



## AVERTISSEMENT

Ce document est le fruit d'un long travail approuvé par le jury de soutenance et mis à disposition de l'ensemble de la communauté universitaire élargie.

Il est soumis à la propriété intellectuelle de l'auteur. Ceci implique une obligation de citation et de référencement lors de l'utilisation de ce document.

D'autre part, toute contrefaçon, plagiat, reproduction illicite encourt une poursuite pénale.

Contact : [ddoc-theses-contact@univ-lorraine.fr](mailto:ddoc-theses-contact@univ-lorraine.fr)

## LIENS

Code de la Propriété Intellectuelle. articles L 122. 4

Code de la Propriété Intellectuelle. articles L 335.2- L 335.10

[http://www.cfcopies.com/V2/leg/leg\\_droi.php](http://www.cfcopies.com/V2/leg/leg_droi.php)

<http://www.culture.gouv.fr/culture/infos-pratiques/droits/protection.htm>

THESE

présentée à

L'UNIVERSITE DE NANCY I

pour l'obtention du titre de

DOCTEUR DE L'UNIVERSITE DE NANCY I

par

Madeleine GINEFRI-GAYET

---

Sujet :

ETUDE DE L'HYPOTHERMIE INDUITE  
PAR LA METHIONINE SULFOXIMINE CHEZ LE RAT :  
INTERVENTION DES SYSTEMES SEROTONINERGIQUES.

---

Soutenue publiquement le 13 novembre 1991 devant la commission d'examen

Membres du jury

Président : J.L. DAVRAINVILLE  
Examineurs : B. KRAFFT  
A. NEHLIG  
T. HEVOR

UNIVERSITE DE NANCY I

---

GROUPE DE FORMATION DOCTORALE "BIOLOGIE-MEDICAMENT"

Président : G.SIEST, Professeur de Biochimie Pharmacologique  
( URA CNRS 597 - Centre du Médicament - U.F.R.PHARMACIE - NANCY)

Membres du Bureau

Collège I : (Professeurs)

J.ATKINSON, Professeur de Pharmacologie cardiovasculaire  
Pharmacologie cardiovasculaire - U.F.R.PHARMACIE - NANCY

A.M.BATT, Professeur de Toxicologie  
URA CNRS 597 - U.F.R.PHARMACIE - NANCY

J.C.BLOCK, Professeur Santé Environnement  
Santé et Environnement - U.F.R.PHARMACIE - NANCY

J.C.JARDILLIER, Professeur de Biochimie  
GIBSA - U.F.R. PHARMACIE - REIMS

B.KRAFFT, Professeur de Biologie du Comportement  
URA CNRS 1293 - U.F.R. STB - VANDOEUVRE

V.LOPPINET, Professeur de Chimie Thérapeutique  
Chimie Thérapeutique - U.F.R. PHARMACIE - NANCY

P.NETTER, Professeur de Pharmacologie  
URA CNRS 1288 - U.F.R. MEDECINE - VANDOEUVRE

A.NICOLAS, Professeur de Chimie Analytique  
URA CNRS 597 - U.F.R.PHARMACIE - NANCY

L.SCHARTZBROD, Professeur de virologie -Immunologie  
Dépt.Microbiologie - U.F.R.PHARMACIE - NANCY

P.VERT, Professeur de Pédiatrie  
INSERM U272 - U.F.R. MEDECINE - NANCY

Collège II : (Maître de conférences)

J.MOUNIE, Docteur  
Formation Biochimie Pharmacologie - U.F.R. PHARMACIE - DIJON

D.DESOR, Docteur  
URA CNRS 1293 - U.F.R. STB - VANDOEUVRE

J.P. KANTELIP, Docteur  
Pharmacologie - U.F.R. MEDECINE - BESANCON

b-	Injection intrapéritonéale de MSO chez des rats de race Wistar AF (IFFA-CREDO).....	23
c-	Injection intrapéritonéale de MSO chez des rats de race Wistar AF (CERJ).....	23
3-	Mesure de la température cutanée.....	28
4-	Mesure de la température rectale du rat après une injection intracérébroventriculaire ou une infusion intracérébrale de MSO.....	28
a-	Injection dans le ventricule latéral.....	30
b-	Injection dans le III <sup>e</sup> ventricule.....	30
c-	Infusion intracérébrale de MSO.....	30
5-	Mesure de la température rectale du rat après une injection intrapéritonéale de MSO associée à la L-méthionine.....	33
6-	Mesure de la température rectale du rat aux températures ambiantes de +36°C et de +11°C..	36
	CONCLUSION.....	38

ETUDE DU ROLE JOUE PAR LA SEROTONINE DANS LE MECANISME D'INDUCTION DE L'HYPOTHERMIE PAR LA MSO

1-	Introduction.....	42
2-	Administration de molécules.....	49
3-	Résultats expérimentaux.....	49
a-	Déplétion en sérotonine.....	50
b-	Charge en 5-HTP .....	50
c-	Intervention éventuelle des récepteurs 5-HT.....	53
4-	Conclusion.....	61

ROLE DU NOYAU DORSAL DU RAPHE

1- Introduction.....	68
2- Résultats expérimentaux.....	68
-Infusion dans le NDR.....	68
-Etude du rôle de la sérotonine.....	73
3- Conclusion.....	73

INTERACTION EVENTUELLE ENTRE LES SYSTEMES CATECHOLAMINERGIQUES ET  
SEROTONINERGIQUES DANS L'INDUCTION DE L'HYPOTHERMIE PAR LA MSO

1- Introduction.....	80
2- Administration de molécules.....	80
3- Résultats expérimentaux.....	81
a- Injection intrapéritonéale de MSO.....	81
b- Injection de MSO dans le III <sup>e</sup> ventricule..	83
4- Conclusion.....	86

INTERVENTION DES SYSTEMES GABAERGIQUES DANS L'INDUCTION DE L'HYPOTH-  
THERMIE PAR LA MSO

1- Introduction.....	90
2- Administration de molécules.....	91
3- Résultats expérimentaux.....	91
a- Injection de MSO dans le ventricule laté- ral.....	91
b- Injection de MSO dans le III <sup>e</sup> ventricule..	91
c- Infusion de MSO dans le noyau dorsal du raphé.....	92
4- Conclusion.....	97

DISCUSSION..... 99

RESUME

1- Introduction..... 109

2- Etude de l'hypothermie induite par la  
MSO..... 110

3- Rôle de la sérotonine..... 110

4- Rôle du noyau dorsal du raphé..... 111

5- Rôle des catécholamines..... 112

6- Rôle du GABA..... 112

7- Discussion..... 112

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

PUBLICATIONS

## ERRATA

- p. 72 - Légende de la Figure 25, lire :  $\star p < 0,01, \star\star p < 0,001$ .
- p. 74 - Légende de la Figure 26, lire :  $\star p < 0,01, \star\star p < 0,001$ .
- p. 81 - Paragraphe 3a, lignes 13 et 14, lire : maintient une hypothermie de  $-2,0^{\circ}\text{C}$  (dose de  $1\text{mg/kg}$ ) ou égale (dose de  $2\text{mg/kg}$ ) à celle d'ue à la MSO seule.
- p. 83 - Paragraphe 3b, ligne 6, lire : par la MSO seule, sauf pour la yohimbine (figure 31).
- p. 91 - Paragraphe 3a, ligne 3, au lieu de 1h30, lire 2h30.
- p. 92 - Paragraphe 3, ligne 8, au lieu de 0h30, lire 1h30.
- p. 92 - Paragraphe 3, ligne 12, supprimer :  $p < 0,05$ , pour la période de 3h à 5h.

A la mémoire de ma mère

A Jacques

A Caroline

A Cécile

A Marie



Abréviations contenues dans le texte :

Aire hypothalamique antérieure : PO-HA  
Fenfluramine : FFA  
Acide  $\gamma$ -aminobutyrique : GABA  
 $\gamma$ -vinylGABA : GVG  
Glutamine synthétase : GS  
5-hydroxytryptamine : 5-HT  
5-hydroxytryptophane : 5-HTP  
Injection intracérébrale : I.i.c.  
Injection intracérébroventriculaire : I.i.v.  
Injection intrapéritonéale : I.i.p.  
Méthionine sulfoximine : MSO  
Noyau dorsal du raphé : NDR  
Parachloroamphétamine : PCA  
Parachlorophénylalanine : PCPA  
Système nerveux central : SNC  
Ventricule latéral : V.l.  
Troisième ventricule : III<sup>e</sup> v.

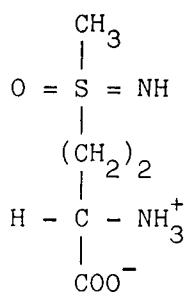
INTRODUCTION

L'injection systémique de L-méthionine-d,l-sulfoximine (MSO), chez le Rat, déclenche un syndrome d'ataxie suivi de convulsions toniques-cloniques (Wada, Ikeda, 1966).

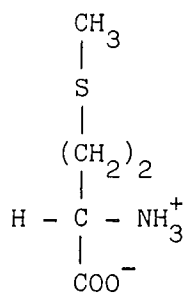
L'étude de cette molécule est d'un grand intérêt car elle permet une certaine approche expérimentale de l'épilepsie "grand mal", cette maladie comportant des convulsions toniques-cloniques dans ses manifestations cliniques intermittentes (Cambier et coll., 1983).

Il est donc intéressant d'étudier les modifications fonctionnelles induites par l'introduction de cette molécule dans l'organisme, pendant la phase d'ataxie qui précède les convulsions. En particulier, Wada et coll. 1967, ont observé, au cours de cette phase, un abaissement de la température rectale chez le Rat et le Chat soumis à l'action de ce convulsivant. Nous avons orienté notre travail de façon à définir les caractéristiques neurobiologiques de cette modification de la température rectale chez le Rat.

#### 1-La L-Méthionine-d,l-Sulfoximine



MSO



L-METHIONINE

Structures moléculaires de la MSO et de la L-Méthionine

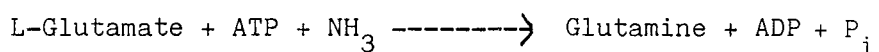
La MSO est une molécule dérivée de la L-Méthionine. Elle a été découverte pour la première fois dans la farine de Blé traitée au trichlorure d'azote ( $\text{NCl}_3$ ) (Bentley et coll., 1950; Campbell et coll., 1950).

Peu de temps après l'administration intrapéritonéale de MSO, celle-ci se localise principalement dans le foie, les reins, lentement elle pénètre la barrière hémato-encéphalique et entre dans le cerveau. Le prélèvement le plus élevé a lieu trois heures après l'administration de MSO (Ghittoni et coll., 1970).

Après une injection intrapéritonéale de (3H)-MSO (150mg/kg), 1% de la dose administrée pénètre dans le cerveau. La distribution régionale de (3H)-MSO révèle une pénétration plutôt uniforme dans le cerveau entier. Après l'administration intrathécale de MSO (79ug), une radioactivité maximum de 43% de la dose est trouvée dans le cervelet 2 heures après l'injection, alors que 49% de la dose s'accumule dans la portion extracorticale du cerveau 3 à 5 heures après l'injection. Si la MSO est associée à de la méthionine, la quantité de MSO atteignant le cerveau est plus faible. (Ghittoni et coll., 1970).

La glutamine synthétase (EC.6.3.1.2.) (GS) est une enzyme-clé dans la fixation de l'ammoniaque dans le cerveau. Elle est confinée aux astrocytes (Norenberg, 1979; Cooper, Plum, 1987). La concentration en glutamine synthétase varie suivant les régions du cerveau : la plus forte concentration se rencontre dans l'hippocampe et la plus faible dans le tronc cérébral (Norenberg, 1979).

La principale action biochimique de la MSO paraît être l'inhibition irréversible de la glutamine synthétase catalysant la réaction :



Quatre à 5 heures après une injection intrapéritonéale de MSO (170mg/kg), l'inhibition de l'enzyme, dans les astrocytes, est de l'ordre de 90% (Sellinger et coll., 1968). Cette inhibition entraîne une augmentation du taux d'ammoniaque de 300%, principalement dans les astrocytes. Celle-ci est détectable une heure après l'administration de MSO et persiste pendant au moins 24 heures. La concentration s'élève de 300 à 400%, à la fois dans le cervelet et les hémisphères cérébraux (Folbergrova et coll., 1969) bien avant le déclenchement des convulsions. Donc, la MSO inhibe la glutamine synthétase localisée dans les astrocytes et ainsi altère ces cellules.

Dans le cervelet, les cellules de Bergmann, sous-classe d'astrocytes, sont atteintes en premier, leur lésion se manifeste par une augmentation de leur taille (Lodin et coll., 1968). Ce sont donc les fonctions cérébelleuses qui sont d'abord perturbées (démarche ataxique, perte d'équilibre et des réflexes de redressement). On note également une augmentation du nombre des astrocytes du cerveau (42%) et leur transformation en astrocytes d'Alzheimer type II, spécialement dans le cortex cérébral. Le compartiment cytoplasmique est dilaté, ce gonflement est partiellement dû à une pénétration d'eau associée à une prolifération des organites cytoplasmiques notamment en ce qui concerne les mitochondries (Hertz et coll., 1987). L'amplification du changement en astrocyte d'Alzheimer type II semble impliquer plus directement l'ammoniaque dans l'évolution de la toxicité de la MSO (Gutierrez, Norenberg, 1977).

L'ammoniaque inhibe aussi l'activité de la glutaminase, l'enzyme permettant le clivage de la glutamine en glutamate et ammoniaque. Ainsi, la MSO peut perturber l'utilisation de la glutamine en tant que précurseur des neurotransmetteurs le glutamate, le GABA et l'aspartate (Raabe, Onstad, 1982).

Le glutamate disponible, par suite de l'inhibition de la glutamine synthétase, ne s'accumulerait pas (Phelps, 1975) mais pourrait être utilisé par la voie gluconéogénique pour la biosynthèse du glycogène (Hevor et coll., 1985; Swanson et coll., 1990). Les augmentations des concentrations en glucose et glycogène sont respectivement de 95% et de 62% avant les convulsions et de 130% pendant les convulsions (Folbergrova et coll., 1969; Berel et coll., 1977).

Vingt quatre à 48 h après l'administration de la MSO, l'accumulation du glycogène est encore importante dans les astrocytes du cortex cérébral et il y apparaît une activation associée à une biosynthèse de novo de l'enzyme gluconéogénique la fructose 1-6-diphosphatase (Hevor, Gayet, 1981). Dans les corps cellulaires des astrocytes et dans les processus subpiaux, péricapillaires et périneuronaux, le glycogène souvent remplit complètement le cytoplasme entourant les organites (Phelps, 1975).

L'administration intrapéritonéale de MSO au Rat entraîne une diminution significative de la concentration cérébrale en S-adénosyl-L-méthionine (AdoMet), la molécule donneur du groupe méthyle. Cette diminution ne ré-

sulte pas d'une réduction de la biosynthèse de l'AdoMet mais plutôt d'une augmentation générale de l'utilisation de l'AdoMet pendant la période pré-convulsive (Schatz et coll., 1977).

Cinq heures après l'administration d'une dose convulsivante de MSO (150mg/kg,i.p.) se produit une diminution des concentrations en sérotonine (30%) dans le tronc cérébral, le cerveau moyen, l'hippocampe et le cortex cérébral (Sellinger, Dietz, 1981). Cette diminution semble être reliée à une perturbation dans la synthèse de la 5-HT pouvant résulter de la réduction de la fourniture en L-tryptophane (Blizard, Balkoski, 1982). De même, la MSO diminue les concentrations en tyrosine, dopamine, norépinéphrine du cerveau (Samuels et coll., 1978).

Donc, l'injection intrapéritonéale de MSO entraîne une encéphalopathie lentement progressive caractérisée par un trouble de la motricité, de la stupeur et environ 7 à 8h plus tard, des convulsions. La principale atteinte morphologique est la transformation de l'astrocyte normal en astrocyte d'Alzheimer type II. La principale action biochimique est le blocage de l'enzyme glutamine synthétase qui entraîne une augmentation du taux d'ammoniaque extra et intracellulaire (Hindfelt, 1975) et par répercussion une accumulation de glycogène dans les astrocytes.

Le mécanisme par lequel l'ammoniaque exerce sa neurotoxicité reste controversé, quoique plusieurs théories aient été proposées: une dépression du métabolisme énergétique, des perturbations ioniques, la dépression de l'inhibition postsynaptique, l'ouverture de la barrière sang cerveau et la perturbation du métabolisme des neurotransmetteurs (cf.Yamamoto et coll. 1989).

## 2-La température interne

### a-Généralités

L'homéothermie n'est qu'une des nombreuses fonctions homéostatiques nécessaires à la "vie libre" des mammifères, celle-ci dépend largement de l'intégrité des structures hypothalamiques du cerveau qui sont impliquées dans de nombreuses autres fonctions homéostatiques de l'organisme (Bligh, 1979).

Les récepteurs périphériques pour le froid et le chaud sont présents dans la peau. Les neurones thermosensibles se trouvent dans la moelle épinière (Carlson, 1973), dans le cerveau et hors du système nerveux central (région abdominale), (Cabanac, 1979). Des récepteurs internes existent dans les veines, les muqueuses et les viscères (Carlson, 1973). L'ensemble des informations provenant de ces divers récepteurs est intégré dans l'hypothalamus.

#### b- L'hypothalamus (figure A)

Il s'étend ventralement au thalamus et forme les parois et le plancher du III<sup>e</sup> ventricule. La lamina terminalis, une structure complexe, mince comprenant des capillaires, des neurones, des cellules gliales, notamment des tancytes, constitue le bord de la ligne médiane antérieure de l'hypothalamus et de la paroi antérieure du système ventriculaire du tronc cérébral (Bleier et coll;, 1980). Les cellules épendymaires hypothalamiques et leurs expansions fonctionnent comme un système de communication entre le liquide céphalo-rachidien du III<sup>e</sup> ventricule d'une part, les neurones et les capillaires dans l'hypothalamus d'autre part (Bleier, 1971).

L'hypothalamus joue un rôle important dans toutes les réponses thermorégulatrices, en particulier l'aire préoptique-hypothalamique antérieure (PO-HA), l'hypothalamus postérieur et les corps mammillaires (Boulant, 1980).

#### c- L'organisation thermorégulatrice hypothalamique (figure B)

L'hypothalamus antérieur reçoit des informations codées à partir de la périphérie qui signalent l'état respectif des thermorécepteurs cutanés et de ceux localisés dans les structures internes. Il existe une autre source d'information, la thermosensibilité localisée à l'aire PO-HA. Cette remarquable propriété physique de l'aire PO-HA révèle que la température du sang circulant à travers les lits capillaires ravitaillant les cellules de cette région intervient localement. Finalement, des cellules de l'aire PO-HA répondent également à la présence de toxines, poisons qui peuvent mettre en danger la vie de l'organisme (Myers, 1980).

Bien que quelques unités thermosensibles aient été identifiées dans cette région (Hardy, 1980), l'hypothalamus postérieur est une structure insensible à une variation thermique et à toutes substances chimiques.

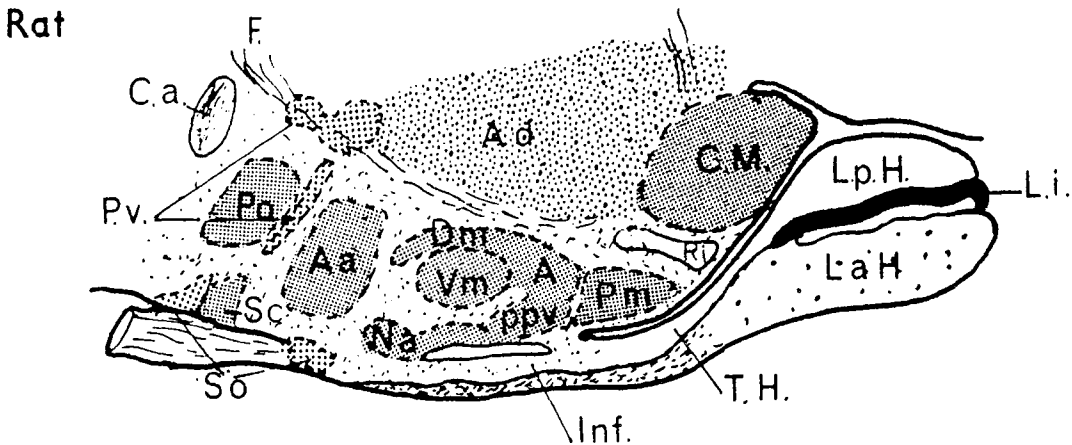


Figure A : Coupe longitudinale schématique d'hypothalamus de Rat.

A.d. : aire hypothalamique dorsale; C.M. : corps mammillaire; R.i. : recessus infundibulaire; L.p.H. : lobe postérieur de l'hypophyse; L.i. : lobe intermédiaire de l'hypophyse; L.a.H. : lobe antérieur de l'hypophyse  
 T.H. : tige hypophysaire; P.m. : noyau prémammillaire; A.p.p.v. : aire postérieure périventriculaire; D.m. : noyau dorso-médian; Inf. : infundibulum  
 V.m. : noyau ventro-médian; N.a. : noyau arqué; A.a. : aire hypothalamique antérieure; S.o. : noyau supra-optique; S.c. : noyau supra-chiasmatique; P.o. : noyau préoptique; P.v. : noyau para-ventriculaire; C.a. : commis-sure antérieure; F. : fornix.

( d'après Laget,P.,1973, Eléments de neuro-anatomie fonctionnelle, 4 (Masson) Paris).



L'hypothalamus postérieur serait l'intermédiaire des réponses efférentes convergentes. Les signaux reçus à partir de l'hypothalamus antérieur pourraient être intégrés aux informations venues des structures extra-hypothalamiques comprenant la moelle épinière, le septum, et les voies motrices subcorticales. Les neurones de l'hypothalamus postérieur pourraient traiter cette information convergente et la transformer en un ensemble de réponses effectrices appropriées comportant des réponses pilomotrices, sudomotrices et métaboliques (Myers et coll., 1976b). La région hypothalamique postérieure est cette partie du diencephale qui exhibe la sensibilité la plus grande aux changements produits dans la température lorsqu'elle est soumise à une altération exogène locale des constituants ioniques. Les réponses sont déclenchées quand la concentration des ions  $\text{Ca}^{2+}$  et  $\text{Na}^+$  est altérée (Jones et coll., 1978).

