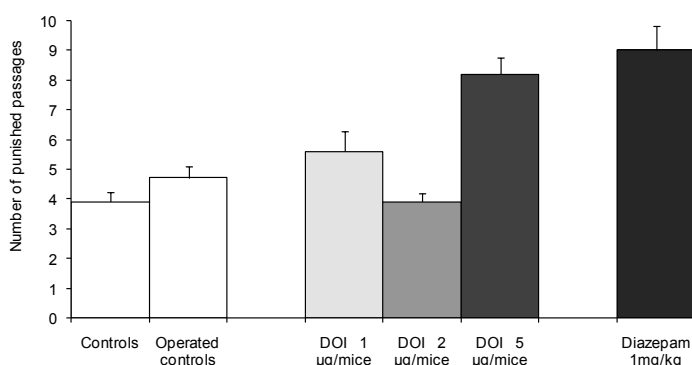


Figure 2: Effect of bilateral intra-hippocampal injection of DOI in the FPT. The results are cited as mean $\pm$ SEM (n=10). Statistical analysis was performed by a one-way ANOVA followed by a Dunnett's test (***) $p < 0.001$ to compare mice effect of local administration of DOI and local administration of artificial cerebro-spinal fluid (aCSF). To compare operated mice with non operated mice and non operated mice with diazepam group, a student's *t* test was performed (@@@ $p < 0.001$).

implantation of stainless steel cannula guides or injection of vehicle did not modify the number of punished passages accepted by mice in comparison with the control group ($p > 0.05$). (Fig 2,3 and 4)

Dorsal hippocampus

The administration of DOI in dorsal hippocampus induced a dose dependant modification in the mice behaviour in the FPT in comparison with control-operated mice [$F_{(2, 27)} = 10.359$, $p < 0.001$]. The local administration of DOI 1 µg or DOI 2 µg in hippocampus did not significantly modify the number of punished passages ($p > 0.05$). The local administration in hippocampus of DOI 5 µg/mice significantly increased the number of punishments accepted by mice in the FPT ($p < 0.001$). Diazepam administered i.p. 30 min before the test significantly increased the number of punished passages in the FPT ($p < 0.001$). (Fig 2)

Amygdala

The statistical analysis demonstrated a significant effect of DOI local administration in the amygdala [$F_{(3, 36)} = 3.533$, $p = 0.025$]. This local administration of DOI at the doses of 1 µg and 2 µg did not modify the number of punished passages accepted by mice in the FPT ($p > 0.05$). The local administration of DOI at the dose of 5 µg/mice significantly decreased the number of punishment in FPT ($p = 0.008$). Diazepam administered i.p. 30 min before the test significantly increased the number of punished passages in the FPT ($p < 0.001$). (Fig 3)

PAG

The intra-PAG injection of DOI significantly modified the mice behaviour in the FPT [$F_{(3, 36)} = 7.367$; $p = 0.001$]. The administration of DOI at the doses of 1 and 2 µg did not modify the number of punished passages accepted by mice ($p > 0.05$). The intra-amygdala administration of DOI at the dose of 5 µg significantly decreased the number of punishment accepted by mice in the FPT ($p = 0.003$). Diazepam administered i.p. 30 min before the test significantly increased the number of punished passages in the FPT ($p < 0.001$). (Fig 4)

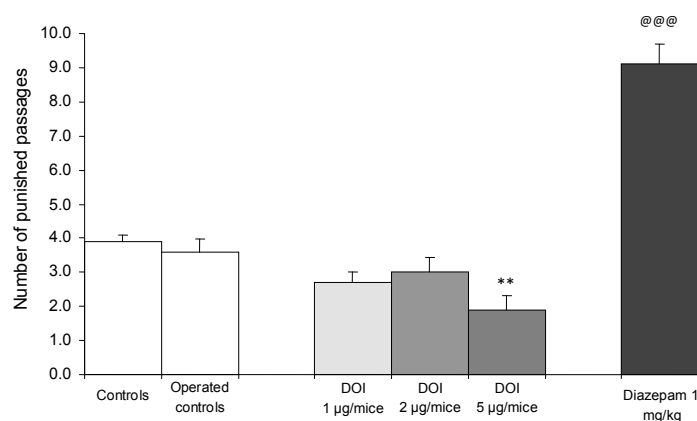


Figure 3: Effect of bilateral intra-amygdala injection of DOI in the FPT. The results are cited as mean $\pm$ SEM (n=10). Statistical analysis was performed by a one-way ANOVA followed by a Dunnett's test (**) $p < 0.01$ to compare mice effect of local administration of DOI and local administration of artificial cerebro-spinal fluid (aCSF). To compare operated mice with non operated mice and non operated mice with diazepam group, a student's *t* test was performed (@@@ $p < 0.001$).

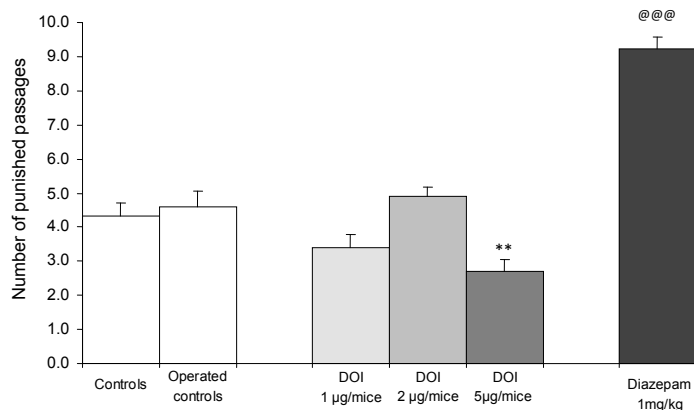


Figure 4: Effect of bilateral intra-PAG injection of DOI in the FPT. The results are cited as mean ± SEM (n=10). Statistical analysis was performed by a one-way ANOVA followed by a Dunnett's test (** $p < 0.01$) to compare mice effect of local administration of DOI and local administration of artificial cerebro-spinal fluid (aCSF). To compare operated mice with non operated mice and non operated mice with diazepam group, a student's *t* test was performed (@@@ $p < 0.001$).

DISCUSSION

In the present study, we have used FPT in order to find cerebral structures implicated in the anxiolytic-like effect of DOI, a 5-HT_{2A/2C} agonist. We had previously described a strong effect of this drug in the FPT, but only with i.p. administration. This work targeted three structures known to be involved in the anxiety process in rodents. Dorsal hippocampus, PAG and amygdala received local infusions of DOI, and then mice were directly placed in FPT, to score the number of punished passages. In parallel with this study, we checked if local infusions of DOI or vehicle in these structures would affect locomotor activity of mice, using an actimeter test. As FPT is an animal model based on exploratory behaviour, the first result to consider is the absence of modifications of locomotor activity after vehicle or DOI local infusions. This was preponderant to go further in the analysis of our results.

Controls animals that received vehicle infusions obtained the same results as naive animals in both behavioural tests. The results of this study show that administration of DOI in dorsal hippocampus triggers a significant increase in the number of punished passages accepted by mice whereas administration of DOI in amygdala and PAG decreases the number of passages punished in the FPT.

The hippocampus is a structure which receive many serotonergic afferences coming from dorsal and median raphe nuclei (McQuade and Sharp, 1997; Moore et al., 1978; Seeman et al., 1980). Modifications of the concentration of 5-HT in this structure helped to reveal its importance in the neurobiological mechanisms of anxiety (Beekman et al., 2005; Belzung et al., 2001; Carvalho et al., 2005; Rex et al., 2005). Bannerman et al. (2003) showed that a lesion of the ventral hippocampus generates modifications of anxious behaviours of rats in some models of anxiety, as a reduction in the immobilization of the rat after having received an electric shock as well as a reduction in the latency time to enter in the white compartment of the test of the light/dark test which shows an anxiolytic-like effect (Bannerman et al., 2003).

On the contrary, other studies did not find any effect of different type of lesions of hippocampus on the behaviour of rats in the elevated plus-maze or on time spent in the white compartment in light/dark test (Dringenberg et al., 1998; Treit and Menard, 1997). Only one study showed the effect of a direct injection in the hippocampus of a 5-HT₂ ligand, the mCPP. The mCPP, a nonselective agonist of 5-HT₂ receptors decrease the time of social interactions in rat and thus has an anxiogenic-like activity (Whitton and Curzon, 1990). These results are different from those obtained in our study but the ligand used is also different. The DOI is an agonist of 5-HT_{2A/2C} receptors. Its activity in the FPT would be due to selective activation of 5-HT_{2A} receptors (Nic Dhonnchadha et al., 2003b). The mCPP is a nonspecific ligand of one of the sub-types of 5-HT₂ receptors with an affinity slightly more important for 5-HT_{2C} receptors. It is then possible that the effect obtained in the study of Whitton and Curzon is due to activation of 5-HT_{2B} or 5-HT_{2C} receptors. Moreover, mCPP injected i.p. do not exert any behavioural modification in mice in the FPT and the elevated plus-maze. At the contrary DOI, in these two tests, has an anxiolytic-like activity; suggesting different mechanisms of action of these two molecules (Nic Dhonnchadha et al., 2003a).

The implication of 5-HT₂ receptors presents in amygdala was largely studied in various models of anxiety. A local infusion of 5-HT in amygdala increases anxious behaviours in a modified Geller-Seifter test and administration of an antagonist of 5-HT₂ receptors, the methysergide shows anxiolytic-like properties in the same test (Hodges et al., 1987). Moreover, microinjections of a nonselective agonist of 5-HT_{2C} receptors the m-CPP, and of a selective agonist of 5-HT_{2C} receptors, the interleukine (IT)-639, in amygdala increases anxious-like behaviours in "open field", this effect was attenuated by systemic co-administration of an antagonist of 5-HT_{2C} receptors (Campbell and Merchant, 2003). Similar results were found in another study where the MK-212, a selective agonist of 5-HT_{2C} receptors, showed an anxiogenic-like activity which was cancelled by a microinjection of ritanserine (de Mello Cruz et al., 2005). On contrary, infusions in amygdala of ketanserine, an antagonist of 5-HT₂ receptors, trigger anxiogenic-like effects in elevated plus-maze in rat (Zangrossi Junior and Graeff, 1994). These results seem mainly to show that the stimulation of 5-HT_{2C} receptors in amygdala induces an increase in anxiety. Moreover, the comparison of mRNA quantity of 5-HT₂ receptors shows that 5-HT_{2C} receptors are the most present sub-type in the amygdala (Pompeiano et al., 1994). Our results show that a direct injection of DOI in amygdala induces an anxiogenic-like effect in the FPT. The DOI is a non-selective agonist of 5-HT_{2A} and 5-HT_{2C} receptors, literature suggests that the activity of DOI is similar under these conditions with the stimulation of receptors 5-HT_{2C}.

The injection of DOI in the PAG seems to induce an effect similar to that observed during an injection in amygdala i.e. an anxiogenic-like effect. In this structure, many contradictory effects were described about activation of 5-HT₂ receptors. Some non selective antagonists of these

receptors (e.g. ketanserine) decrease aversive effects induced by a stimulation of the PAG in the rat. The authors of this study conclude that blocking 5-HT₂ receptors in the PAG contributes to inhibit intra-cerebral aversive systems (Jenck et al., 1989). Another study using the T-maze in rat shows that the administration of 5-HT in the PAG has an anxiogenic-like effect and that administration of antagonists of 5-HT_{2A} and 5-HT_{2C} receptors in the PAG 10 min before the 5-HT injection in the same structure prevents its effect. In this study, the data used to score anxiogenic-like behaviours in this test (latency time of the rat to enter in the open arm of the apparatus) is not modified by the DOI. It would seem possible that the quantity used in this study is insufficient for obtaining an effect (de Paula Soares and Zangrossi, 2004). Cerebral administration of 5-HT raises the level of electric stimulations of the PAG needed to induce escape behaviours of rat. This effect is blocked by ketanserine, suggesting an implication of 5-HT₂ receptors (Schutz et al., 1985). Moreover, DOI induces an increase of this level too, that would indicate an anxiolytic-like effect of the activation of 5-HT₂ receptors in the PAG (Jacob et al., 2002). These results are conflicting with our results, but these contradictions can be explained by the differences in methodology between the two studies: electric stimulations of the PAG versus behavioural tests. The fact that these studies were undertaken on rats and ours on mice can also lead to discordance of the results.

Altogether, these data suggest that the neurobiological mechanism implied in the central anxiolytic-like effect of DOI, observed after a systemic administration would implicate mainly the dorsal hippocampus. Amygdala and PAG would exert an anxiogenic-like effect on behaviour of mice with DOI, but the global effect of DOI remains anxiolytic-like.

REFERENCES:

- Amano, K., Tanikawa, T., Iseki, H., Kawabatake, H., Notani, M., Kawamura, H. and Kitamura, K. (1978) Single neuron analysis of the human midbrain tegmentum. Rostral mesencephalic reticulotomy for pain relief. *Appl. Neurophysiol.* 41(1-4), 66-78.
- Antoniadis, E.A. and McDonald, R.J. (2000) Amygdala, hippocampus and discriminative fear conditioning to context. *Behav. Brain. Res.* 108(1), 1-19.
- Aron, C., Simon, P., Larousse, C. and Boissier, J.R. (1971) Evaluation of a rapid technique for detecting minor tranquilizers. *Neuropharmacology* 10(4), 459-469.
- Bandler, R. and Shipley, M.T. (1994) Columnar organization in the midbrain periaqueductal gray: modules for emotional expression? *Trends Neurosci.* 17(9), 379-389.
- Bannerman, D.M., Grubb, M., Deacon, R.M., Yee, B.K., Feldon, J. and Rawlins, J.N. (2003) Ventral hippocampal lesions affect anxiety but not spatial learning. *Behav. Brain. Res.* 139(1-2), 197-213.
- Beekman, M., Flachskamm, C. and Linthorst, A.C. (2005) Effects of exposure to a predator on behaviour and serotonergic neurotransmission in different brain regions of C57Bl/6N mice. *Eur. J. Neurosci.* 21(10), 2825-2836.
- Belzung, C., El Hage, W., Moindrot, N. and Griebel, G. (2001) Behavioral and neurochemical changes following predatory stress in mice. *Neuropharmacology* 41(3), 400-408.
- Blanchard, D.C. and Blanchard, R.J. (1972) Innate and conditioned reactions to threat in rats with amygdaloid lesions. *J. Comp. Physiol. Psychol.* 81(2), 281-290.
- Bourin, M., Hascoet, M., Mansouri, B., Colombel, M.C. and Bradwejn, J. (1992) Comparison of behavioral effects after single and repeated administrations of four benzodiazepines in three mice behavioral models. *J. Psychiatry Neurosci.* 17(2), 72-77.
- Bourin, M. and Nic Dhonnchadha, B.A. (2005) 5-HT₂ receptors and anxiety. *Drug Dev. Res.* 65, 133-140.
- Brandao, M.L., Troncoso, A.C., de Souza Silva, M.A. and Huston, J.P. (2003) The relevance of neuronal substrates of defense in the midbrain tectum to anxiety and stress: empirical and conceptual considerations. *Eur. J. Pharmacol.* 463(1-3), 225-233.
- Campbell, B.M. and Merchant, K.M. (2003) Serotonin 2C receptors within the basolateral amygdala induce acute fear-like responses in an open-field environment. *Brain Res.* 993(1-2), 1-9.
- Campeau, S., Hayward, M.D., Hope, B.T., Rosen, J.B., Nestler, E.J. and Davis, M. (1991) Induction of the c-fos proto-oncogene in rat amygdala during unconditioned and conditioned fear. *Brain Res.* 565(2), 349-352.
- Carvalho, M.C., Albrechet-Souza, L., Masson, S. and Brandao, M.L. (2005) Changes in the biogenic amine content of the prefrontal cortex, amygdala, dorsal hippocampus, and nucleus accumbens of rats submitted to single and repeated sessions of the elevated plus-maze test. *Braz. J. Med. Biol. Res.* 38(12), 1857-1866.
- de Bortoli, V.C., Nogueira, R.L. and Zangrossi, H., Jr. (2006) Effects of fluoxetine and buspirone on the panicolytic-like response induced by the activation of 5-HT_{1A} and 5-HT_{2A} receptors in the rat dorsal periaqueductal gray. *Psychopharmacology (Berl)* 183(4), 422-428.
- de Mello Cruz, A.P., Pinheiro, G., Alves, S.H., Ferreira, G., Mendes, M., Faria, L., Macedo, C.E., Motta, V. and Landeira-Fernandez, J. (2005) Behavioral effects of systemically administered MK-212 are prevented by ritanserin microinfusion into the basolateral amygdala of rats exposed to the elevated plus-maze. *Psychopharmacology (Berl)* 182(3), 345-354.
- de Paula Soares, V. and Zangrossi, H., Jr. (2004) Involvement of 5-HT_{1A} and 5-HT₂ receptors of the dorsal periaqueductal gray in the regulation of the defensive behaviors generated by the elevated T-maze. *Brain Res. Bull.* 64(2), 181-188.
- Dringenberg, H.C., Kornelsen, R.A., Pacelli, R., Petersen, K. and Vanderwolf, C.H. (1998) Effects of amygdaloid lesions, hippocampal lesions, and buspirone on black-white exploration and food carrying in rats. *Behav. Brain. Res.* 96(1-2), 161-172.
- Franklin, K. and Paxinos, G. (1997) *The Mouse Brain in Stereotaxic Coordinates*, San Diego.
- Gerlai, R. (2001) Behavioral tests of hippocampal function: simple paradigms complex problems. *Behav. Brain. Res.* 125(1-2), 269-277.
- Goldstein, L.E., Rasmusson, A.M., Bunney, B.S. and Roth, R.H. (1996) Role of the amygdala in the coordination of behavioral, neuroendocrine, and prefrontal cortical monoamine responses to psychological stress in the rat. *J. Neurosci.* 16(15), 4787-4798.
- Graeff, F.G. (1990) Brain defense systems of anxiety. In B.G.a.N.J.R. (eds), *Ed. Handbook of Anxiety, The Neurobiology of anxiety*, p. 307-354. Elsevier Science Publishers, Amsterdam.
- Hascoet, M., Bourin, M., Colombel, M.C., Fiocco, A.J. and Baker, G.B. (2000) Anxiolytic-like effects of antidepressants after acute administration in a four-plate test in mice. *Pharmacol. Biochem. Behav.* 65(2), 339-344.
- Higgins, G.A., Jones, B.J., Oakley, N.R. and Tyers, M.B. (1991) Evidence that the amygdala is involved in the disinhibitory effects of 5-HT₃ receptor antagonists. *Psychopharmacology (Berl)* 104(4), 545-551.
- Hodges, H., Green, S. and Glenn, B. (1987) Evidence that the amygdala is involved in benzodiazepine and serotonergic effects on punished responding but not on discrimination. *Psychopharmacology (Berl)* 92(4), 491-504.
- Jacob, C.A., Cabral, A.H., Almeida, L.P., Magierek, V., Ramos, P.L., Zanolini, J.M., Landeira-Fernandez, J., Zangrossi, H. and Nogueira, R.L. (2002) Chronic imipramine enhances 5-HT_{1A} and 5-HT₂ receptors-mediated inhibition of panic-like behavior in the rat dorsal periaqueductal gray. *Pharmacol. Biochem. Behav.* 72(4), 761-766.
- Jenck, F., Broekkamp, C.L. and Van Delft, A.M. (1989) Effects of serotonin receptor antagonists on PAG stimulation induced aversion: different contributions of 5HT₁, 5HT₂ and 5HT₃ receptors. *Psychopharmacology (Berl)* 97(4), 489-495.
- Kataoka, Y., Shibata, K., Miyazaki, A., Inoue, Y., Tominaga, K., Koizumi, S., Ueki, S. and Niwa, M. (1991) Involvement of the dorsal hippocampus in mediation of the antianxiety action of tandospirone, a 5-hydroxytryptamine_{1A} agonistic anxiolytic. *Neuropharmacology* 30(5), 475-480.
- Lovick, T.A. (1993) The periaqueductal gray-rostral medulla connection in the defence reaction: efferent pathways and descending control mechanisms. *Behav. Brain Res.* 58(1-2), 19-25.

- Mamounas, L.A., Mullen, C.A., O'Hearn, E. and Molliver, M.E. (1991) Dual serotonergic projections to forebrain in the rat: morphologically distinct 5-HT axon terminals exhibit differential vulnerability to neurotoxic amphetamine derivatives. *J. Comp. Neurol.* 314(3), 558-586.
- Masse, F., Hascoet, M. and Bourin, M. (2006) Effect of GABAergic ligands on the anxiolytic-like activity of DOI (a 5-HT(2A/2C) agonist) in the four-plate test in mice. *Eur. Neuropsychopharmacol.*
- McQuade, R. and Sharp, T. (1997) Functional mapping of dorsal and median raphe 5-hydroxytryptamine pathways in forebrain of the rat using microdialysis. *J. Neurochem.* 69(2), 791-796.
- Menard, J. and Treit, D. (1998) The septum and the hippocampus differentially mediate anxiolytic effects of R(+)-8-OH-DPAT. *Behav. Pharmacol.* 9(2), 93-101.
- (1999) Effects of centrally administered anxiolytic compounds in animal models of anxiety. *Neurosci. Biobehav. Rev.* 23(4), 591-613.
- Moore, R.Y., Halaris, A.E. and Jones, B.E. (1978) Serotonin neurons of the midbrain raphe: ascending projections. *J. Comp. Neurol.* 180(3), 417-438.
- Nashold, B.S., Jr., Wilson, W.P. and Slaughter, D.G. (1969) Sensations evoked by stimulation in the midbrain of man. *J. Neurosurg.* 30(1), 14-24.
- Nic Dhonnchadha, B.A., Bourin, M. and Hascoet, M. (2003a) Anxiolytic-like effects of 5-HT₂ ligands on three mouse models of anxiety. *Behav. Brain Res.* 140(1-2), 203-214.
- Nic Dhonnchadha, B.A., Hascoet, M., Jolliet, P. and Bourin, M. (2003b) Evidence for a 5-HT_{2A} receptor mode of action in the anxiolytic-like properties of DOI in mice. *Behav. Brain Res.* 147(1-2), 175-184.
- Nic Dhonnchadha, B.A., Ripoll, N., Clenet, F., Hascoet, M. and Bourin, M. (2005) Implication of 5-HT₂ receptor subtypes in the mechanism of action of antidepressants in the four plates test. *Psychopharmacology (Berl)* 179(2), 418-429.
- Plaznik, A., Jessa, M., Bidzinski, A. and Nazar, M. (1994) The effect of serotonin depletion and intra-hippocampal midazolam on rat behavior in the Vogel conflict test. *Eur. J. Pharmacol.* 257(3), 293-296.
- Pompeiano, M., Palacios, J.M. and Mengod, G. (1994) Distribution of the serotonin 5-HT₂ receptor family mRNAs: comparison between 5-HT_{2A} and 5-HT_{2C} receptors. *Brain Res. Mol. Brain Res.* 23(1-2), 163-178.
- Rex, A., Voigt, J.P. and Fink, H. (2005) Anxiety but not arousal increases 5-hydroxytryptamine release in the rat ventral hippocampus in vivo. *Eur. J. Neurosci.* 22(5), 1185-1189.
- Sanders, M.J., Wiltgen, B.J. and Fanselow, M.S. (2003) The place of the hippocampus in fear conditioning. *Eur. J. Pharmacol.* 463(1-3), 217-223.
- Schutz, M.T., de Aguiar, J.C. and Graeff, F.G. (1985) Anti-aversive role of serotonin in the dorsal periaqueductal grey matter. *Psychopharmacology (Berl)* 85(3), 340-345.
- Seeman, P., Westman, K., Coscina, D. and Warsh, J.J. (1980) Serotonin receptors in hippocampus and frontal cortex. *Eur. J. Pharmacol.* 66(2-3), 179-191.
- Stefanski, R., Palejko, W., Bidzinski, A., Kostowski, W. and Plaznik, A. (1993) Serotonergic innervation of the hippocampus and nucleus accumbens septi and the anxiolytic-like action of midazolam and 5-HT_{1A} receptor agonists. *Neuropharmacology* 32(10), 977-985.
- Treit, D. and Menard, J. (1997) Dissociations among the anxiolytic effects of septal, hippocampal, and amygdaloid lesions. *Behav. Neurosci.* 111(3), 653-658.
- Whitton, P. and Curzon, G. (1990) Anxiogenic-like effect of infusing 1-(3-chlorophenyl) piperazine (mCPP) into the hippocampus. *Psychopharmacology (Berl)* 100(1), 138-140.
- Young, S.L., Bohenek, D.L. and Fanselow, M.S. (1994) NMDA processes mediate anterograde amnesia of contextual fear conditioning induced by hippocampal damage: immunization against amnesia by context preexposure. *Behav. Neurosci.* 108(1), 19-29.
- Zangrossi Junior, H. and Graeff, F.G. (1994) Behavioral effects of intra-amygdala injections of GABA and 5-HT acting drugs in the elevated plus-maze. *Braz. J. Med. Biol. Res.* 27(10), 2453-2456.