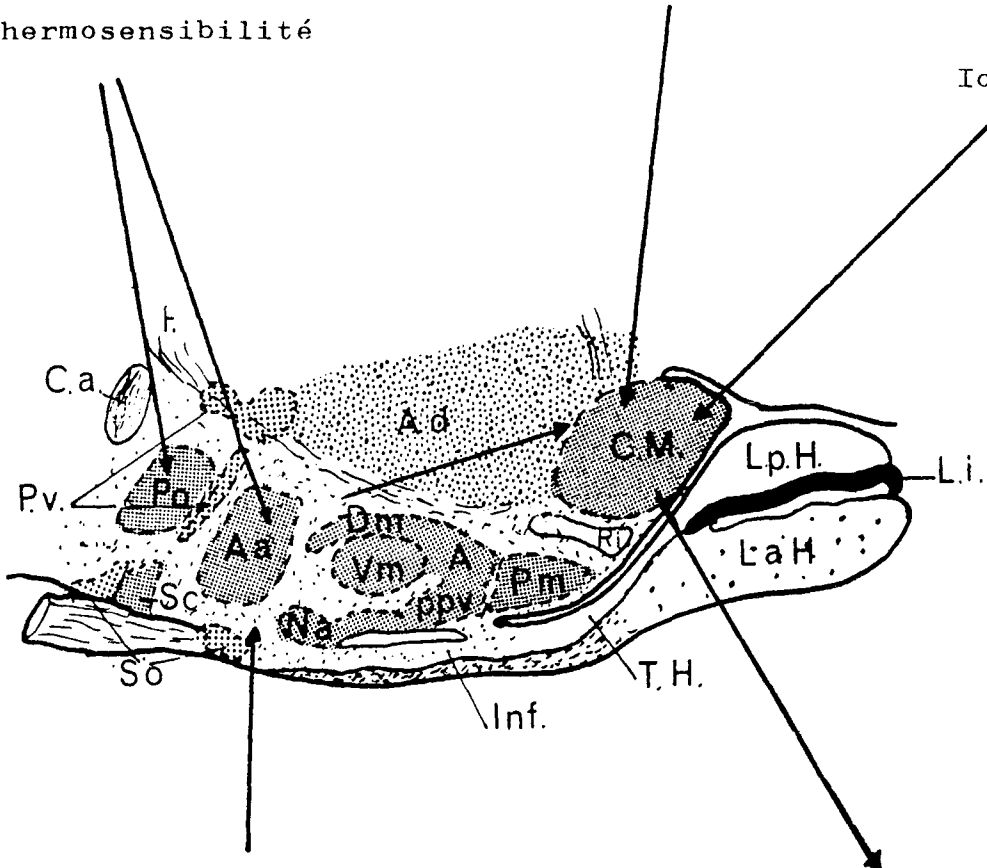
Selon Myers et coll. (1976b), un "set-point" fonctionnel concernant la température corporelle, c'est à dire une température de référence de l'ordre de  $37^{\circ}\text{C}$ , serait présent à la naissance chez la plupart des mammifères. Le mécanisme du "set-point" doit être gouverné par une propriété fondamentale et intrinsèque d'une population sélectionnée de neurones situés dans le tronc cérébral à proximité anatomique et ayant des liens avec les neurones thermosensibles. Ce site est considéré comme étant séparé anatomiquement du foyer neuronal impliqué dans le processus de régulation. Ces neurones responsables du maintien du "set-point" thermique devraient être différents de ceux qui détectent la température et contrôlent les réactions de régulation. Quand le "set-point" est dévié, la régulation autour du nouveau niveau de température prend place normalement au moyen des fonctions vasomotrices, pilomotrices, métaboliques et autres fonctions ordinairement utilisées quand la valeur de référence est de  $37^{\circ}\text{C}$  (Myers, 1978b). La défense du "set-point" est réalisée par des informations indépendantes probablement transmises par des neurones cholinergiques à partir de l'aire hypothalamique antérieure à travers l'hypothalamus postérieur (Myers, 1978b).

Des expériences ont été réalisées à l'aide du 2-désoxy-D-glucose (3g/kg, i.p.) qui entre en compétition avec le D-glucose pour le transport dans le cerveau mais qui n'est pas métabolisé (Horton et coll., 1973). On note une ataxie après 10min., des convulsions pendant 10 à 20 min. et de l'hypothermie. Les corps mammillaires répondent aux microinjections de 2-DG par une hypothermie généralisée (Shiraishi, Mager, 1980). Ceux-ci ont donc une fonction thermorégulatrice contrôlée par la concentration en glucose métabolique-

Moelle épinière , Septum ,  
Voies motrices subcorti-  
cales

Thermosensibilité

Ions :  $Ca^{2+}$ ,  
 $Na^+$



Thermorécepteurs  
cutanés et internes

Réponse effectrice

Figure B : Représentation schématique des mécanismes thermorégulateurs  
au niveau des centres de hypothalamus du Rat.  
Les abréviations sont celles utilisées dans la figure A .

ment disponible. Au cours de la période préconvulsive qui suit l'administration de MSO, l'oxydation du glucose est déprimée, l'oxydation d'autres substrats (acétate, phénylalanine et proline) considérés comme étant des précurseurs du "petit compartiment glutamate" (astrocytes, terminaisons nerveuses) peut être accrue (Cooper et coll., 1983; Cooper et coll., 1979, Van den Berg, Van den Velden, 1970).

#### d-Le rôle de certains neurotransmetteurs et autres molécules

Les noyaux du raphé du tronc cérébral et des régions de la formation réticulaire médiane peuvent déclencher et transmettre un signal quand l'équilibre thermique est modifié et peuvent stimuler la fonction thermorégulatrice autonome aussi bien que certaines des réponses comportementales (Gottschlich, Werner, 1985). Les noyaux dorsal et médian du raphé sont impliqués dans la transmission du signal thermique vers la région préoptique (Werner, Bienek, 1985). Le noyau dorsal du raphé (NDR) (groupe B7) est le plus gros noyau du raphé et il contient la plus forte accumulation en corps cellulaires sérotoninergiques du cerveau (Descarries et coll., 1982). Quelques fibres sérotoninergiques prenant origine dans le noyau dorsal du raphé innervent l'hypothalamus postérieur (Steinbusch, 1984). La 5-HT joue un rôle dans la thermorégulation au niveau de l'hypothalamus antérieur (Myers, 1975b).

L'acide  $\gamma$ -aminobutyrique (GABA) exercerait un contrôle inhibiteur sur les neurones sérotoninergiques centraux par l'intermédiaire d'un récepteur GABA localisé dans les noyaux du raphé (Nishikawa, Scatton, 1985). Le NDR reçoit des afférences provenant de l'habénula latérale et de la substantia nigra (Pars compacta): ce sont des voies gabaergiques inhibitrices (Aghajanian et coll., 1987). L'allylglycine, inhibiteur de la glutamate décarboxylase (EC.4.1.1.15) diminue la concentration en GABA du cerveau ce qui produit une réponse hypothermique chez le Rat (De Feudis, 1984).

Le NDR reçoit aussi des afférences provenant de la région hypothalamique latérale: ce sont des voies noradrénergiques excitatrices (Aghajanian et coll., 1987). Le locus coeruleus contenant des neurones noradrénergiques et le noyau dorsal du raphé sont innervés réciproquement, de telle sorte que la noradrénaline (NA) facilite l'activité sérotoninergique et la stimulation du NDR inhibe l'activité du locus coeruleus (cf. Petersen et coll., 1989). Une diminution de la teneur en 5-HT endogène se traduit par une perte de contrôle de la libération de Na par "feedback" négatif (Reader et coll.

1986).

La dopamine (DA) également semble jouer un rôle important dans la régulation centrale de la température corporelle chez le mammifère (cf. Lee et coll., 1985). Il existe une projection dopaminergique à partir du noyau dorsal du raphé vers le cortex préfrontal, le striatum, l'hippocampe et le cerveau antérieur basal (Yoshida et coll., 1989).

Ces résultats suggèrent que la 5-HT, le GABA et les catécholamines pourraient jouer un rôle important dans la thermorégulation centrale du mammifère.

Donc, les mammifères ont une température interne maintenue au voisinage d'une température stable appelée "set-point" thermique. L'intégration des informations nécessaires à la régulation se fait dans l'hypothalamus. Le taux en glucose sanguin contrôle la fonction thermorégulatrice dans les corps mammillaires où le mécanisme du "set-point" paraît être situé, ce mécanisme serait basé sur un équilibre entre les concentrations locales des ions  $\text{Na}^+$  et  $\text{Ca}^{2+}$ . Le mécanisme du "set-point" doit être dépendant d'une population sélectionnée de neurones dans le tronc cérébral, séparé anatomiquement du foyer neuronal impliqué dans le processus de régulation. Les neurotransmetteurs principalement mis en cause paraissent être la 5-HT, le GABA et les catécholamines.

### 3 - But du présent travail

Le but du travail que nous présentons est d'étudier les modalités de la variation de la température interne du Rat soumis à l'action de la MSO et de tenter de tirer des conclusions en ce qui concerne les voies neuronales dans le système nerveux central qui peuvent être impliquées dans cette variation.

La MSO sera injectée par la voie intrapéritonéale pour définir les caractéristiques de son action sur la température interne (le moment d'apparition de l'action, sa durée, la dose nécessaire). Etant donné que les centres thermorégulateurs siègent dans le SNC, nous injecterons la MSO directement dans les ventricules ou dans certaines structures cérébrales précises pour déterminer si les mêmes caractéristiques d'action de la MSO sur la température interne sont maintenues.

Nous nous poserons la question de savoir si l'action de la MSO est sensible à la variation de la température ambiante.

Comme nous l'avons vu la 5-HT jouant un rôle important dans la thermorégulation, nous étudierons si l'action de la MSO est modifiée par intervention sur le métabolisme et en particulier en agissant au niveau des neurones sérotoninergiques du noyau dorsal du raphé.

Nous savons qu'il existe une interférence entre les catécholamines et la 5-HT. Le NDR freine l'activité du locus coeruleus alors que le locus coeruleus stimule celle du NDR. Nous nous demanderons si la MSO peut interférer avec ces actions réciproques entre les systèmes sérotoninergiques et les systèmes noradrénergiques.

Le GABA exogène inhibant la libération de la 5-HT dans le cerveau du Rat par l'intermédiaire des récepteurs  $GABA_B$  qui paraissent être localisés présynaptiquement (Schlicker et coll., 1984), nous rechercherons si le GABA peut jouer un rôle dans l'action hypothermisante de la MSO.

METHODES EXPERIMENTALES

### 1 - Animaux

Les expériences ont été faites sur des rats mâles appartenant aux races Sprague-Dawley (EOPS); Wistar, souche Allinghton Farms (IFFA-CREDO) et Wistar, souche Allinghton Farms (CERJ), de poids corporel compris entre 200g et 300g au moment de l'opération, à une température ambiante contrôlée de  $+23^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$ . Ils sont soumis à un cycle lumière-obscurité de 12h. L'éclairement a lieu entre 6h et 18h avec un libre accès à la nourriture et à l'eau. Les expériences ont lieu de 9h à 11h.

### 2 - Mesure de la température rectale

Le rat est placé dans une boîte ("restrainer") en acrylate modèle Harvard bien ventilée. La sonde thermique (Yellows Springs Instruments CO., YSI, Yellows Springs OH, modèle 402) est introduite dans le rectum sur une longueur de 6cm (Lomax, 1966). La sonde est reliée à un téléthermomètre (YSI, modèle 43), lui-même relié à un enregistreur potentiométrique Servotrace, modèle PE<sub>1</sub>-10, réglé à la vitesse de 1,0mm/mn. La sonde est maintenue par du sparadrap.

La représentation graphique des résultats est exprimée en déviation de la température rectale ( $\Delta^{\circ}\text{C}$ ) enregistrée par rapport à celle du rat au temps zéro. La température rectale du rat au temps zéro est de  $+38^{\circ}\text{C} \pm 0,4^{\circ}\text{C}$ .

### 3 - Mesure de la température cutanée

La température cutanée est mesurée à la base de la queue du rat. Les poils sont rasés à ce niveau. L'animal est mis dans la boîte décrite précédemment. La sonde (YSI, modèle 421) est placée sur la peau, bien au-dessus de la veine caudale et est maintenue par du sparadrap. Cette sonde est reliée à un téléthermomètre (YSI, modèle 43) indiquant directement, à chaque instant, la température cutanée de l'animal. Ce téléthermomètre est lui-même relié à un enregistreur potentiométrique Servotrace, modèle PE<sub>1</sub>-10

réglé à la vitesse de 1.0mm/mn.

#### 4-Température ambiante

La température ambiante est contrôlée pendant la durée de l'expérience. La température ambiante élevée ( $36 \pm 0,5^{\circ}\text{C}$ ) est maintenue dans une étuve ventilée. La température basse ( $11 \pm 1,0^{\circ}\text{C}$ ) est réalisée dans une table réfrigérée avec thermostat, ventilée et éclairée.

#### 5-Injection intrapéritonéale

La L-méthionine-d,l-sulfoximine (MSO) (Sigma, St.Louis, MO) (50-200mg/kg de poids corporel) dissoute dans 1,0ml par 200g de poids corporel, de NaCl stérile à 0,9%, est injectée par voie intrapéritonéale. Les animaux témoins reçoivent le même volume de NaCl stérile à 0,9%.

Dans certaines expériences, la MSO (150mg/kg de poids corporel) est injectée simultanément avec de la L-méthionine (Sigma) (700mg/kg de poids corporel) dans un volume total de 1,0ml par 200g de poids corporel de NaCl stérile à 0,9%.

#### 6-Injection intracérébroventriculaire

Une semaine avant l'expérience, le rat est placé dans un appareil stéréotaxique David Kopf, modèle 900, anesthésié à l'équithésine (3ml/kg, i. p.). Une canule guide unilatérale de calibre G26, d'une longueur de 11,0 ou 13,0mm en acier inoxydable (Hamilton) est implantée perpendiculairement à la surface du crâne avec l'extrémité restant 1mm au-dessus d'un ventricule latéral ou du III<sup>e</sup> ventricule. Les coordonnées stéréotaxiques pour le ventricule latéral sont (en mm) : A= 7,0; L= 1,4; H= 8,5 et pour le III<sup>e</sup> ventricule sont (en mm) : A= 6,1; L= 0,0; H= 3,5 (Albe-Fessard et coll., 1971; Myers, 1977); la canule est maintenue en place par du ciment dentaire et des vis en acier inoxydable insérées dans le crâne. Un stylet en acier inoxydable d'une longueur de 11,0 ou 13,0mm est placé dans la canule guide et y est maintenu jusqu'au début de l'expérience. La MSO (60-75 $\mu\text{g}$  par rat), dissoute dans NaCl stérile à 0,9% ou du liquide céphalo-rachidien artificiel stérile (Myers, Ruwe, 1982) est injectée dans un volume de 10 $\mu\text{l}$  sur une période de 2mn par une aiguille à injection de calibre G33, d'une



longueur de 12,0 ou 14,0 mm, reliée par un tube PE-10 d'environ 50 cm de longueur, à une microseringue Hamilton, d'une capacité de 50 $\mu$ l poussée par l'intermédiaire d'une pompe à injection Braun, modèle Perfusor I, à vitesse variable. L'extrémité de l'aiguille à injection se localise à 1mm au-dessous de l'extrémité de la canule guide. Après l'injection, le stylet est remis en place. Après chaque expérience, 10 $\mu$ l d'une solution de bleu de bromophénol à 1% est injectée dans le ventricule latéral ou le III<sup>e</sup> ventricule chez le rat anesthésié à l'équithésine (3ml/kg, i.p.), puis le rat est perfusé par le ventricule cardiaque gauche avec une solution de formaldéhyde à 10% et le cerveau est coupé longitudinalement pour vérifier la coloration de toutes les cavités ventriculaires.

#### 7-Infusion intracérébrale

La technique chirurgicale est la même que pour l'injection intracérébroventriculaire. Une canule guide de calibre G26 est implantée unilatéralement au-dessus d'un site dans la région préoptique-hypothalamique antérieure (PO-HA) en utilisant les coordonnées suivantes (Albe-Fessard et coll. 1971) (en mm): A=7,3, L=0,4, H=3,0; dans l'amygdale: A=5,8, L=4,5, H=4,0; dans l'hippocampe: A=3,2, L=4,5, H=5,0; et dans la région mammillaire utilisant les coordonnées suivantes (Paxinos, Watson, 1982) (en mm), la ligne interauriculaire étant le point de référence: A=5,2, L=0,5, H=16; dans le noyau du raphé dorsal: A=1,2, L=0,0, H=4,5. La MSO (25 $\mu$ g par rat) dissoute dans une solution de NaCl stérile à 0,9% est infusée dans un volume de 0,5 $\mu$ l sur une période de 3mn par une aiguille à injection de calibre G33, d'une longueur de 12,0 ou 14,0mm en acier inoxydable utilisant une seringue Hamilton de capacité 5 $\mu$ l, comme décrit pour l'injection intracérébroventriculaire. L'aiguille à injection descend 1,0mm plus bas que la pointe de la canule guide et est maintenue en place pendant 10mn avant d'être enlevée lentement. Après chaque expérience, 0,5 $\mu$ l de la solution de bleu de bromophénol à 1% dans de l'eau bidistillée est infusée dans l'aire PO-HA, l'amygdale, l'hippocampe, la région mammillaire et dans le noyau du raphé dorsal des rats anesthésiés à l'équithésine (3ml/kg, i.p.), puis ils sont perfusés par voie intracardiaque à l'aide d'une solution de formaldéhyde à 10% et le cerveau est découpé dans un cryostat à -20°C afin de vérifier le site exact de la microinfusion (Myers, 1977).

### 8-Tests statistiques

Les résultats sont exprimés sous la forme d'une moyenne avec son écart-type. Les comparaisons des résultats sont effectuées entre la température rectale du rat soumis à l'action de la MSO et celle du rat témoin (précisé dans la légende de chaque figure) avec le test  $t$  de Student, la signification est limitée à 0,05.

### Equithésine

Sa composition est la suivante :

- . Chloral hydraté - 4,25 g
  - . Sulfate de magnésium - 2,126 g
  - . Pentobarbital - 0,972 g
  - . Propylène glycol - 42,8 ml
  - . Alcool 90% - 11,5 ml
  - . Eau distillée qsp. 100 ml
- à conserver à l'obscurité.

### Calcul des doses

Le calcul de la dose de MSO injectée par voie intrapéritonéale a été effectué à partir des données de Ghittoni et coll., 1970. Pour une dose convulsivante, Ghittoni a utilisé 0,94mmole/kg de MSO, soit l'équivalent de 180mg/kg de MSO (P.M. de la MSO : 180,2). D'où le choix des doses utilisées dans notre travail.

Le calcul de la dose de MSO injectée par voie intracérébroventriculaire a été effectué à partir des données de l'auteur cité précédemment. Il a utilisé 0,44 $\mu$ mole de MSO soit 79 $\mu$ g de MSO par cerveau de Rat.

Sur une période de 30mn , 4 heures après l'injection, la répartition des 79 $\mu$ g de MSO est de l'ordre de 33,3% pour l'ensemble du cerveau. La quantité de MSO ainsi présente pendant cette même période est donc de 26,1 $\mu$ g par cerveau de Rat, d'où l'infusion de 25 $\mu$ g de MSO par structure cérébrale du Rat.

NOMENCLATURE

AD	: nucleus Anterior dorsalis thalami
AM	: nucleus Anterior medialis thalami
Amygd	: Amygdala
AV	: nucleus Anterior ventralis thalami
3st	: nucleus Striae terminalis
CA	: Cornu Ammonis
Ca	: Commissura anterior
CC	: Corpus callosum
Cd	: nucleus Caudatus
Ch	: Chiasma opticum
C.hip.	: Commissura hippocampi (= Psalterium ventralis)
CI	: Capsula interna
C.Inf.	: Colliculus inferior
CL	: nucleus Centralis lateralis thalami
Cl	: Claustrum
CM	: Centrum medianum (ou Centre médian)
CP	: Commissura posterior
Pt	: nucleus Parataenialis
CS	: Colliculus superior
DBB	: Gyrus diagonalis (ou Bande diagonale de Broca)
DBC	: Decussatio brachium conjunctivum
FD	: Fascia dentata
FH	: Fimbria hippocampi
FLD	: Fasciculus longitudinalis dorsalis
FLM	: Fasciculus longitudinalis medialis
Fx	: Fornix (descendeur)
GC	: Griseum centrale mesencephali
GLD	: nucleus Genicularis lateralis dorsalis thalami
GLV	: nucleus Genicularis lateralis ventralis thalami
GM	: nucleus Genicularis medialis thalami
GP	: Globus pallidus
Hbl	: nucleus Habenularis lateralis
Hbm	: nucleus Habenularis medialis
IP	: Ganglio interpeduncularis
to	: Tractus opticus
VA	: nucleus Ventralis anterior thalami
L	: nucleus Lateralis thalami
LA	: nucleus Lateralis anterior thalami
LP	: nucleus Lateralis posterior thalami
lem	: lemniscus medialis
Ime	: lamina medullaris externa
MD	: nucleus Medialis dorsalis thalami
MV	: nucleus Medialis ventralis (= submedius) thalami
NCM	: nucleus Centralis medianus thalami
NR	: nucleus Ruber
N sept.m.	: nucleus Septalis medialis
N III	: nervus oculomotorius
PC	: nucleus Paracentralis thalami
Ped	: Pedunculus cerebri
Pf	: nucleus Parafascicularis thalami
Pm	: Area Premamillaris
P tect.l.	: nucleus Praetectalis lateralis
P tect. m.	: nucleus Praetectalis medialis
apol.	: arera preoptica lateralis
Pont	: Pons
Put	: Putamen
PV	: nucleus Paraventricularis thalami
Re	: nucleus Reumiens
Ret	: nucleus Reticularis thalami
Ret M	: Substantia reticularis mesencephali
Rh	: nucleus Rhomboidens
Sm	: Stria medullaris
SN	: Substantia nigra
Thp	: Tractus habenulo interpeduncularis
T	: ou Retroflexus (de Meynert)
Tmt	: Tractus mamillo-thalamicus (de Vicq d'Azyr)
VL	: nucleus Ventralis anterior thalami
VM	: nucleus Ventralis medialis thalami
ZI	: Zona incerta

HYPOTHALAMUS

aha	: area hypothalamica anterior
ahd	: area hypothalamica dorsalis
ahl	: area hypothalamica lateralis
ahm	: area hypothalamica medialis
ahp	: area hypothalamica posterior
ar	: nucleus infundibularis ou arcuatus
apolf.l	: area preolfactiva lateralis
apom	: area preoptica medialis
C. Mam.	: Corpus mamillare
C. Mam.l	: Corpus mamillare lateralis n. parammiliaris)
dm	: nucleus dorsomedialis hypothalami
hyp	: hypophysis
pv	: nucleus paraventricularis hypothalami
sch.	: nucleus supracniasmaticus
so	: nucleus supraopticus
t.olf.	: tractus olfactorius
vm	: nucleus ventromedialis hypothalami

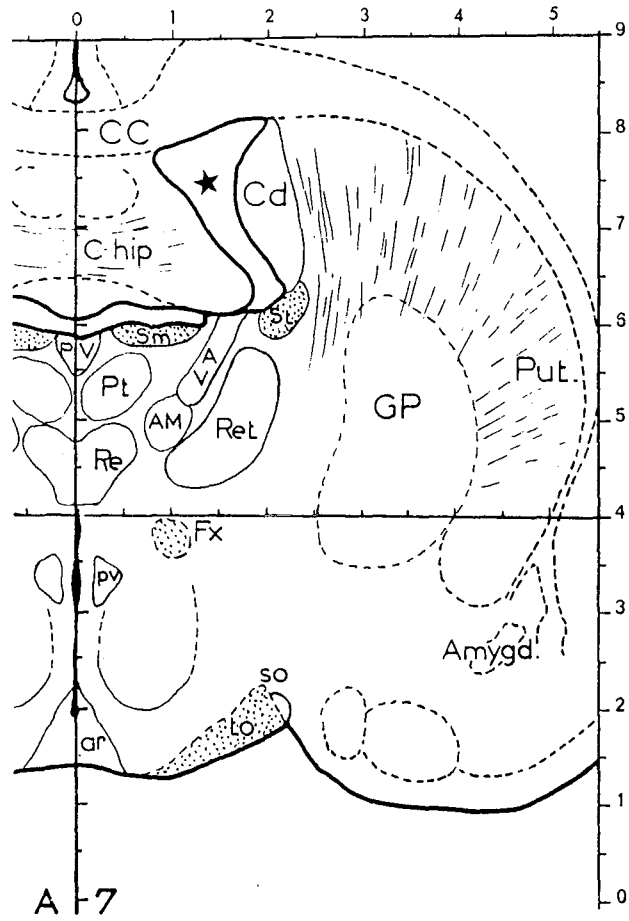


Figure 1- Site d'injection intracérébroventriculaire (ventricule latéral) (\*) dans le cerveau du Rat, selon les coordonnées de l'atlas stéréotaxique d'Albe-Fessard et coll. (1971).

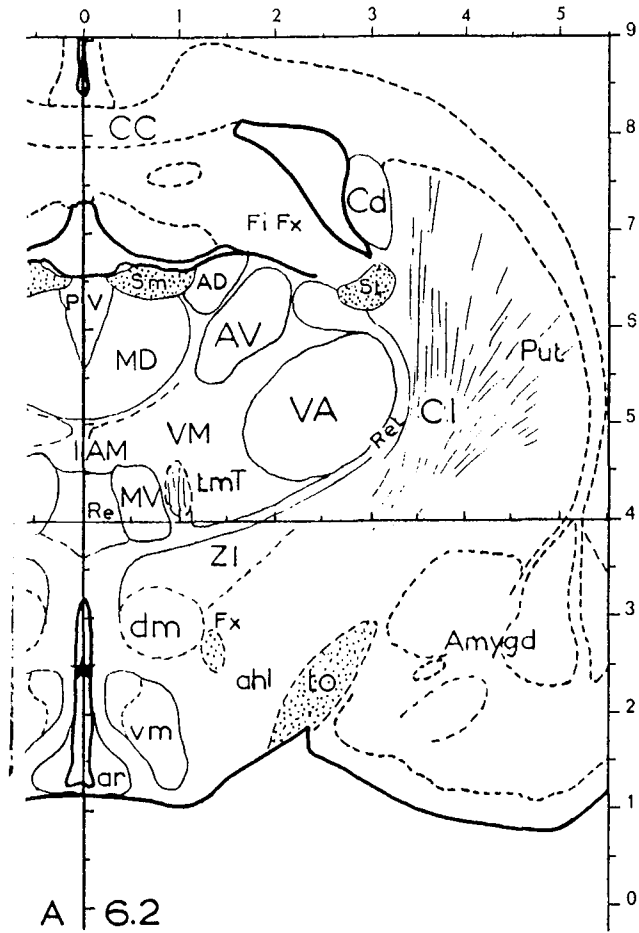


Figure 2- Site d'injection intracérébroventriculaire (III<sup>e</sup> ventricule)  
 (\*) dans le cerveau du Rat, selon les coordonnées de l'atlas  
 stéréotaxique d'Albe-Fessard et coll. (1971).

ETUDE DE L'HYPOTHERMIE INDUITE PAR LA METHIONINE SULFOXIMINE

Comme nous l'avions écrit dans l'introduction à ce travail, Wada et coll., 1967, ont observé un abaissement de la température rectale chez le rat à la suite d'une injection intrapéritonéale de MSO.

Quelles sont les caractéristiques de cette hypothermie et à quelles modalités comportementales s'associent-elles ?

La température moyenne des rats normaux restreints est de  $38^{\circ} \pm 0,4^{\circ} \text{C}$  à une température ambiante de  $+24^{\circ} \text{C}$  et elle est considérée comme une référence dans nos expériences.

#### 1- Mesure de la température rectale du rat soumis à l'action de la MSO

La MSO est injectée par voie intrapéritonéale (150mg/kg). Le rat est maintenu restreint et à la température ambiante de  $+24^{\circ} \text{C}$ .

Les résultats sont illustrés par la figure 3.

Les résultats obtenus montrent nettement l'action de la MSO sur la température rectale du rat. L'hypothermie enregistrée ( $-3,5^{\circ} \text{C}$ ) est très significative par rapport au groupe témoin, 3h à 4h après l'injection de MSO. La baisse maximale est atteinte de 4h à 4h30 après l'injection. Cette hypothermie s'accompagne d'un syndrome d'ataxie. Au fur et à mesure que la température rectale baisse, l'animal perd la possibilité de se déplacer, les pattes postérieures sont d'abord atteintes, puis les pattes antérieures et finalement l'organisme tout entier. Dans la plupart des cas, on observe des convulsions toniques-cloniques plus ou moins violentes. Elles apparaissent au moins 5h après l'injection de MSO. 24h après l'injection, le rat a un comportement apparemment "normal".

Est ce que cette hypothermie dépend de la dose de MSO injectée ?

#### 2- Mesure de la température rectale du rat soumis à l'action de différentes doses de MSO

Trois séries d'expériences ont été faites.

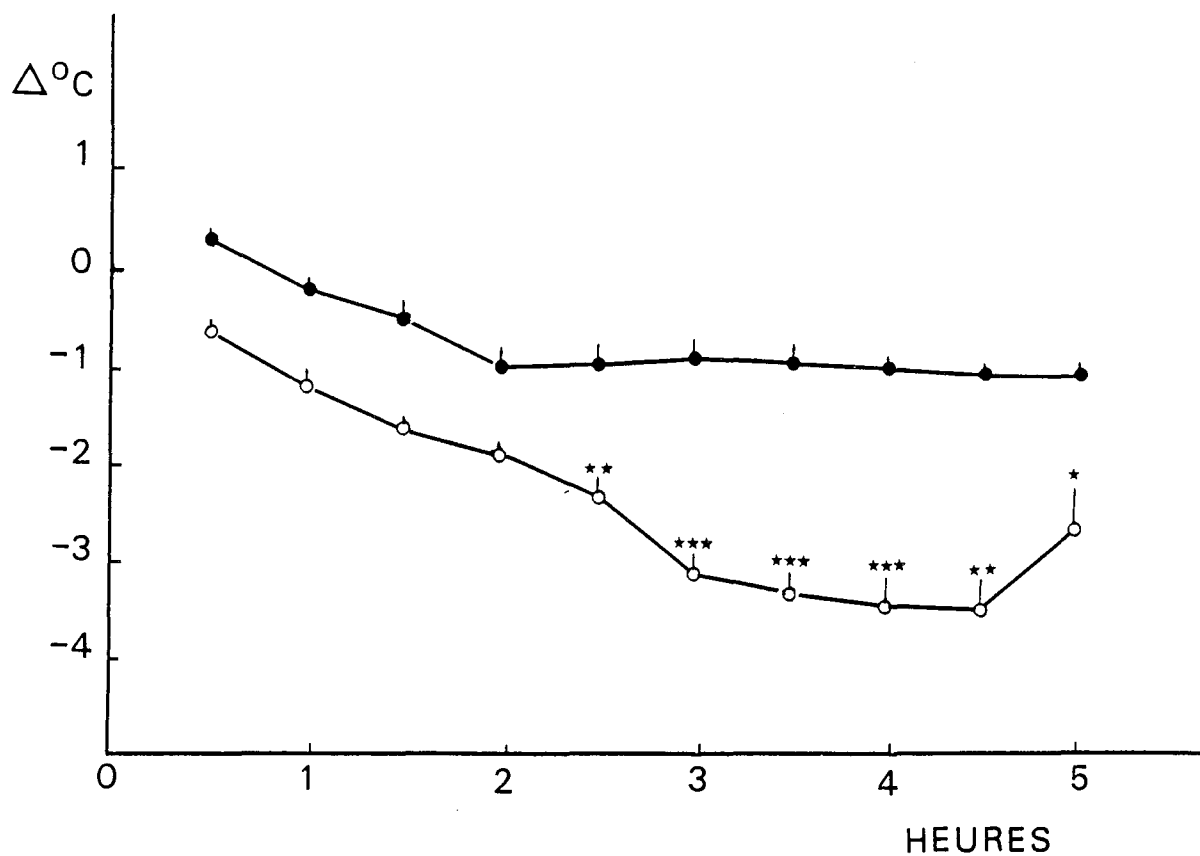


Figure 3- Variation de la température rectale ( $\Delta^{\circ}\text{C}$ ) à la suite d'une injection intrapéritonéale de MSO au Rat Wistar AF, à une température ambiante de  $24^{\circ}\text{C}$ . ● : témoins (n=5); ○ : MSO (150mg/kg) (n=10). Durée en heures: \*  $p < 0,05$ , \*\*  $p < 0,01$ , \*\*\*  $p < 0,001$ , pour les différences significatives avec les témoins.



a - Injection intrapéritonéale de MSO chez des rats de race Sprague-Dawley.

La MSO est injectée à la dose de 100mg/kg ou de 150mg/kg ou de 175mg/kg. Les résultats sont illustrés par la figure 4.

Ces résultats indiquent une action de la MSO sur la température rectale du rat, quelle que soit la dose utilisée : Les différences ne sont pas significatives entre les valeurs des trois groupes de résultats. La dose de MSO ne semble pas exercer d'influence sur l'amplitude de la baisse de la température rectale. L'hypothermie induite par la MSO n'est donc pas dépendante de la dose.

Du point de vue comportemental, l'animal présente un syndrome d'ataxie et souvent des convulsions. A 100mg/kg, on observe surtout un fort syndrome d'ataxie; à 175mg/kg, il en est souvent de même et la mort est assez fréquente.

b - Injection intrapéritonéale de MSO chez des rats de race Wistar AF (IFFA-CREDO).

La MSO est injectée à la dose de 50mg/kg ou de 100mg/kg ou de 150mg/kg. Les résultats sont illustrés par les figures 5-A et 5-A'.

Ces résultats montrent une action de la MSO sur la température rectale du rat, quelle que soit l'une des doses de MSO utilisées, la molécule induit une hypothermie. A la dose de 50mg/kg, la MSO provoque une très légère hypothermie, vers la 6<sup>ème</sup> heure. Cette dose représente donc la dose minimale active de MSO. A la dose de 100mg/kg ou de 150mg/kg, la MSO provoque une hypothermie presque identique. Il y a un léger décalage (30 min) dans le déclenchement de l'hypothermie et l'amplitude de la baisse de la température est de  $-3,5^{\circ}\text{C}$  ( $p < 0,01$ ) à  $-3,8^{\circ}\text{C}$  ( $p < 0,001$ ).

Du point de vue comportemental, l'animal présente un syndrome d'ataxie et souvent des convulsions sauf à la dose de MSO de 50mg/kg.

Donc pour les doses actives de 100mg/kg et de 150mg/kg, les caractéristiques de l'hypothermie sont pratiquement identiques.

c - Injection intrapéritonéale de MSO chez des rats de race Wistar AF (CERJ).

La MSO est injectée à la dose de 100mg/kg ou de 150mg/kg ou de 200mg/kg.

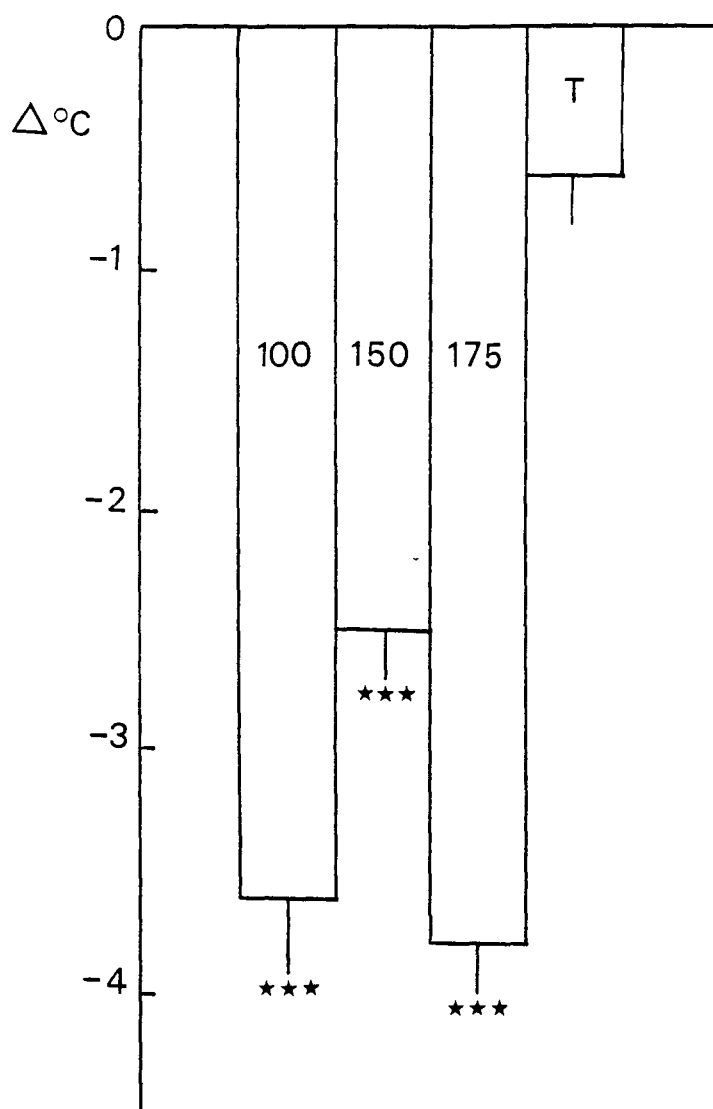


Figure 4- Amplitude maximum de l'hypothermie rectale ( $\Delta^{\circ}\text{C}$ ) à la suite de l'injection intrapéritonéale de différentes doses de MSO au Rat Sprague-Dawley, à une température ambiante de  $24^{\circ}\text{C}$ . Les doses de MSO sont de 100mg/kg (colonne 100) (n=5), 150mg/kg (colonne 150) (n=5), 175mg/kg (colonne 175) (n=5). \*\*\*  $p < 0,001$ , pour les différences significatives avec les témoins (colonne T) (n=5).

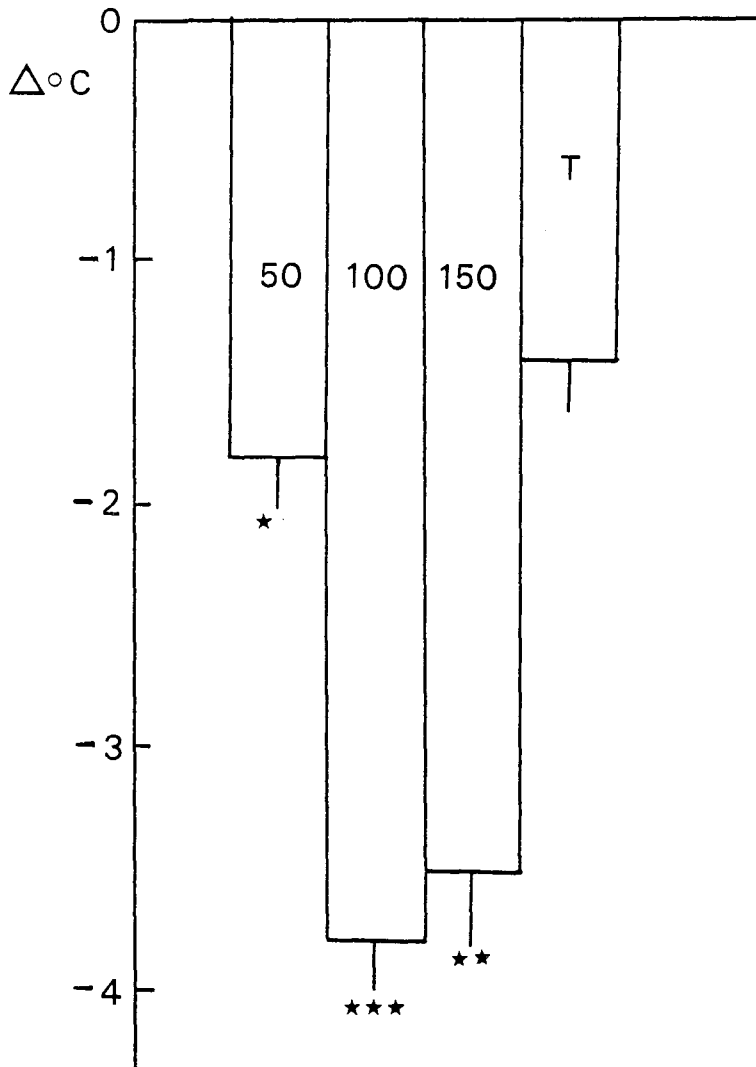


Figure 5-A Amplitude maximum de l'hypothermie rectale ( $\Delta^{\circ}\text{C}$ ) à la suite de l'injection intrapéritonéale de différentes doses de MSO au Rat Wistar AF (IFFA-CREDO), à une température ambiante de  $24^{\circ}\text{C}$ . Les doses de MSO sont de 50mg/kg (colonne 50) (n=9), 100mg/kg (colonne 100) (n=10), 150mg/kg (colonne 150) (n=10). \*\*  $p < 0,01$ , \*\*\*  $p < 0,001$ , pour les différences significatives avec les témoins (n=5) (colonne T).

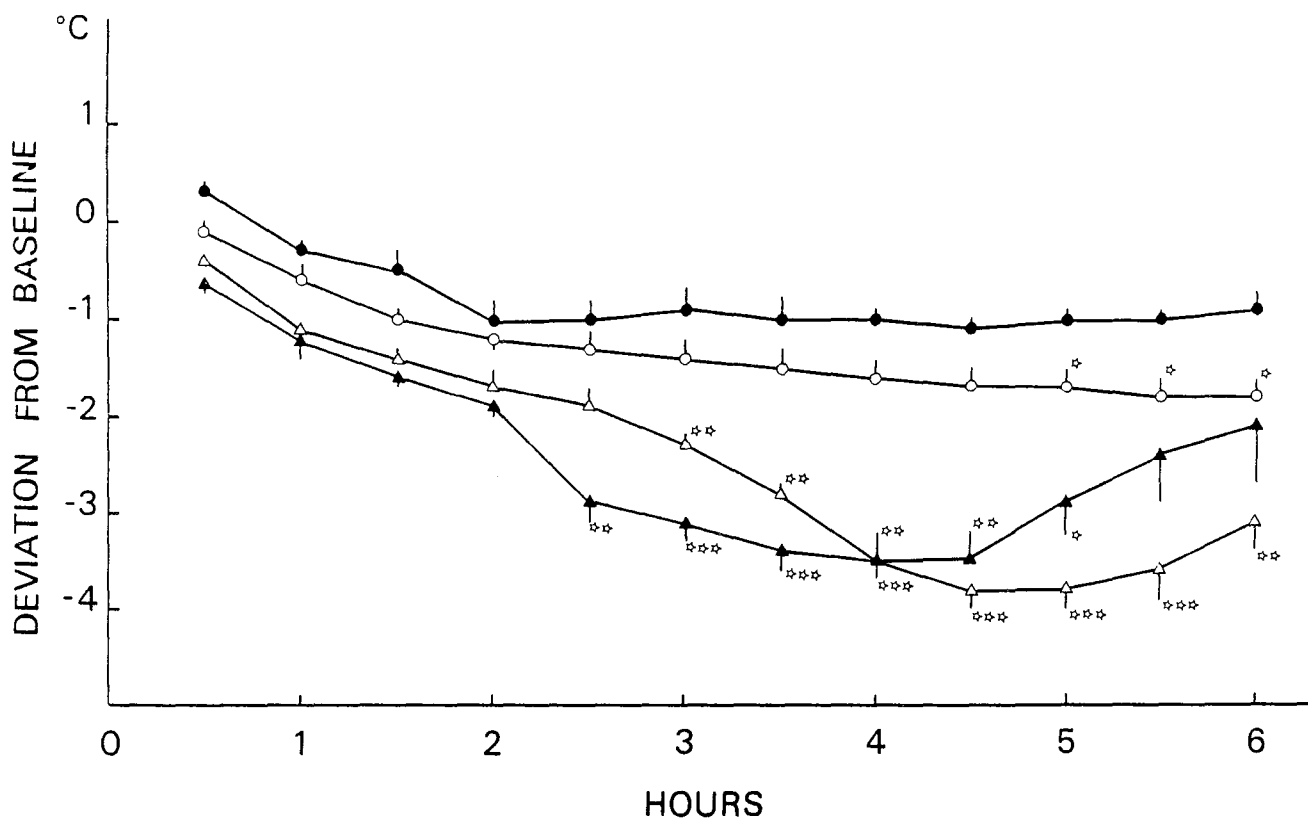


Figure 5-A' Modifications de la température rectale induites par une injection intrapéritonéale de différentes doses de MSO, à la température ambiante de 24°C.

●: témoins (n=5).

○: MSO 50mg/kg (n=9).

△: MSO 100mg/kg (n=10).

▲: MSO 150mg/kg (n=10).

Durée en heures.

☆  $p < 0,05$ ; ☆☆  $p < 0,01$ ; ☆☆☆  $p < 0,001$ , pour les différences significatives avec les témoins.

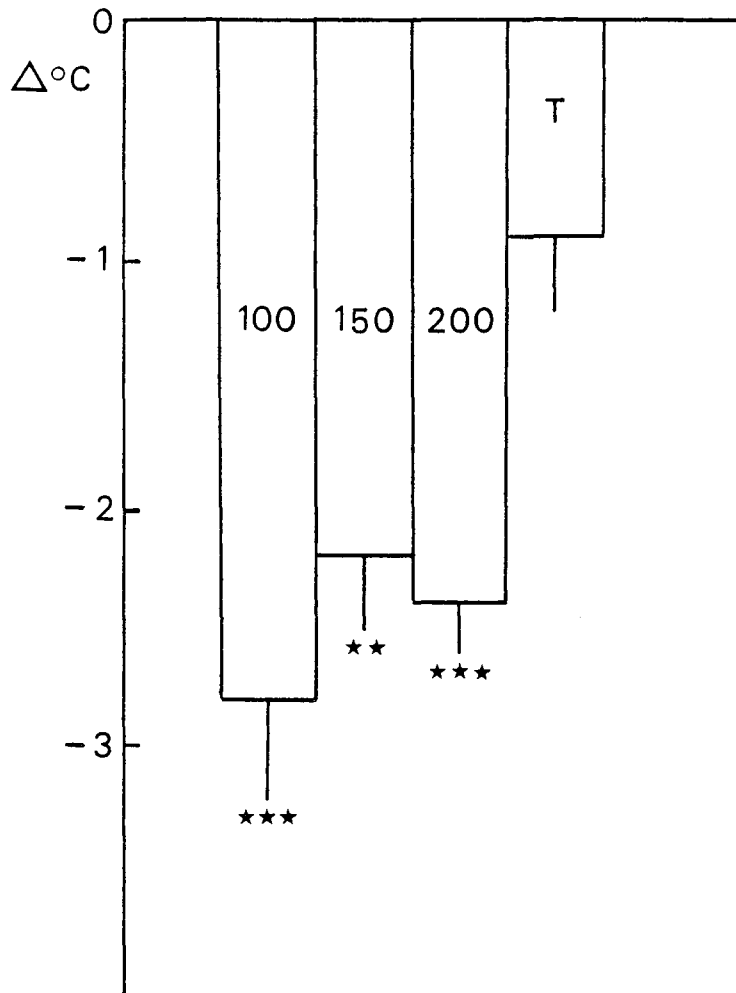


Figure 5- B Amplitude maximum de l'hypothermie rectale ( $\Delta^{\circ}\text{C}$ ) à la suite de l'injection intrapéritonéale de différentes doses de MSO au Rat Wistar AF (CERJ), à une température ambiante de  $24^{\circ}\text{C}$ . Les doses de MSO sont de 100mg/kg (colonne 100) (n=4), 150mg/kg (colonne 150) (n=8), 200mg/kg (colonne 200) (n=4). \*\*  $p < 0,01$ , \*\*\*  $p < 0,001$ , pour les différences significatives avec les témoins (colonne T) (n=4).