B. Discussion de l'étude 3

Cette étude nous a permis de mettre en place et de valider le protocole d'injection localisée dans des structures cérébrales (hippocampe, amygdale et PAG). Auparavant, nous nous étions limités à des injections intra-cérébro ventriculaires comme nous l'avions pratiqué pour les déplétions, notamment avec des toxines telles que la 6-OHDA (Dailly et al., 2006). Désormais, des injections tissulaires peuvent être effectuées en suivant ce protocole. L'utilisation de guide-canules fixés à l'aide de ciment verre-ionomère permet de limiter le volume mort lors de l'injection. De plus, la technique permet les opérations et injections unilatérales ou bilatérales. Nous avons ainsi pu évaluer les volumes et les vitesses d'injections utilisables pour nos travaux ultérieurs et définir ainsi nos paramètres standards.

A la suite de ce travail, nous avons continué à développer et à améliorer la méthode utilisée, afin de rendre plus précises nos injections. Grâce à ce protocole, nous étions désormais en mesure de pratiquer des injections de manière spécifique dans plusieurs parties de l'hippocampe : CA1, CA2 et CA3 qui constituent la région de la corne d'Ammon. Au niveau de l'amygdale, nous pouvions désormais injecter dans les noyaux baso-latéral et latéral.

Nous avons pu constater que l'injection de DOI dans l'hippocampe entraînait un effet de type anxiolytique dans le FPT. A l'opposé, une injection de DOI dans l'amygdale ou dans la PAG a déclenché une réaction de type anxiogène. L'implication de ces structures dans l'effet de type anxiolytique du DOI démontre leur importance dans le mécanisme d'action des molécules anxiolytiques. Nous pouvons supposer que l'effet de type anxiolytique du DOI dans le FPT chez les souris naïves est la résultante de l'activation de plusieurs structures, la somme d'effets anxiolytiques et anxiogènes dont l'équilibre est responsable de la réponse comportementale finalement observée. L'hippocampe dorsal semble responsable de l'effet de type anxiolytique alors que la PAG et l'amygdale entraîneraient un effet anxiogène. Lors d'un retest, cet équilibre entre les structures exerçant un effet anxiolytique (hippocampe) et celles exerçant un effet anxiogène (PAG, amygdale) pourrait être modifié.

Pour mettre à l'épreuve cette hypothèse, ce protocole d'étude pourra être effectué chez des souris expérimentées, afin de déterminer si l'injection de DOI ou d'une autre molécule exerçant un effet anti-punitif déclenche ou non une augmentation du nombre de passages punis. Nous pourrions alors déterminer si les structures impliquées dans la réponse comportementale lors du test et du retest sont identiques.

V. Etude 4 : Differences of implicated structures in aversive learning and in one-trial tolerance to BZD, using injections of DOI and diazepam in four-plate test-retest in mice

Localisation des structures impliquées dans la mémoire aversive et la « one-trial tolerance » aux BZD par des injections cérébrales de diazépam et de DOI dans le modèle de test-retest du FPT chez la Souris

« Differences of implicated structures in aversive learning and in one-trial tolerance to BZD, using injections of DOI and diazepam in four-plate test-retest in mice. » préparé pour soumission au journal Neuropsychopharmacology.

Petit-Demouliere, B., Massé, F., Cogrel, N., Dubois, I., Hascoët, M., Bourin, M.

A. Objectifs de l'étude 4

Dans les études précédentes, nous nous sommes intéressés aux facteurs spatiaux et temporels responsables de l'apparition des phénomènes de « one-trial tolerance » aux benzodiazépines et de mémoire aversive observés lors d'injections intra-péritonéales (Petit-Demouliere et al., 2007). Grâce à ces résultats, nous pouvons d'ores et déjà conclure à l'existence de modifications rapides et persistantes du comportement des souris, dès les 30 premières secondes du test. En effet, dans ce bref intervalle de temps, la souris semble capable de cartographier le nouvel environnement qui lui est présenté. Par ailleurs, une assimilation des dangers potentiels est intégrée à cette représentation, incluant ainsi les punitions électriques lors de l'exploration.

Afin de compléter les résultats obtenus dans ces travaux de comportement, il convenait d'utiliser une démarche pharmacologique plus précise. Précédemment, la mise au point et la validation du protocole d'injection localisée dans des structures cérébrales, nous a offert cette possibilité.

Dans cette étude, nous avons donc cherché à comprendre quelles structures cérébrales étaient impliquées dans les différentes variations comportementales et pharmacologiques observées précédemment. Nous cherchions à déterminer si les structures que nous avons décidé d'étudier étaient impliquées dans la mémoire aversive ou la « one-trial tolerance ».

Deux protocoles ont été mis en place, afin de répondre à deux questions principales :

- Quelle(s) structure(s) cérébrale(s) est(sont) impliquée(s) dans l'apprentissage aversif, responsable de la diminution du nombre de passages punis observés lors du retest chez des souris injectées uniquement avec du véhicule ?
- Quelle(s) structure(s) cérébrale(s) est(sont) impliquée(s) dans le phénomène de « one-trial tolerance » au diazépam ?

Le premier protocole consistait à injecter du DOI, du diazépam ou le véhicule dans les différentes structures cérébrales que nous avons sélectionnées en fonction de leur intérêt dans l'étude de l'anxiété, et pour lesquelles nous avons validé les protocoles de chirurgie et d'injection, à savoir : les 3 régions de l'hippocampe (CA1, CA2 et CA3), la PAG et les deux noyaux de l'amygdale (baso-latéral (BLA) et latéral (LA)). Ces injections ont été pratiquées sur des souris naïves et sur des souris retestées. Un contrôle de l'activité locomotrice spontanée a été pratiqué en parallèle, afin de déterminer les possibles effets moteurs que pourraient déclencher les injections localisées.

Le DOI constitue notre témoin de référence dans l'étude du test-retest dans le FPT chez la Souris, en effet il conserve son activité de type anxiolytique lors du retest (Ripoll et al., 2005). Il était donc

intéressant pour nous de connaître sa zone d'action, afin de définir les récepteurs et les structures impliquées dans cet effet de type anxiolytique résistant au test-retest. De plus, nous avons préalablement testé les effets d'injections localisées de DOI dans l'hippocampe, la PAG ainsi que l'amygdale dans le FPT chez des souris naïves. Ce nouveau travail peut apporter des détails supplémentaires sur les structures impliquées dans l'effet du DOI. De même, nous pourrions déterminer si les structures impliquées lors du retest dans l'effet du DOI sont identiques, puisque celui-ci conserve son effet anti-punitif au cours du retest.

Les injections de diazépam visaient à déterminer les structures dans lesquelles le diazépam pourrait exprimer un effet de type anxiolytique chez les souris naïves et expérimentées, et ainsi comprendre les modifications de relations entre les structures qui pourraient être la cause de la « one-trial tolerance » observées lors du retest.

En parallèle à ce travail, nous avons émis l'hypothèse qu'au cours du prétest, l'activation de certaines structures pouvait être responsable des effets observés lors du retest, aussi bien dans la « one-trial tolerance » que dans la mémoire aversive. Pour tester cette hypothèse, nous avons utilisé dans un second protocole, une méthode d'inhibition réversible à l'aide de chlorhydrate de lidocaïne (Daumas et al., 2005). L'injection de cette substance, 10 minutes avant le prétest, entraîne une inactivation de la structure ciblée pendant la durée du FPT, par une inhibition des canaux sodiques des tissus neuronaux. Il a en effet été montré dans l'EPM chez le Rat que des inactivations réversibles du noyau basolatéral de l'amygdale, de la PAG ou de l'hypothalamus pouvaient annuler la « one-trial tolerance » (Carobrez and Bertoglio, 2005). Néanmoins, parmi les différentes études utilisant ce protocole, le choix du temps d'injection n'est pas constant. Ainsi, la lidocaïne est parfois injectée avant le prétest, après le prétest, ou avant le retest (Bertoglio et al., 2005; Daumas et al., 2005; File et al., 1998, 1999). Dans notre travail, nous avons décidé d'inactiver les structures au cours du prétest, en pratiquant l'injection avant celui-ci, afin de focaliser notre attention sur les processus d'acquisition ayant lieu au cours de cette première exposition.

Lors du retest, nous avons pratiqué des injections intra-péritonéales de véhicule ou de diazépam. Nous pouvions ainsi étudier le rôle de chaque structure sur le phénomène de « one-trial tolerance » au diazépam, en comparant les souris expérimentées injectées ou non avec de la lidocaïne et recevant cette BZD. Nous pouvions aussi connaître l'effet de l'inactivation d'une structure sur l'apprentissage aversif, en comparant les souris naïves et les souris expérimentées mais inactivées.

Differences of implicated structures in aversive learning and in one-trial tolerance to benzodiazepines, using injections of DOI or diazepam and reversible inactivation in four-plate test-retest in mice.

B. Petit-Demouliere, F. Massé, N. Cogrel, I. Dubois, M. Hascoët, M. Bourin*

* Corresponding author: EA 3256 “Neurobiologie de l’anxiété et de la dépression”, Faculté de Médecine, BP 53508, 1 Rue Gaston Veil, F44035 Nantes Cedex 01 France
E-mail: michel.bourin@univ-nantes.fr
Phone: +33-2-40412852
Fax: +33-2-40412856

Abstract :

Four-Plate test-retest (FPT-R) is a useful protocol to study aversive memory and abolishment of benzodiazepines effects in experienced mice to four-plate test (FPT). In the present study, we have used local injections paradigm, in order to localize structures implied in anxiolytic-like effects of two drugs in naïve and experienced mice: a benzodiazepine, diazepam that is only active in naïve mice; and a 5-HT_{2A/2C} agonist, DOI that exert its anxiolytic-like effect both in naïve and experienced mice. Periaqueductal grey substance, three sub-regions of hippocampus (CA1, CA2 and CA3) and two nuclei of amygdala have been studied. In a second protocol, we have reversibly inactivated these structures before first exposure to FPT in mice with lidocaine, in order to recover anxiolytic-like effect of diazepam during retest. DOI exerts anxiolytic-like effect when injected into CA2 only, in naïve and experienced mice. Diazepam had an anxiolytic-like effect in naïve mice when injected into lateral nucleus of amygdala, and in experienced mice when injected into PAG. Lidocaine injections did not help to recover the anxiolytic-like effect of diazepam, in all structures. But vehicle injection into CA3 in naïve mice cancelled aversive memory usually observed in experienced mice during retest in FPT.

INTRODUCTION

Benzodiazepines are widely implicated in the treatment of anxiety disorders. This extensive use in clinical practice led to the definition of benzodiazepines as a gold standard in animal models of anxiety. Predictive validity of a new model was subsequently linked to the effectiveness of benzodiazepines to exert an anxiolytic-like effect in animals. Development of new animal models of anxiety allowed the discovery of a phenomenon called “one-trial tolerance” (OTT). Previously described by File and Lister, the abolishment of anxiolytic-like effect of benzodiazepines in experienced mice has been widely studied, especially in elevated plus-maze (File, 1990; Lister, 1987). Among all animal models of anxiety in mice available, the four plates test-retest (FPT-R) is a good possibility of studying the phenomena of OTT with diazepam (Hascoët et al., 1997; Petit-Demouliere et al., 2007; Ripoll et al., 2005). In FPT-R, spatial knowledge of the apparatus seems to be the major factor triggering abolishment of the anxiolytic-like effect of diazepam. On contrary, removing electric punishments did not modify OTT (Petit-Demouliere et al., 2007). OTT could be related to a kind of ‘aversive learning’ linked to environment, even if scopolamine or atropine sulfate, used as amnesic agents did not modify OTT in FPT (Calzavara et al., 2005; Ripoll et al., 2005). Moreover, memory-enhancing drugs (amphetamine and pentylentetrazole) seem to enhance OTT observed in the elevated plus-maze in mice when injected post-trial 1 (Vargas et al., 2006).

The next step in the understanding of OTT is to elucidate which structures are involved in the anxiolytic-like effect of diazepam in naïve mice in FPT. Furthermore, we have to investigate structures that could be involved in the ‘aversive learning’ phenomenon and/or in the abolishment of anxiolytic-like effect of diazepam during Trial 2 in FPT. To work on this topic, we have used DOI or diazepam local injections in cerebral structures. Indeed when administered intra-peritoneally (i.p.), this 5-HT_{2A/2C} agonist does not undergo OTT and keeps its anxiolytic-like effect in the test-retest with FPT (Nic Dhonnchadha et al., 2003b; Ripoll et al., 2005).

Among all brain structures implicated in anxiety process, we have chosen periaqueductal gray matter (PAG), basolateral (BLA) and lateral (LA) nuclei of amygdala, and three sub-regions of hippocampus (CA1, CA2 and CA3). PAG has been implicated in fear and anxiety process, but also directly in OTT phenomenon, as an increased activity of the PAG could explain the lack of anxiolytic-like effect of drugs elicited by prior apparatus experience (Bertoglio et al., 2005). BLA plays a crucial role in the consolidation of information that could lead to insensitivity to benzodiazepines (File et al., 1998). LA contributes also to contextual or elemental conditioned associations, and interacts with BLA (Calandreau et al., 2005). Hippocampus has been implicated in the functional state of benzodiazepines receptors in other brain regions (File et al., 1999), shows differential involvements of dorsal CA3 and CA1 hippocampal sub-regions in contextual memory (Daumas et al., 2005), and

therefore seems to be a good candidate for the study of OTT and aversive memory. Additionally, synaptic plasticity in BLA has been described after stimulation of the hippocampal formation *in vivo* (Maren and Fanselow, 1995).

In the first protocol of this study, we have successively infused artificial cerebro-spinal fluid (aCsf), diazepam or DOI in each structure immediately before the test in naive mice and in experienced mice, in order to evaluate structures implicated in the anxiolytic-like effect of these drugs. Localized injections of benzodiazepines in hippocampus seem to induce changes in anxiolytic-like effect but also in motor activity in mice (Heldt and Ressler, 2006). To evaluate this phenomenon, we made infusions protocols both for FPT and for actimeter test.

In a second protocol, we have used a procedure of reversible inactivation of each structure during Trial 1, using lidocaine micro-infusions. Lidocaine is a local anesthetic agent that produces reversible inactivation of neural tissue via blockade of voltage-gated sodium channels (Daumas et al., 2005). Infused in the structure 10 minutes prior to Trial 1, inactivation of the tissue during the first experiment could help to recover the anxiolytic-like effect of diazepam administrated *i.p.* during Trial 2. We emit the hypothesis that during the Trial 1, a structure is activated or stressed by the exposure to FPT. This information is available shortly after the test, and kept into a tissue (Petit-Demouliere and Bourin, 2007). Inactivation of a specific structure during Trial 1 could help us to determine which structures are involved in OTT and/or in aversive memory observed during Trial 2.

MATERIAL AND METHODS

Animals

Male mice (Swiss strain) (Centre d'élevage Janvier, France) weighing 20–24 g were used in this study. They were housed 18 per cage (40 cm×28 cm×17 cm) on 12-h light: 12-h dark cycle (light on 07:00 h) and had free access to food and water. The ambient temperature of the room was maintained at 21±1 °C. Experimental groups were composed of 12 mice. All experiments were performed within the guidelines of the French Ministry of Agriculture for experiments with laboratory animals (law no. 87 848). Testing was performed between 08:00 and 12:00 h.

Drugs

For *i.p.* administration, diazepam (RBI, Sigma, France) was mixed in distilled water with a 5% concentration of Tween-80 and injected at a dose of 1 mg/kg. Controls received vehicle treatment only. Diazepam and vehicle were administered 30 min before the test in a volume of 0.5 ml/20 g of body weight.

For local infusion, dissolved diazepam (5 mg/mL, Renaudin, France) was employed. 2% lidocaine hydrochloride (RBI, Sigma, France) was dissolved in aCsf (for diazepam and lidocaine, injection of 0.3 µL at 0.2 µL/min, at each point of injection). aCsf was used to

dissolve DOI-hydrochloride [(±)-2,5-dimethoxy-4-iodoamphetamine] at 5mg/mL (RBI, Sigma, France), and to inject in control-operated mice (for aCsf and DOI, injection of 0.5 µL at 0.5 µL/min, at each point of injection). Lidocaine was injected 10 minutes before Trial 1. Volume, doses, rates of injection and time interval were chosen after preliminary works and in accordance to literature. The chosen volume of the bolus (0.3 µL) ensures that lidocaine spreads in, and by consequence, inactivates only the studied area (Daumas et al., 2005).

Behavioral procedure:

The apparatus (Bioseb, France) consists of a cage (18 cm×25 cm×16 cm) floored by four identical rectangular metal plates (8 cm×11 cm) separated from one another by a gap of 4mm. 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 behavior. Following a 15 s habituation period, the animal is subjected to an electric shock when crossing from one plate to another. The number of punishments is recorded during a 1-min test period. In order to reduce any neophobic response to the situation other than the one linked to the test, the FPT was previously dirtied by mice other than those used during the test. Mice were always tested in a soiled apparatus and there was no cleaning between trials. Every test session was made by the same experimenter in the same room with the same apparatus.

Implantation of guide cannulae for microinfusions

Mice were anaesthetized with chloral hydrate (400 mg/kg). Stainless-steel guide cannulae (0.60 mm external and 0.35 mm internal diameters) (Unimed, Swiss) were implanted bilaterally for CA1, CA2, CA3, BLA and LA, unilaterally for PAG using standard stereotaxic procedures and apparatus (Bioseb, France). Following coordinates were used: CA1: (AP) –2 mm posterior to bregma, (ML) ±1 mm, (DV) –1.5 mm from the skull, CA2: (AP) –2.5 mm, (ML) ±1.75 mm, (DV) –2 mm, CA3: (AP) –2.9 mm, (ML) ±2.9 mm, (DV) –2.5 mm, PAG: (AP) –4.6 mm, (ML) ±0 mm, (DV) –2 mm, BLA: (AP) –1.4 mm, (ML) ±2.9 mm, (DV) –4.9 mm and for LA: (AP) –2 mm, (ML) ±3.25 mm, (DV) –4.25 mm, according to the brain atlas of Franklin and Paxinos (Franklin and Paxinos, 1997). Cannulae guides were fixed to the skull with radiopaque posterior glass ionomer restorative cement GC Fuji IX (Henri Schein, France). Stainless-steel dummy-cannulae were inserted into guide cannulae to prevent occlusion and left in place until the injections were made. After surgery, mice were allowed at least 7 days to recover. Localizations of the implantation of cannulae guides were checked by histological procedure on cryostat sections.

Intra-hippocampal micro-infusion procedure

Each infusion cannulae (0.30 mm external and 0.15 mm internal diameter) was connected by a polypropylene tube to a 2 µL Hamilton micro-syringe that delivered the solution using an automated pump (Harvard apparatus,

France). Behavioral test occurs immediately after injection.

Protocol 1: Influence of diazepam or DOI infusion in brain structures with naïve or experienced mice.

Mice were individually tested in the FPT, randomly for drug treatment and test experience. Eight groups were formed according to the treatment (operated mice injected with aCsf, DOI or Diazepam and non-operated mice labeled as 'control') and the previous experience of the test (Naïve or Retest mice).

Test-retest paradigm in the FPT consists of two separate trials (interval between the two tests: 24 h). The two trials are called "test or Trial 1" and "retest or Trial 2". In Trial 1, mice were submitted to the FPT without injection. During Trial 2, the mice were injected, either i.p. thirty minutes before the test with vehicle or diazepam, or locally in each structure immediately before the test with aCsf, DOI or diazepam. Naïve mice and non-operated mice (which received vehicle or diazepam (1 mg/kg)) were submitted to the test during the same session.

Protocol 2: Influence of reversible inactivation of each structure in Trial 1 on anxiolytic-like effect of i.p. administrated diazepam during Trial 2.

Mice were separated into six groups depending on the treatment in Trial 1 and Trial 2. During Trial 1, mice were locally injected with aCsf or lidocaine 10 minutes before FPT. During Trial 2, mice were injected i.p. with vehicle or diazepam. Non-operated mice were injected i.p. with vehicle or diazepam and scored during Trial 2 session. No naïve operated mice were used, as results of protocol 1 showed that surgery had no effect on the number of punishments accepted.

Locomotor activity

Using an actimeter (Bioseb, France), we checked if surgery or infusion would modify or not the locomotor activity of mice, in order to isolate potential false positive in the study. Locomotor activity was recorded during 75 sec. immediately after the infusion of aCsf, Diazepam or DOI, or 10 minutes after lidocaine injection, to be concordant with the FPT protocols. Controls were made with mice which were not operated.

Statistical analysis

Results were expressed as a mean of the number of punished passages ($\pm$ SEM) for the FPT. Data were tested for homogeneity of the variance and normal distribution. A two-way ANOVA (trial 1 x treatment in trial 2) was employed. If the ANOVA showed a significant interaction between the two factors, a Sidak's test was performed directly. If no significant interaction was shown, ANOVA two-way was performed as an additive model, in order to raise the strength of the analysis of the main factors. Sidak's post-hoc was made on this second ANOVA if needed. To test the effect of lidocaine injection during Trial 1, a one-way ANOVA was performed. All analyses were conducted using the SPSS program for IBM compatible computer.

RESULTS

Locomotor activity

Controls of the locomotor activity did not reveal any incidence of the surgery, the injection or the injected drug on locomotor activity. Statistical analysis did not reveal any significant result in all groups ($p > 0.05$).

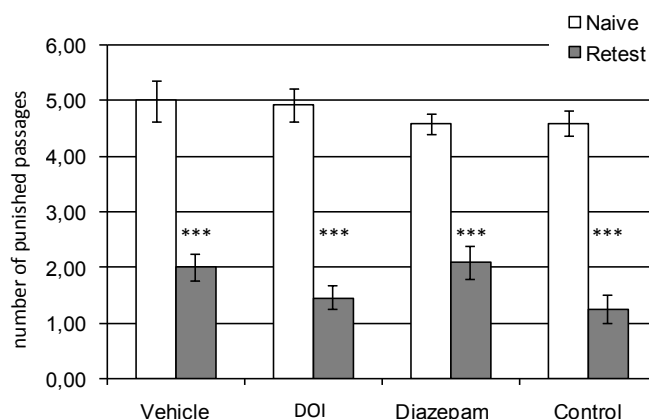


Figure 1: Effects of surgery and local injection of aCsf, DOI (5 μ g) or diazepam (3 μ g) in hippocampus CA1 on the number of punished passages accepted by naïve or experienced mice. Data are represented with mean $\pm$ sem (n=12). * represents a difference with respective naïve groups (* : $p < 0.05$; ** : $p < 0.01$; *** : $p < 0.001$).

Protocol 1: Influence of diazepam or DOI infusion in brain structures with naïve or experienced mice.

Hippocampus CA1 (Fig. 1): Two-way ANOVA revealed no significant interaction between the two factors. Performed as an additive model, the factor "trial 1" showed significantly an effect on the number of accepted punishments [$F_{(1,91)}=269.41$; ($p < 0.001$)]. No effect of the factor "treatment during trial 2" was found [$F_{(3,91)}=1.74$; ($p > 0.05$)]. In naïve mice and in retest mice, surgery and injection of vehicle, DOI or diazepam did not modify the number of punishments accepted by mice,

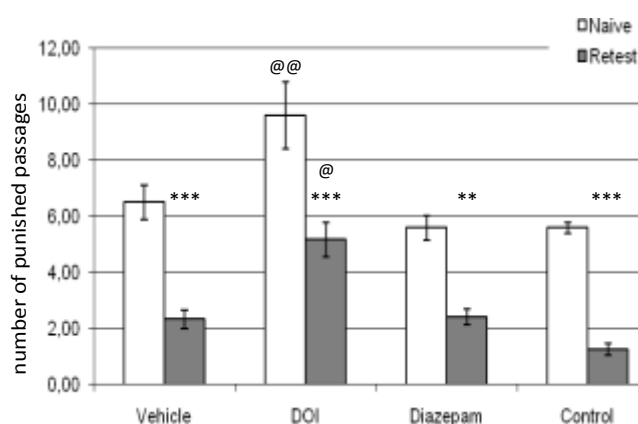


Figure 2: Effects of surgery and local injection of aCsf, DOI (5 μ g) or diazepam (3 μ g) in hippocampus CA2 on the number of punished passages accepted by naïve or experienced mice. Data are represented with mean $\pm$ sem (n=12). * represents a difference with respective naïve groups (* : $p < 0.05$; ** : $p < 0.01$; *** : $p < 0.001$). @ represents a difference with respective vehicle treated group (@ : $p < 0.05$; @@ : $p < 0.01$; @@@ : $p < 0.001$).

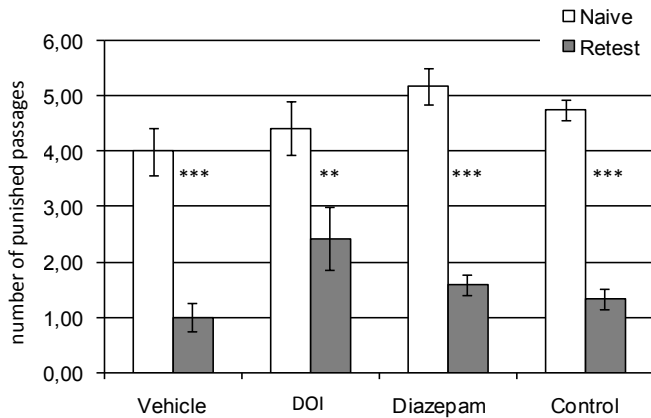


Figure 3 : Effects of surgery and local injection of aCsf, DOI (5 µg) or diazepam (3 µg) in hippocampus CA3 on the number of punished passages accepted by naïve or experienced mice. Data are represented with mean $\pm$ sem (n=12). * represents a difference with respective naïve groups (*: $p < 0,05$; **: $p < 0,01$; ***: $p < 0,001$).

compared to respective control non-operated mice. For each condition, there is a significant decrease of the number of punishments accepted by mice between naïve mice and retest mice ($p < 0.001$).

Hippocampus CA2 (Fig. 2): Two-way ANOVA revealed no significant interaction between the two factors. Performed as an additive model, the factor “test” showed significantly an effect on the number of accepted punishments [$F_{(1,91)}=98.28$; ($p < 0.001$)]. The factor “treatment during trial 2” was significant [$F_{(3,91)}=18.91$; ($p < 0.001$)]. For each condition, there is a significant decrease of the number of punishments accepted by mice between naïve mice and retest mice ($p < 0,001$ for aCsf, DOI and non operated, $p < 0,01$ for diazepam). Sidak’s post-hoc revealed that DOI injections raise significantly the number of punishments accepted by mice, in naïve ($p < 0.01$) and retest groups ($p < 0.05$) compared to respective vehicle-injected controls. Surgery and injection of vehicle or diazepam did not

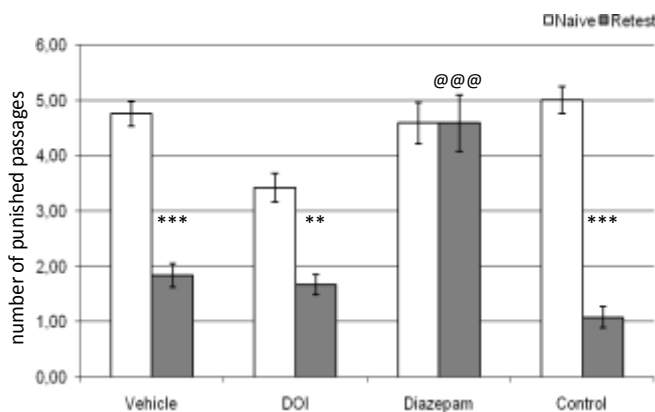


Figure 4 : Effects of surgery and local injection of aCsf, DOI (2,5 µg) or diazepam (1,5 µg) in PAG on the number of punished passages accepted by naïve or experienced mice. Data are represented with mean $\pm$ sem (n=12). * represents a difference with respective naïve groups (*: $p < 0,05$; **: $p < 0,01$; ***: $p < 0,001$). @ represents a difference with respective vehicle treated group (@: $p < 0,05$; @@: $p < 0,01$; @@@: $p < 0,001$).

modify the number of accepted punishments compared to non-operated respective controls ($p > 0.05$) in naïve and retest groups.

Hippocampus CA3 (Fig. 3): Two-way ANOVA revealed no significant interaction between the two factors. Performed as an additive model, the factor “trial 1” showed significantly an effect on the number of accepted punishments [$F_{(1,91)}=142.35$; ($p < 0.001$)]. No effect of the factor “treatment during trial 2” was found [$F_{(3,91)}=2.47$; ($p > 0.05$)]. In naïve mice and in retest mice, surgery and injection of vehicle, DOI or diazepam did not modify the number of punishments accepted by mice, compared to respective control non-operated mice. For each condition, there is a significant decrease of the number of punishments accepted by mice between naïve mice and retest mice ($p < 0.001$ for aCsf, diazepam and non operated, $p < 0.01$ for DOI).

PAG (Fig. 4): Two-way ANOVA had significant results for “test” factor [$F_{(1,88)}=105.42$; ($p < 0.001$)], for “treatment during trial 2” factor [$F_{(3,88)}=17.34$; ($p < 0.001$)] and for the interaction [$F_{(3,88)}=16.2$; ($p < 0.001$)]. Surgery and injection of vehicle and diazepam did not modify the number of accepted punishments by naïve mice ($p > 0.05$). Diazepam injected in retest mice increased the number of accepted punished passages compared to aCsf-injected retest controls ($p < 0.001$); it restored this value at the same level as naïve control mice. Except for diazepam-treated groups, retest mice had always a significantly decreased number of accepted punishments compared to naïve mice ($p < 0,001$ for aCsf and non operated, $p < 0.01$ for DOI).

BLA (Fig. 5): Two-way ANOVA revealed no significant interaction between the two factors. Performed as an additive model, the factor “test” showed significantly an effect on the number of accepted punishments [$F_{(1,91)}=194.10$; ($p < 0.001$)]. No effect of the factor “treatment during trial 2” was found [$F_{(3,91)}=1.33$; ($p > 0.05$)]. In naïve mice and in retest mice, surgery and

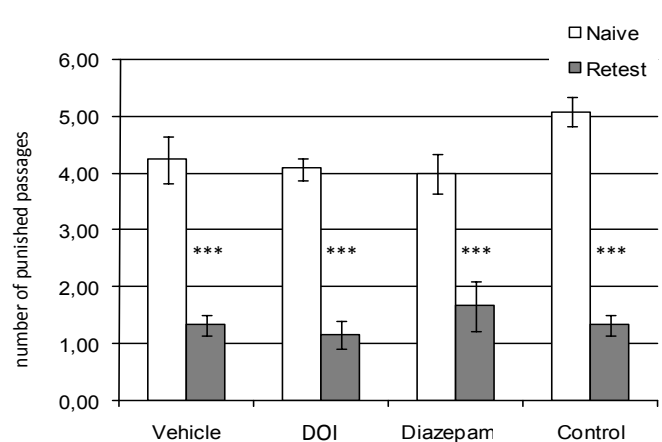


Figure 5 : Effects of surgery and local injection of aCsf, DOI (5 µg) or diazepam (3 µg) in BLA on the number of punished passages accepted by naïve or experienced mice. Data are represented with mean $\pm$ sem (n=12). * represents a difference with respective naïve groups (*: $p < 0,05$; **: $p < 0,01$; ***: $p < 0,001$).

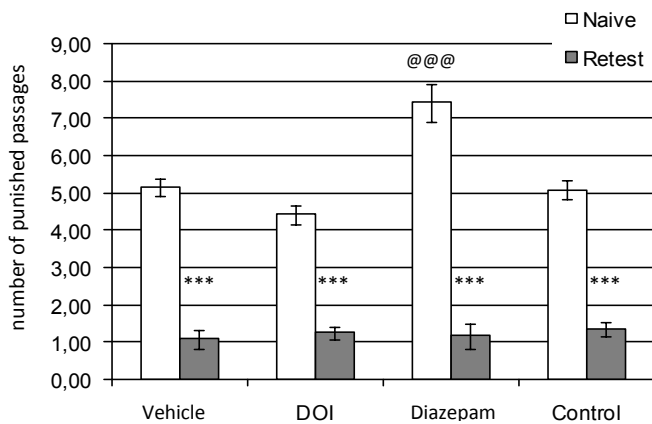


Figure 6: Effects of surgery and local injection of aCsf, DOI (5 µg) or diazepam (3 µg) in LA on the number of punished passages accepted by naïve or experienced mice. Data are represented with mean $\pm$ sem ($n=12$). * represents a difference with respective naïve groups (*: $p<0,05$; **: $p<0,01$; ***: $p<0,001$). @ represents a difference with respective vehicle treated group (@: $p<0,05$; @@: $p<0,01$; @@@: $p<0,001$).

injection of vehicle, DOI or diazepam did not modify the number of punishments accepted by mice, compared to respective control non-operated mice. For each condition, there is a significant decrease of the number of punishments accepted by mice between naïve mice and retest mice ($p<0.001$).

LA (Fig. 6): Two-way ANOVA had significant results for “test” factor [$F_{(1,88)}=418.22$; ($p<0.001$)], for “treatment during trial 2” factor [$F_{(3,88)}=9.17$; ($p<0.001$)] and for the interaction [$F_{(3,88)}=10.19$; ($p<0.001$)]. Surgery and injection of vehicle or DOI did not modify the number of accepted punishments by naïve mice ($p>0.05$). Diazepam injected in naïve mice increased the number of accepted punished passages compared to aCsf-injected controls ($p<0.001$). In retest mice, surgery and injection of vehicle, DOI or diazepam did not modify the number of punishments accepted by mice. Retest mice had always a significantly decreased number of accepted punishments compared to naïve mice ($p<0.001$).

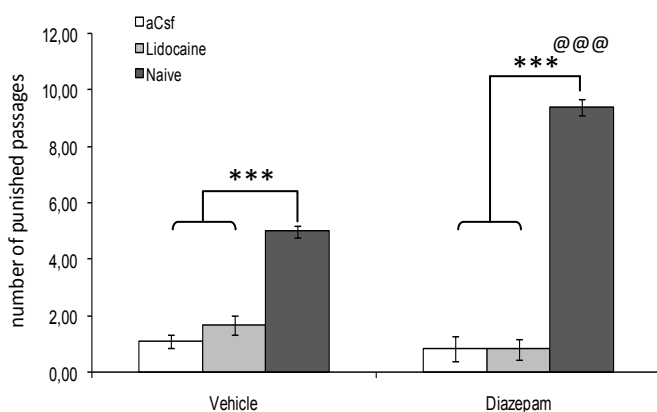


Figure 7: Effects of local injection of aCsf or lidocaine (2 µL at 2%) in CA1 on the number of punished passages accepted by naïve or experienced mice treated i.p. with vehicle or diazepam (1 mg/kg). Data are represented with mean $\pm$ sem ($n=12$). * represents a difference with respective naïve groups (*: $p<0,05$; **: $p<0,01$; ***: $p<0,001$). @ represents a difference with respective vehicle treated group (@: $p<0,05$; @@: $p<0,01$; @@@: $p<0,001$).

Protocol 2:

Hippocampus CA1 (Fig. 7): One-way ANOVA did not show any significant effect of lidocaine injection on the number of accepted punishments during Trial 1 compared to mice that received aCsf ($p>0.05$). Two-way ANOVA had significant results for “test” factor [$F_{(2,66)}=235.08$; ($p<0.001$)], for “treatment during trial 2” factor [$F_{(1,66)}=17.50$; ($p<0.001$)] and for the interaction [$F_{(2,66)}=39.11$; ($p<0.001$)]. In retest groups, no difference of the number of accepted punishments could be observed between mice treated with vehicle or diazepam ($p>0.05$). Lidocaine did not modify the number of accepted punishments during Trial 2 compared to aCsf injected mice, for saline or diazepam groups ($p>0.05$). Naive controls had expected results, with a strong increase of accepted punished passage in mice treated with diazepam compared to vehicle-treated naïve mice ($p<0.001$). Retest groups significantly accepted less punished passages than naïve groups, for saline and diazepam treatments ($p<0.001$).

Hippocampus CA2 (Fig. 8): One-way ANOVA did not show any significant effect of lidocaine injection on the number of accepted punishments during Trial 1 compared to mice that received aCsf ($p>0.05$). Two-way ANOVA had significant results for “test” factor [$F_{(2,66)}=134.26$; ($p<0.001$)], for “treatment during trial 2” factor [$F_{(1,66)}=32.38$; ($p<0.001$)] and for the interaction [$F_{(2,66)}=17.93$; ($p<0.001$)]. In retest groups, no difference of the number of accepted punishments could be observed between mice treated with vehicle or diazepam ($p>0.05$). Lidocaine did not modify the number of accepted punishments during Trial 2 compared to aCsf injected mice, for saline or diazepam groups ($p>0.05$). Naive controls had expected results, with a strong increase of accepted punished passage in mice treated with diazepam compared to vehicle-treated naïve mice ($p<0.001$). Retest groups significantly accepted less punished passages than naïve groups, for saline and diazepam treatments ($p<0.001$).

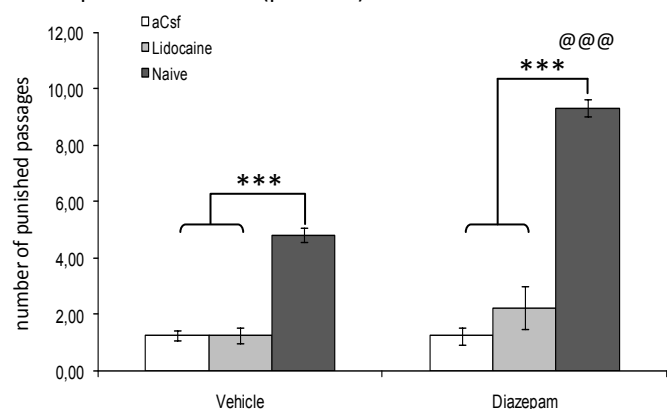


Figure 8: Effects of local injection of aCsf or lidocaine (2 µL at 2%) in CA2 on the number of punished passages accepted by naïve or experienced mice treated i.p. with vehicle or diazepam (1 mg/kg). Data are represented with mean $\pm$ sem ($n=12$). * represents a difference with respective naïve groups (*: $p<0,05$; **: $p<0,01$; ***: $p<0,001$). @ represents a difference with respective vehicle treated group (@: $p<0,05$; @@: $p<0,01$; @@@: $p<0,001$).

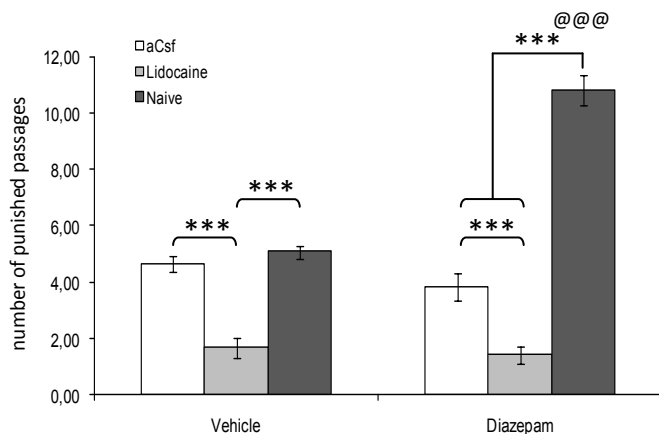


Figure 9 : Effects of local injection of aCsf or lidocaine(2 μ L at 2%) in CA3 on the number of punished passages accepted by naïve or experienced mice treated i.p. with vehicle or diazepam (1 mg/kg). Data are represented with mean $\pm$ sem (n=12). * represents a difference with respective naïve groups (*: $p<0,05$; **: $p<0,01$; ***: $p<0,001$). @ represents a difference with respective vehicle treated group (@: $p<0,05$; @@: $p<0,01$; @@@: $p<0,001$).

Hippocampus CA3 (Fig. 9): One-way ANOVA did not show any significant effect of lidocaine injection on the number of accepted punishments during Trial 1 compared to mice that received aCsf ($p>0.05$). Two-way ANOVA had significant results for “test” factor [$F_{(2,66)}=143.55$; ($p<0.001$)], for “treatment during trial 2” factor [$F_{(1,66)}=25.11$; ($p<0.001$)] and for the interaction [$F_{(2,66)}=45.93$; ($p<0.001$)]. In retest groups, no difference of the number of accepted punishments could be observed between mice treated with vehicle or diazepam ($p>0.05$). There is a significant difference, in vehicle and diazepam-treated mice, between mice injected with vehicle or lidocaine in trial 1 ($p<0.001$, for both treatments). Lidocaine-treated mice had expected results for retest mice, with a strong decrease of the number of accepted punishments. Injection of vehicle during Trial 1 produced an increase of the number of accepted punishments during Trial 2, for both treatments. It restored the number at the

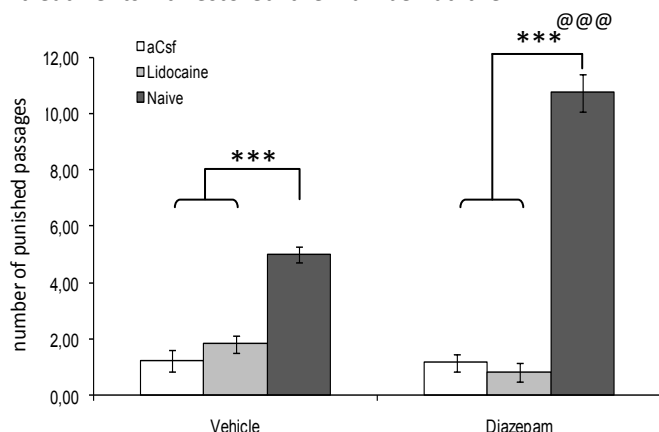


Figure 10 : Effects of local injection of aCsf or lidocaine(2 μ L at 2%) in PAG on the number of punished passages accepted by naïve or experienced mice treated i.p. with vehicle or diazepam (1 mg/kg). Data are represented with mean $\pm$ sem (n=12). * represents a difference with respective naïve groups (*: $p<0,05$; **: $p<0,01$; ***: $p<0,001$). @ represents a difference with respective vehicle treated group (@: $p<0,05$; @@: $p<0,01$; @@@: $p<0,001$).

same level than naïve vehicle-treated mice. Naive controls had expected results, with a strong increase of accepted punished passage in mice treated with diazepam during trial 2 compared to vehicle-treated naïve mice ($p<0.001$).

PAG (Fig. 10): One-way ANOVA reveal a significant effect of lidocaine injection on the number of accepted punishments during Trial 1 compared to mice that received aCsf, a strong increase of the number of accepted punishments was observed 10 minutes after the injection of lidocaine [$F_{(1,47)}=47.31$; ($p<0.001$)]. Two-way ANOVA had significant results for “test” factor [$F_{(2,66)}=67.05$; ($p<0.001$)], for “treatment during trial 2” factor [$F_{(1,66)}=17.48$; ($p<0.001$)] and for the interaction [$F_{(2,66)}=12.72$; ($p<0.001$)]. In retest groups, no difference of the number of accepted punishments could be observed between mice treated with vehicle or diazepam ($p>0.05$). Lidocaine did not modify the number of accepted punishments during Trial 2 compared to aCsf injected mice, for saline or diazepam groups ($p>0.05$). Naive controls had expected results, with a strong increase of accepted punished passage in mice treated with diazepam compared to vehicle-treated naïve mice ($p<0.001$). Retest groups significantly accepted less punished passages than naïve groups, for saline and diazepam treatments ($p<0.001$).