Les résultats sont illustrés par la figure 5-B.

Aux doses étudiées, la MSO provoque une hypothermie située entre  $-2,8$  ( $p < 0,001$ ) et  $-2,2^{\circ}\text{C}$  ( $p < 0,01$ ). La température la plus basse est enregistrée dans la période de 4-5h après l'injection de MSO. L'amplitude de la baisse est la plus importante à la dose de 100mg/kg.

Du point de vue comportemental, l'animal est ataxique, les réflexes de redressement sont impossibles. L'animal est couché sur le flanc ou sur le ventre, on note des convulsions généralisées. Il apparaît une hypertonie des membres postérieurs. Les rats sont parfois insensibles au toucher. 24 heures après, tous les animaux recouvrent un comportement apparemment "normal".

Ainsi l'hypothermie induite est indépendante de la dose de MSO administrée. Pour l'ensemble des expériences qui vont suivre, nous avons choisi la race Wistar AF (CERJ), et la dose de MSO de 150mg/kg.

### 3-Mesure de la température cutanée

La MSO est injectée à la dose de 150mg/kg.

Les résultats sont illustrés par la figure 6.

La température cutanée enregistrée au niveau de la base de la queue ne baisse pas lors d'une injection intrapéritonéale de MSO, alors que la température rectale baisse. Il n'y a pas de modification de la température périphérique. Donc, l'hypothermie induite par la MSO n'est pas d'origine périphérique mais d'origine centrale.

Comme nous l'avons précisé dans l'introduction de notre travail, les centres thermorégulateurs siègent dans le système nerveux central (aire-préoptique-hypothalamique antérieure, hypothalamus postérieur et corps mammillaires). Quelle sera l'action de la MSO, si nous l'infusions directement dans des structures cérébrales ?

Nous allons injecter la MSO dans le ventricule latéral et le III<sup>e</sup> ventricule (proche des structures hypothalamiques) et l'infuser dans l'aire préoptique-hypothalamique antérieure, les corps mammillaires et certaines structures cérébrales jouant un rôle dans le déclenchement des convulsions.

### 4-Mesure de la température rectale du rat, après une injection intracérébroventriculaire ou une infusion intracérébrale de MSO.

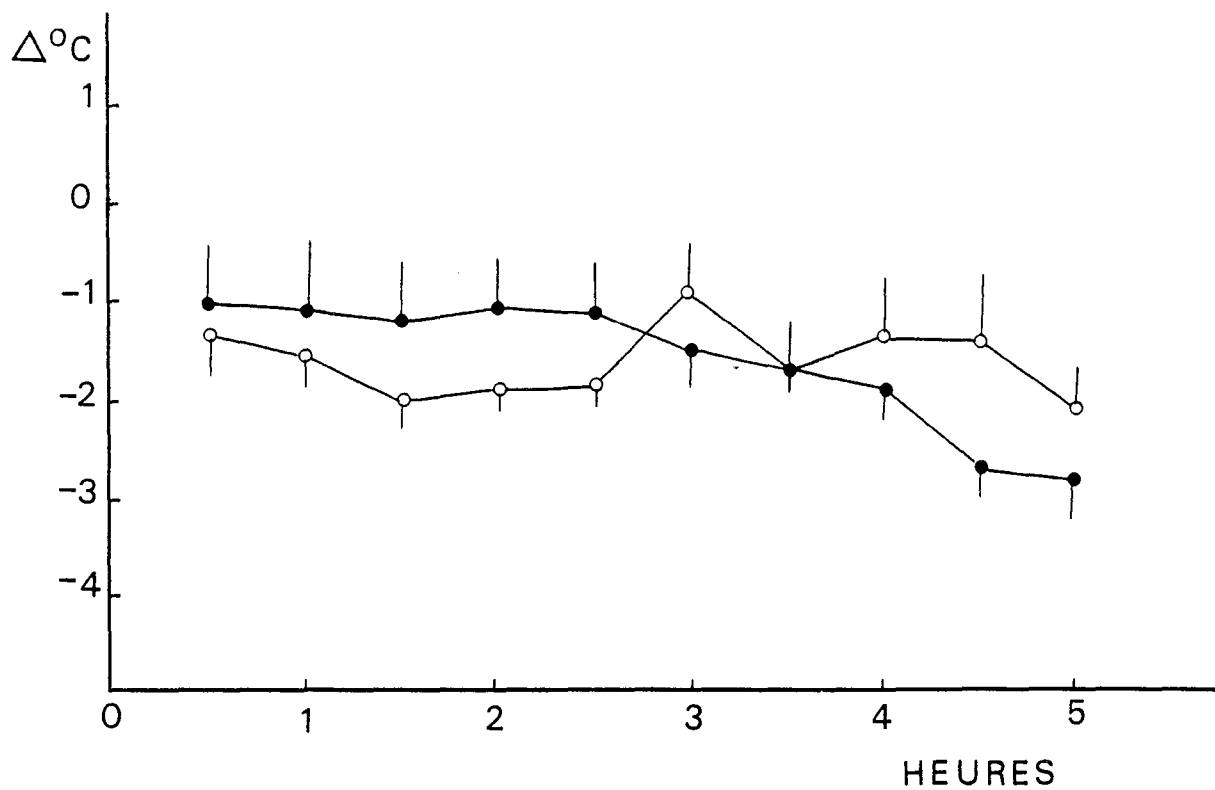


Figure 6- Variation de la température cutanée ( $\Delta^{\circ}\text{C}$ ) à la suite d'une injection intrapéritonéale de MSO au rat, à une température ambiante de  $24^{\circ}\text{C}$ .

● : témoins (n=5).

○ : MSO 150mg/kg (n=5).

Durée en heures.

Aucune différence significative avec les témoins.

#### a-Injection dans le ventricule latéral

La MSO est injectée à la dose de 75 $\mu$ g dans un volume de 10 $\mu$ l, le rat est maintenu restreint et à la température ambiante de +24°C.

Les résultats sont illustrés par la figure 7.

La température rectale subit une baisse de l'ordre de -2,3°C ( $p < 0,001$ ) sous l'influence de la MSO injectée dans le ventricule latéral. La baisse de la température s'amorce plus rapidement que lors d'une injection intrapéritonéale et elle atteint sa valeur maximale plus tôt (3h au lieu de 4h-4h30).

Du point de vue comportemental, on observe les mêmes phases que lors d'une injection intrapéritonéale de MSO. La différence importante réside dans le fait que les temps de latence sont raccourcis. Le syndrome d'ataxie puis les convulsions généralisées apparaissent plus rapidement. Les mécanismes d'induction de l'hypothermie se développent plus rapidement lors de l'injection intracérébroventriculaire de MSO.

#### b-Injection dans le III<sup>e</sup> ventricule

La MSO est injectée à la dose de 60 $\mu$ g dans un volume de 10 $\mu$ l. Le rat est maintenu restreint et à la température ambiante de +24°C.

Les résultats sont illustrés par la figure 8.

La MSO déclenche rapidement une hypothermie importante. Elle est comparable à celle provoquée par l'injection de MSO dans le ventricule latéral. Son apparition est plus précoce (1h au lieu de 2h). Le retour à la normothermie s'amorce vers 2h30 au lieu de 4h (V.L.). Celle-ci est rétablie en fin d'expérience.

Du point de vue comportemental, l'animal présente une ataxie progressive suivie de convulsions violentes. Le rat retrouve assez rapidement son état "normal".

#### c-Infusion intracérébrale de MSO

La MSO est infusée à la dose de 25 $\mu$ g dans un volume de 0,5 $\mu$ l. Le rat est maintenu restreint et à la température ambiante de +24°C.

Les résultats concernant l'infusion dans l'aire préoptique-hypothalamique antérieure (PO-HA) sont illustrés par la figure 9.



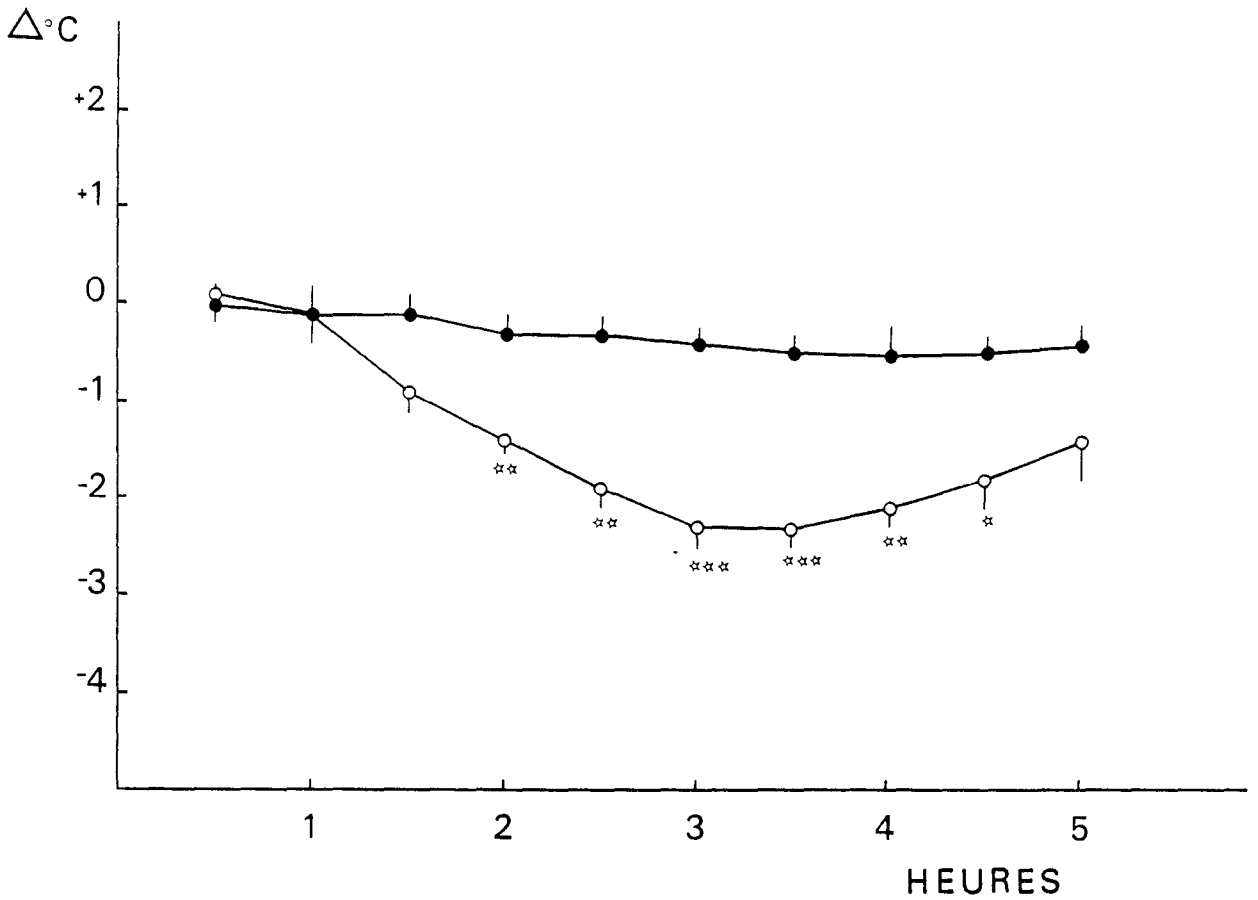


Figure 7- Variation de la température rectale ( $\Delta^{\circ}\text{C}$ ) à la suite d'une injection intracérébroventriculaire (ventricule latéral) de MSO au Rat, à une température ambiante de  $24^{\circ}\text{C}$ . ● : témoins (n=5); ○ : MSO ( $75\mu\text{g}$  par rat) (n=5). Durée en heures. \*  $p < 0,05$ , \*\*  $p < 0,01$ , \*\*\*  $p < 0,001$ , pour les différences significatives avec les témoins.

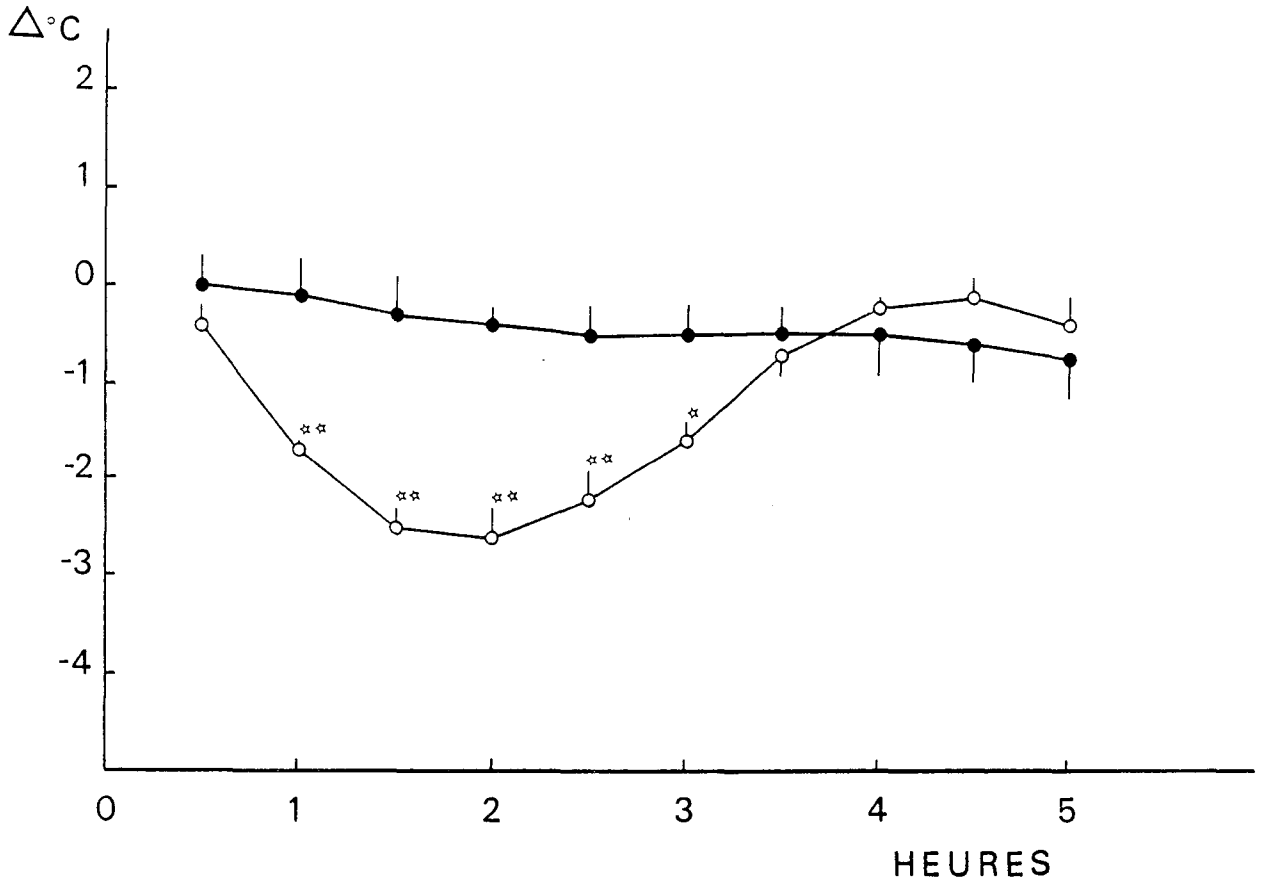


Figure 8- Variation de la température rectale ( $\Delta^{\circ}\text{C}$ ) à la suite d'une injection intracérébroventriculaire (III<sup>e</sup> ventricule) de MSO au Rat, à une température ambiante de  $24^{\circ}\text{C}$ . ●: témoins (n=4); ○: MSO (60 $\mu\text{g}$  par rat) (n=5). Durée en heures. \*  $p < 0,01$ , \*\*  $p < 0,001$ , pour les différences significatives avec les témoins.

La MSO infusée dans l'aire PO-HA agit sur la température rectale du rat, mais dans ce cas, elle induit une hyperthermie rectale avec un maximum de  $+2^{\circ}\text{C}$  ( $p < 0,001$ ). La montée de la température s'amorce trois heures après l'injection.

Du point de vue comportemental, l'animal ne présente aucune perturbation.

La MSO infusée dans les corps mammillaires, l'amygdale et l'hippocampe n'induit pas d'hypothermie.

Du point de vue comportemental, l'animal ne présente aucune perturbation motrice.

D'après l'ensemble des résultats (sauf pour les injections intracérébrales), la MSO provoque une hypothermie de l'ordre de  $2^{\circ}$  à  $3^{\circ}\text{C}$ . Cette hypothermie se développe progressivement dès l'injection de la molécule. La baisse maximale est atteinte d'autant plus rapidement que l'injection est faite proche des structures hypothalamiques. Donc l'action de la MSO semble bien dépendre d'un mécanisme central. Cette hypothermie corporelle s'accompagne toujours d'un syndrome d'ataxie suivi plus ou moins par des convulsions toniques et cloniques généralisées lors du retour à la normothermie.

On sait que la L-Méthionine est dans ces conditions expérimentales un anticonvulsivant. Peut-elle jouer un rôle lors de l'action hypothermique de la MSO ?

#### 5-Mesure de la température rectale du rat après une injection intrapéritonéale de MSO associée à la L-Méthionine

La MSO est injectée à la dose de 150mg/kg associée à une dose de 700 mg/kg de L-Méthionine. (D'après Sellinger et coll., 1970,  $\frac{\text{MSO}}{\text{L-Méthionine}} = \frac{1}{7}$  ).

Les résultats sont illustrés par la figure 10.

La L-Méthionine associée à la MSO ne modifie pas l'abaissement de la température rectale observé avec la MSO seule. Du point de vue comportemental, l'animal ne manifeste aucune perturbation motrice. Par contre, la température rectale baisse comme lors du syndrome progressif d'ataxie. La baisse atteint une valeur de  $-2,7^{\circ}\text{C}$  ( $p < 0,001$ ).

On peut émettre l'hypothèse que les mécanismes provoquant l'hypothermie sont indépendants de ceux sous-jacents aux perturbations du comportement.

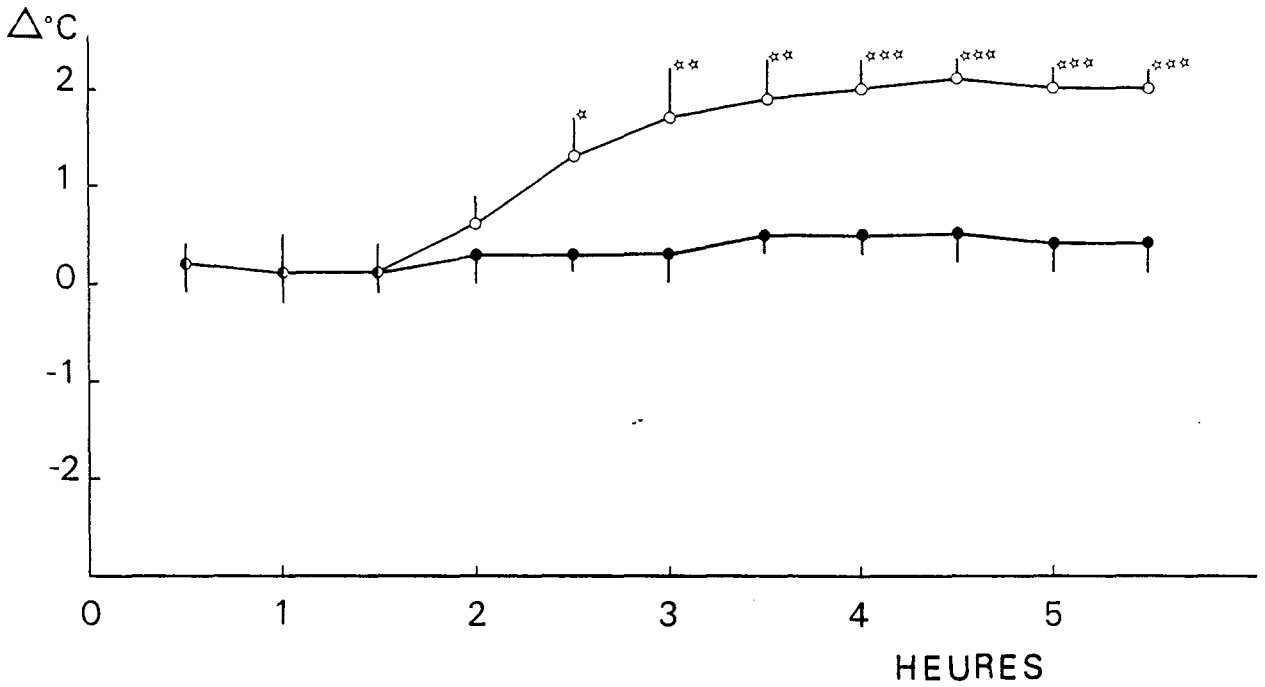


Figure 9- Variation de la température rectale ( $\Delta^{\circ}\text{C}$ ) à la suite d'une infusion unilatérale de MSO dans l'aire préoptique/hypothalamique antérieure (PO/HA) du Rat, à une température ambiante de  $24^{\circ}\text{C}$ . ●: témoins (n=7); ○: MSO ( $25\mu\text{g}$  par Rat) (n=5). Durée en heures. \*  $p < 0,05$ ; \*\*  $p < 0,01$ ; \*\*\*  $p < 0,001$ , pour les différences significatives avec les témoins.