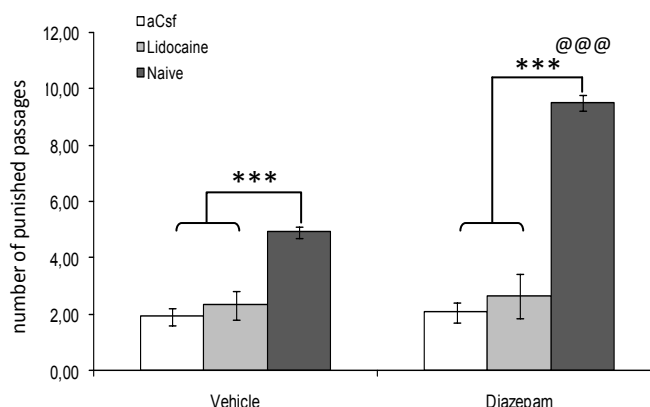


Figure 11 : Effects of local injection of aCsf or lidocaine(2 μ L at 2%) in BLA on the number of punished passages accepted by naïve or experienced mice treated i.p. with vehicle or diazepam (1 mg/kg). Data are represented with mean $\pm$ sem (n=12). * represents a difference with respective naïve groups (*: $p<0,05$; **: $p<0,01$; ***: $p<0,001$). @ represents a difference with respective vehicle treated group (@: $p<0,05$; @@: $p<0,01$; @@@: $p<0,001$).

BLA (Fig. 11): One-way ANOVA did not show any significant effect of lidocaine injection on the number of accepted punishments during Trial 1 compared to mice that received aCsf ($p>0.05$). Two-way ANOVA had significant results for “test” factor [$F_{(2,66)}=67.05$; ($p<0.001$)], for “treatment during trial 2” factor [$F_{(1,66)}=17.48$; ($p<0.001$)] and for the interaction [$F_{(2,66)}=12.72$; ($p<0.001$)]. In retest groups, no difference of the number of accepted punishments could be observed between mice treated with vehicle or diazepam ($p>0.05$). Lidocaine did not modify the number

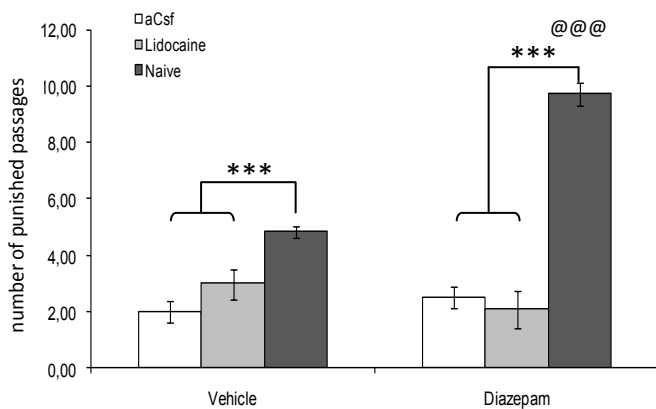


Figure 12 : Effects of local injection of aCsf or lidocaine (2 μ L at 2%) in LA on the number of punished passages accepted by naïve or experienced mice treated i.p. with vehicle or diazepam (1 mg/kg). Data are represented with mean $\pm$ sem (n=12). * represents a difference with respective naïve groups (*: $p < 0,05$; **: $p < 0,01$; ***: $p < 0,001$). @ represents a difference with respective vehicle treated group (@: $p < 0,05$; @@: $p < 0,01$; @@@: $p < 0,001$).

of accepted punishments during Trial 2 compared to aCsf injected mice, for saline or diazepam groups ($p > 0.05$). Naïve controls had expected results, with a strong increase of accepted punished passage in mice treated with diazepam compared to vehicle-treated naïve mice ($p < 0.001$). Retest groups significantly accepted less punished passages than naïve groups, for saline and diazepam treatments ($p < 0.001$).

LA (Fig. 12): One-way ANOVA did not show any significant effect of lidocaine injection on the number of accepted punishments during Trial 1 compared to mice that received aCsf ($p > 0.05$). Two-way ANOVA had significant results for “test” factor [$F_{(2,66)} = 80.40$; ($p < 0.001$)], for “treatment during trial 2” factor [$F_{(1,66)} = 16.94$; ($p < 0.001$)] and for the interaction [$F_{(2,66)} = 23.23$; ($p < 0.001$)]. In retest groups, no difference of the number of accepted punishments could be observed between mice treated with vehicle or diazepam ($p > 0.05$). Lidocaine did not modify the number of accepted punishments during Trial 2 compared to aCsf injected mice, for saline or diazepam groups ($p > 0.05$). Naïve controls had expected results, with a strong increase of accepted punished passage in mice treated with diazepam compared to vehicle-treated naïve mice ($p < 0.001$). Retest groups significantly accepted less punished passages than naïve groups, for saline and diazepam treatments ($p < 0.001$).

DISCUSSION:

OTT to BZD is a phenomenon studied since more than 15 years. A large majority of studies worked with the EPM to describe this tolerance, to understand the interplay between learning and anxiety, to assess the effect of amnesic compounds during Trial 1 on the anxiolytic-like effect of drugs during Trial 2. In the present study, we have used FPT, which we had previously described as a good tool for working on OTT (Petit-Demoulière et al., 2007). Localized injections of lidocaine, diazepam, DOI or

vehicle in structures related to anxiety processing were done during the study, and did not modify the locomotor activity of mice.

The first step in this work was to find which structure could be involved in the appearance of the anxiolytic-like effect of DOI or diazepam during FPT. To answer this question, we have injected these drugs into different brain structures implied in anxiety process. This protocol revealed that stimulation of 5-HT_{2A/2C} receptors localized in CA2 by DOI exerts an anxiolytic-like effect in FPT, for naïve mice but also for experienced mice. CA1 and CA3 stimulations with DOI or diazepam injected locally did not modify behaviors of mice in FPT, for naïve or retest animals. This specificity of the behavioral response to the injection of DOI is interesting. We can conclude that the injection protocol is enough precise to target these area. Moreover, we have previously shown that DOI exerts its effect in FPT via 5-HT_{2A} receptors (Ripoll et al., 2006b).

Anxiolytic-like effects of diazepam were found in naïve mice after localized injection into LA, but not BLA. In retest mice, PAG is the only structure where injections of diazepam had increased the number of accepted punishments.

These results confirm us that hippocampus, amygdala and PAG are both implicated in the processing of DOI or diazepam anxiolytic-like effects. Moreover, the role of these structures is deeply modified by the previous experience of mice, at least for amygdala and PAG. Diazepam was effective when injected in LA with naïve mice, and became ineffective when injected in this structure with experienced mice. The reciprocal observation was made for PAG.

The anxiolytic-like effect of injection of diazepam in LA was an expected result, because microinjection of BZD into the amygdala had anxiolytic effects in conflict tests and other models of conditioned fear ((Graeff et al., 1993). On the contrary, DOI injection into amygdala did not exert an anxiogenic effect, as we had previously described (unpublished data) and similar administration of 5-HT or of a 5-HT_{1A} receptor agonist had anxiogenic effects in conflict tests and other models of conditioned fear (Graeff et al., 1993). This discrepancy may be due to the targeted structure, another nucleus could be involved in this anxiogenic effect.

In protocol 2, we have focused our work on the loss of anxiolytic-like effect of diazepam during Trial 2. Lidocaine produced a reversible inactivation of each structure and allowed us to compare the effects of vehicle or diazepam i.p. injections in experienced mice with or without activation of a structure during Trial 1. CA1, CA2, PAG, LA or BLA inactivation did not modify the OTT observed during Trial 2, nor the decrease of punished passages observed with experienced mice.

In PAG, we observed a strong anti-punishment effect of the lidocaine injection during Trial 1. As this structure is linked to a flight/fight behavioral response, we can

suppose that the observed increase of the number of accepted punishments is linked to a panic effect, due to the inactivation of the PAG. Moreover, PAG is a heterogeneous structure and it is possible that a more precise injection into dorsal or ventral part of the PAG could give us more information about this behavior. It is strongly interesting to observe that no influence of this inactivation can be seen during retest, for both treatments. This lack of influence of the inactivation of the PAG informs us that this structure could be dimly implied in aversive memory processing.

In CA3, an unexpected result was observed. Injection of vehicle during Trial 1 was sufficient to cancel the negative effect of previous exposure on accepted punishments during Trial 2. These retest mice accepted the same number of punishments than naïve control mice. On the contrary, mice injected with lidocaine during Trial 1 were not affected, and had the expected result for retest mice, with only less than two accepted punishment. Injection of vehicle during Trial 1 seems to activate neurons of the implicated structure, and this activation could lead to modifications of the results during Trial 2. Not observed with CA1 and CA2, injection/activation of CA3 appears to be critical for the decrease of accepted punished passages during Trial 2. Lidocaine injection led to inactivation of the tissue during Trial 1, and to the absence of modification of the classical profile of retest mice.

This activation of CA3 by injection of vehicle could be explained by the fact that we inject a bolus into a dense tissue, a neuron network without any space for the liquid.

CA3 could then be strongly implied in aversive learning, responsible for the decrease of accepted punishments observed during Trial 2 in mice treated with vehicle (Calzavara et al., 2005; Hascoet et al., 1997; Petit-Demouliere et al., 2007; Vargas et al., 2006).

In the present study, we have emitted the hypothesis that inactivation of a structure during Trial 1 could lead us to understand what are the areas implicated in one-trial tolerance and/or aversive memory. Reversible inactivation via lidocaine did not modify the effects or the lack of effect of injected drugs during Trial 2, for all studied structures. Two explanations can be made: first, may be phenomena responsible for these processes happen after the test, when inactivation has already disappeared. Lidocaine has only a short-time effect, about 15 minutes. A second explanation could be linked to an untargeted structure in the brain, maybe locus coeruleus, median raphe or prefrontal cortex.

To achieve this topic, we could target these different structures, or use a new technical approach: reversible inactivation could be used during Trial 2, in order to study what structures are involved during retest in the behavior of mice, drugged or undrugged.

Altogether, these results confirm that hippocampus, amygdala and PAG are both implied in the behavior of mice during four-plate test-retest.

We can suppose that aversive memory and one-trial tolerance to BZD are processed by different networks with different structures. PAG seem to have little effect in the behavior of experienced mice during retest in FPT. Hippocampus appears to be mainly involved in the anxiolytic-like effect of DOI and in aversive memory but not in one-trial tolerance phenomenon. CA2 and CA3 regions could be the center of DOI activity and aversive memory.

On the contrary, amygdala and PAG does not seem to be involved in aversive memory and DOI effect, but in BZD effect in naïve or experienced mice. We have observed that BZD effect may be linked to these two structures, but with differently with naïve or experienced mice.

Overall, we can conclude that FPT-R is a good tool to study aversive memory and OTT to BZD. It seems useful to study aversive memory, in parallel with other contextual fear conditioning models. The difference between these tools is mainly due to the role of electric footshocks. It is only an unconditioned stimulus in contextual fear conditioning models. In FPT-R, it is strongly linked to exploration, and mice can avoid punishments with an adequate behavioral response. This difference place FPT-R as a useful tool, and model to study aversive memory, in parallel with one-trial tolerance in mice.

REFERENCES

- Bertoglio, L. J., C. Anzini, et al. (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**(1): 99-107.
- Calandrea, L., A. Desmedt, et al. (2005). "A different recruitment of the lateral and basolateral amygdala promotes contextual or elemental conditioned association in Pavlovian fear conditioning." *Learn Mem* **12**(4): 383-8.
- Calzavara, M. B., C. L. Patti, et al. (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**(19): 2235-46.
- Daumas, S., H. Halley, et al. (2005). "Encoding, consolidation, and retrieval of contextual memory: differential involvement of dorsal CA3 and CA1 hippocampal subregions." *Learn Mem* **12**(4): 375-82.
- File, S. E. (1990). "One-trial tolerance to the anxiolytic effects of chlordiazepoxide in the plus-maze." *Psychopharmacology (Berl)* **100**(2): 281-2.
- File, S. E., L. E. Gonzalez, et al. (1998). "Role of the basolateral nucleus of the amygdala in the formation of a phobia." *Neuropsychopharmacology* **19**(5): 397-405.
- File, S. E., L. E. Gonzalez, et al. (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**(2): 312-20.

Franklin, K. and G. Paxinos (1997). The Mouse Brain in Stereotaxic Coordinates. San Diego.

Graeff, F. G., M. C. Silveira, et al. (1993). "Role of the amygdala and periaqueductal gray in anxiety and panic." Behav Brain Res **58**(1-2): 123-31.

Hascoet, M., M. Bourin, et al. (1997). "Influence of prior experience on mice behavior using the four-plate test." Pharmacol Biochem Behav **58**(4): 1131-8.

Heldt, S. A. and K. J. Ressler (2006). "Localized injections of midazolam into the amygdala and hippocampus induce differential changes in anxiolytic-like motor activity in mice." Behav Pharmacol **17**(4): 349-56.

Lister, R. G. (1987). "The use of a plus-maze to measure anxiety in the mouse." Psychopharmacology (Berl) **92**(2): 180-5.

Maren, S. and M. S. Fanselow (1995). "Synaptic plasticity in the basolateral amygdala induced by hippocampal formation stimulation in vivo." J Neurosci **15**(11): 7548-64.

Nic Dhonnchadha, B. A., M. Hascoet, et al. (2003). "Evidence for a 5-HT_{2A} receptor mode of action in the anxiolytic-like properties of DOI in mice." Behav. Brain. Res. **147**(1-2): 175-84.

Petit-Demouliere, B., M. Hascoët, et al. (2007). "Factors triggering abolishment of benzodiazepines effects in the four-plate test-retest." Eur. Neuropsychopharmacol.

Petit-Demouliere, B., Bourin, M., 2007. Temporal parameters of one-trial tolerance to benzodiazepines in four-plate test-retest. Behav Brain Res.

Ripoll, N., Hascoet, M., Bourin, M., 2005. Implication of 5-HT_{2A} subtype receptors in DOI activity in the four-plates test-retest paradigm in mice. Behav Brain Res.

Ripoll, N., B. A. Nic Dhonnchadha, et al. (2005). "The four-plates test-retest paradigm to discriminate anxiolytic effects." Psychopharmacology (Berl) **180**(1): 73-83.

Vargas, K. M., C. Da Cunha, et al. (2006). "Amphetamine and pentylentetrazole given post-trial 1 enhance one-trial tolerance to the anxiolytic effect of diazepam in the elevated plus-maze in mice." Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry **30**(8): 1394-402.

B. Discussion de l'étude 4 :

Le phénomène de « one-trial tolerance » est étudié depuis plus de 15 ans, majoritairement sur l'EPM. Dans le cadre de ce travail de thèse, nous avons pu démontrer que l'utilisation du FPT était appropriée pour travailler sur ce sujet. De plus, nous nous sommes intéressés à l'apprentissage aversif qui se déroule entre le test et la réexposition au test.

La présente étude avait pour but de connaître les structures cérébrales impliquées dans la mémoire aversive chez les souris administrées avec du véhicule, mais aussi dans l'effet de type anxiolytique du diazépam et dans le phénomène de « one-trial tolerance » observés dans le retest du FPT.

Pour cela, deux protocoles ont été définis afin, dans un premier temps de connaître l'effet d'une injection directe de DOI ou de diazépam dans chacune des structures retenues, en comparaison avec des souris recevant du LCR. Ensuite, à l'aide d'un protocole d'inactivation localisée, lors du prétest, nous avons cherché à déterminer si l'activation de l'une de ces structures lors du prétest pouvait être responsable de la mémoire aversive ou de la « one-trial tolerance » au diazépam. Nous avons constaté en premier lieu, que les opérations ainsi que les injections des différents traitements dans les structures concernées n'entraînaient pas de modification de l'activité locomotrice horizontale, mesurée avec un actimètre.

Les résultats du premier protocole ont révélé que la stimulation des récepteurs sérotoninergiques de type 5-HT_{2A/2C} dans l'hippocampe entraînait un effet de type anxiolytique, exclusivement dans la région 2 de la corne d'Ammon. Cette activité est vraisemblablement liée à l'action du DOI sur les récepteurs de type 5-HT_{2A}. En effet, nous avons préalablement constaté que ce type de récepteur était probablement plus impliqué dans l'effet de type anxiolytique observé dans le FPT que les récepteurs 5-HT_{2C} (Ripoll et al., 2006b). Il est néanmoins intéressant de constater que ce résultat est similaire à celui obtenu dans l'étude précédente, avec un effet de type anxiolytique lors d'une injection de DOI dans l'hippocampe de souris naïves. Les coordonnées utilisées pour l'hippocampe de manière générale étaient proches de celles utilisées dans cette étude pour la région CA2. Nous avons alors émis l'hypothèse que la réponse à une administration de DOI était régulée par l'activité des récepteurs α_2 -adrénergiques (Masse et al., 2006). Pour poursuivre dans cette hypothèse, nous pourrions stimuler localement le locus cœruleus ou l'inactiver; les réponses comportementales liées à ces protocoles permettraient de décrire plus précisément les

relations entre ces deux systèmes, qui peuvent se dérouler entre le locus coeruleus et l'hippocampe, au niveau de CA2.

Des effets différents sont observés lors de l'injection de diazépam dans l'amygdale selon le noyau ciblé. Ainsi, une injection dans le noyau latéral (LA) augmente le nombre de passages punis chez les individus naïfs seulement. Par contre, en ciblant le noyau baso-latéral, seuls les animaux « retest » présentent une augmentation du nombre de passages punis acceptés. Ce résultat confirme l'implication du noyau BLA dans l'effet de type anxiolytique des benzodiazépines, mise en évidence par d'autres techniques. Nos résultats sont en adéquation avec ceux retrouvés dans la littérature. Ainsi, une injection de benzodiazépines dans le noyau BLA ou LA provoque un effet de type anxiolytique dans l'EPM, le test de Vogel ou d'interaction sociale (Gonzalez et al., 1996; Thomas et al., 1985; Zangrossi Junior and Graeff, 1994). De plus, l'injection aiguë de diazépam augmente les courants inhibiteurs post-synaptiques dans le BLA mais aussi dans le noyau central de l'amygdale (Kang-Park et al., 2004). Nous avons pu ainsi constater que notre protocole d'injection permettait bien une localisation précise, à l'échelle de structures aussi précises que les noyaux de l'amygdale.

Dans le second protocole, nous avons émis l'hypothèse que lors de la première exposition, une structure était activée et conservait une trace, une information qui déclenchait lors de la réexposition, une perte de l'effet de type « anxiolytique » du diazépam. Nous souhaitions tester de la même façon la mémoire aversive qui apparaît lors du protocole de test-retest, en comparant des souris naïves et des souris prétestées dont une structure avait été inactivée durant le prétest. Dans ce cadre, nous avons supposé qu'il était possible de connaître l'implication des différentes structures ciblées dans ces deux processus.

Le premier résultat à considérer est l'augmentation du nombre de passages punis observé lors de l'injection de lidocaïne dans la PAG dans le FPT chez les souris naïves, durant du prétest. Cet effet correspondrait à l'inactivation de cette structure impliquée dans les phénomènes de panique et de fuite. Ainsi, l'inactivation de la structure pendant ce prétest entraînerait une prise de risque afin de fuir la menace représentée par le test et les punitions électriques. L'inactivation des autres structures (BLA, LA, CA1, CA2 et CA3) n'a pas modifié le comportement des souris lors du prétest.

Lors du retest, nous avons pu constater que l'inactivation de chacune des structures lors du prétest, ne permettait pas de rétablir un effet anti-punitif du diazépam lors du retest. Ce résultat peut-être dû à un facteur temporel, ainsi une inactivation après le prétest ou avant

le retest aurait pu fournir d'autres résultats. Par ailleurs, il est possible qu'une autre structure soit impliquée dans la «one-trial tolerance».

De plus, aucun effet sur la mémoire aversive n'a pu être mis en évidence par le biais de l'injection de lidocaïne dans chacune des structures. Le nombre de passages punis acceptés par les souris, dont une structure a été inactivée lors du prétest, n'est pas différent de celui des souris témoins non opérées.

Par contre, de manière inattendue, l'injection de LCR dans la région 3 de la corne d'Ammon a entraîné un effet sur la réponse comportementale des souris retestées. En effet, une augmentation du nombre de passages punis acceptés par ces souris a été mesurée, permettant d'obtenir une réponse similaire à celle des souris témoins naïves non opérées. Cette réponse a été constatée quel que soit le traitement lors du retest. Cet effet paradoxal n'est plus retrouvé lorsque la région CA3 a été inactivée par une injection de lidocaïne à la place du LCR lors du prétest.

Nous n'avons pas d'autres données, et dès lors, nous ne pouvons qu'émettre une hypothèse. Il pourrait être envisageable que la région CA3 soit reliée de manière directe ou indirecte avec une structure non étudiée dans ce travail. L'injection de LCR provoquerait alors une activation de CA3 qui modifierait l'état de cette structure non identifiée, rendant inopérante l'information entraînant la mémoire aversive lors de la réexposition.

Malgré cela, nous pouvons conclure qu'il existe deux schémas distincts régissant les processus de mémoire aversive et de « one-trial tolerance » aux benzodiazépines, comme nous l'avons préalablement établi dans les études précédentes.

Il semble en effet que l'hippocampe ne soit pas directement impliqué dans la perte d'effet du diazépam, ou dans l'effet de type anxiolytique déclenché par cette benzodiazépine chez des souris naïves. A l'opposé, la PAG et l'amygdale ne semblent pas être impliquées dans les phénomènes de mémoire aversive, puisque leur inactivation (ou leur activation par injection de LCR) n'entraîne pas de variation du nombre de passages punis acceptés par les souris témoins lors du retest.

Pour poursuivre cette étude, il conviendrait d'attaquer la problématique avec l'optique inverse, à savoir une inactivation d'une structure 10 minutes avant le retest. Cela permettrait de savoir quelle structure est nécessaire lors du retest pour observer la mémoire aversive et / ou la «one-trial tolerance» au diazépam. En effet, dans ce cadre de recherche, il a été mis en évidence chez le Rat, qu'une injection de lidocaïne dans la PAG annulait la «one-

trial tolerance» observée chez des rats traités au midazolam dans l'EPM, uniquement si celle-ci était pratiquée avant le retest, mais pas si l'injection de lidocaïne avait lieu avant ou après le prétest (Bertoglio et al., 2005). De même, une injection dans l'hypothalamus dorso-médian pratiquée avant le retest dans l'EPM permet de restaurer l'effet anxiolytique du chlordiazépoxyde chez le Rat dans l'EPM (File et al., 1999). Nous n'avons initialement pas retenu cette chronologie d'injection afin de limiter les difficultés d'interprétations liée à la présence de deux traitements lors de la seconde exposition dans ces conditions. Il est possible que, bien que la lidocaïne seule n'ait pas d'effet de type anxiolytique dans le test, une superposition entre l'effet de la BZD et de la lidocaïne entraînerait un effet difficilement explicable. Pour cette raison, nous avons décidé d'injecter la lidocaïne avant le prétest, pour étudier la phase d'acquisition. De même, le fait d'injecter après le prétest peut compliquer l'interprétation des résultats observés, en partie du fait de l'absence de donnée sur la phase d'encodage des informations collectées durant le prétest.

Par ailleurs, d'autres structures peuvent être ciblées afin de connaître leurs implications dans ces processus. Parmi les principales, nous pouvons citer le locus coeruleus, le noyau du raphé, les noyaux médian et central de l'amygdale, l'hypothalamus dorso-médian, le noyau du lit de la strie terminale, bien qu'elle semble plutôt impliquée dans les réponses comportementales à long terme (Walker et al., 2003), le noyau accumbens, qui pourrait être le lieu de rétention de l'information aversive (Levita et al., 2002) et le cortex préfrontal (Lowry et al., 2005). Pour cette dernière structure, nous avons initialement pensé l'intégrer dans notre étude, pourtant, au moment de définir le protocole, nous avons pu constater que la grande étendue de cette structure posait un réel problème méthodologique. En effet, en se référant à plus de dix articles utilisant des injections localisées dans le cortex préfrontal chez la souris CD1 ou Swiss, nous avons pu constater de fortes différences dans les coordonnées de la région ciblée. Il semble difficile de supposer que ce tissu si vaste puisse exercer un effet homogène sur le comportement quel que soit le lieu de l'injection. Il paraît donc prudent de régionaliser le cortex préfrontal, en multipliant les sous-régions et en les détaillant selon la localisation des récepteurs ciblés.

VI. Etude 5 : Modifications neurochimiques lors du test-retest du FPT chez la Souris

Modifications neurochimiques observées lors d'une exposition au FPT, puis lors de la réexposition au test dans quatre aires cérébrales chez la Souris

A. Objectifs de l'étude 5

Le but de cette étude était de mettre en évidence l'implication des systèmes dopaminergique, sérotoninergique et noradrénergique dans les phénomènes de «one-trial tolerance» et de mémoire aversive observés lors d'un protocole de test-retest du FPT. Ce travail a été réalisé en effectuant un dosage tissulaire des concentrations de ces monoamines par chromatographie liquide à haute performance, à différentes étapes clés du protocole. Les dosages ont été effectués au sein du laboratoire, selon une technique publiée par le Dr. E. Dailly (Dailly et al., 2006).

Nous avons ainsi soumis des souris à un test-retest, en sacrifiant des individus avant et après le prétest et le retest. Nous avons procédé à une dislocation cervicale, puis au prélèvement sur plaque réfrigérée de quatre aires principales : l'hypothalamus, l'hippocampe, le striatum et le cortex. Les tissus ont été placés dans de la carboglace, puis broyés et préparés pour les analyser ultérieurement.

Nous avons ainsi pu étudier les variations de chacun des neurotransmetteurs étudiés aux points clés du protocole répartis sur 24 heures, à savoir avant et après le prétest et le retest.

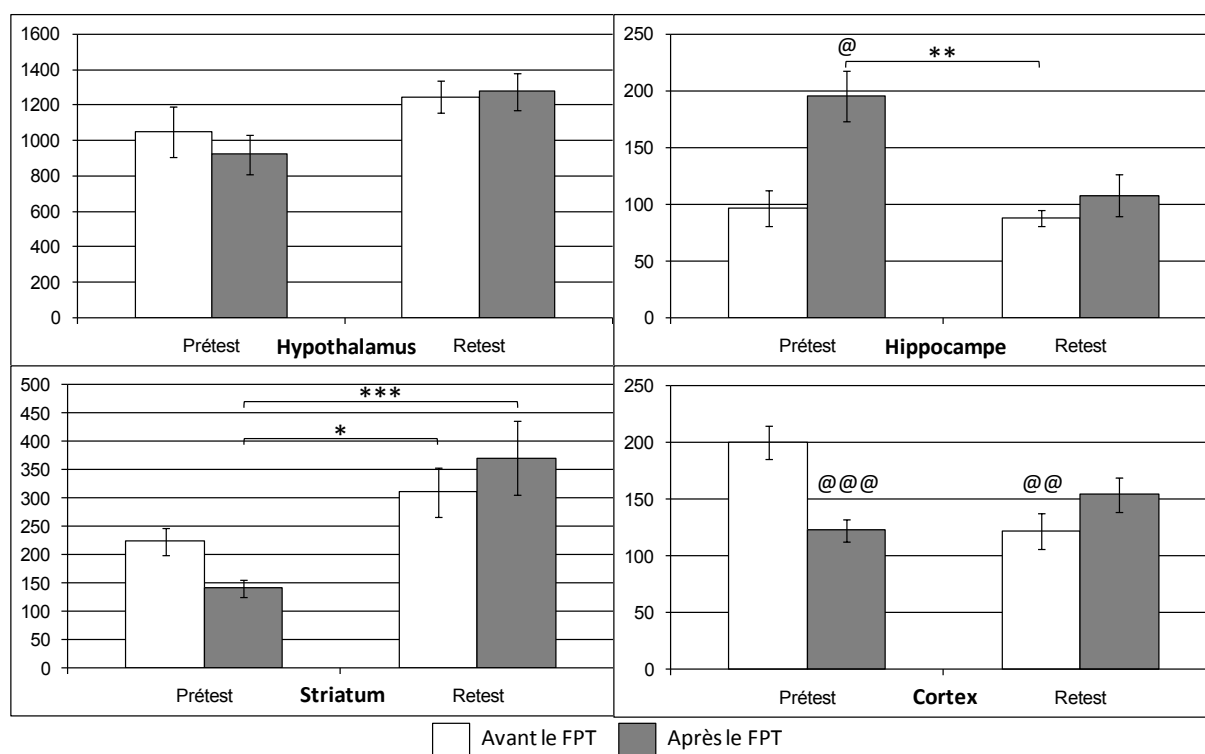


Figure 10 : Variation des concentrations de Noradrénaline au sein de l'hypothalamus, de l'hippocampe, du striatum et du cortex durant le protocole de test-retest du FPT chez la Souris. Les concentrations sont exprimées en ng/g de tissu. Les données sont exprimées en moyenne $\pm$ sem (n=12). Le sigle @ représente une différence significative, entre le groupe ciblé et le groupe « avant le prétest » qui constitue le groupe témoin (@ : $p < 0,05$; @@ : $p < 0,001$; @@@ : $p < 0,001$). Le sigle * représente une différence significative entre les deux groupes désignés par l'accolade (* : $p < 0,05$; ** : $p < 0,01$; *** : $p < 0,001$).

Nous pouvons constater sur la figure 10 que les concentrations de noradrénaline sont affectées par l'expérience du test, chez des souris naïves et expérimentées. Dans l'hypothalamus, aucune variation significative n'a été observée [$F_{(3,43)}=2.12$; $p < 0,113$]. Dans l'hippocampe, nous avons constaté un impact de l'exposition au test sur ces concentrations [$F_{(3,43)}=5.104$; $p < 0,004$], avec notamment une augmentation de près de 100 % de la concentration de noradrénaline après le prétest ($p < 0,015$). Avant le retest, 24h après le prétest, les concentrations étaient revenues au niveau initial ($p < 0,009$), et ne sont plus affectées par une nouvelle exposition au FPT. Dans le striatum [$F_{(3,43)}=6.743$; $p < 0,001$], la première exposition au FPT ne modifie pas immédiatement la concentration de noradrénaline, en effet, après le prétest, aucune variation significative n'est observée. Par contre, nous avons noté une forte élévation de la concentration 24 h après, avant le retest ($p < 0,022$). Malgré tout, la différence obtenue n'est pas significative, par rapport aux concentrations obtenues chez des souris naïves. Dans le cortex [$F_{(3,43)}=7.497$; $p < 0,001$], une diminution de la concentration de noradrénaline est constatée dès la fin du prétest

($p < 0,001$). Celle-ci persiste le lendemain, avant le retest ($p < 0,002$), mais aucune différence significative n'est observée après le retest, en comparaison avec les souris naïves.

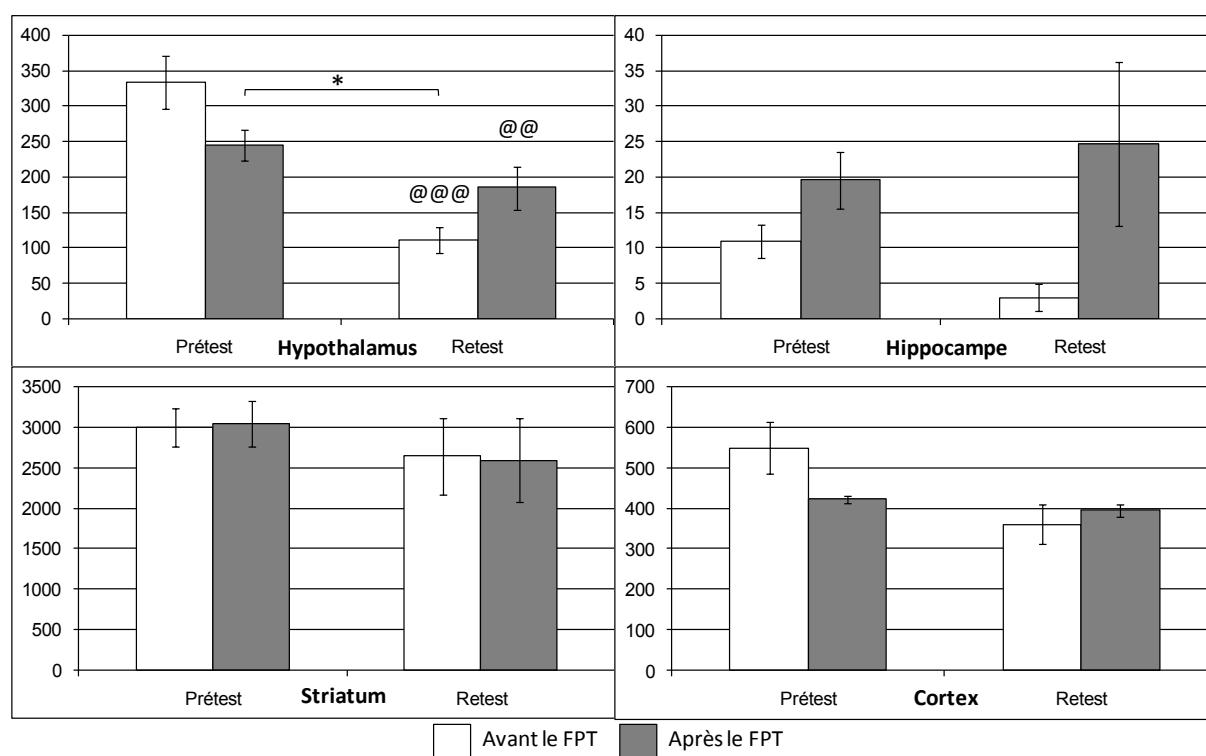


Figure 11 : Variation des concentrations de Dopamine au sein de l'hypothalamus, de l'hippocampe, du striatum et du cortex durant le protocole de test-retest du FPT chez la Souris. Les concentrations sont exprimées en ng/g de tissu. Les données sont exprimées en moyenne $\pm$ sem ($n=11-12$). Le sigle @ représente une différence significative, entre le groupe ciblé et le groupe « avant le prétest » qui constitue le groupe témoin (@ : $p < 0,05$; @@ : $p < 0,001$; @@@ : $p < 0,001$). Le sigle * représente une différence significative entre les deux groupes désignés par l'accolade (* : $p < 0,05$; ** : $p < 0,01$; *** : $p < 0,001$).

Sur la figure 11, nous pouvons constater que l'exposition au test n'a pas entraîné de variations significatives de la concentration de dopamine dans l'hippocampe [$F_{(3,42)}=2.241$; $p < 0,099$], dans le striatum [$F_{(3,42)}= 0.363$; $p < 0,78$] et dans le cortex [$F_{(3, 42)}=1.866$; $p < 0,151$] pour tous les temps. Par contre, dans l'hypothalamus, nous avons observé une variation significative des concentrations de dopamine [$F_{(3,42)}=10.641$; $p < 0,001$]. Le prétest n'a pas modifié immédiatement la concentration de dopamine, mais une forte diminution est constatée durant les 24 heures suivant le prétest ($p < 0,001$). Cette diminution persiste après le retest.

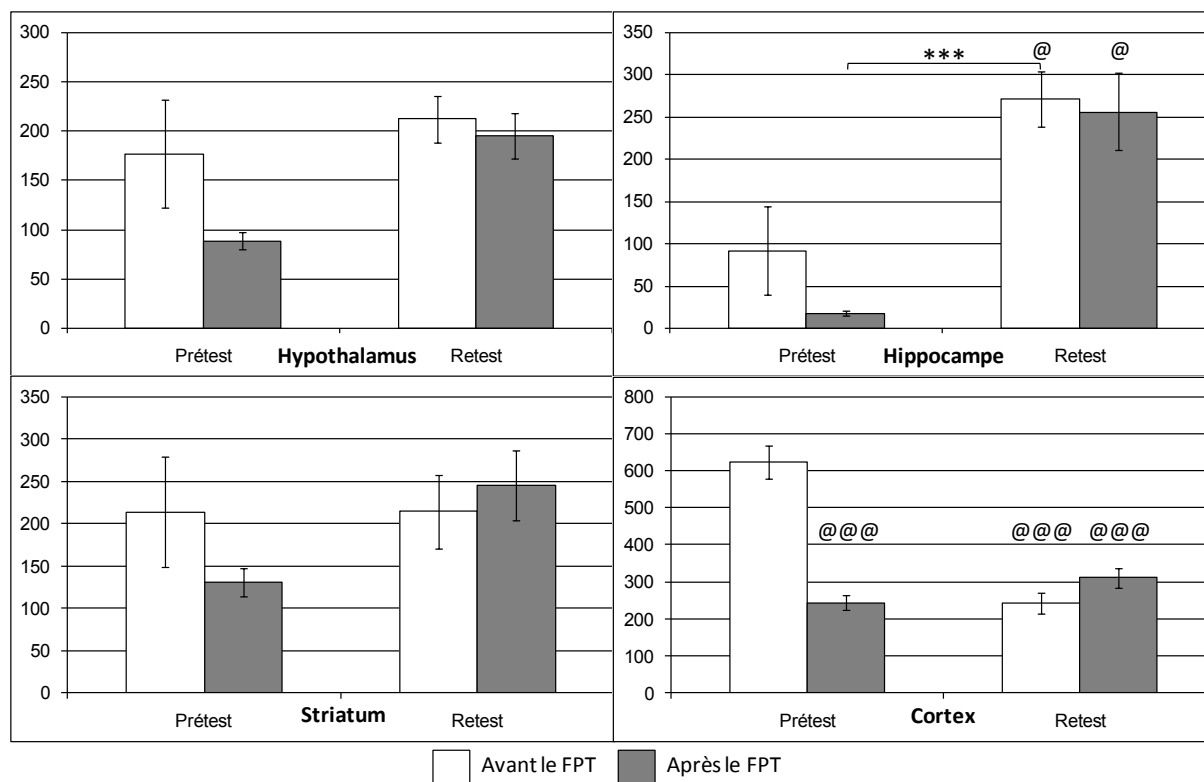


Figure 12 : Variation des concentrations de Sérotonine au sein de l'hypothalamus, de l'hippocampe, du striatum et du cortex durant le protocole de test-retest du FPT chez la Souris. Les concentrations sont exprimées en ng/g de tissu. Les données sont exprimées en moyenne $\pm$ sem (n=12). Le sigle @ représente une différence significative, entre le groupe ciblé et le groupe « avant le prétest » qui constitue le groupe témoin (@ : $p < 0,05$; @@ : $p < 0,001$; @@@ : $p < 0,001$). Le sigle * représente une différence significative entre les deux groupes désignés par l'accolade (* : $p < 0,05$; ** : $p < 0,01$; *** : $p < 0,001$).

Sur la figure 12, nous pouvons constater que l'exposition au FPT n'a pas déclenché de variation significative de la concentration de sérotonine lors du prétest ou du retest dans l'hypothalamus [$F_{(3,43)}=2.696$; $p < 0,059$] et dans le striatum [$F_{(3,43)}=1.189$; $p < 0,326$]. Par contre, une forte variation a été observée dans l'hippocampe [$F_{(3,43)}=10.347$; $p < 0,001$], au sein duquel une augmentation de plus de 150 % est retrouvée entre la fin du prétest et le début du retest ($p < 0,001$). La seconde exposition au FPT ne modifie pas cette nouvelle concentration. Il existe une différence significative entre les concentrations de sérotonine des souris naïves et prétestées, avant le FPT ($p < 0,05$). Dans le cortex [$F_{(3,43)}=35.653$; $p < 0,001$], une forte diminution de la sérotonine est observée dès la fin du prétest ($p < 0,001$), et celle-ci persiste 24 heures plus tard, même après une réexposition au FPT ($p < 0,001$).

B. Discussion de l'étude 5

L'étude neurochimique des neurotransmetteurs au sein de l'hypothalamus, de l'hippocampe, du striatum et du cortex a révélé un impact variable de l'exposition au test, chez des souris naïves ou prétestées.

Concernant la noradrénaline, nous pouvons constater que sa concentration réagit fortement à la première exposition au FPT, dans l'hippocampe. Cette forte élévation peut traduire le stress engendré par le FPT. Par contre, un retour à la concentration initiale est observé durant les 24 heures suivant le prétest. L'absence d'élévation lors du retest est un indice fort de la modification de perception de l'environnement, lorsque celui-ci est connu. En effet, l'effet aversif de l'environnement est connu, et le système noradrénergique ne réagit pas de la même façon chez ces souris expérimentées. Dans le cortex, une diminution est constatée lors du prétest, suivie d'un retour à la normale après le retest. Là encore, nous pouvons supposer que la première exposition déclenche une réaction de stress, constatée par cette forte diminution. Les concentrations de noradrénaline ne sont pas modifiées par l'exposition au FPT lors du retest, l'environnement n'exerçant vraisemblablement plus la même forme d'aversion, de néophobie. Parmi les travaux portant sur l'effet du stress sur le système noradrénergique, il a été rapporté qu'un stress aigu augmentait la concentration de noradrénaline dans le cortex, ce qui va à l'encontre de notre résultat. De manière général, plusieurs travaux semblent s'accorder sur le fait qu'un stress aigu entraîne une activation du Locus coeruleus qui déclenche une augmentation de la concentration de noradrénaline dans les différents régions ciblées par celui-ci (Flugge et al., 2004). Cela pourrait expliquer en partie nos résultats obtenus dans l'hippocampe à court terme et dans le striatum 24 heures après le prétest.

Le système dopaminergique est apparemment affecté par l'exposition au FPT uniquement dans l'hypothalamus. La diminution de la concentration en dopamine observée dure 24 heures et persiste après le retest. Les différentes études ciblées sur les variations du système dopaminergique rapportent des augmentations de concentration de la dopamine, dans le cortex et l'amygdale, suite à un stress aigu, des chocs non évitables, une manipulation de l'animal ou au confinement dans une boîte de test (Dazzi et al., 2005; Heinsbroek et al., 1991; Herman et al., 1982; Inglis and Moghaddam, 1999). Mais plusieurs résultats sont en opposition avec ces données, et il semble exister de fortes variations des modifications du

système dopaminergique, selon la sévérité et le contrôle de l'élément stressant, la souche ainsi que l'expérience de l'animal (Cabib and Puglisi-Allegra, 1996; Flugge et al., 2004).

Le système sérotoninergique réagit au stress du FPT de manière significative dans l'hippocampe et dans le cortex. Une forte augmentation persistante est observée dans l'hippocampe, ainsi qu'une diminution dans le cortex, se prolongeant après le retest. La variation de concentration de sérotonine dans l'hippocampe est un résultat qui a été constaté dans de nombreux travaux, mais pour lequel il existe de fortes disparités. En effet, certaines études ont constaté une augmentation du neurotransmetteur dans l'hippocampe après exposition de souris à un prédateur tel que le chat ou après une exposition de rats à l'EPM alors que d'autres ne montrent aucune modification (Beekman et al., 2005; Belzung et al., 2001; Rex et al., 2005). A l'inverse, une autre étude a permis d'observer une diminution de la 5-HT dans l'hippocampe après l'exposition de rats à un EPM (Carvalho et al., 2005). Les différences de résultats obtenus sont possiblement dues aux différences de méthodologies employées dans ces études (Rat ou Souris, dosage des neurotransmetteurs par des techniques d'HPLC ou de microdialyse). Dans une revue de la littérature, Flügge et collaborateurs ont constaté que le stress élevait les concentrations de sérotonine dans diverses régions du cerveau, et qu'il semblait augmenter l'activité de la tryptophane hydroxylase, enzyme de la bio-synthèse de la sérotonine (Boadle-Biber et al., 1989; Flugge et al., 2004).

Le système noradrénergique a réagi rapidement à l'exposition au FPT, mais un retour rapide aux concentrations initiales est constaté. Cela peut signifier que ce système est impliqué dans le stress initial, lié à la néophobie, mais qu'il intervient de façon moindre dans la gestion du stress lors d'une exposition à un environnement aversif préalablement découvert. A l'inverse, les systèmes dopaminergiques et sérotoninergiques ont été affectés de façon soutenue. Les souris expérimentées n'avaient pas les mêmes concentrations de sérotonine dans l'hippocampe et dans le cortex avant d'être exposées au FPT, en comparaison avec des souris naïves. Il en est de même pour la dopamine dans l'hypothalamus. Cela peut indiquer que ces deux systèmes, dans ces structures sont impliqués dans la modification de la réponse comportementale observée lors du retest. En effet, ces concentrations différentes pourraient être liées à une activation modifiée des systèmes et des structures au cours de la réexposition.

Ces résultats confirment nos données précédemment acquises dans l'étude du comportement ainsi que lors des injections cérébrales. Il existe bien une différence de réponse comportementale lors du retest, vraisemblablement liée à une différence d'activation des structures et des systèmes monoaminergiques. Ce lien entre les modifications de réponse comportementale dans les modèles d'anxiété et les concentrations de monoamines se retrouve dans d'autres études (Belzung et al., 2001).

Il est intéressant de constater que, bien que l'étude soit effectuée sur les concentrations tissulaires totales, nous avons observé des variations des neurotransmetteurs dans les différentes structures. Nous n'avons pas pu doser les métabolites des différents neurotransmetteurs, ce qui ne nous permet pas de connaître le taux de renouvellement de ces molécules, ainsi que ses variations. Pour poursuivre ce travail, une étude des concentrations des neurotransmetteurs et de leurs métabolites dans la fente synaptique pourrait être envisagée, afin d'étudier leurs métabolismes, même si sa faisabilité reste discutable. En effet, les protocoles de microdialyse sont difficiles à utiliser sur des animaux en conditions de test, notamment dans un protocole de FPT, utilisant une enceinte fermée empêchant la fuite de l'animal. De plus, il a été mis en évidence que ce type de protocole pouvait modifier la réponse comportementale des animaux, à certains stimuli lors d'un test d'anxiété (McQuade et al., 1999).

Le choix de notre souche peut aussi avoir contribué aux différences observées entre nos résultats et d'autres études sur le stress aigu ou les chocs plantaires. En effet, les animaux de la souche Swiss semblent subir peu de variations de leurs concentrations monoaminergiques lors d'une exposition à un élément stressant, comme un prédateur par exemple. La souche C57/BL6 ou DBA/2 s'est avérée plus réactive à ce type de test (Belzung et al., 2001).