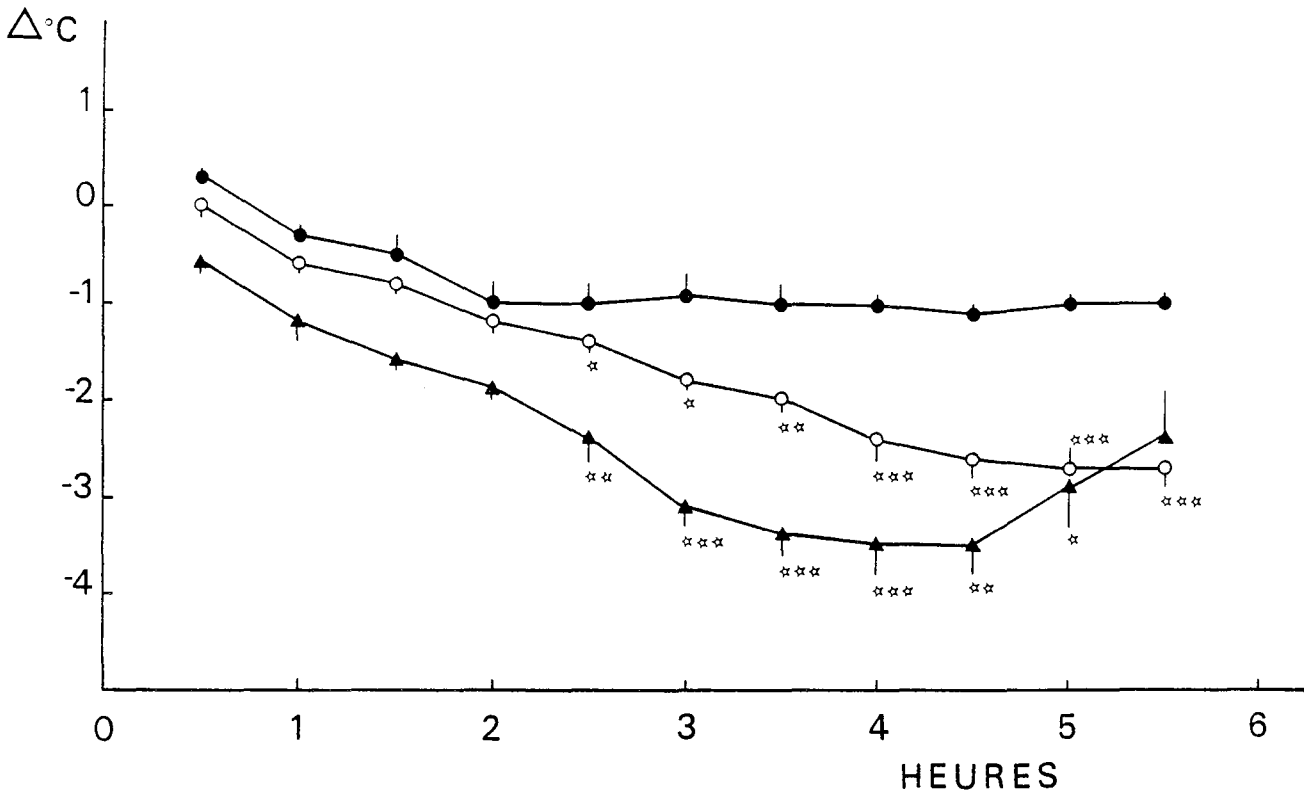


Figure 10- Variation de la température rectale ( $\Delta^{\circ}\text{C}$ ) à la suite d'une injection intrapéritonéale au Rat de soit MSO ( $\blacktriangle$ : MSO 150mg/kg) (n=10) soit MSO associée à L-Méthionine ( $\circ$ : MSO 150mg/kg plus L-Méthionine 700mg/kg) (n=4), à une température ambiante de  $24^{\circ}\text{C}$ .  $\bullet$ : témoins (n=5). Durée en heures. \*  $p < 0,05$ , \*\*  $p < 0,01$ , \*\*\*  $p < 0,001$ , pour les différences significatives avec les témoins.

La baisse de la température interne enregistrée à la suite de l'administration de MSO seule n'est pas modifiée par l'addition simultanée de L-méthionine qui supprime les perturbations comportementales motrices. L'hypothermie induite par la MSO est donc d'origine centrale et les mécanismes qui président à son développement sont différents de ceux présidant au développement des perturbations du comportement moteur.

Cette hypothermie est-elle sous la dépendance des conditions de température ambiante ?

#### 6-Mesure de la température rectale du rat aux températures ambiantes de +36°C et de +11°C

La MSO est injectée à la dose de 75 $\mu$ g dans le ventricule latéral. Le rat est maintenu restreint et à la température ambiante de +24°C sauf pendant 1H (30min après l'injection de MSO) où il est soumis à une température ambiante de +36°C ou de +11°C.

Les résultats sont illustrés par la figure 11 et la figure 12.

Si le rat est placé une heure en température ambiante élevée, 6degrés au dessus de la zone de neutralité thermique (située entre +28°C et +30°C) la température interne du rat augmente de 1°C pendant son séjour à +36°C et après retour à +24°C, on note une baisse de 1°C par rapport à la température initiale. Le témoin placé dans les mêmes conditions subit une modification comparable de sa température rectale. L'animal témoin ou soumis à l'action de la MSO passe d'une ambiance chaude à une ambiance comparativement plus froide (+36°C  $\rightarrow$  +24°C) et sa température interne subit une baisse. Chez le rat témoin, elle se stabilise, chez le rat soumis à l'action de la MSO, le déclenchement des convulsions provoque un retour de la température interne à la valeur initiale. L'animal régule bien sa température centrale même étant soumis à l'action de la MSO.

Si le rat est placé à une température ambiante de +11°C, pendant une heure, sa température interne chute et baisse de 6,1°C environ. Il est passé d'une ambiance thermique normale de +24°C à une ambiance thermique froide de +11°C, sa température interne subit une baisse d'autant plus importante qu'il est soumis à l'action de la MSO. L'animal étant replacé à +24°C, il passe d'une ambiance froide à une ambiance plus chaude comparativement (+11°C  $\rightarrow$  +24°C), sa température interne devrait remonter, ceci s'observe

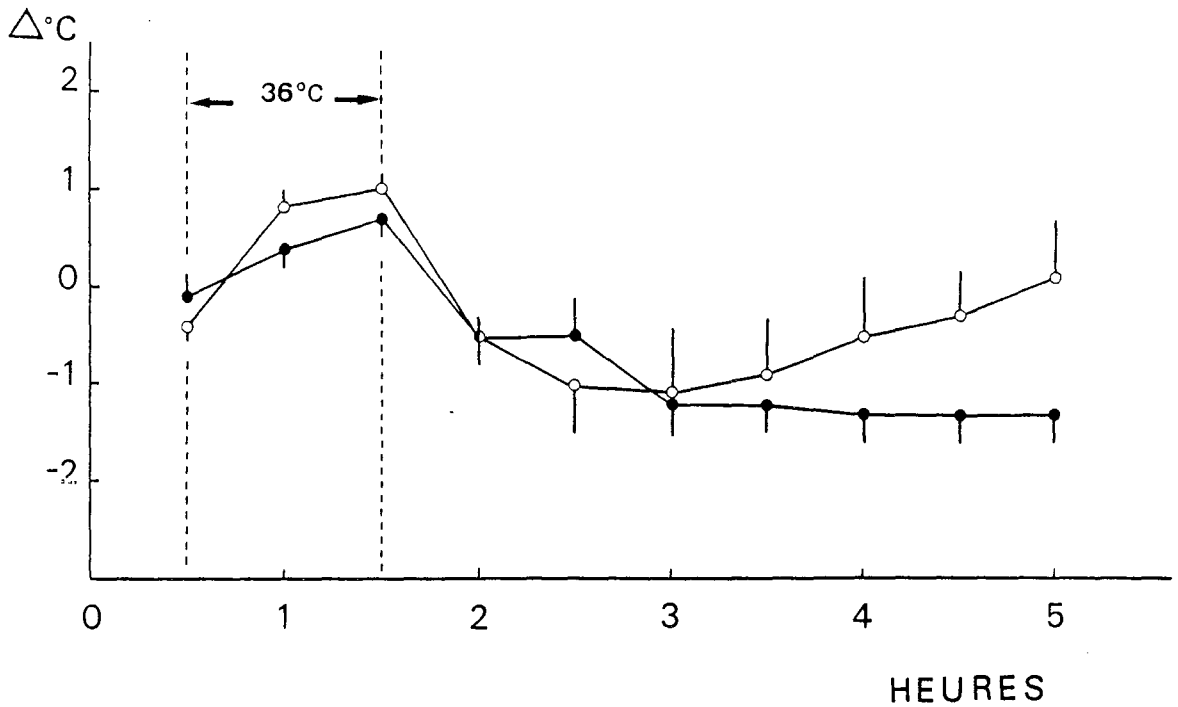


Figure 11- Variation de la température rectale ( $\Delta^{\circ}\text{C}$ ) à la suite d'une injection intracérébroventriculaire (ventricule latéral) de MSO au Rat, à une température ambiante de  $24^{\circ}\text{C}$ . La température ambiante a été élevée à  $36^{\circ}\text{C}$ , 30mn après l'injection, pendant une durée de 60mn indiquée par les lignes verticales interrompues. ● : témoins (n=5); ○ : MSO ( $75\mu\text{g}$  par Rat) (n=5). Durée en heures. Aucune différence significative avec les témoins.

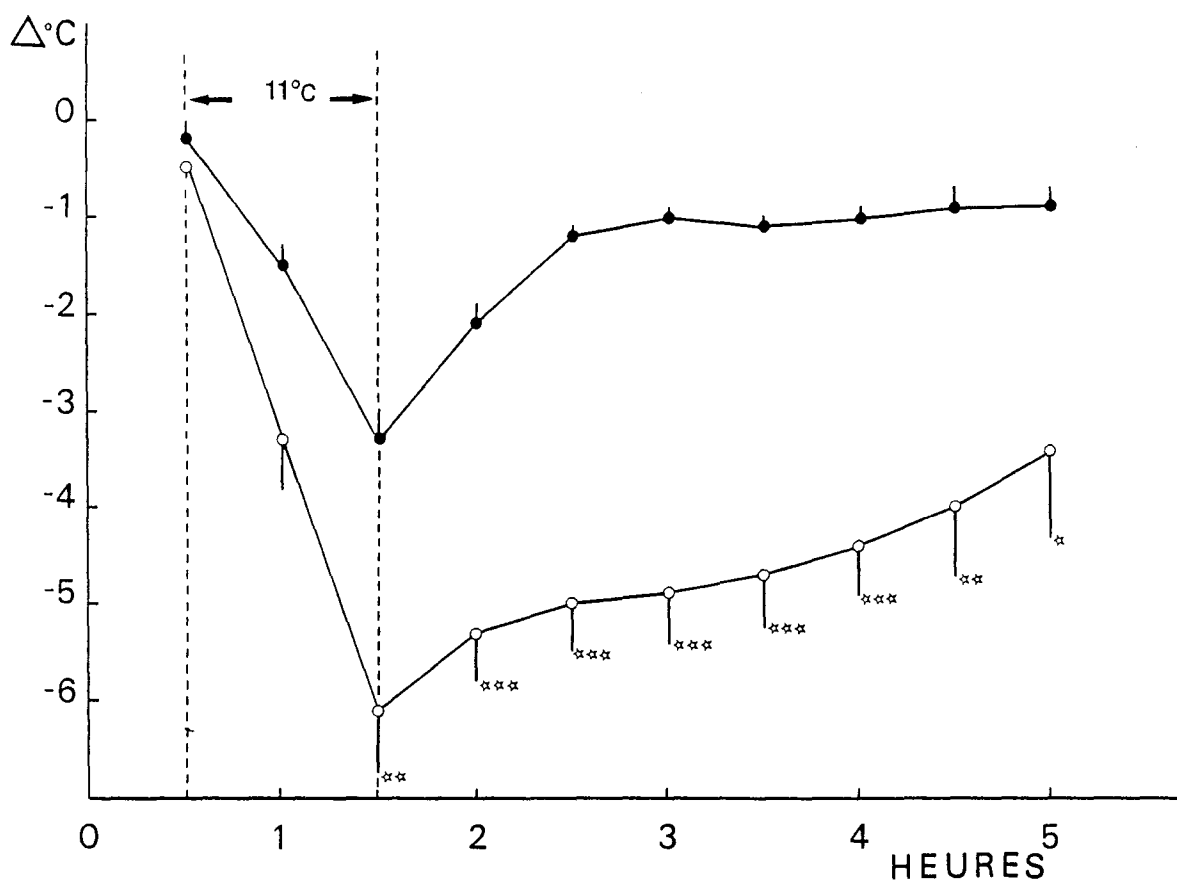


Figure 12- Variation de la température rectale ( $\Delta^{\circ}\text{C}$ ) à la suite d'une injection intracérébroventriculaire (ventricule latéral) de MSO au Rat, à une température ambiante de  $24^{\circ}\text{C}$ . La température ambiante a été abaissée à  $11^{\circ}\text{C}$ , 30mn après l'injection, pendant une durée de 60mn indiquée par les lignes verticales interrompues. ● : témoins (n=6); ○ : MSO ( $75\mu\text{g}$  par rat) (n=6). Durée en heures. \*  $p < 0,05$ ; \*\*  $p < 0,01$ , \*\*\*  $p < 0,001$ , pour les différences significatives avec les témoins.



bien chez le rat témoin, mais bien plus lentement et faiblement chez le rat soumis à l'action de la MSO, d'autant plus qu'il manifeste des convulsions.

Il y a perte de la possibilité de régulation thermique chez le rat soumis à l'action de la MSO dans la zone des températures basses.

Du point de vue comportemental, l'animal présente un syndrome d'ataxie, suivi de convulsions au froid et au chaud. Donc les convulsions peuvent se déclencher même si l'animal a une température interne basse.

Surtout, lors d'une injection intracérébroventriculaire, une température ambiante chaude protège le rat d'une hypothermie importante due à l'action de la MSO. Donc, le métabolisme cérébral semble jouer un rôle dans l'apparition de l'hypothermie.

## CONCLUSION

Chez le Rat, quand la molécule de MSO est administrée (à la dose de 150-170mg/kg, i.p.), elle est rapidement prélevée par le foie et le rein et traverse la barrière sang-cerveau. Dans le SNC le prélèvement le plus important de (<sup>3</sup>H) MSO a lieu vers 2 heures et atteint environ 1% de la dose administrée (Ghittoni et coll., 1970); puis, à 6 heures, la molécule est rapidement et uniformément distribuée sans aucune accumulation préférentielle (Schatz et coll., 1976) et elle se lie aux protéines, spécifiquement au site actif de la glutamine synthétase (Meister, 1978), principalement dans les astrocytes de la matière grise dans toutes les régions du cerveau (Norenberg, 1983). L'inhibition irréversible de l'activité de la glutamine synthétase (Meister, 1978) conduit à une élévation des teneurs en ammoniacque dans les compartiments extra et intracellulaire du cerveau: dans le sang artériel et le liquide céphalo-rachidien, les valeurs approchent 0,3mmole/kg de poids frais et dans le cerveau, elles sont proches de 0,9mmole/kg de poids frais, à 1h30 (Cooper et coll., 1979; Hindfelt, 1975). Dans les mêmes conditions expérimentales, chez le rat restreint, la MSO induit une hypothermie rectale profonde, à la température ambiante de 24°C, confirmant ainsi les résultats précédemment obtenus chez le rat libre de se déplacer (Wada et coll., 1967). L'action thermique de la MSO ne semble pas être strictement dépendante de la dose, quoique le minimum de la température rectale atteigne 1,75°C à la dose de 50mg/kg et 3,8°C à la dose de 100mg/kg, mais à une dose de 150mg/kg, le niveau de l'hypothermie n'est

pas inférieur, seule son évolution est accélérée (figure 5). L'étude de la posologie sur deux autres souches de rat confirme ces résultats. C'est toujours pendant la diminution de la température rectale que le rat perd progressivement sa capacité de manifester des réflexes de redressement et de répondre aux stimuli extérieurs nociceptifs conduisant à l'apparition d'un syndrome d'ataxie; les convulsions toniques-cloniques épisodiques ne commencent pas avant que la température rectale n'ait atteint une valeur proche de la normothermie. L'hypothermie induite par la MSO n'implique pas un mécanisme périphérique puisque, dans les mêmes conditions expérimentales, la température de la peau enregistrée à la surface de la base de la queue ne varie pas significativement (figure 6).

L'injection unilatérale de la MSO dans le ventricule latéral, à la dose de 75 $\mu$ g par animal, induit une diminution de la température rectale atteignant la même que celle induite par l'administration systémique de la molécule (figure 7). Nous avons montré que la MSO (150mg/kg, i.p.) administrée en association avec la L-méthionine (700mg/kg) supprime l'apparition du syndrome d'ataxie ainsi que les convulsions épisodiques subséquentes observées après l'administration de MSO seule, mais il y a maintien de l'hypothermie induite par la MSO seule (figure 10). Il a été trouvé auparavant que l'activité de la glutamine synthétase est uniformément diminuée dans toutes les régions du cerveau (approximativement 10% de la valeur de contrôle) quand la MSO est administrée par voie intrapéritonéale, mais quand la molécule est administrée par voie intrapéritonéale associée à la L-méthionine, l'activité de la glutamine synthétase est inférieure de 20% aux valeurs des témoins (Sellinger et coll., 1968); d'autre part, il apparaît qu'un pourcentage élevé de la radioactivité totale de (3H)MSO est trouvé dans l'hippocampe, le cervelet et l'hypothalamus des animaux recevant (3H)MSO seule. Réciproquement, un pourcentage inférieur est trouvé dans le cortex des rats recevant (3H)MSO + méthionine par rapport à celui trouvé dans le cortex des rats recevant (3H)MSO seule (Schatz et coll., 1976). En conclusion, il semblerait que l'hypothermie rectale induite par la MSO soit dépendante du stade de l'inhibition de l'activité de la glutamine synthétase dans les astrocytes de la matière grise, en particulier dans les régions du cerveau conduisant à une élévation de la concentration en ammoniac confinée à ces régions. Des résultats antérieurs ont révélé l'absence d'une relation directe entre l'inhibition de la glutamine synthéta-

se induite par la MSO et les convulsions déclenchées par cette molécule ( Sellinger et coll.,1968). Nos résultats présents prouvent que l'hypothermie rectale induite par la MSO est fonctionnellement un état de poïkilo-thermie en ambiance froide sans perturbation de la thermorégulation en ambiance chaude (figures 11 et 12). A la température du laboratoire (24°C), le rat restreint fait face à une baisse de la température ambiante, la valeur de la température d'équilibre étant de 30°C (Myers,1981; Poole, Stephenson,1977) résultant en une baisse de la température rectale. Donc la MSO peut être considérée comme une molécule hypothermique mais une relation directe ne peut pas être établie entre l'hypothermie qu'elle induit et le syndrome d'ataxie progressif associé à la perturbation de la réponse aux stimuli nociceptifs externes, puisque les rats soumis à une température ambiante chaude manifestent ce comportement. L'hypothermie induite par la MSO est un état fonctionnel ressemblant au développement de la poïkilo-thermie faisant suite à la lésion de l'aire hypothalamique postérieure (Hardy,1973).

Nous avons montré que l'injection de MSO dans le III<sup>e</sup> ventricule induit une chute de la température rectale, avec un minimum à 2heures, suivie par un retour à la normothermie associée au développement rapide du syndrome d'ataxie avec des convulsions épisodiques à environ 4heures. Ainsi, il semblerait que des structures cellulaires dans l'hypothalamus à proximité des parois du ventricule puissent être métaboliquement affectées par la MSO (figure 8). Nos expériences ont aussi montré qu'une infusion unilatérale de MSO dans 7 sites à l'intérieur de l'aire PO-HA induit une hyperthermie rectale rapide, par contre une infusion réalisée dans les mêmes conditions dans 10 sites de la région mammillaire n'est suivie d'aucun effet sur la température interne. De plus, dans ces deux séries d'expérience, le comportement des rats n'est pas affecté.

ETUDE DU ROLE JOUE PAR LA SEROTONINE DANS LE MECANISME D'INDUCTION DE  

---

L'HYPOTHERMIE PAR LA MSO  

---

On sait que la sérotonine (5-HT) joue un rôle important dans la thermorégulation (Myers, 1975b). D'autre part, une dose convulsivante de MSO produit une diminution dans le cerveau entier en 5-HT : sur 10 à 40mn, ralentissement du turnover de 5-HT dans le tronc cérébral, le mésencéphale et le striatum; sur 5 heures, diminution du turnover dans le cortex, le tronc cérébral et le striatum. (Sellinger, Dietz, 1981). Ceci pourrait être lié à des diminutions des concentrations en tryptophane dans le tissu cérébral (Blizard, Balkoski, 1982).

Est ce que l'hypothermie induite par la MSO est modifiée si l'on agit sur le métabolisme de la 5-HT ?

## 1 - Introduction

La sérotonine (5-hydroxytryptamine, 5-HT) est synthétisée à partir de l'acide aminé le tryptophane par la voie d'une hydroxylase spécifique qui forme l'intermédiaire, le 5-hydroxytryptophane (5-HTP), qui est ensuite décarboxylé en sérotonine. La sérotonine est principalement métabolisée par la monoamine oxydase type A, formant l'acide 5-hydroxyindoleacétique (5-HIAA). La sérotonine est synthétisée dans des neurones d'où ensuite elle est libérée; cependant, la sérotonine est également formée par des cellules non neuronales telles que les cellules entérochromaffines de l'intestin, et elle est stockée et libérée par des cellules telles que les plaquettes sanguines, celles-ci prélèvent la 5-HT mais ne la synthétisent pas.

Tryptophane → 5-OH-tryptophane → 5-OH-tryptamine → A-5-OH-indoleacétique

Les neurones sérotoninergiques dans le cerveau de mammifère constituent

des circuits neuronaux très étendus. Bien qu'un petit pourcentage des neurones du cerveau soit des neurones sérotoninergiques, ces derniers innervent beaucoup d'aires différentes dans le cerveau. Par suite de cette innervation extensive par les neurones sérotoninergiques, ceux-ci semblent être impliqués dans de multiples fonctions du cerveau. La sérotonine peut également influencer de nombreux tissus périphériques.

En 1979, Peroutka et Snyder définirent deux types de récepteurs 5-HT dans le cerveau à partir de la liaison de radioligands. Le récepteur 5-HT<sub>1</sub> fut marqué par la (3H)-5-HT. Les agonistes avaient généralement une affinité supérieure à celle des antagonistes pour ce récepteur. De plus, un certain nombre de preuves démontraient que ce récepteur était lié à l'adénylate cyclase. Le récepteur 5-HT<sub>2</sub> fut marqué dans le cortex frontal par la (3H)spipérone. Les antagonistes avaient une affinité pour ce récepteur supérieure à celle des agonistes. Par la suite, il fut démontré que la (3H)-5-HT ne se lie pas à un seul site, mais à des sites multiples qui peuvent être différenciés en fonction de leur affinité pour d'autres agents.

Les études les plus récentes établissent que 5 sous-types de récepteurs 5-HT peuvent être définis dans le tissu cérébral en fonction de la liaison de radioligands, ce sont les récepteurs 5-HT<sub>1A</sub>, 5-HT<sub>1B</sub>, 5-HT<sub>1C</sub>, 5-HT<sub>1D</sub> et 5-HT<sub>2</sub>. Il existerait également un récepteur 5-HT<sub>3</sub>.