Conclusion et discussion

Au cours de ce travail, nous avons cherché à caractériser les facteurs spatiaux et temporels, ainsi que les structures cérébrales intervenant dans les réponses comportementales observées au cours d'un protocole de test-retest dans le FPT chez la Souris.

En effet, dans ce type de protocole, une perte d'effet des benzodiazépines a été mise en évidence, ainsi que des phénomènes de mémoire aversive en l'absence de traitement, lors du retest.

Ces deux composantes liées à la «one-trial tolerance» et à la mémoire aversive nécessitaient une étude approfondie. En effet, la connaissance des structures cérébrales, des systèmes de neurotransmission ainsi que des facteurs environnementaux responsables de cette perte brusque d'effet, pourrait permettre d'améliorer l'efficacité des molécules, de mieux comprendre les effets secondaires observés et d'offrir potentiellement de nouvelles voies thérapeutiques dans les pathologies anxieuses. Par ailleurs, ce protocole pourrait constituer un outil d'étude de la mémoire aversive lors d'un stress répété.

De plus, nous avons cherché à mettre en évidence l'utilité de ce modèle animal d'anxiété dans l'étude de cette « one-trial tolerance » face au modèle couramment utilisé : l'EPM.

Dans le test-retest de l'EPM, les différentes études ont permis d'isoler quelques facteurs critiques dans les processus modifiant les réponses comportementales observées durant le retest. Ainsi, les facteurs spatial et environnemental au cours du prétest semblent particulièrement impliqués dans l'apparition de la tolérance aux BZD durant le retest. De même, le facteur temporel est un paramètre crucial dans l'établissement de ce phénomène.

Pour étudier ces différents facteurs, nous avons travaillé en parallèle avec deux molécules exerçant un effet de type anxiolytique dans le FPT chez la souris naïve, une benzodiazépine : le diazépam et un agoniste des récepteurs sérotoninergiques 5-HT_{2A/2C} : le DOI. De plus, nous avons montré que cette dernière substance grâce à son activité sur les récepteurs 5-HT_{2A} conservait cet effet anti-punitif lors de la réexposition au test (Ripoll et al., 2006b; Ripoll et al., 2005). A l'aide de cette propriété, nous avons donc cherché à comprendre les effets des paramètres étudiés sur la réponse anxiolytique, lors du retest dans le FPT chez la Souris.

Notre protocole d'étude visait dans un premier temps à comprendre les paramètres critiques aux niveaux spatial et temporel, dans l'établissement de la tolérance aux benzodiazépines, mais aussi dans la mise en place des phénomènes de mémoire aversive. Pour cela, nous avons comparé les effets d'injections intra-péritonéales de DOI ou de diazépam lors du retest par rapport à des injections intra-péritonéales de véhicule, afin de connaître l'impact des modifications de protocole et spatio-temporelles sur les résultats lors du retest.

Notre première étape a permis de confirmer que la perte d'effet des benzodiazépines, et plus particulièrement du diazépam, était liée non pas à la présence des chocs électriques, mais bien à l'exposition au test. Nous nous sommes ensuite intéressés à l'influence de ces chocs électriques sur l'amplitude de la réponse de type anxiolytique au DOI lors du retest. A l'aide de modifications du protocole de test lors du premier test et / ou lors du retest, nous avons pu obtenir des résultats significatifs. Ce premier travail publié nous a permis de conclure que la perte de l'effet de type anxiolytique était liée à la connaissance de l'environnement spatial proche, lors de la réexposition, et non aux chocs électriques, ceux-ci n'agissant que comme potentialisateurs du phénomène. Cette conclusion nous a permis de valider notre utilisation du FPT dans un protocole de test-retest, comme modèle d'étude de la «one-trial tolerance».

De plus, nous avons pu constater que la connaissance de l'environnement nouveau ainsi que des menaces potentielles est prépondérante dans l'établissement de la «one-trial tolerance».

Cela nous permet d'étudier de manière plus critique les résultats obtenus dans le test-retest dans l'EPM. Ainsi, dans plusieurs travaux, l'environnement entre le prétest et le retest a été modifié, et il a été constaté que les BZDs conservaient leur effet. Nous pouvons supposer que ces résultats étaient fortement liés à la connaissance de l'environnement. L'ajout d'une situation aversive telle que de l'air pulsé dans les bras « fermés » (Pereira et al., 1999), ou de bords sur les bras « ouverts » (Fernandes and File, 1996), pourrait être perçu par l'animal comme une modification de l'environnement et de ses risques. Dans ce cas, une nouvelle exploration de l'espace proche serait nécessaire, afin de collecter tous les indices spatiaux et aversifs. L'animal pourrait être confronté au cours de la nouvelle exploration, à une situation

de néophobie, contre laquelle les BZD s'avèrent efficaces. Par contre, lors d'un retest avec un environnement identique, l'animal n'est plus motivé pour explorer cet environnement connu, avec le risque de s'exposer aux stimuli aversifs. Je ne considère pourtant pas que ce nouvel état soit lié à une phobie, mais plutôt à une prostration, qui pourrait se rapprocher d'un abandon. Malgré cela, nous ne pouvons pas non plus qualifier cet état de désespoir comportemental, en effet, de nombreux antidépresseurs se sont avérés inactifs dans le retest du FPT.

Disposant alors d'un modèle valide et fiable pour comprendre le phénomène de la «one-trial tolerance», nous avons poursuivi notre étude des paramètres qui pouvaient être impliqués dans l'apparition de cette tolérance. En effet, une partie de ces travaux avaient été effectués sur le modèle de l'EPM, mais le FPT, de par sa simplicité et sa robustesse, pouvait permettre d'obtenir des réponses différentes.

En effet, alors que le protocole d'EPM impose une session de 5 minutes; le FPT s'effectue sur 1 minute et 15 secondes. Les travaux d'étude des paramètres temporels ont révélé qu'une durée d'exposition inférieure à 2 minutes lors de la première exposition à l'EPM n'entraînait pas de phénomène de tolérance chez le Rat (Dal-Col et al., 2003). Les résultats obtenus sur des durées pourtant plus brèves dans le FPT nous permettent de raccourcir ces intervalles de temps, et de préciser encore mieux la fenêtre temporelle critique pour l'apparition de la «one-trial tolerance».

Dans cette seconde étude, nous avons donc pu mettre en évidence l'importance du temps d'exposition lors du premier test, ainsi que de l'intervalle de temps entre les deux sessions.

Nous avons pu constater que le phénomène de « one-trial tolerance » s'exprimait lors du retest lorsque les souris avaient été exposées seulement 30 secondes durant la première session, indépendamment de la présence ou non des chocs électriques durant le test. Par contre, une exposition de 15 secondes n'est pas suffisante pour déclencher ce phénomène lors du retest. Cela peut être attribué au fait que la souris n'a pas suffisamment de temps pour se faire une représentation complète de l'espace de test.

Nous ne pouvons pas comparer cet indice temporel avec les données obtenues dans l'EPM, puisque l'espèce utilisée (le Rat) ainsi que la benzodiazépine (le chlordiazépoxide ou le midazolam) sont différentes.

L'étude de l'intervalle de temps nous a permis de constater que les informations acquises lors de la première exposition sont disponibles dès la fin du test, puisqu'une souris réexposée immédiatement au test ne continue pas à explorer l'environnement. Malgré tout, nous ne pouvons savoir si cette diminution observée quel que soit l'intervalle de temps (0 secondes – 2 heures) est liée à une cause unique ou plutôt à plusieurs phénomènes successifs d'habituation puis de mémorisation progressive.

Dans ce cadre, nous avons exposé plusieurs résultats complémentaires, non publiés mais apportant certaines informations utiles à la discussion. Ainsi, à l'aide d'une étude de l'effet du diazépam sur un intervalle compris entre 5 minutes et 30 minutes entre le prétest et le retest, nous avons pu constater que les cinétiques d'apparition de la mémoire aversive ainsi que de la «one-trial tolerance» semblaient être différentes. Ce résultat permet de supposer que les processus et les structures sous-jacents à l'établissement de ces deux phénomènes sont différents.

Cette information est renforcée par l'étude de l'effet du diazépam lors d'un retest séparé de plusieurs jours du prétest. Ainsi, sur l'intervalle 3 jours – 42 jours, nous avons constaté que la mémoire aversive observée lors du retest persistait sur cet intervalle de temps, alors que la «one-trial tolerance» s'estompait après 14 jours, et que le diazépam retrouvait un effet anti-punitif dans le FPT.

Afin de compléter ce travail, nous nous sommes ensuite intéressés aux structures cérébrales impliquées dans la mise en place de la tolérance aux benzodiazépines. Pour cela, nous avons mis au point un protocole d'injection localisée dans des structures impliquées dans l'anxiété. Lors de cette étude, nous avons pu mettre en évidence une implication de l'hippocampe dans le mécanisme d'action du DOI dans le FPT.

De plus, ce travail a permis de valider notre protocole, et de constater que l'opération n'entraînait pas de modification des résultats obtenus dans le FPT, en comparaison avec des souris non opérées de la même cohorte. A la suite de cette étude, nous avons continué cette mise au point, afin de pouvoir injecter plus précisément au niveau de noyaux spécifiques des structures d'intérêt. Ainsi, nous avons travaillé sur trois structures, avec six points d'injection au total. L'amygdale, en considérant deux de ses noyaux : le noyau latéral et le noyau baso-latéral, la substance grise périaqueducule, ainsi que l'hippocampe, avec trois sous-régions de la corne d'Ammon.

Dans la quatrième étude, nous avons donc cherché à connaître le rôle de ces différentes structures dans l'effet de type anxiolytique observé dans le FPT après une injection intrapéritonéale. Pour cela, nous avons dans un premier temps pratiqué des injections localisées de diazépam, ainsi que de DOI, dans chacune des structures, afin de déterminer leurs interventions respectives dans l'effet observé lors du test. Par la suite, nous avons utilisé une technique d'inactivation réversible, afin de connaître l'intervention de ces structures lors du prétest, et l'impact lors du retest de cette inactivation.

Les résultats obtenus nous permettent de constater que les structures ciblées ont toutes un intérêt dans notre étude. En effet, la stimulation des récepteurs 5-HT_{2A/2C} dans la région CA2 de l'hippocampe a entraîné un effet de type anxiolytique dans le test chez des souris naïves ou expérimentées. L'injection d'aCsf dans la région CA3 a modifié la réponse comportementale lors du retest des souris témoins, suggérant un lien de cette zone avec la mémoire aversive.

En ce qui concerne la PAG ainsi que l'amygdale et plus particulièrement son noyau latéral, nous avons démontré que l'injection de diazépam dans ces structures, entraînait un effet de type anxiolytique dans le test. De plus l'inactivation de la PAG avait le même effet dans le test chez la souris naïve.

Au cours des différentes études, nous avons pu remarquer un comportement différent entre les souris retestées injectées avec du véhicule ou avec du diazépam à la dose de 1 mg/kg. En effet, alors que les souris ayant reçu une dose de diazépam restent parfaitement immobiles lors du retest, pattes écartées dans une attitude de « freezing », les souris injectées avec du véhicule explorent la plaque sur laquelle elles sont déposées en début de test, et n'effectuent pas ou peu de passages sur une autre plaque. Malgré tout, ces souris ont un comportement explorateur marqué, totalement différent de celui des souris injectées au diazépam. Nous avons pu observer des flairages, des redressements, des comportements de saut d'une plaque à l'autre, des extensions sur les plaques adjacentes sans franchissement complet. Cette forte différence de comportement n'est malheureusement pas perceptible avec le seul indice dont nous disposons, à savoir le nombre de passages punis.

Le FPT tire une grande partie de son intérêt de cette relative simplicité. Un seul indice permet de décrire un effet pharmacologique, à l'opposé de son « concurrent » direct, l'EPM qui dispose d'une grande quantité de résultats plus difficilement interprétables.

Plusieurs travaux ont prôné une utilisation de paramètres éthologiques dans le test de l'EPM, ou une simplification des indices recueillis, afin de faciliter son analyse (Wall and Messier, 2001). En effet, le recours à une analyse complexe, de type multifactorielle entraîne un risque de perte d'information, ou de succession d'approximation, qui peuvent biaiser le résultat observé sur l'appareil. Dans le cadre du FPT, une analyse éthologique pourrait être envisageable, mais diminuerait fortement ses avantages vis-à-vis d'autres modèles de ce type. La non-utilisation de caméras, ou de relevés complexes permet d'appréhender rapidement le test et de multiplier le nombre d'animaux dans une session de test.

Parmi les évolutions envisageables, il pourrait être intéressant de considérer l'utilisation de rayons photo-électriques, tels que ceux présents dans un actimètre. Deux rayons placés en croix au niveau des intersections des plaques permettraient de différencier parmi les souris n'effectuant aucun passage durant la minute que dure le test, celles qui ont malgré cela exprimé un comportement de type exploratoire. Il pourrait être intéressant de mesurer le temps de latence avant le premier choc. En effet, au cours de ce travail, nous avons pu constater que lors de l'utilisation du diazépam, certaines souris n'effectuaient pas de passages du tout, alors que d'autres appartenant au même groupe, avec le même traitement, effectuaient une série de plusieurs passages successifs, déclenchée par le premier choc.

L'analyse des réponses comportementales observées lors du retest, lors des injections localisées de diazépam, nous permet d'émettre une hypothèse, qui nécessiterait une étude comportementale plus poussée pour être validée. Le diazépam, lorsqu'il est utilisé lors du retest, pourrait être actif puisque son injection dans la PAG augmente le nombre de passages punis acceptés. Pourtant, le comportement de « freezing » lors du retest indique qu'il semble exister un conflit entre plusieurs structures activées. Nous pouvons supposer que lors de son injection par voie intra-péritonéale chez des souris naïves, le diazépam va se fixer sur des récepteurs GABA_A dans différentes structures cérébrales, exprimant un effet tendant globalement à augmenter le nombre de passages punis acceptés. Lors de la seconde exposition, nous considérons qu'il a dû y avoir une modification de la sensibilité de récepteurs GABA_A dans certaines structures responsables de cet effet de type anxiolytique. Ainsi, la résultante de l'injection de diazépam et de la modulation de récepteurs GABA_A dans différentes aires cérébrales n'est pas une augmentation du nombre de passages punis

acceptés, mais plutôt un effet de type panique ou « freezing ». Cette variation de sensibilité régionalisée n'a pas pu être mise en évidence lors du protocole d'inactivation par la lidocaïne pour différentes raisons :

- un facteur temporel, la fenêtre d'inactivation du tissu est très brève et les récepteurs peuvent être modifiés après l'exposition au test
- un facteur structural, d'autres structures peuvent être envisagées comme impliquées dans cet effet

Néanmoins, nous avons lors de l'étude 1 réfuté l'hypothèse selon laquelle la « one-trial tolerance » observée dans le test-retest de l'EPM était liée à une modification conformationnelle des récepteurs GABA_A. En effet, cette modification, si elle est liée à l'exposition à l'EPM aurait dû avoir un effet sur la réponse comportementale au diazépam dans le FPT. Cela n'a pas été le cas, et nous devons alors considérer qu'il existe un lien entre cette modification de la sensibilité des récepteurs GABA_A et la mémoire spatiale qui semble se fixer dès les 30 premières secondes de test.

Tout au cours de ce travail, nous avons utilisé ce test, qui malgré cette apparente simplicité s'est révélé très à même de nous apporter une grande quantité d'informations.

Cette utilisation des tests comportementaux pour décrire des mécanismes d'action et des processus neurologiques impliqués est très riche, abordable mais peut facilement être biaisée par une mauvaise caractérisation de l'outil comportemental.

Nous avons cherché à la fois les mécanismes impliqués dans la mémoire aversive et la « one-trial tolerance », afin non seulement de comprendre les phénomènes impliqués dans ces processus, mais aussi de mieux caractériser le FPT et son protocole de test-retest.

Notre première étude nous a permis de placer le test-retest du FPT comme un modèle d'étude de la « one-trial tolerance » mais aussi de la mémoire aversive. Notre second travail nous a permis d'affiner cette caractérisation en y apportant une dimension temporelle importante. Nous savons que nous travaillons sur des phénomènes très rapidement mis en place, mais nécessitant un apprentissage spatial d'au moins 30 secondes.

Par la suite, nous avons pu mettre en évidence que les structures cérébrales impliquées dans la réponse de type anxiolytique de deux molécules actives dans le test étaient vraisemblablement différentes. Ainsi, l'hippocampe s'est montré sensible à une injection de

DOI, mais le diazépam n'a pas entraîné de réponse, et la réciproque a été mise en évidence dans l'amygdale et dans la PAG.

Il est par ailleurs intéressant de constater que dans une étude de l'activité anxiolytique et motrice du midazolam, des injections localisées de cette BZD dans l'amygdale ont déclenché un effet de type anxiolytique, mesuré à l'aide d'un test d'open-field. Aucun effet n'a par contre été retrouvé lors d'une injection dans l'hippocampe (Heldt and Ressler, 2006).

Le travail effectué avec les injections de lidocaïne lors du prétest visait à déterminer si l'inactivation d'une structure ciblée, lors de la première exposition pouvait modifier les phénomènes de mémoire aversive ou de la «one-trial tolerance». Nous avons pu mettre en évidence une influence de l'hippocampe sur la mémoire aversive, de manière indirecte toutefois. Par contre, l'inactivation des structures ciblées n'a pas modifié l'effet du diazépam lors du retest.

Cette étude reposait sur l'hypothèse que lors de la première exposition, une information était stockée dans une structure, et était ensuite utilisée lors du retest. Pour la mémoire aversive, nous ne pouvons pas conclure de manière plus avancée sur le rôle de la région CA3 de l'hippocampe.

Pourtant, en s'intéressant à d'autres études liées à la mémoire spatiale, nous pouvons constater que les récepteurs NMDA de la région CA3 ont un rôle crucial dans l'acquisition rapide d'indices spatiaux lors d'une exposition unique à un nouvel environnement (Nakazawa et al., 2004). Nous pouvons donc supposer que les récepteurs NMDA de la région CA3 de l'hippocampe sont impliqués dans l'apprentissage spatial ayant lieu lors du prétest dans le FPT. Il conviendrait, afin de tester cette hypothèse, d'effectuer une étude pharmacologique à l'aide d'injections d'agonistes et d'antagonistes des récepteurs NMDA, afin de constater si la diminution du nombre de passages punis observée lors du retest peut être annulée.

Pour la «one-trial tolerance», il est possible que nous n'ayons pas ciblé les structures majoritairement impliquées dans la «one-trial tolerance» lors du prétest. Nous pouvons aussi supposer que l'information est créée à posteriori de l'exposition. En effet, la lidocaïne n'agit plus 15 minutes après son injection, et il pourrait être envisageable que la stimulation entraînée par l'exposition ne se répercute que plus tard sur les structures liées à la «one-trial tolerance».

Il conviendrait maintenant d'explorer d'autres structures, mais aussi de refaire ce type de protocole en inactivant les structures non pas pour le prétest, mais plutôt lors du retest. Ainsi, nous pourrions envisager qu'une structure inactivée pourrait annuler la perte d'effet du diazépam lors de cette seconde exposition.

Les résultats de notre étude neurochimique permettent de constater que les modifications de la réponse comportementale sont visibles dans les quatre aires étudiées (hypothalamus, hippocampe, striatum et cortex) selon les systèmes de neurotransmission monoaminergiques. Il semble notamment que les systèmes dopaminergique et sérotoninergique soient impliqués dans ces modifications lors du retest. Nous avons ainsi observé une diminution des concentrations de dopamine dans l'hypothalamus lors du retest, liée à la première exposition. L'exposition au FPT durant le prétest a fortement diminué la concentration de sérotonine dans le cortex, de manière rapide et durable. Par contre, cette concentration a fortement augmenté dans l'hippocampe après le prétest. Une analyse plus poussée, basée sur les taux de renouvellement et les quantités de neurotransmetteurs dans la fente synaptique permettrait d'étudier de façon plus complète les implications des systèmes monoaminergiques dans ces phénomènes.

Au vu de l'ensemble des résultats, il convient de se poser la question de l'intérêt du protocole de test-retest du FPT. La première interrogation que nous avons soulevée est de savoir si les résultats obtenus permettent encore de caractériser un effet anxiolytique (Ripoll et al., 2005). Cela ne semble pas être le cas, puisque la classe de molécules de référence dans la pathologie anxieuse, à savoir les benzodiazépines, est inefficace dans le test.

Dans ce cadre, nous avons quelquefois utilisé le terme d'effet de type « anxiolytique » lors du retest pour décrire l'augmentation du nombre de passages punis. Pourtant, cela ne peut être exprimé ainsi que lorsque le test utilisé est encore lié à la pathologie anxieuse, ce qui n'est pas prouvé. Cet abus de langage n'avait pas de valeur forte, puisqu'il a simplement servi à décrire les résultats plutôt qu'à les interpréter.

Peut-il s'agir d'un modèle de pathologie humaine, nécessitant alors une validation pharmacologique, mais aussi constructive complète ?

Actuellement le protocole de test-retest du FPT ne peut pas être considéré comme un modèle animal d'une pathologie. Toutefois, il semble être indiqué pour étudier les

phénomènes de tolérances aux benzodiazépines, et leurs mécanismes d'action. Malgré tout, il est difficile de faire un parallèle entre les résultats que nous pouvons obtenir dans ce modèle, et l'apparition de la tolérance aux BZD après trois semaines de traitement chronique (File, 1993). Nous ne pouvons pas rapprocher ce protocole de test-retest dans le FPT, des modèles de peur conditionnée envers un stimulus discret, utilisés pour étudier les phénomènes de mémoire aversive et d'associations entre stimuli. En effet, dans ces modèles, deux stimuli sont imposés à l'animal : un son ou une lumière (stimulus neutre) et un choc électrique plantaire (stimulus aversif) par exemple. L'association créée entre les deux stimuli n'est pas représentative de celle qui peut avoir lieu entre les chocs électriques et l'environnement dans le FPT. Ici, les deux stimuli représentés par les chocs électriques et l'exposition à un nouvel environnement ont une connotation négative. Il n'y a pas de stimulus neutre dans cette situation. De plus, lors de la réexposition, le stimulus aversif des chocs électriques est toujours présent. L'état dans lequel se trouve l'animal lors du retest pourrait se rapprocher de la peur conditionnée. Nous pouvons ainsi constater des similarités avec les modèles de peur conditionnée contextuelle. Néanmoins, le stimulus aversif représenté par les chocs électriques dans ces modèles est de type non conditionnel, alors que dans le test-retest du FPT, le stimulus aversif est lié à l'exploration et au passage d'une plaque à l'autre. Pourtant, dans ce type de modèle, nous retrouvons une implication de l'hippocampe et de l'amygdale (LeDoux, 2000). Ainsi, dans ces conditions, le contexte est associé au stimulus non conditionnel. Cela nécessite une représentation spatiale du contexte par l'hippocampe qui communique avec les noyaux basal et basal accessoire de l'amygdale qui projettent à leur tour sur le noyau central, pour entraîner via le tronc cérébral une réponse comportementale de peur (Fig. 13).

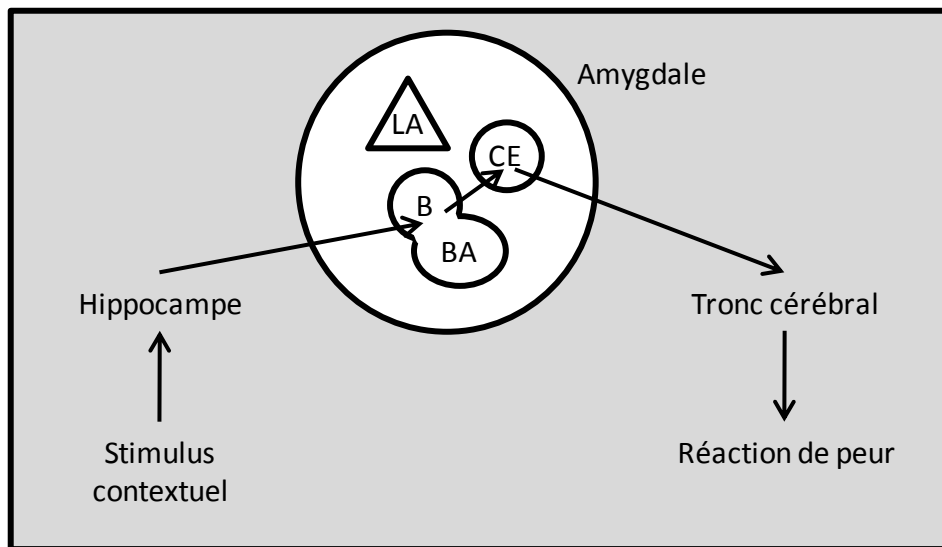


Figure 13 : Le conditionnement contextuel. L'information passe par l'hippocampe, qui projette vers les noyaux basal (B) et basal accessoire (BA), projetant à leur tour vers le noyau central (CE) responsable de la stimulation du tronc cérébral déclenchant la réaction de peur. Le noyau latéral (LA) n'est pas impliqué dans ce conditionnement (LeDoux, 2000).

De plus, dans le cadre de la formation de la peur contextuelle, une étude récente a mis en évidence un facteur temporel important dans la modification de la réponse comportementale lors d'une réexposition à une chambre susceptible de soumettre les animaux à des chocs électriques plantaires.

En effet, les auteurs ont constaté que pour obtenir un bénéfice de la préexposition, les animaux devaient être libres d'explorer au minimum 20 à 40 secondes le test dans son ensemble. Si les animaux n'avaient la possibilité d'explorer que la moitié de la chambre, à cause d'une plaque transparente placée en son centre, les réponses comportementales n'étaient pas modifiées lors de la réexposition. La durée minimale retrouvée dans cette étude correspond parfaitement à celle que nous avons mise en évidence dans l'étude 2 (McHugh and Tonegawa, 2007).

Par contre, nous n'avons pas retrouvé les résultats d'une autre étude ciblée sur l'inactivation des noyaux amygdaliens BLA ou LA préalablement à la première exposition au test dans un modèle de peur contextuelle conditionnée. En effet, une inactivation de BLA à l'aide de lidocaïne, 5 minutes avant le conditionnement, a empêché le conditionnement contextuel. L'inactivation du noyau LA a entraîné des variations de réponse conditionnée, en fonction du contexte étudié (Calandreau et al., 2005).

Dans notre travail, nous n'avons pas constaté de variation de la réponse comportementale lors du retest après une inactivation de ces noyaux durant le prétest.

Grâce à la composante punitive du FPT, il paraît plausible d'utiliser le test-retest comme modèle d'étude de la mémoire aversive et de l'apprentissage spatial qui lui est lié. Ce protocole d'aspect simple et sommaire contient ainsi au moins deux composantes apparentes, liées à la néophobie, mais aussi à l'aversion. À l'aide de différentes techniques invasives ou non, il semble judicieux de l'utiliser pour décrire des mécanismes d'action ou des interrelations structurales impliqués dans la mise en place d'une réponse comportementale à une situation de stress répété. Il convient aussi de l'utiliser pour déterminer les mécanismes d'action impliqués dans l'effet des BZD et de leur perte d'effet.

Il se différencie par ailleurs des protocoles d'anxiété, de par l'absence de réponse aux traitements de référence que sont les BZD. Il ne représente pas non plus un modèle de peur contextuelle simple, puisque les punitions, constituant le stimulus aversif, sont liées à l'exploration et l'animal peut apprendre à les éviter. La tâche demandée implique une notion de décision de l'animal qui n'existe pas dans les protocoles de peur conditionnée contextuelle, dans lequel l'animal adopte une posture de prostration, liée à l'incapacité de fournir une réponse comportementale adaptée.

Références

- Albrechet-Souza, L., Oliveira, A. R., De Luca, M. C., Tomazini, F. M., Santos, N. R., Brandao, M. L., 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, 571-579.
- Amaral, D. G., 2002. The primate amygdala and the neurobiology of social behavior: implications for understanding social anxiety. *Biol Psychiatry* 51, 11-17.
- Amaral, D. G., Witter, M., 1995. Hippocampal formation. In: Paxinos, G., (Ed), *The rat nervous system*. Academic Press, San Diego, pp. 443-492.
- Aron, C., Simon, P., Larousse, C., Boissier, J. R., 1971. Evaluation of a rapid technique for detecting minor tranquilizers. *Neuropharmacology* 10, 459-469.
- Augustsson, H., Dahlborn, K., Meyerson, B. J., 2005. Exploration and risk assessment in female wild house mice (*Mus musculus musculus*) and two laboratory strains. *Physiol Behav* 84, 265-277.
- Bandler, R., Carrive, P., 1988. Integrated defence reaction elicited by excitatory amino acid microinjection in the midbrain periaqueductal grey region of the unrestrained cat. *Brain Res* 439, 95-106.
- Beekman, M., Flachskamm, C., Linthorst, A. C., 2005. Effects of exposure to a predator on behaviour and serotonergic neurotransmission in different brain regions of C57bl/6N mice. *Eur. J. Neurosci.* 21, 2825-2836.
- Behbehani, M. M., 1995. Functional characteristics of the midbrain periaqueductal gray. *Prog Neurobiol* 46, 575-605.
- Behbehani, M. M., Jiang, M. R., Chandler, S. D., Ennis, M., 1990. The effect of GABA and its antagonists on midbrain periaqueductal gray neurons in the rat. *Pain* 40, 195-204.
- Belzung, C., 2001. Rodent models of anxiety-like behaviors: are they predictive for compounds acting via non-benzodiazepine mechanisms? *Curr Opin Investig Drugs* 2, 1108-1111.
- Belzung, C., El Hage, W., Moindrot, N., Griebel, G., 2001. Behavioral and neurochemical changes following predatory stress in mice. *Neuropharmacology* 41, 400-408.
- Belzung, C., Griebel, G., 2001. Measuring normal and pathological anxiety-like behaviour in mice: a review. *Behav Brain Res* 125, 141-149.
- Beracochea, D., 2006. Anterograde and retrograde effects of benzodiazepines on memory. *ScientificWorldJournal* 6, 1460-1465.
- Bertoglio, L. J., Anzini, C., Lino-de-Oliveira, C., Carobrez, A. P., 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, 99-107.
- Bertoglio, L. J., Carobrez, A. P., 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, 197-203.
- Bertoglio, L. J., Carobrez, A. P., 2002. Prior maze experience required to alter midazolam effects in rats submitted to the elevated plus-maze. *Pharmacol Biochem Behav* 72, 449-455.
- Bertoglio, L. J., Carobrez, A. P., 2003. Anxiolytic-like effects of NMDA/glycine-B receptor ligands are abolished during the elevated plus-maze trial 2 in rats. *Psychopharmacology (Berl)* 170, 335-342.
- Bertoglio, L. J., Carobrez, A. P., 2004. Scopolamine given pre-Trial 1 prevents the one-trial tolerance phenomenon in the elevated plus-maze Trial 2. *Behav Pharmacol* 15, 45-54.
- Blanchard, D. C., Blanchard, R. J., 1972. Innate and conditioned reactions to threat in rats with amygdaloid lesions. *J. Comp. Physiol. Psychol.* 81, 281-290.
- Blanchard, D. C., Blanchard, R. J., Tom, P., Rodgers, R. J., 1990. Diazepam changes risk assessment in an anxiety/defense test battery. *Psychopharmacology (Berl)* 101, 511-518.

- Boadle-Biber, M. C., Corley, K. C., Graves, L., Phan, T. H., Rosecrans, J., 1989. Increase in the activity of tryptophan hydroxylase from cortex and midbrain of male Fischer 344 rats in response to acute or repeated sound stress. *Brain Res* 482, 306-316.
- 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.
- Bourin, M., 1997. Animal models of anxiety: are they suitable for predicting drug action in humans? *Pol J Pharmacol* 49, 79-84.
- Bourin, M., Hascoet, M., 2001. Drug mechanisms in anxiety. *Curr Opin Investig Drugs* 2, 259-265.
- Bourin, M., Hascoet, M., 2003. The mouse light/dark box test. *Eur J Pharmacol* 463, 55-65.
- Bourin, M., Hascoet, 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., Petit-Demouliere, B., Nic Dhonnchadha, B. A., Hascoet, M., 2007. Animal models of anxiety in mice. *Fundamental and Clinical Pharmacology*.
- Brown, J. S., Kalish, H. I., Farber, I. E., 1951. Conditioned fear as revealed by magnitude of startle response to an auditory stimulus. *J Exp Psychol* 41, 317-328.
- Bueno, C. H., Zangrossi, H., Jr., Nogueira, R. L., Soares, V. P., Viana, M. B., 2005. Panicolytic-like effect induced by the stimulation of GABAA and GABAB receptors in the dorsal periaqueductal grey of rats. *Eur J Pharmacol* 516, 239-246.
- Cabib, S., Puglisi-Allegra, S., 1996. Stress, depression and the mesolimbic dopamine system. *Psychopharmacology (Berl)* 128, 331-342.
- Calandrea, L., Desmedt, A., Decorte, L., Jaffard, R., 2005. A different recruitment of the lateral and basolateral amygdala promotes contextual or elemental conditioned association in Pavlovian fear conditioning. *Learn Mem* 12, 383-388.
- Calzavara, M. B., Patti, C. L., Lopez, G. B., Abilio, V. C., Silva, R. H., Frussa-Filho, R., 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, 2235-2246.
- Campbell, B. M., Merchant, K. M., 2003. Serotonin 2C receptors within the basolateral amygdala induce acute fear-like responses in an open-field environment. *Brain Res* 993, 1-9.
- Canteras, N. S., Swanson, L. W., 1992. Projections of the ventral subiculum to the amygdala, septum, and hypothalamus: a PHAL anterograde tract-tracing study in the rat. *J Comp Neurol* 324, 180-194.
- Carobrez, A. P., Bertoglio, L. J., 2005. Ethological and temporal analyses of anxiety-like behavior: the elevated plus-maze model 20 years on. *Neurosci Biobehav Rev* 29, 1193-1205.
- Carola, V., D'Olimpio, F., Brunamonti, E., Mangia, F., Renzi, P., 2002. Evaluation of the elevated plus-maze and open-field tests for the assessment of anxiety-related behaviour in inbred mice. *Behav Brain Res* 134, 49-57.
- Carvalho, M. C., Albrechet-Souza, L., Masson, S., Brandao, M. L., 2005. Changes in the biogenic amine content of the prefrontal cortex, amygdala, dorsal hippocampus, and nucleus accumbens of rats submitted to single and repeated sessions of the elevated plus-maze test. *Braz. J. Med. Biol. Res.* 38, 1857-1866.
- Celerier, A., Pierard, C., Beracochea, D., 2004a. Effects of ibotenic acid lesions of the dorsal hippocampus on contextual fear conditioning in mice: comparison with mammillary body lesions. *Behav Brain Res* 151, 65-72.
- Celerier, A., Pierard, C., Rachbauer, D., Sarrieau, A., Beracochea, D., 2004b. Contextual and serial discriminations: a new learning paradigm to assess simultaneously the effects of acute stress on retrieval of flexible or stable information in mice. *Learn Mem* 11, 196-204.
- Costall, B., Jones, B. J., Kelly, M. E., Naylor, R. J., Tomkins, D. M., 1989. Exploration of mice in a black and white test box: validation as a model of anxiety. *Pharmacol Biochem Behav* 32, 777-785.

- Crawley, J. N., 1981. Neuropharmacologic specificity of a simple animal model for the behavioral actions of benzodiazepines. *Pharmacol Biochem Behav* 15, 695-699.
- Crawley, J. N., 1985. Exploratory behavior models of anxiety in mice. *Neurosci Biobehav Rev* 9, 37-44.
- Cressant, A., Besson, M., Suarez, S., Cormier, A., Granon, S., 2007. Spatial learning in Long-Evans Hooded rats and C57BL/6J mice: different strategies for different performance. *Behav Brain Res* 177, 22-29.
- Crusio, W. E., 2001. Genetic dissection of mouse exploratory behaviour. *Behav Brain Res* 125, 127-132.
- Cruz-Morales, S. E., Santos, N. R., Brandao, M. L., 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, 973-978.
- Dailly, E., Chenu, F., Petit-Demouliere, B., Bourin, M., 2006. Specificity and efficacy of noradrenaline, serotonin depletion in discrete brain areas of Swiss mice by neurotoxins. *J Neurosci Methods* 150, 111-115.
- Dal-Col, M. L., Pereira, L. O., Rosa, V. P., Calixto, A. V., Carobrez, A. P., Faria, M. S., 2003. Lack of midazolam-induced anxiolysis in the plus-maze Trial 2 is dependent on the length of Trial 1. *Pharmacol Biochem Behav* 74, 395-400.
- Daumas, S., Halley, H., Frances, B., Lassalle, J. M., 2005. Encoding, consolidation, and retrieval of contextual memory: differential involvement of dorsal CA3 and CA1 hippocampal subregions. *Learn Mem* 12, 375-382.
- Davis, M., 1998a. Anatomic and physiologic substrates of emotion in an animal model. *J Clin Neurophysiol* 15, 378-387.
- Davis, M., 1998b. Are different parts of the extended amygdala involved in fear versus anxiety? *Biol Psychiatry* 44, 1239-1247.
- Davis, M., Falls, W. A., Campeau, S., Kim, M., 1993. Fear-potentiated startle: a neural and pharmacological analysis. *Behav Brain Res* 58, 175-198.
- Dawson, G. R., Crawford, S. P., Stanhope, K. J., Iversen, S. D., Tricklebank, M. D., 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, 570-572.
- Dazzi, L., Seu, E., Cherchi, G., Biggio, G., 2005. Chronic administration of the SSRI fluvoxamine markedly and selectively reduces the sensitivity of cortical serotonergic neurons to footshock stress. *Eur Neuropsychopharmacol* 15, 283-290.
- Dwyer, D. M., Killcross, S., 2006. Lesions of the basolateral amygdala disrupt conditioning based on the retrieved representations of motivationally significant events. *J Neurosci* 26, 8305-8309.
- Espejo, E. F., 1997. Effects of weekly or daily exposure to the elevated plus-maze in male mice. *Behav Brain Res* 87, 233-238.
- Fanselow, M. S., 1991. The midbrain periaqueductal gray as a coordinator of action in response to fear and anxiety. In: Depaulis, A., Bandler, R., (Eds), *The Midbrain Periaqueductal Grey Matter: Functional, Anatomical and Immunohistochemical Organization*. Plenum, New York, pp. 151-173.
- Fernandes, C., File, S. E., 1996. The influence of open arm ledges and maze experience in the elevated plus-maze. *Pharmacol Biochem Behav* 54, 31-40.
- File, S. E., 1990. One-trial tolerance to the anxiolytic effects of chlordiazepoxide in the plus-maze. *Psychopharmacology (Berl)* 100, 281-282.
- File, S. E., 1993. The interplay of learning and anxiety in the elevated plus-maze. *Behav Brain Res* 58, 199-202.
- File, S. E., 2001. Factors controlling measures of anxiety and responses to novelty in the mouse. *Behav Brain Res* 125, 151-157.
- File, S. E., Gonzalez, L. E., Gallant, R., 1998. Role of the basolateral nucleus of the amygdala in the formation of a phobia. *Neuropsychopharmacology* 19, 397-405.

- File, S. E., Gonzalez, L. E., Gallant, R., 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, 312-320.
- File, S. E., Kenny, P. J., Cheeta, S., 2000. The role of the dorsal hippocampal serotonergic and cholinergic systems in the modulation of anxiety. *Pharmacol Biochem Behav* 66, 65-72.
- File, S. E., Mabbutt, P. S., Hitchcott, P. K., 1990. Characterisation of the phenomenon of "one-trial tolerance" to the anxiolytic effect of chlordiazepoxide in the elevated plus-maze. *Psychopharmacology (Berl)* 102, 98-101.
- File, S. E., Zangrossi, H., 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, 240-244.
- File, S. E., Zangrossi, H., Jr., Sanders, F. L., Mabbutt, P. S., 1994. Raised corticosterone in the rat after exposure to the elevated plus-maze. *Psychopharmacology (Berl)* 113, 543-546.
- File, S. E., Zangrossi, H., Jr., Viana, M., Graeff, F. G., 1993. Trial 2 in the elevated plus-maze: a different form of fear? *Psychopharmacology (Berl)* 111, 491-494.
- Flugge, G., Van Kampen, M., Mijster, M. J., 2004. Perturbations in brain monoamine systems during stress. *Cell Tissue Res* 315, 1-14.
- Franklin, K., Paxinos, G., 1997. *The Mouse Brain in Stereotaxic Coordinates*, San Diego.
- Frussa-Filho, R., Ribeiro Rde, A., 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, 519-525.
- Garakani, A., Mathew, S. J., Charney, D. S., 2006. Neurobiology of anxiety disorders and implications for treatment. *Mt Sinai J Med* 73, 941-949.
- Gaskin, S., White, N. M., 2006. Cooperation and competition between the dorsal hippocampus and lateral amygdala in spatial discrimination learning. *Hippocampus* 16, 577-585.
- Gonzalez, L. E., Andrews, N., File, S. E., 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, 145-153.
- Gonzalez, L. E., File, S. E., 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, 1505-1511.
- Govindarajan, A., Rao, B. S., Nair, D., Trinh, M., Mawjee, N., Tonegawa, S., Chattarji, S., 2006. Transgenic brain-derived neurotrophic factor expression causes both anxiogenic and antidepressant effects. *Proc Natl Acad Sci U S A* 103, 13208-13213.
- Graeff, F. G., 1981. Minor tranquilizers and brain defense systems. *Braz J Med Biol Res* 14, 239-265.
- Graeff, F. G., 2004. Serotonin, the periaqueductal gray and panic. *Neurosci Biobehav Rev* 28, 239-259.
- Graeff, F. G., Silveira, M. C., Nogueira, R. L., Audi, E. A., Oliveira, R. M., 1993. Role of the amygdala and periaqueductal gray in anxiety and panic. *Behav Brain Res* 58, 123-131.
- Gray, T. S., Carney, M. E., Magnuson, D. J., 1989. Direct projections from the central amygdaloid nucleus to the hypothalamic paraventricular nucleus: possible role in stress-induced adrenocorticotropin release. *Neuroendocrinology* 50, 433-446.
- Griebel, G., Belzung, C., Perrault, G., Sanger, D. J., 2000. Differences in anxiety-related behaviours and in sensitivity to diazepam in inbred and outbred strains of mice. *Psychopharmacology (Berl)* 148, 164-170.
- Griebel, G., Simiand, J., Steinberg, R., Jung, M., Gully, D., Roger, P., Geslin, M., Scatton, B., Maffrand, J. P., Soubrie, P., 2002. 4-(2-Chloro-4-methoxy-5-methylphenyl)-N-[(1S)-2-cyclopropyl-1-(3-fluoro-4-methylphenyl)ethyl]-5-methyl-N-(2-propynyl)-1, 3-thiazol-2-amine hydrochloride (SSR125543A), a potent and selective corticotrophin-releasing factor(1) receptor antagonist. II. Characterization in rodent models of stress-related disorders. *J Pharmacol Exp Ther* 301, 333-345.

- Gutierrez, A., Khan, Z. U., Morris, S. J., De Blas, A. L., 1994. Age-related decrease of GABAA receptor subunits and glutamic acid decarboxylase in the rat inferior colliculus. *J Neurosci* 14, 7469-7477.
- Hall, C. S., 1934. Emotional behavior in the rat: I. Defecation and urination as measures of individual differences in emotionality. *J. Comp. Psychol.* 18, 385-403.
- Handley, S. L., Mithani, S., 1984. Effects of alpha-adrenoceptor agonists and antagonists in a maze-exploration model of 'fear'-motivated behaviour. *Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol* 327, 1-5.
- Hascoet, M., Bourin, M., 1998. A new approach to the light/dark test procedure in mice. *Pharmacol Biochem Behav* 60, 645-653.
- Hascoet, 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.
- Hascoet, M., Bourin, M., Couetoux du Tertre, A., 1997. Influence of prior experience on mice behavior using the four-plate test. *Pharmacol Biochem Behav* 58, 1131-1138.
- Hascoet, M., Colombel, M. C., Bourin, M., 1999. Influence of age on behavioural response in the light/dark paradigm. *Physiol Behav* 66, 567-570.
- Hasunuma, K., Terano, T., Tamura, Y., Yoshida, S., 1991. Formation of epoxyeicosatrienoic acids from arachidonic acid by cultured rat aortic smooth muscle cell microsomes. *Prostaglandins Leukot Essent Fatty Acids* 42, 171-175.
- Hebb, A. L., Zacharko, R. M., Dominguez, H., Trudel, F., Laforest, S., Drolet, G., 2002. Odor-induced variation in anxiety-like behavior in mice is associated with discrete and differential effects on mesocorticolimbic cholecystokinin mRNA expression. *Neuropsychopharmacology* 27, 744-755.
- Heinsbroek, R. P., van Haaren, F., Feenstra, M. G., Boon, P., van de Poll, N. E., 1991. Controllable and uncontrollable footshock and monoaminergic activity in the frontal cortex of male and female rats. *Brain Res* 551, 247-255.
- Heldt, S. A., Ressler, K. J., 2006. Localized injections of midazolam into the amygdala and hippocampus induce differential changes in anxiolytic-like motor activity in mice. *Behav Pharmacol* 17, 349-356.
- Herman, J. P., Guillonneau, D., Dantzer, R., Scatton, B., Semerdjian-Rouquier, L., Le Moal, M., 1982. Differential effects of inescapable footshocks and of stimuli previously paired with inescapable footshocks on dopamine turnover in cortical and limbic areas of the rat. *Life Sci* 30, 2207-2214.
- Hogg, S., 1996. A review of the validity and variability of the elevated plus-maze as an animal model of anxiety. *Pharmacol Biochem Behav* 54, 21-30.
- Holmes, A., 2001. Targeted gene mutation approaches to the study of anxiety-like behavior in mice. *Neurosci Biobehav Rev* 25, 261-273.
- Holmes, A., Iles, J. P., Mayell, S. J., Rodgers, R. J., 2001. Prior test experience compromises the anxiolytic efficacy of chlordiazepoxide in the mouse light/dark exploration test. *Behav Brain Res* 122, 159-167.
- Holmes, A., Parmigiani, S., Ferrari, P. F., Palanza, P., Rodgers, R. J., 2000. Behavioral profile of wild mice in the elevated plus-maze test for anxiety. *Physiol Behav* 71, 509-516.
- Holmes, A., Rodgers, R. J., 1998. Responses of Swiss-Webster mice to repeated plus-maze experience: further evidence for a qualitative shift in emotional state? *Pharmacol Biochem Behav* 60, 473-488.
- Holmes, A., Rodgers, R. J., 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, 971-980.
- Holmes, A., Rodgers, R. J., 2003. Prior exposure to the elevated plus-maze sensitizes mice to the acute behavioral effects of fluoxetine and phenelzine. *Eur J Pharmacol* 459, 221-230.