Il est intéressant de préciser que le récepteur 5-HT<sub>1A</sub> est un site de liaison à haute affinité pour la 5-HT, il est peut-être le médiateur de certaines actions comportementales et de l'effet hypothermique. Le récepteur 5-HT<sub>2</sub> est un site de liaison à grande affinité pour l'antagoniste la (3H) ketanserin, il peut être le médiateur de l'effet hyperthermique (Koenig, et coll., 1988).

5-HT est formée à l'intérieur de la terminaison nerveuse, elle est stockée dans des vésicules, elle est libérée lors de l'influx nerveux dans la fente synaptique. Là, elle agit sur des récepteurs sur le neurone postsynaptique pour réaliser le phénomène de la neurotransmission à travers la synapse. La 5-HT dans la fente synaptique est inactivée principalement par transport en retour à l'intérieur de la terminaison nerveuse grâce à l'intervention de transporteurs de membrane spécifiques ou de pompes à prélèvement sur la membrane nerveuse. Une fois à l'intérieur du neurone 5-HT, la 5-HT est déjà inactive dans la mesure où les récepteurs synaptiques sont concernés et elle peut soit être ré-utilisée dans des vésicules de stocka-

ge ou dégradée métaboliquement par la monoamine oxydase. En plus des récepteurs postsynaptiques; des autorécepteurs semblent aussi exister sur les terminaisons nerveuses sérotoninergiques elles-mêmes. L'activation de ces autorécepteurs conduit à la diminution de la synthèse et de la libération de 5-HT. Apparemment, l'autorécepteur a le rôle physiologique de sonder la concentration en 5-HT de la fente synaptique et en conséquence de moduler la libération ultérieure et la synthèse de 5-HT. La figure 13 est une représentation schématique des événements se déroulant à une synapse sérotoninergique (Fuller, 1988); (voir aussi la figure 13 bis).

L'hypothalamus, le noyau dorsal du raphé en particulier sont riches en sites 5-HT<sub>1</sub> (Pazos, Palacios, 1985). Les corps mammillaires contiennent une concentration moyenne en 5-HT<sub>2</sub> (Pazos et coll., 1985). La concentration la plus élevée en récepteur sérotoninergique, dans le cerveau apparaît être à l'intérieur des plexus choroïdes (5-HT<sub>1C</sub>, Meibach, 1984). Les neurones sérotoninergiques ont également été trouvés formant des plexus dans les parois épendymaires limitant les ventricules (Meibach, 1984).

La réponse hypothermique du rat à l'action de l'agoniste du récepteur 5-HT<sub>1A</sub>, le 8-hydroxy-2-(di-n-propylamino)tétralin (8-OH-DPAT) serait due à sa liaison à des autorécepteurs présynaptiques (Goodwin et coll., 1987) ou à des récepteurs postsynaptiques étant donné que ces derniers résistent à une forte déplétion du cerveau en 5-HT après traitement par la para-chlorophénylalanine (PCPA) (Hutson et coll., 1987).

Le syndrome comportemental 5-HT peut être provoqué par administration de précurseurs 5-HT ou d'agonistes 5-HT à de nombreuses espèces, mais il est étudié le plus souvent chez le Rat (Jacobs, 1976). Les symptômes du syndrome furent définis à l'origine comme étant,

(1) : l'abduction des membres postérieurs, (2) : la marche des pattes antérieures, (3) : le va-et-vient latéral de la tête, (4) : le tremblement de repos, (5) : la rigidité des membres postérieurs, (6) : la queue de Straub. Si les rats montraient 4 de ces 6 signes, ils étaient comptés comme montrant le syndrome. Les symptômes du syndrome 5-HT seraient provoqués par l'activation des récepteurs 5-HT<sub>1A</sub> post-synaptiques (Tricklebank et coll., 1985).

Des études récentes démontrent que des agonistes sélectifs des récepteurs 5-HT injectés par la voie systémique ou 5-HT elle-même injectée par

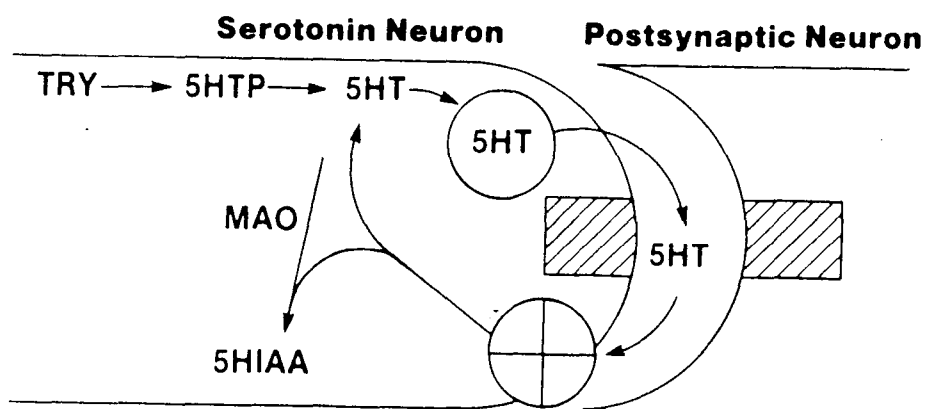


Figure 13- Représentation d'une synapse sérotonergique pour illustrer les sites possibles de l'action de molécules. Des molécules peuvent agir directement sur le récepteur postsynaptique en mimant ou en bloquant l'action de 5-HT. Des molécules peuvent augmenter la quantité de 5-HT agissant sur le récepteur postsynaptique par augmentation des réserves intraneurales de 5-HT de telle sorte qu'une quantité supérieure est libérée, par libération de 5-HT directement ou par inhibition du reprélèvement de 5-HT. Des molécules peuvent diminuer la quantité de 5-HT agissant sur le récepteur postsynaptique en épuisant les réserves intraneurales de 5-HT ou en activant l'autorécepteur présynaptique pour freiner la libération de 5-HT (d'après Fuller, 1988).



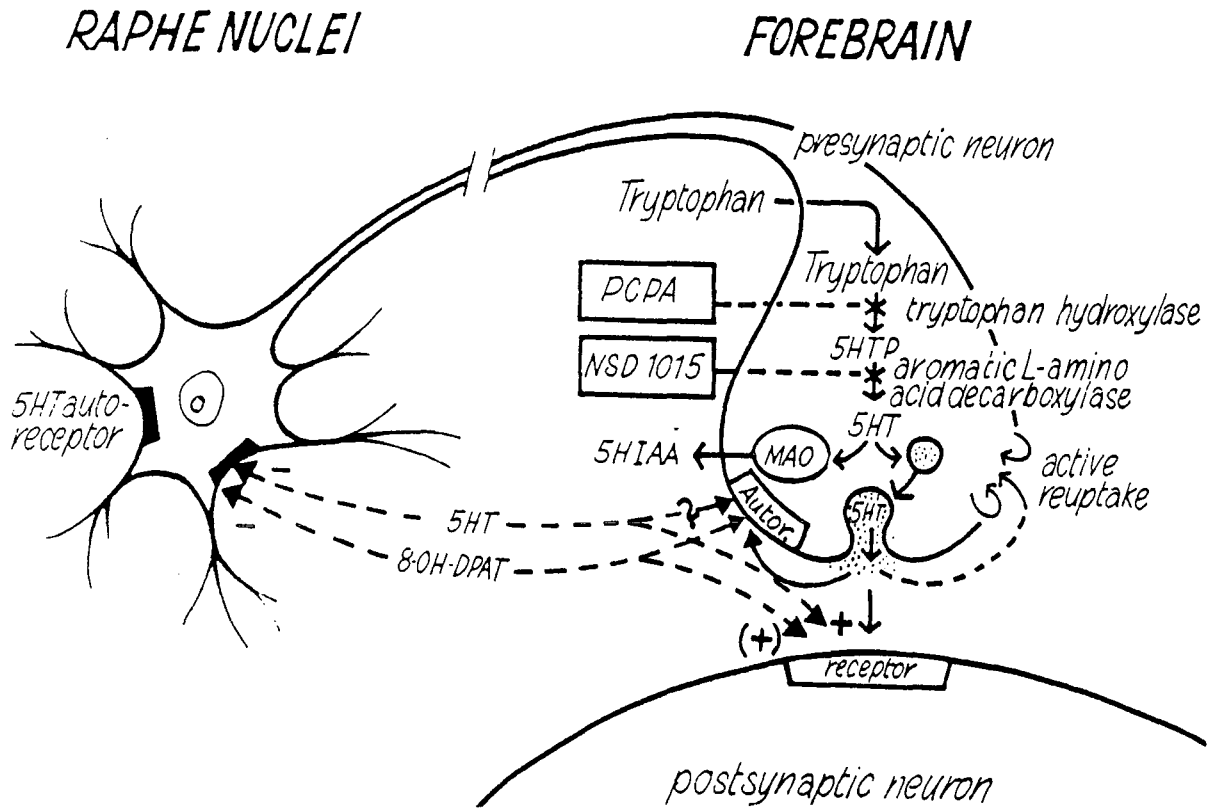


Figure 13 bis

Représentation schématique d'un neurone sérotonergique : le corps cellulaire et la région terminale.

(d'après Hillegaart v., 1991, Functional topography of brain serotonergic pathways in the rat, Acta Physiol. Scand., 142).

MOLECULES	5-HT <sub>1A</sub>	5-HT <sub>1B</sub>	5-HT <sub>1C</sub>	5-HT <sub>1D</sub>	5-HT <sub>2</sub>
8-OH-DPAT	8,74	4,22	5,24	5,94	5,04
Buspirone	7,58	3,94	5,08	4,48	6,07
Ketanserin	5,86	5,72	7,01	6,00	8,86
Cyproheptadine	6,45	5,32	7,86		8,46
(+) pindolol	5,93	5,02	4,42		4,93
(-) pindolol	7,71	7,75	4,23	5,23	4,35
(-) propranolol	6,81	7,33	6,75	5,49	5,65
Phentolamine	5,52	5,37	6,05		6,06
Yohimbine	6,86	5,46	4,37	7,12	5,95
Prazosin	5,00	5,10	4,70		4,96

Tableau : Valeurs de l'affinité des agonistes et des antagonistes de diverses classes structurales utilisés ou cités dans ce travail, pour les sous-types des récepteurs 5-HT<sub>1</sub> et 5-HT<sub>2</sub> (valeurs du pK<sub>D</sub>, exprimées en -log mol/l).  
(d'après Hoyer, 1988).

la voie intracérébroventriculaire et directement dans le cerveau du Rat ou de la Souris, induisaient l'hypothermie corporelle par l'activation des récepteurs 5-HT<sub>1</sub>, probablement le récepteur sous-type 5-HT<sub>1A</sub> (Goodwin et coll., 1985 et 1987; Gudelsky et coll., 1986; Hjorth, 1985; Hutson et coll., 1987; Wozniak et coll., 1988; Yamada et coll., 1988).

Les expériences qui vont suivre ont été mises au point pour déterminer si une relation pouvait exister entre le ralentissement du taux de "turnover" de 5-HT dans le système nerveux central (Sellinger et Dietz, 1981) et la diminution de la température corporelle, chez le Rat soumis à l'action d'une dose convulsivante de MSO, la molécule étant administrée par la voie systémique et par la voie intracérébroventriculaire. Les effets d'une déplétion en 5-HT seront étudiés, soit par prétraitement aigu par une dose élevée de PCPA, inhibiteur de l'étape "rate-limiting" de la synthèse de 5-HT (Alexander et coll., 1988; Borbély et coll., 1973; Jequier et coll., 1967; Koe et Weissman, 1966; Lorens, 1978) ou par un prétraitement par les deux dérivés de l'amphétamine, PCA et FFA, qui induisent la libération de 5-HT suivie par des diminutions persistantes des concentrations en métabolites de 5-HT dans le cerveau antérieur reflétant la dégénérescence des terminaisons axoniques sérotonergiques dans de nombreuses régions du cerveau antérieur (Fuller et coll., 1965; Mamounas et Molliver, 1988; Molliver et Molliver 1990; Ricaurte et coll., 1985; Sanders-Bush et Steranka, 1978). Inversement, une charge en 5-HTP est faite par administration du précurseur immédiat de 5-HT seul ou simultanément par prétraitement avec la carbidopa, un inhibiteur de la décarboxylase périphérique, induisant une augmentation de la concentration en 5-HT dans le système nerveux central (Anderson et coll., 1987; Bedard et Pycock, 1977; Bogdanski et coll., 1958; Löscher et coll., 1984; Maeda et coll., 1984; Sakumoto et coll., 1984; Trulson et Jacobs, 1975).

L'action de la MSO pourrait conduire à la libération de 5-HT à partir des terminaisons axoniques ou dendritiques des neurones sérotonergiques à la suite de l'élévation des teneurs en ammoniac dans les compartiments extra- et intracellulaires du cerveau (Erecinska et coll., 1987), résultant de l'inhibition irréversible de la glutamine synthétase (Cooper et coll., 1979; Hindfelt, 1975; Meister, 1978). L'indoleamine libre dans le compartiment extracellulaire activerait certains récepteurs pré- ou postsynaptiques dans différentes régions du système nerveux central, cette activation induisant

l'hypothermie. La validité de cette hypothèse de travail est vérifiée par une étude des effets du (+)pindolol et du (-)propranolol, antagonistes puissants des récepteurs 5-HT<sub>1</sub>, et de la Ketanserin, antagoniste des récepteurs 5-HT<sub>2</sub> (Glennon 1987; Hoyer, 1988).

## 2 - Administration de molécules

La DL-p-chlorophénylalanine méthyl ester (PCPA), chlorhydrate (Sigma) (300mg/kg), est dissoute dans NaCl à 0,9% et est injectée par voie i.p. 48 heures avant l'administration de MSO.

La DL-p-chloroamphétamine (PCA), chlorhydrate (Sigma) (6mg/kg), est dissoute dans NaCl à 0,9%. Immédiatement avant l'administration de la molécule, le rat est placé dans une température ambiante de +12°C, puis il reçoit deux injections intrapéritonéales (à 24h d'intervalle) de PCA (Mamounas, Molliver, 1988). 24 heures après la deuxième injection, l'animal est replacé dans la température ambiante normale de +24°C et la MSO est injectée 5 jours plus tard.

La D-fenfluramine (FFA), chlorhydrate (I.R.I. Servier, Neuilly) (40 mg/kg), dissoute dans NaCl à 0,9% est injectée par voie sous-cutanée 24 heures avant l'administration de MSO (Knapp, Mandell, 1976).

Le 5-hydroxy-L-tryptophane (5HTP) (Sigma) (50-200mg/kg) dissous dans NaCl à 0,9% chauffé, est injecté par voie i.p. seul ou 30mn après le pré-traitement avec la carbidopa (Merck Sharp and Dohme, Rahway, N.J.) (10mg/kg) dissoute grâce à une quantité équimolaire de HCl dissous dans NaCl à 0,9% et injectée par voie i.p., la MSO est injectée 15mn plus tard.

Le (+) Pindolol (Sigma) (1,5-6mg/kg), dissous dans HCl dilué dans NaCl à 0,9%, est injecté par voie sous-cutanée une heure avant l'administration de MSO.

Le (-)Propranolol, chlorhydrate (Sigma) (16-25mg/kg, i.p.), dissous dans NaCl à 0,9%, est injecté 20mn avant la MSO.

La Ketanserin, tartrate (Janssen Pharmaceutica, Beerse) (0,7-1,4mg/kg, i.p.) dissoute dans NaCl à 0,9%, est injectée 20mn avant la MSO.

## 3 - Résultats expérimentaux

La MSO est injectée soit par voie intrapéritonéale à la dose de 150 mg/kg, soit par voie intracérébroventriculaire à la dose de 75ug dans le

ventricule latéral ou à la dose de 60ug dans le III<sup>e</sup> ventricule.

Les rats sont maintenus restreints et à la température ambiante de 24°C.

#### a-Déplétion en 5-HT

Comme il a été précisé dans " Administration de molécules ", les rats soumis à la MSO, ont été traités au préalable par trois molécules provoquant la déplétion en 5-HT, ce sont la PCPA, la PCA et la FFA.

Le traitement au préalable par une dose unique, élevée de PCPA (300mg/kg) est suivi d'une forte hypothermie légèrement supérieure à celle induite par la MSO seule (figures 14 et 15). Les rats manifestent rapidement un syndrome d'ataxie associé à un myoclonus des membres postérieurs et éventuellement à des convulsions toniques-cloniques généralisées.

Les résultats obtenus avec des rats traités au préalable par la PCA (deux injections de 6mg/kg, i.p.) ou la FFA (40mg/kg, s.c.) ressemblent à ceux obtenus avec les animaux traités au préalable par la PCPA. L'hypothermie induite par la MSO n'est pas statistiquement différente de l'hypothermie enregistrée chez les rats recevant la MSO seule (figures 14 et 15). Les rats manifestent un syndrome d'ataxie associé à un état d'inertie (flat body posture) et un déclenchement précoce des convulsions toniques-cloniques, particulièrement chez les animaux traités au préalable par la FFA recevant la MSO dans le III<sup>e</sup> ventricule 24 heures plus tard.

#### b-Charge en 5-HTP

Les rats soumis à la MSO sont prétraités par deux doses de 5-HTP (100 ou 200 mg/kg, i.p.) seul et par deux doses de 5-HTP (50 ou 100 mg/kg, i.p.) associé au préalable à la carbidopa (10mg/kg, i.p.). Comme on l'a observé auparavant (Carter, Leander, 1980; Henning, Rubenson, 1971; Lin et coll., 1978), l'administration de 5-HTP chez le rat produit un effet hypothermique qui paraît résulter d'une action de 5-HTP (ou de métabolites) hors de la barrière sang-cerveau: dans nos expériences cette hypothermie est évidente chez les animaux témoins recevant 5-HTP (200mg/kg, i.p.) seul. Le prétraitement avec le 5-HTP (100mg/kg, i.p.) seul ne modifie ni l'évolution ni l'amplitude de l'hypothermie induite par la MSO (figure 16), mais tous les animaux sont atteints d'inertie sans hypertonie musculaire ou clonus. Le pré-

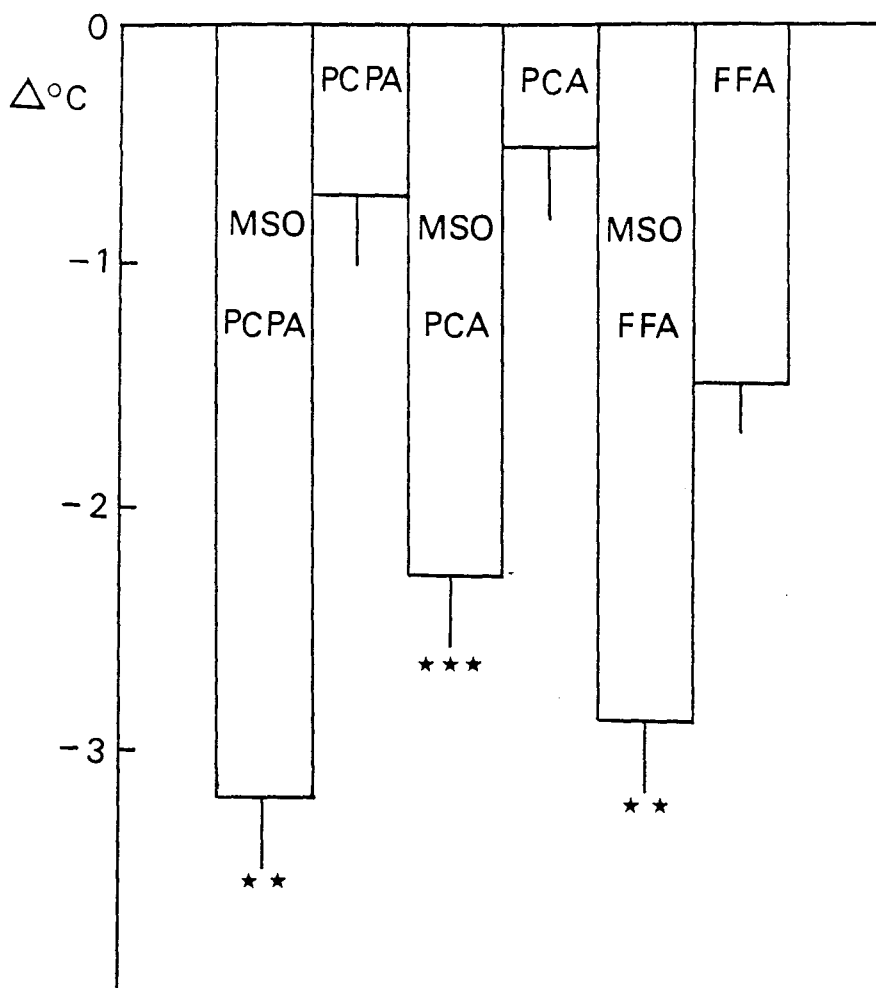


Figure 14- Amplitude maximum de l'hypothermie rectale ( $\Delta^{\circ}\text{C}$ ) à la suite de l'injection intrapéritonéale de MSO (150mg/kg) au Rat, à une température ambiante de  $24^{\circ}\text{C}$ . Prétraitement par PCPA (300mg/kg, i.p.) (colonne MSO-PCPA) (n=4); témoins (colonne PCPA) (n=4). Prétraitement par PCA (2x6mg/kg, i.p.) (colonne MSO-PCA) (n=4); témoins (colonne PCA) (n=4). Prétraitement par FFA (40mg/kg, s.c.) (colonne MSO-FFA) (n=4); témoins (colonne FFA) (n=4). \*\*  $p < 0,01$ , \*\*\*  $p < 0,001$ , pour les différences significatives avec les témoins respectifs.