- Inglis, F. M., Moghaddam, B., 1999. Dopaminergic innervation of the amygdala is highly responsive to stress. *J Neurochem* 72, 1088-1094.
- Iversen, L. L., Glowinski, J., 1966. Regional differences in the rate of turnover of norepinephrine in the rat brain. *Nature* 210, 1006-1008.
- Jones, G. H., Schneider, C., Schneider, H. H., Seidler, J., Cole, B. J., Stephens, D. N., 1994. Comparison of several benzodiazepine receptor ligands in two models of anxiolytic activity in the mouse: an analysis based on fractional receptor occupancies. *Psychopharmacology (Berl)* 114, 191-199.
- Jones, N., King, S. M., 2001. Influence of circadian phase and test illumination on pre-clinical models of anxiety. *Physiol Behav* 72, 99-106.
- Kang-Park, M. H., Wilson, W. A., Moore, S. D., 2004. Differential actions of diazepam and zolpidem in basolateral and central amygdala nuclei. *Neuropharmacology* 46, 1-9.
- Klodzinska, A., Chojnacka-Wojcik, E., Palucha, A., Branski, P., Popik, P., Pilc, A., 1999. Potential anti-anxiety, anti-addictive effects of LY 354740, a selective group II glutamate metabotropic receptors agonist in animal models. *Neuropharmacology* 38, 1831-1839.
- Klodzinska, A., Tatarczynska, E., Chojnacka-Wojcik, E., Nowak, G., Cosford, N. D., Pilc, A., 2004. Anxiolytic-like effects of MTEP, a potent and selective mGlu5 receptor agonist does not involve GABA(A) signaling. *Neuropharmacology* 47, 342-350.
- Lamprea, M. R., Cardenas, F. P., Silveira, R., Morato, S., Walsh, T. J., 2000. Dissociation of memory and anxiety in a repeated elevated plus maze paradigm: forebrain cholinergic mechanisms. *Behav Brain Res* 117, 97-105.
- Lapin, I. P., 1999. [A decreased frequency of peeking out from the dark compartment--the only constant index of the effect of anxiogens on the behavior of mice in a "light-darkness" chamber]. *Zh Vyssh Nerv Deiat Im I P Pavlova* 49, 521-526.
- LeDoux, J. E., 1996. *The Emotional Brain*, New-York.
- LeDoux, J. E., 2000. Emotion circuits in the brain. *Annu Rev Neurosci* 23, 155-184.
- Lee, C., Rodgers, R. J., 1990. Antinociceptive effects of elevated plus-maze exposure: influence of opiate receptor manipulations. *Psychopharmacology (Berl)* 102, 507-513.
- Levita, L., Dalley, J. W., Robbins, T. W., 2002. Disruption of Pavlovian contextual conditioning by excitotoxic lesions of the nucleus accumbens core. *Behav Neurosci* 116, 539-552.
- Lister, R. G., 1987. The use of a plus-maze to measure anxiety in the mouse. *Psychopharmacology (Berl)* 92, 180-185.
- Lister, R. G., 1990. Ethologically-based animal models of anxiety disorders. *Pharmacol Ther* 46, 321-340.
- Lowry, C. A., Johnson, P. L., Hay-Schmidt, A., Mikkelsen, J., Shekhar, A., 2005. Modulation of anxiety circuits by serotonergic systems. *Stress* 8, 233-246.
- Maren, S., Fanselow, M. S., 1995. Synaptic plasticity in the basolateral amygdala induced by hippocampal formation stimulation in vivo. *J Neurosci* 15, 7548-7564.
- Martinez, R. C., Ribeiro de Oliveira, A., Brandao, M. L., 2007. Serotonergic mechanisms in the basolateral amygdala differentially regulate the conditioned and unconditioned fear organized in the periaqueductal gray. *Eur Neuropsychopharmacol*.
- Masse, F., Hascoet, M., Bourin, M., 2005. α 2-Adrenergic agonists antagonise the anxiolytic-like effect of antidepressants in the four-plate test in mice. *Behav Brain Res* 164, 17-28.
- Masse, F., Hascoet, M., Bourin, M., 2007a. Effect of GABAergic ligands on the anxiolytic-like activity of DOI (a 5-HT(2A/2C) agonist) in the four-plate test in mice. *Eur Neuropsychopharmacol* 17, 483-491.
- Masse, F., Hascoet, M., Dailly, E., Bourin, M., 2006. Effect of noradrenergic system on the anxiolytic-like effect of DOI (5-HT2A/2C agonists) in the four-plate test. *Psychopharmacology (Berl)* 183, 471-481.
- Masse, F., Nic Dhonnchadha, B. A., Hascoet, M., Bourin, M., 2007b. Anxiolytic-like effect of 5-HT(2) ligands and benzodiazepines co-administration: comparison of two animal models of anxiety (the four-plate test and the elevated plus maze). *Behav Brain Res* 177, 214-226.

- McCall, R. B., Aghajanian, G. K., 1979. Serotonergic facilitation of facial motoneuron excitation. *Brain Res* 169, 11-27.
- McDonald, R. J., White, N. M., 1993. A triple dissociation of memory systems: hippocampus, amygdala, and dorsal striatum. *Behav Neurosci* 107, 3-22.
- McDonald, R. J., White, N. M., 1995. Information acquired by the hippocampus interferes with acquisition of the amygdala-based conditioned-cue preference in the rat. *Hippocampus* 5, 189-197.
- McHugh, T. J., Tonegawa, S., 2007. Spatial exploration is required for the formation of contextual fear memory. *Behav Neurosci* 121, 335-339.
- McQuade, R., Creton, D., Stanford, S. C., 1999. Effect of novel environmental stimuli on rat behaviour and central noradrenaline function measured by in vivo microdialysis. *Psychopharmacology (Berl)* 145, 393-400.
- Mehta, A. K., Ticku, M. K., 1999. An update on GABAA receptors. *Brain Res Brain Res Rev* 29, 196-217.
- Millan, M. J., 2003. The neurobiology and control of anxious states. *Prog Neurobiol* 70, 83-244.
- Misslin, R., 2003. The defense system of fear: behavior and neurocircuitry. *Neurophysiol Clin* 33, 55-66.
- Mitra, R., Jadhav, S., McEwen, B. S., Vyas, A., Chattarji, S., 2005. Stress duration modulates the spatiotemporal patterns of spine formation in the basolateral amygdala. *Proc Natl Acad Sci U S A* 102, 9371-9376.
- Moreira, C. M., Masson, S., Carvalho, M. C., Brandao, M. L., 2007. Exploratory behaviour of rats in the elevated plus-maze is differentially sensitive to inactivation of the basolateral and central amygdaloid nuclei. *Brain Res Bull* 71, 466-474.
- Moser, M. B., Moser, E. I., 1998. Functional differentiation in the hippocampus. *Hippocampus* 8, 608-619.
- Moser, P. C., 1989. An evaluation of the elevated plus-maze test using the novel anxiolytic buspirone. *Psychopharmacology (Berl)* 99, 48-53.
- Nakazawa, K., McHugh, T. J., Wilson, M. A., Tonegawa, S., 2004. NMDA receptors, place cells and hippocampal spatial memory. *Nat Rev Neurosci* 5, 361-372.
- Nashold, B. S., Jr., Wilson, W. P., Slaughter, D. G., 1969. Sensations evoked by stimulation in the midbrain of man. *J Neurosurg* 30, 14-24.
- Nemeroff, C. B., 2003. The role of GABA in the pathophysiology and treatment of anxiety disorders. *Psychopharmacol Bull* 37, 133-146.
- Nic Dhonnchadha, B. A., Bourin, M., Hascoet, M., 2003a. Anxiolytic-like effects of 5-HT₂ ligands on three mouse models of anxiety. *Behav. Brain. Res.* 140, 203-214.
- Nic Dhonnchadha, B. A., Hascoet, M., Jolliet, P., Bourin, M., 2003b. Evidence for a 5-HT_{2A} receptor mode of action in the anxiolytic-like properties of DOI in mice. *Behav. Brain. Res.* 147, 175-184.
- Ohl, F., 2005. Animal models of anxiety. *Handb Exp Pharmacol*, 35-69.
- Ohman, A., 1992. Fear and anxiety as emotional phenomena: Clinical, Phenomenological, evolutionary perspectives, and information-processing mechanisms. In: Lewis, M., Haviland, J. M., (Eds), *Handbook of the Emotions*. Guilford, New-York, pp. 511-536.
- Paxinos, G., Watson, C., 1998. *The Rat Brain in Stereotaxic Coordinates*.
- Pellow, S., Chopin, P., File, S. E., Briley, M., 1985. Validation of open:closed arm entries in an elevated plus-maze as a measure of anxiety in the rat. *J Neurosci Methods* 14, 149-167.
- Pereira, J. K., Vieira, R. J., Konishi, C. T., Ribeiro, R. A., Frussa-Filho, R., 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, PL101-107.
- Petit-Demouliere, B., Bourin, M., 2007. Temporal parameters of one-trial tolerance to benzodiazepines in four-plate test-retest. *Behav Brain Res*.
- Petit-Demouliere, B., Chenu, F., Bourin, M., 2005. Forced swimming test in mice: a review of antidepressant activity. *Psychopharmacology (Berl)* 177, 245-255.

- Petit-Demouliere, B., Hascoet, M., Bourin, M., 2007. Factors triggering abolishment of benzodiazepines effects in the four-plate test-retest in mice. *Eur Neuropsychopharmacol*.
- Prut, L., Belzung, C., 2003. The open field as a paradigm to measure the effects of drugs on anxiety-like behaviors: a review. *Eur J Pharmacol* 463, 3-33.
- Rex, A., Voigt, J. P., Fink, H., 2005. Anxiety but not arousal increases 5-hydroxytryptamine release in the rat ventral hippocampus in vivo. *Eur. J. Neurosci*. 22, 1185-1189.
- Ripoll, N., Hascoet, M., Bourin, M., 2006a. The four-plates test: anxiolytic or analgesic paradigm? *Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry* 30, 873-880.
- Ripoll, N., Hascoet, M., Bourin, M., 2006b. Implication of 5-HT_{2A} subtype receptors in DOI activity in the four-plates test-retest paradigm in mice. *Behav Brain Res* 166, 131-139.
- Ripoll, N., Nic Dhonnchadha, B. A., Sebille, V., Bourin, M., Hascoet, M., 2005. The four-plates test-retest paradigm to discriminate anxiolytic effects. *Psychopharmacology (Berl)* 180, 73-83.
- Rodgers, R. J., Johnson, N. J., 1995. Factor analysis of spatiotemporal and ethological measures in the murine elevated plus-maze test of anxiety. *Pharmacol Biochem Behav* 52, 297-303.
- Rodgers, R. J., Johnson, N. J., Carr, J., Hodgson, T. P., 1997. Resistance of experientially-induced changes in murine plus-maze behaviour to altered retest conditions. *Behavioural Brain Research* 86, 71-77.
- Rodgers, R. J., Johnson, N. J., Cole, J. C., Dewar, C. V., Kidd, G. R., Kimpson, P. H., 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, 41-50.
- Rodgers, R. J., Lee, C., Shepherd, J. K., 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, 102-110.
- Rodgers, R. J., Shepherd, J. K., 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, 237-242.
- Russo, A. S., Guimaraes, F. S., De Aguiar, J. C., Graeff, F. G., 1993. Role of benzodiazepine receptors located in the dorsal periaqueductal grey of rats in anxiety. *Psychopharmacology (Berl)* 110, 198-202.
- Saldivar-Gonzalez, J. A., Posadas-Andrews, A., Rodriguez, R., Gomez, C., Hernandez-Manjarrez, M. E., Ortiz-Leon, S., Martinez-Pineda, A., Gomez-Laguna, D., Salgado, V., Manjarrez, J., Alvarado, R., 2003. Effect of electrical stimulation of the baso-lateral amygdala nucleus on defensive burying shock probe test and elevated plus maze in rats. *Life Sci* 72, 819-829.
- Sanders, S. K., Shekhar, A., 1995. Regulation of anxiety by GABA_A receptors in the rat amygdala. *Pharmacol Biochem Behav* 52, 701-706.
- Sandford, J. J., Argyropoulos, S. V., Nutt, D. J., 2000. The psychobiology of anxiolytic drugs. Part 1: Basic neurobiology. *Pharmacol Ther* 88, 197-212.
- Schwaber, J. S., Kapp, B. S., Higgins, G. A., Rapp, P. R., 1982. Amygdaloid and basal forebrain direct connections with the nucleus of the solitary tract and the dorsal motor nucleus. *J Neurosci* 2, 1424-1438.
- Serradeil-Le Gal, C., Wagnon, J., Simiand, J., Griebel, G., Lacour, C., Guillon, G., Barberis, C., Brossard, G., Soubrie, P., Nisato, D., Pascal, M., Pruss, R., Scatton, B., Maffrand, J. P., Le Fur, G., 2002. Characterization of (2S,4R)-1-[5-chloro-1-[(2,4-dimethoxyphenyl)sulfonyl]-3-(2-methoxyphenyl)-2-oxo-2,3-dihydro-1H-indol-3-yl]-4-hydroxy-N,N-dimethyl-2-pyrrolidine carboxamide (SSR149415), a selective and orally active vasopressin V1b receptor antagonist. *J Pharmacol Exp Ther* 300, 1122-1130.
- Shekhar, A., McCann, U. D., Meaney, M. J., Blanchard, D. C., Davis, M., Frey, K. A., Liberzon, I., Overall, K. L., Shear, M. K., Tecott, L. H., Winsky, L., 2001. Summary of a National Institute of Mental Health workshop: developing animal models of anxiety disorders. *Psychopharmacology (Berl)* 157, 327-339.

- Shepherd, J. K., Grewal, S. S., Fletcher, A., Bill, D. J., Dourish, C. T., 1994. Behavioural and pharmacological characterisation of the elevated "zero-maze" as an animal model of anxiety. *Psychopharmacology (Berl)* 116, 56-64.
- Silveira, M. C., Sandner, G., Graeff, F. G., 1993. Induction of Fos immunoreactivity in the brain by exposure to the elevated plus-maze. *Behav Brain Res* 56, 115-118.
- Slotnick, B. M., Jarvik, M. E., 1966. Deficits in passive avoidance and fear conditioning in mice with septal lesions. *Science* 154, 1207-1208.
- Takeuchi, Y., Matsushima, S., Matsushima, R., Hopkins, D. A., 1983. Direct amygdaloid projections to the dorsal motor nucleus of the vagus nerve: a light and electron microscopic study in the rat. *Brain Res* 280, 143-147.
- Takeuchi, Y., McLean, J. H., Hopkins, D. A., 1982. Reciprocal connections between the amygdala and parabrachial nuclei: ultrastructural demonstration by degeneration and axonal transport of horseradish peroxidase in the cat. *Brain Res* 239, 583-588.
- Tatarczynska, E., Klodzinska, A., Chojnacka-Wojcik, E., Palucha, A., Gasparini, F., Kuhn, R., Pilc, A., 2001. Potential anxiolytic- and antidepressant-like effects of MPEP, a potent, selective and systemically active mGlu5 receptor antagonist. *Br J Pharmacol* 132, 1423-1430.
- Thomas, S. R., Lewis, M. E., Iversen, S. D., 1985. Correlation of [3H]diazepam binding density with anxiolytic locus in the amygdaloid complex of the rat. *Brain Res* 342, 85-90.
- Vargas, K. M., Da Cunha, C., Andreatini, R., 2006. Amphetamine and pentylene-tetrazole given post-trial 1 enhance one-trial tolerance to the anxiolytic effect of diazepam in the elevated plus-maze in mice. *Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry* 30, 1394-1402.
- Veening, J. G., Swanson, L. W., Sawchenko, P. E., 1984. The organization of projections from the central nucleus of the amygdala to brainstem sites involved in central autonomic regulation: a combined retrograde transport-immunohistochemical study. *Brain Res* 303, 337-357.
- Vogel, J. R., Beer, B., Clody, D. E., 1971. A simple and reliable conflict procedure for testing anti-anxiety agents. *Psychopharmacologia* 21, 1-7.
- Waddell, J., Morris, R. W., Bouton, M. E., 2006. Effects of bed nucleus of the stria terminalis lesions on conditioned anxiety: aversive conditioning with long-duration conditional stimuli and reinstatement of extinguished fear. *Behav Neurosci* 120, 324-336.
- Wahlsten, D., Metten, P., Phillips, T. J., Boehm, S. L., 2nd, Burkhart-Kasch, S., Dorow, J., Doerksen, S., Downing, C., Fogarty, J., Rodd-Henricks, K., Hen, R., McKinnon, C. S., Merrill, C. M., Nolte, C., Schalomon, M., Schlumbohm, J. P., Sibert, J. R., Wenger, C. D., Dudek, B. C., Crabbe, J. C., 2003. Different data from different labs: lessons from studies of gene-environment interaction. *J Neurobiol* 54, 283-311.
- Walker, D. L., Toufexis, D. J., Davis, M., 2003. Role of the bed nucleus of the stria terminalis versus the amygdala in fear, stress, and anxiety. *Eur J Pharmacol* 463, 199-216.
- Wall, P. M., Messier, C., 2001. Methodological and conceptual issues in the use of the elevated plus-maze as a psychological measurement instrument of animal anxiety-like behavior. *Neurosci Biobehav Rev* 25, 275-286.
- Ward, B. O., Stephens, D. N., 1998. Sensitisation of withdrawal signs following repeated withdrawal from a benzodiazepine: differences between measures of anxiety and seizure sensitivity. *Psychopharmacology (Berl)* 135, 342-352.
- Wesolowska, A., Paluchowska, M. H., Golembiowska, K., Chojnacka-Wojcik, E., 2003. Pharmacological characterization of MP349, a novel 5-HT_{1A}-receptor antagonist with anxiolytic-like activity, in mice and rats. *J Pharm Pharmacol* 55, 533-543.
- Whimbey, A. E., Denenberg, V. H., 1967. Two independent behavioral dimensions in open-field performance. *J Comp Physiol Psychol* 63, 500-504.
- White, N. M., McDonald, R. J., 1993. Acquisition of a spatial conditioned place preference is impaired by amygdala lesions and improved by fornix lesions. *Behav Brain Res* 55, 269-281.
- White, S. R., Neuman, R. S., 1980. Facilitation of spinal motoneurone excitability by 5-hydroxytryptamine and noradrenaline. *Brain Res* 188, 119-127.

Zangrossi Junior, H., Graeff, F. G., 1994. Behavioral effects of intra-amygdala injections of GABA and 5-HT acting drugs in the elevated plus-maze. *Braz J Med Biol Res* 27, 2453-2456.

RESUME :

Ce travail visait à déterminer les facteurs et les structures cérébrales impliqués dans les modifications de réponse comportementale lors d'une réexposition au test des quatre plaques (FPT) chez la Souris. Ainsi, nous observons une mémoire aversive chez la souris expérimentée n'ayant pas reçu de traitement, et une « one-trial tolerance » (OTT), qui est la perte de l'effet de type anxiolytique d'une molécule lors du retest. Nous avons travaillé avec le diazépam, une benzodiazépine qui exerce un effet de type anxiolytique dans le FPT chez la souris naïve, mais le perd lors du retest ; et le DOI, un agoniste des récepteurs 5-HT_{2A/2C}, qui a un effet de type anxiolytique en test et en retest du FPT. La seule connaissance de l'environnement est responsable de l'OTT lors du retest, alors que la mémoire aversive est liée aussi aux punitions. Une exposition de 30 secondes durant le prétest est suffisante pour déclencher ces processus. De plus, la mémoire aversive est observable immédiatement après le FPT. L'étude des structures cérébrales impliquées, par injections localisées, révèle que le DOI semble agir sur l'hippocampe, alors que le diazépam est actif dans le noyau latéral de l'amygdale en test et dans la substance grise périaqueducule en retest du FPT. Le rôle de l'hippocampe dans la mémoire aversive a été confirmé par une inactivation réversible de lidocaïne, un anesthésique local. Enfin, une étude neurochimique a révélé l'implication des systèmes sérotoninergique dans l'hippocampe et le cortex, et dopaminergique dans l'hypothalamus, au cours du test-retest dans le FPT. Ces résultats suggèrent que mémoire aversive et OTT sont liés à des mécanismes et structures différents.

Mots clés : test des quatre plaques, mémoire aversive, diazépam, one-trial tolerance

Title : Characterization of spatial-temporal factors and the cerebral structures implied in the tolerance to benzodiazepines and the aversive memory, observed during the four plate test-retest in mice

Abstract :

This thesis aimed at discovering factors and cerebral structures implicated in the modification of the behaviour of mice, during re-exposure to a four-plate test. Aversive memory and one-trial tolerance (OTT) are observed during this retest. Aversive memory consists in a diminution of the number of accepted punished passages. « One-trial tolerance » is the abolishment of the anxiolytic-like effect of a drug in experimented mice. Diazepam, a usual benzodiazepine affected by OTT, is used in parallel with DOI, a 5-HT_{2A/2C} agonist that keeps its anxiolytic-like activity during retest, in order to study this phenomenon. In the first study, spatial knowledge of the apparatus was found to be responsible of the OTT during retest. The aversive memory was linked also to punishments. The second study showed that 30 seconds of pretest were sufficient to observe OTT and aversive memory during retest. Moreover, aversive memory is effective immediately after the pretest. In the next study, local injections of DOI and of diazepam revealed that hippocampus was activated by DOI. Diazepam was active when injected into lateral nuclei of amygdala in naive mice, and into periaqueductal gray matter in experimented mice. A neuro-chemical study with HPLC revealed that serotonergic system was affected by the pretest in hippocampus and cortex. Dopaminergic system was modified in hypothalamus of experimented mice. To sum up, these results suggest that aversive memory and OTT seem triggered via different mechanisms, supported by different structures.

Keywords : four-plate test, aversive memory, diazepam, one-trial tolerance