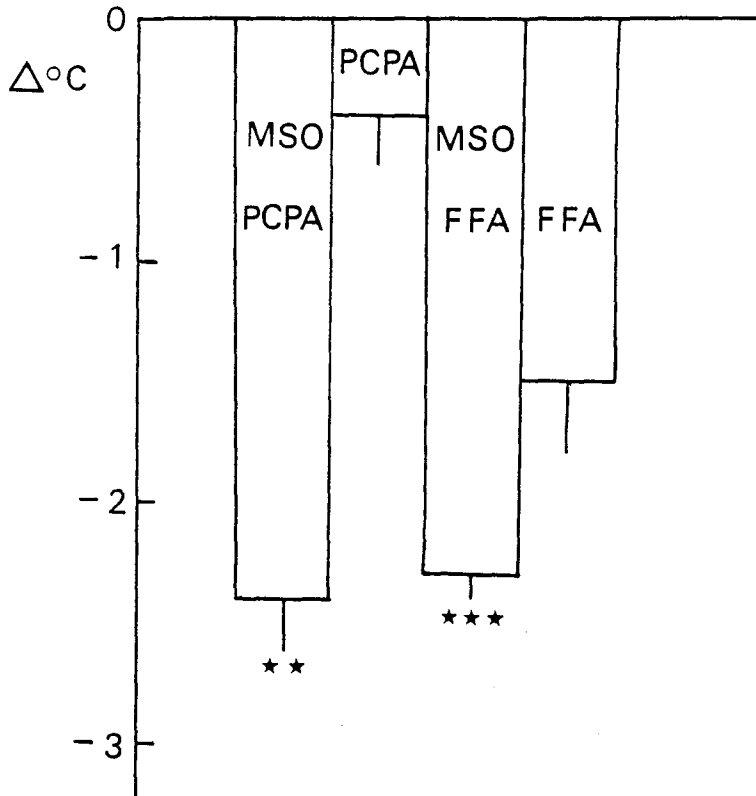


Figure 15- Amplitude maximum de l'hypothermie rectale ( $\Delta^{\circ}\text{C}$ ) à la suite de l'injection intracérébroventriculaire (III<sup>e</sup> ventriculaire) de MSO (60 $\mu\text{g}$  par rat) au Rat, à une température ambiante de 24 $^{\circ}\text{C}$ . Prétraitement par PCPA (300mg/kg, i.p.) (colonne MSO-PCPA) (n=3); témoins (colonne PCPA) (n=4). Prétraitement par FFA (40mg/kg, s.c.) (colonne MSO-FFA) (n=3); témoins (colonne FFA) (n=4). \*\*  $p < 0,01$ , \*\*\*  $p < 0,001$ , pour les différences significatives avec les témoins respectifs.

traitement par le 5-HTP (200mg/kg,i.p.) seul ou par le 5-HTP (100mg/kg,i.p.) associé au préalable à la carbidopa (10mg/kg,i.p.) supprime l'hypothermie induite par la MSO,notamment chez les animaux soumis à une injection de MSO dans le III<sup>e</sup> ventricule (figure 17),cependant ces derniers montrent une inertie de longue durée,avec le blocage du réflexe de redressement associé à un mouvement d'extension et de flexion anormal des membres postérieurs,mais sans aucune manifestation d'hypertonie musculaire.Comme on l'a décrit auparavant (Colpaert et coll.,1989),les rats recevant la MSO dans le III<sup>e</sup> ventricule exhibent une "flat body posture" importante.Chez les rats prétraités par le 5-HTP (50mg/kg,i.p.) associé au préalable à la carbidopa (10mg/kg,i.p.) et ensuite soumis à la MSO (150mg/kg,i.p.),l'hypothermie rectale enregistrée est approximativement 50% plus faible que celle enregistrée chez les rats prétraités par le 5-HTP (100mg/kg,i.p.) seul (figure 16) ;dans ces conditions expérimentales,tous les animaux sont atteints d'inertie associée à une "flat body posture". Le traitement au préalable par le 5-HTP (200mg/kg et 100mg/kg,i.p.) puis l'injection de MSO (150mg/kg,i.p.) entraînent la mort de 75% des rats,dans les 24 heures suivant les injections.

### c-Intervention éventuelle des récepteurs 5-HT

-Type 5-HT<sub>1</sub> : Effets d'antagonistes non sélectifs

Le prétraitement des rats soumis à la MSO par le (+) pindolol (1,5-6mg/kg,s.c) a conduit à deux effets sur l'hypothermie rectale.Aux doses de 1,5 et 3,0mg/kg,le pindolol atténue statistiquement ou même inhibe l'hypothermie induite par la MSO (figures 18,19,20).Les animaux souffrent d'un syndrome d'ataxie,avec marche des membres antérieurs,aucun ajustement de la posture,le myoclonus des membres postérieurs et pour ceux recevant une injection de MSO dans le III<sup>e</sup> ventricule,un comportement de rotation. Certains des rats recevant la MSO dans le ventricule latéral,manifestent plus tard des convulsions et même sont encore atteints d'ataxie 24 heures après l'injection de MSO. A la dose de 6mg/kg,le pindolol ne modifie pas statistiquement ni le développement,ni l'amplitude de l'hypothermie induite par la MSO (figure 18),tous les animaux exhibent un syndrome d'ataxie accompagné d'une "flat body posture".

Le prétraitement par le (-) propranolol (16-25mg/kg,i.p.) provoque une hypothermie rectale immédiate chez les rats recevant



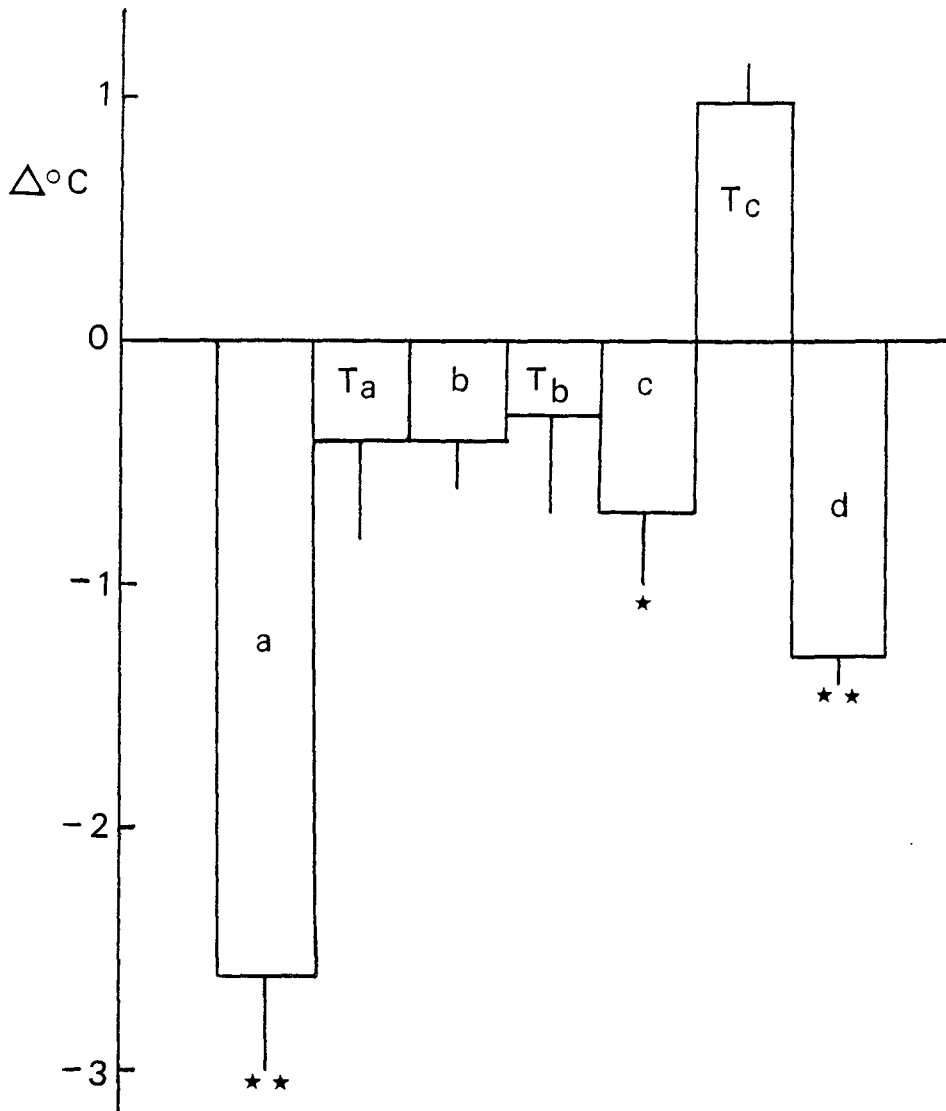


Figure 16- Amplitude maximum de la variation de la température rectale ( $\Delta^{\circ}\text{C}$ ) à la suite de l'injection intrapéritonéale de MSO.

(150mg/kg) au rat, à une température ambiante de 24°C.

Prétraitement par 5-HTP (100mg/kg, i.p.) (colonne a) (n=5); témoins (colonne T<sub>a</sub>) (n=4), 20mn avant la MSO.

Prétraitement par 5-HTP (200mg/kg, i.p.) (colonne b) (n=4); témoins (colonne T<sub>b</sub>) (n=4), 20mn avant la MSO.

Prétraitement par 5-HTP (100mg/kg, i.p.) préassocié à carbidopa (10mg/kg, i.p.) (colonne c) (n=4); témoins (colonne T<sub>c</sub>) (n=4), 30mn avant le 5-HTP.

Prétraitement par 5-HTP (50mg/kg, i.p.) préassocié à carbidopa (10mg/kg, i.p.) (colonne d) (n=4); témoins non représentés (n=4), 30mn avant le 5-HTP.

\*  $p < 0,05$ , \*\*  $p < 0,01$ , pour les différences significatives avec les témoins respectifs.

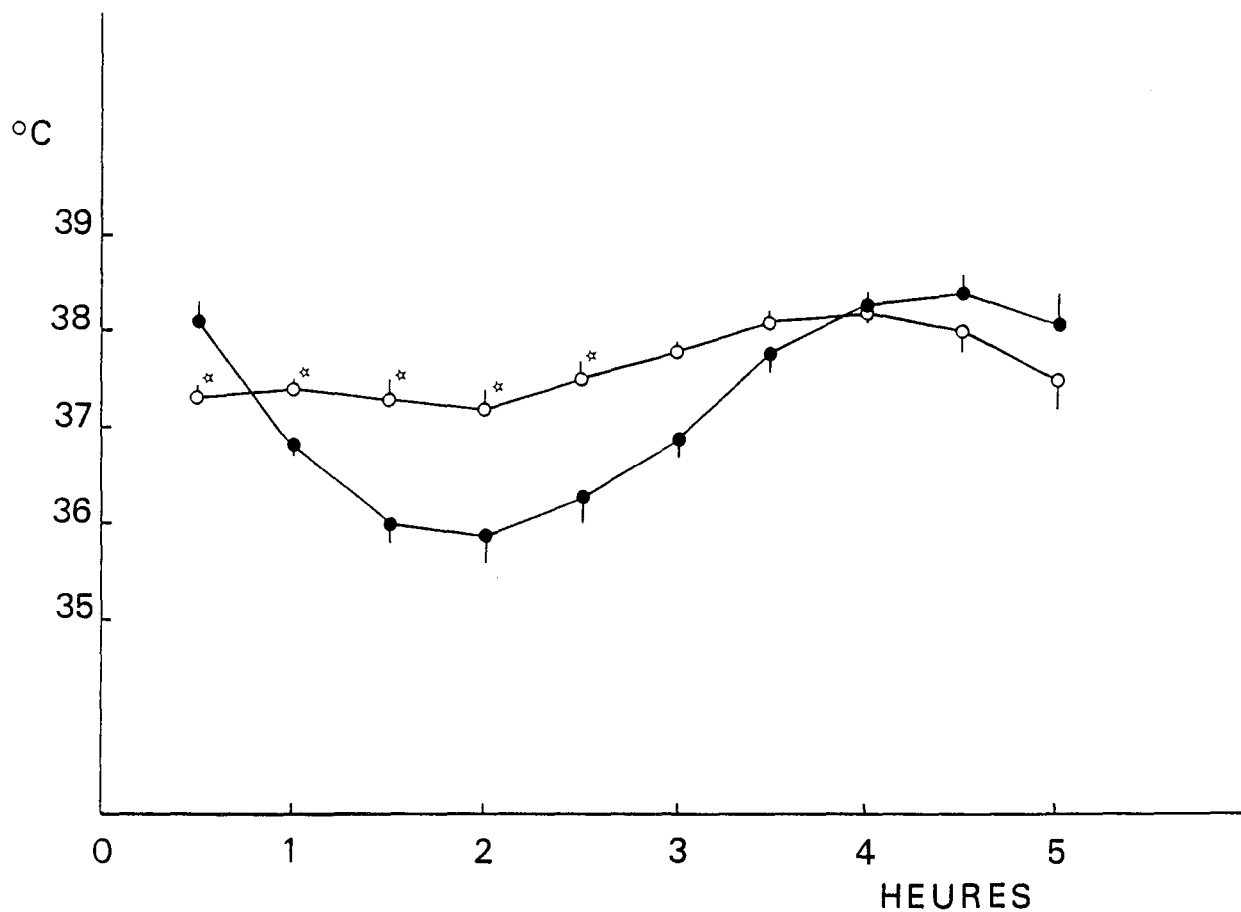


Figure 17- Variations de la température rectale à la suite de l'injection intracérébroventriculaire (III<sup>e</sup> ventricule) de MSO au Rat, à la température ambiante de 24°C. ○: 5-HTP (200mg/kg, i.p.) 15mn avant l'injection de MSO (60µg par rat) (n=5); ●: témoins recevant MSO (60µg par rat) (n=5) dans le III<sup>e</sup> ventricule. \*  $p < 0,01$  pour la différence significative avec les témoins.

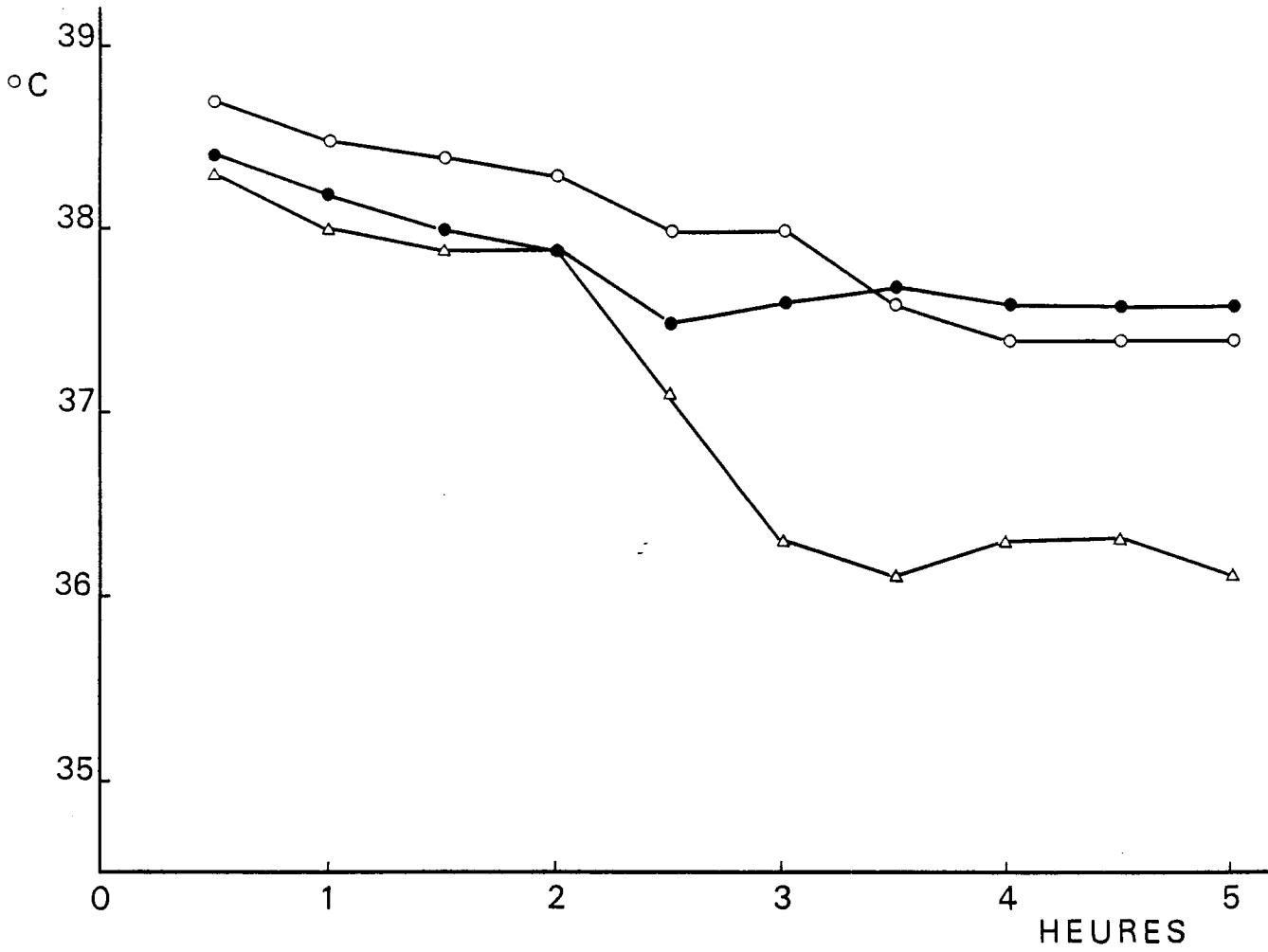


Figure 18- Evolution de la température rectale ( °C) à la suite d'une injection intrapéritonéale de MSO (150mg/kg) à 3 rats. ○ : prétraitement par ( $\pm$ )pindolol (3mg/kg,s.c.); △:prétraitement par ( $\pm$ ) pindolol (6mg/kg;s.c.); ● : rat témoin ( ( $\pm$ )pindolol 3mg/kg,s.c.). Température ambiante de 24°C. Durée en heures. I.s.c. de ( $\pm$ )pindolol 60mn avant la MSO.

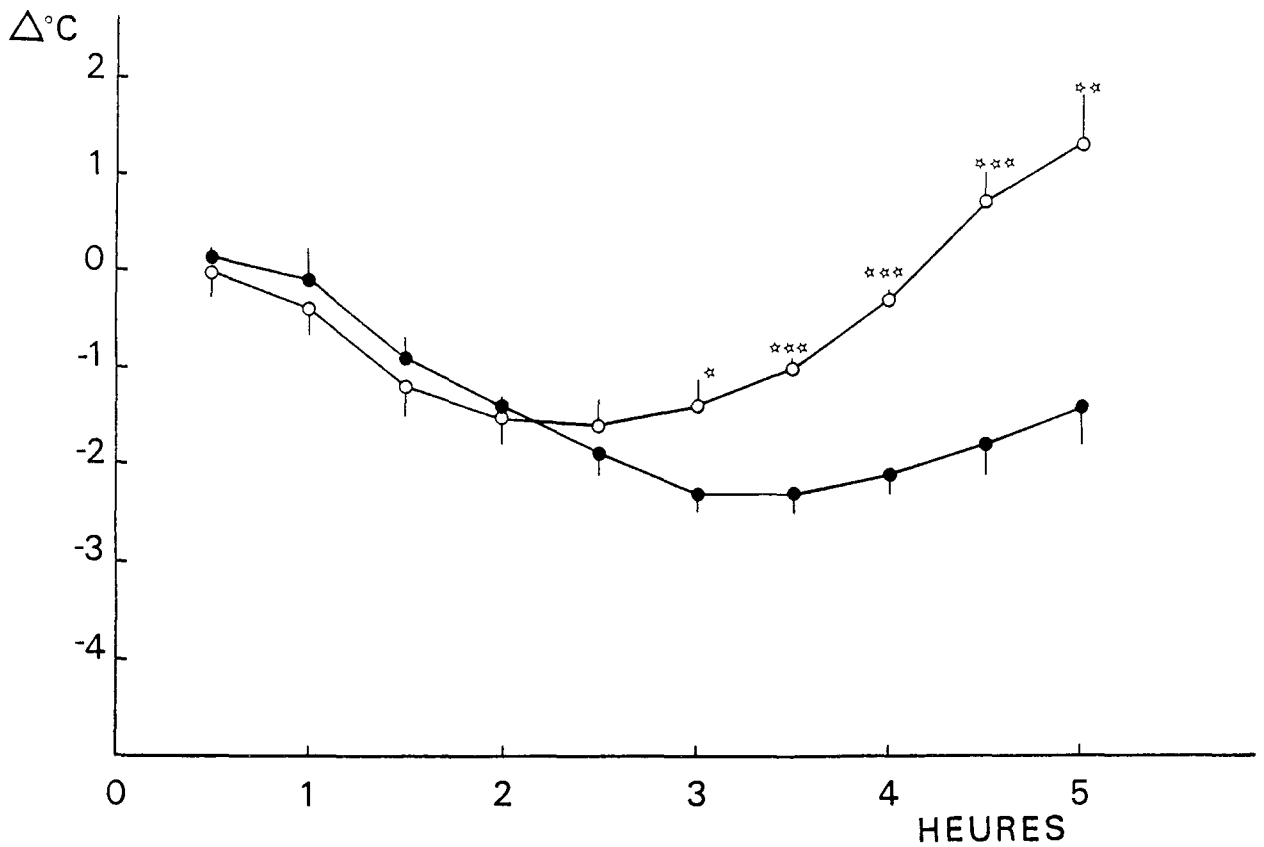


Figure 19- Variation de la température rectale ( $\Delta^{\circ}\text{C}$ ) à la suite d'une injection intracérébroventriculaire (ventricule latéral) de MSO (75 $\mu\text{g}$  par rat) au rat, à la température ambiante de 24 $^{\circ}\text{C}$ . ○ : (±)pindolol (3mg/kg), s.c.) 60mn avant (n=5); ● : témoins, MSO seule (n=5). \*  $p < 0,05$ , \*\*  $p < 0,01$ , \*\*\*  $p < 0,001$ , pour les différences significatives avec les témoins.

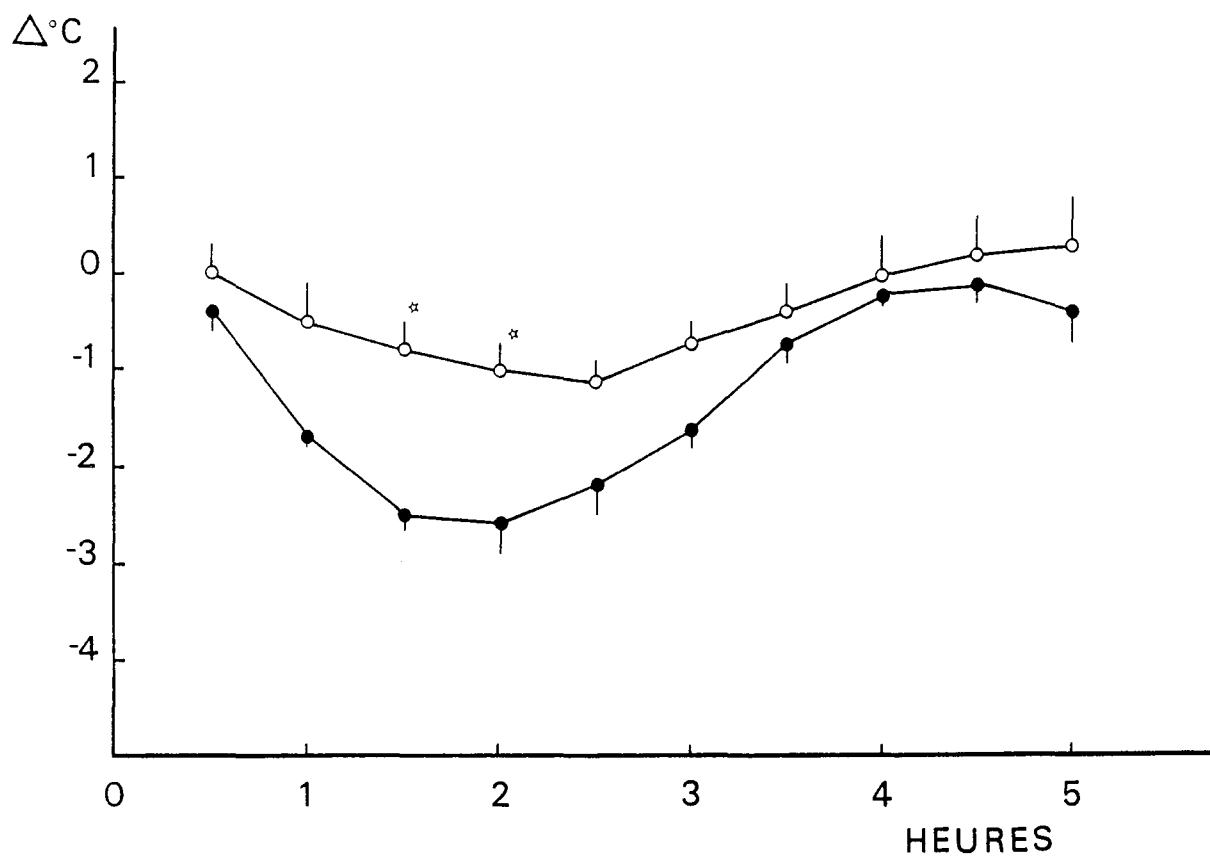


Figure 20- Variation de la température rectale ( $\Delta^{\circ}\text{C}$ ) à la suite d'une injection intracérébroventriculaire (III<sup>e</sup> ventricule) de MSO (60 $\mu\text{g}$  par rat), à la température ambiante de 24 $^{\circ}\text{C}$ . ○: (+)pindolol (3mg/kg, s.c.) 60mn avant (n=6); ●: témoins, MSO seule (n=5). \*  $p < 0,01$ , pour les différences significatives avec les témoins.

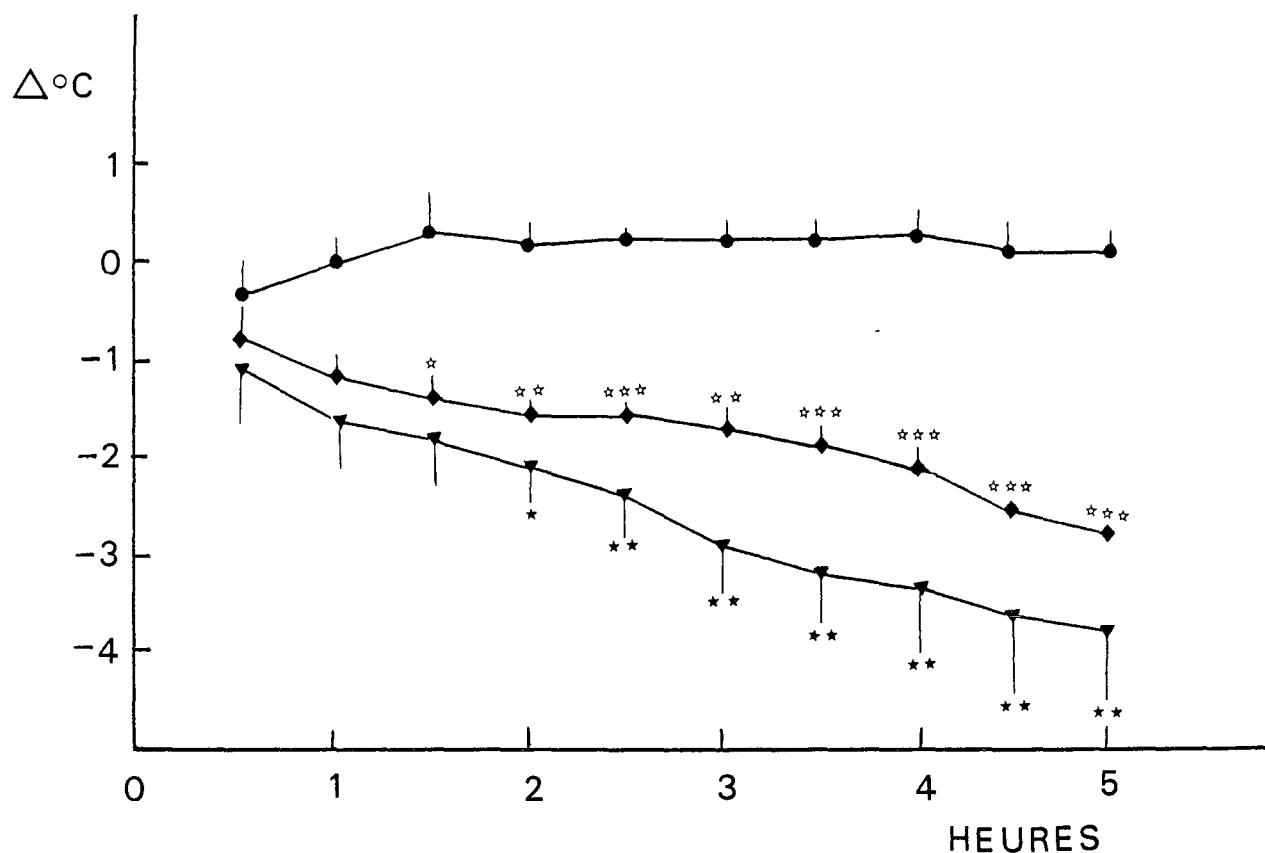


Figure 21- Variation de la température rectale ( $\Delta^{\circ}\text{C}$ ) à la suite d'une injection intrapéritonéale de MSO (150mg/kg, i.p.) au rat, à la température ambiante de  $24^{\circ}\text{C}$ . ▼ : (-)propranolol (16mg/kg, i.p.), 15mn avant; ◆ : (-)propranolol (25mg/kg, i.p.), 15mn avant la MSO; ● : témoins. Durée en heures.

★  $p < 0,05$ , ★★  $p < 0,01$ , ★★★  $p < 0,001$ , pour les différences significatives avec les témoins.

Pour chaque série d'expérience  $n=4$ .

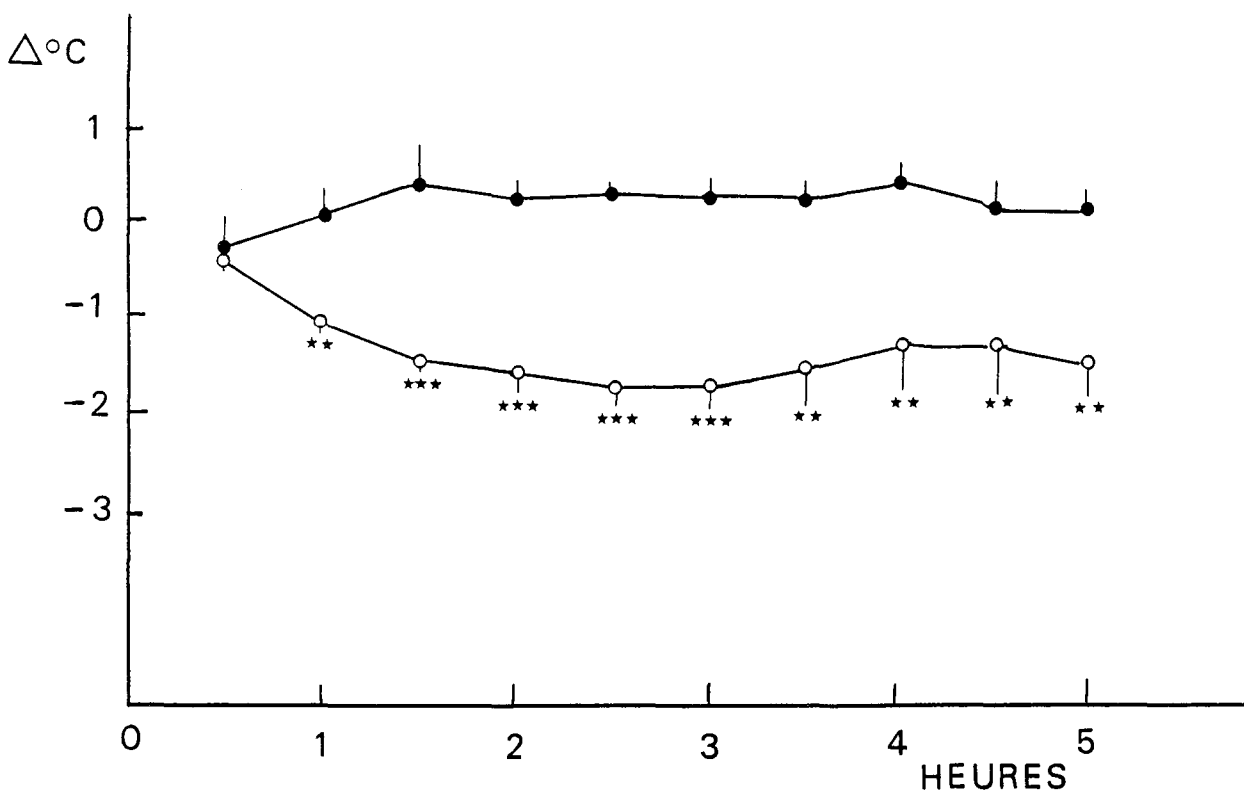


Figure 22- Variation de la température rectale ( $\Delta^{\circ}\text{C}$ ) à la suite d'une injection intracérébroventriculaire (III<sup>e</sup> ventricule) de MSO (60ug par rat) au rat, à la température ambiante de  $24^{\circ}\text{C}$ . ○ : (-)propranolol 16mg/kg, i.p.), 20mn avant la MSO; ● : témoins.

★★ $p < 0,01$ , ★★★ $p < 0,001$ , pour les différences significatives avec les témoins. Durée en heures.

Pour chaque expérience  $n=4$ .

la MSO dans le III<sup>e</sup> ventricule ( $p < 0,001$  à 1h), cette hypothermie s'étend jusqu'à 5h ( $p < 0,01$ ) (figure 22), en outre, l'amplitude de l'hypothermie induite par la MSO injectée par voie intrapéritonéale augmente (figure 21). Tous les animaux prétraités par le propranolol recevant ensuite la MSO par la voie systémique ne montrent aucun ajustement de la posture mais une abduction des membres postérieurs, réciproquement, ceux recevant la MSO dans le III<sup>e</sup> ventricule exhibent un syndrome d'ataxie avec myoclonus des membres postérieurs ou même des convulsions toniques-cloniques suivies d'opisthotonos.

-Type 5-HT<sub>2</sub> : Effet d'un antagoniste sélectif

En présence de Ketanserin (0,7-1,4mg/kg, i.p.) l'hypothermie induite par la MSO n'est pas statistiquement différente de celle enregistrée avec la MSO seule, de même que le comportement associé chez tous les animaux recevant la MSO par la voie systémique; cependant, pour la majeure partie des rats recevant la MSO dans le III<sup>e</sup> ventricule le prétraitement par la Ketanserin est associé à des convulsions toniques-cloniques suivies d'opisthotonos.

#### 4 - Conclusion

Il a été montré qu'une concentration d'ammoniaque de 0,1 à 10mM stimule la sécrétion d'amines, en particulier la 5-HT, d'une intensité dépendant de la concentration, à partir des synaptosomes du cerveau du rat (Erecinska et coll., 1987). L'ammoniaque induit une alcalinisation des vésicules de stockage intrasynaptiques provoquant ainsi une sortie des amines dans le cytoplasme et leur fuite subséquente dans le milieu extérieur par une inversion des transporteurs de la membrane plasmique (Erecinska et coll., 1987). Ainsi, l'augmentation progressive de la concentration en ammoniaque dans le cerveau du rat, jusqu'à 4 à 5heures, à la suite de l'administration de MSO, pourrait être suffisante pour induire une fuite et une déplétion de la 5-HT en premier lieu au niveau des neurones sérotoninergiques, leurs somas étant localisés dans les noyaux du raphé du mésencéphale. Dans nos expériences concernant l'existence éventuelle d'une relation entre l'hypothermie induite par la MSO et le métabolisme cérébral de la 5-HT, les effets d'une réduction des concentrations en 5-HT sont étudiés par un traitement aigu par la PCPA, la PCA et la FFA. La PCPA provoque une inhibition de la synthèse de la 5-HT, principalement dans le cerveau antérieur mais moins dans les somas des neurones sérotoninergiques (Aghajanian et coll.,



1973), simultanément avec une déplétion périphérique et centrale en 5-HT (Alexander et coll.,1988; Chaput et coll.,1990; Koe,Weissman,1966; Lorens, 1978).La PCA et la FFA induisent la libération de 5-HT à partir du compartiment extravésiculaire synaptique (Fuller et coll.,1988; Garattini et coll. 1987; Kuhn et coll.,1985; Sarkissian et coll.,1990; Trulson,Jacobs,1976), liée dans le cerveau antérieur,à une perte sélective des terminaisons 5-HT à partir du noyau dorsal du raphé mais non à partir du noyau médian du raphé (Blier et coll.,1990; Mamounas,Molliver,1988; Molliver,Molliver, 1990) et conduisant à des réductions à long-terme des teneurs en 5-HT cérébrales (Fuller et coll.,1965; Kleven,Seiden,1989; Ricaurte et coll.,1985; Sanders-Bush,Steranka,1978; Steranka,Sanders-Bush,1979).

Le prétraitement des rats soumis à la MSO par ces dépléteurs en 5-HT ou potentialise (PCPA) ou ne modifie pas (PCA et FFA) l'hypothermie corporelle,cependant les troubles moteurs apparaissent plus tôt,particulièrement chez les animaux recevant la MSO dans le III<sup>e</sup> ventricule.Il a été observé antérieurement que le traitement par la MSO associée à la PCPA provoquait une réduction supérieure des concentrations en 5-HT dans le cerveau moyen et l'hypothalamus à celle déterminée après le traitement par la PCPA seule (Sellinger,Dietz,1981).D'ailleurs,des différences dans la déplétion en 5-HT apparaissent chez les rats entre les diverses régions du cerveau du rat (Miller et coll.,1970 ; Steranka,Sanders-Bush,1979) à la suite du prétraitement par la PCPA, le PCA et la FFA,mais aucune de ces trois molécules n'altère le métabolisme de la sérotonine dans les corps cellulaires des neurones des noyaux dorsal et médian du raphé (Aghajanian et coll.,1973; Mamounas,Molliver,1988; Molliver,Molliver,1990).Si des systèmes 5-HT centraux contrôlent ou modulent une interdépendance possible entre l'hypothermie centrale et les troubles moteurs induits par la MSO,il apparait nécessaire d'étudier les effets d'une charge en 5-HTP.Les rats sont prétraités par une seule dose de 5-HTP (200mg/kg,i.p.) seule ou par 5-HTP (100mg/kg,i.p.) préassocié avec la carbidopa (10mg/kg,i.p.),un inhibiteur de la décarboxylase périphérique (Porter et coll.,1962; Warsh, Stancer,1976),et de la décarboxylase de l'endothélium des capillaires cérébraux (Bartholini et coll.,1971),ceux-ci conservent une température interne pratiquement constante après l'administration de la MSO sans disparition de la majorité des troubles moteurs.L'administration de 5-HTP résulte principalement en une élévation du degré de "turn-over" et de la

libération de 5-HT (De Simoni et coll., 1987), ce qui augmente l'activité fonctionnelle sérotonergique (Green, 1984), bien que son effet soit considéré comme aspécifique. D'ailleurs, la charge en 5-HTP pourrait se traduire par une production de 5-HT différente d'un point de vue topographique et fonctionnel de la 5-HT endogène produit en l'absence du précurseur (Kleven et coll., 1983). Nous avons montré qu'un prétraitement par le 5-HTP (100mg/kg, i.p.) seul, ne modifie pas le développement et le degré de l'hypothermie induite par la MSO, ce qui prouve que l'augmentation du métabolisme de la 5-HT dans les cellules endothéliales (Hardebo et coll., 1980; Maruki et coll., 1984) est sans effet; réciproquement, le prétraitement par le 5-HTP associé à la carbidopa supprime l'hypothermie induite par la MSO ce qui prouve que le parenchyme cérébral est le site de la synthèse accrue et de la libération de la 5-HT (Anderson et coll., 1987). Les chronologies des variations des concentrations en 5-HT dans le cerveau des rats, à la suite de l'injection intrapéritonéale de 5-HTP (100mg/kg) et de 5-HTP (100mg/kg) préassocié à la carbidopa (10mg/kg) peuvent être strictement mises en parallèle avec les chronologies des variations de la température rectale des rats soumis à la MSO par voie intrapéritonéale, à la suite des deux prétraitements indiqués ci-dessus, respectivement (Löscher et coll., 1984); les augmentations en 5-HT du cerveau à 2, 4 et 6 heures excèdent fortement celles observées sans carbidopa. Ainsi, l'augmentation des concentrations en 5-HT dans le cerveau des rats soumis à la MSO neutralise l'action hypothermique de la molécule, sans supprimer la majorité des troubles moteurs induits associés à la manifestation de certains comportements déclenchés par la 5-HT tels que l'abduction des membres postérieurs (Green, 1984; Jacobs, 1976) et la posture d'inertie "flat body posture" (Colpaert et coll., 1989).

Les réponses d'ordre fonctionnel de la 5-HT que de nombreux auteurs ont observées et étudiées sont d'apparition relativement lente et de longue durée, ce qui suggère que cette action est de nature métabotrope. La diversité à la fois de l'action et des réponses provoquées par des manipulations pharmacologiques suggère qu'il existe, notamment dans le système nerveux central, de multiples types de récepteurs 5-HT (Glennon, 1987; Hamon et coll. 1988; Peroutka, 1987, 1988). Nous avons montré que le prétraitement des rats par le (+)pindolol aux doses de 1,5 à 3mg/kg, s.c., atténue ou supprime l'

hypothermie induite par la MSO administrée par la voie systémique ou dans le III<sup>e</sup> ventricule (figures 18,19,20). Le pindolol est un antagoniste non sélectif des  $\beta$ -adrénocepteurs ayant une forte affinité pour le site de liaison 5-HT<sub>1A</sub> (Hoyer,1988; Middlemiss et coll.,1985). Il est intéressant de préciser que chez des rats prétraités par le pindolol à la dose de 6mg/kg, s.c., il n'y a aucune modification dans les caractéristiques de l'hypothermie rectale induite par la MSO (150mg/kg, i.p.); ce résultat confirme le double rôle d'antagoniste et d'agoniste des récepteurs sous-type 5-HT<sub>1A</sub> joué par le pindolol (Hjorth, Carlsson, 1985, 1986). A la concentration la plus élevée, le pindolol a un effet légèrement potentialisateur sur l'action hypothermique de la MSO. Le prétraitement des rats par le (-) propranolol (16 à 25mg/kg, i.p.) conduit à des résultats assez complexes lorsque ceux-ci sont ensuite soumis à l'action de la MSO: l'hypothermie induite par la MSO est renforcée si cette dernière molécule est administrée par la voie intrapéritonéale, alors que l'hypothermie est atténuée si la MSO est injectée dans le III<sup>e</sup> ventricule (figures 21,22). Le propranolol est un antagoniste non sélectif des  $\beta$ -adrénocepteurs qui manifeste une affinité pour le site de liaison 5-HT<sub>1A</sub> dix fois inférieure à celle manifestée par le pindolol (Hoyer, 1988), le propranolol n'apparaît pas comme étant un bon antagoniste des autorécepteurs 5-HT<sub>1A</sub> (Sharp et coll., 1990). L'administration de Ketanserin aux doses de 0,7 à 1,4mg/kg, i.p., 20mn avant l'injection systémique ou dans le III<sup>e</sup> ventricule de la MSO, ne modifie aucune des caractéristiques de l'hypothermie interne ainsi produite. La ketanserin est un antagoniste à forte affinité pour le site de liaison 5-HT<sub>2</sub> (Hoyer, 1988). Il a été proposé que l'activation des récepteurs sous-types 5-HT<sub>1A</sub> résulte en une réponse hypothermique, tandis que l'activation des récepteurs 5-HT<sub>2</sub> produit une réponse hyperthermique (Gudelsky et coll., 1986; Hjorth, 1985). Ainsi, des agonistes 5-HT<sub>1A</sub> tels que la 8-hydroxy-2-(di-n-propylamino) tetralin (8-OH-DPAT) ou la molécule anxiolytique, la buspirone, produisent une hypothermie interne chez le rat par activation des mécanismes liés au récepteur 5-HT<sub>1A</sub> (Koenig et coll., 1988). La dose de 8-OH-DPAT requise pour provoquer l'hypothermie est généralement près de 5 à 10 fois supérieure à celle requise pour une inhibition significative de la synthèse de la 5-HT, dans ce cas il y a stimulation des récepteurs 5-HT postsynaptiques (Hjorth, Magnusson, 1988). Plus récemment, on a suggéré que des ligands sélec-

tifs du récepteur 5-HT<sub>1A</sub> activent les autorécepteurs 5-HT<sub>1A</sub> présynaptiques (somato-dendritiques) dans les noyaux du raphé, diminuent la libération de 5-HT et ainsi abaissent la température corporelle, indiquant des propriétés d'agonistes à ce récepteur (Lesch et coll., 1990). De récentes études de cartographie quantitative par autoradiographie des récepteurs sérotonergiques dans le cerveau du rat apportent les résultats suivants: la plupart des aires offrant d'importantes concentrations en récepteurs 5-HT<sub>1</sub> correspondent à celles contenant des terminaisons nerveuses des neurones sérotonergiques localisés principalement dans les noyaux du raphé, ces aires étant notamment l'hippocampe, le septum, le néocortex, les ganglions basaux, l'hypothalamus (différents noyaux), la substantia nigra; par contre, la densité des récepteurs 5-HT<sub>2</sub> est bien supérieure dans les aires du télencéphale, notamment le néocortex et le claustrum, que dans les aires méso-ou métencéphaliques (Pazos, Palacios, 1985; Pazos et coll, 1985).

Comme on peut le constater le problème de l'existence d'un lien éventuel entre l'action de la MSO sur le métabolisme de la 5-HT et l'hypothermie corporelle est particulièrement difficile à résoudre. Les travaux de nature pharmacologique, dont nous venons de parler, ont pratiquement tous été réalisés à l'aide de ligands artificiels des récepteurs 5-HT, mais en ce qui concerne notre problème le ligand est la 5-HT. On sait que la 5-HT possède une forte affinité pour les récepteurs 5-HT<sub>1</sub>:  $K_i = 2,2 \text{ nM}$  pour le sous-type 5-HT<sub>1A</sub> notamment; par contre la 5-HT offre une très faible affinité pour les récepteurs 5-HT<sub>2</sub>:  $K_i = 2700 \text{ nM}$  (Peroutka, 1987). La sécrétion de 5-HT provoquée progressivement par l'augmentation de la concentration en ammoniac, due à l'inhibition de l'activité de la glutamine synthétase par la MSO, peut se traduire par une occupation progressive des récepteurs 5-HT<sub>1</sub> dans différentes régions du système nerveux central du rat. Il apparaît probable que ce sont les récepteurs sous-types 5-HT<sub>1A</sub> auxquels se lie 5-HT extracellulaire, et peut-être en premier lieu ceux localisés dans les noyaux du raphé mésencéphalique, la liaison de la 5-HT s'étendant progressivement aux récepteurs 5-HT<sub>1</sub>, sous-types 5-HT<sub>1A</sub> et 5-HT<sub>1B</sub>, situés dans les diverses régions cérébrales innervées par les arborisations terminales diffuses sérotonergiques. Sellinger et Dietz (1981) ont suggéré que la MSO affectait en premier lieu les corps cellulaires sérotoninergiques, localisés dans les régions du tronc cérébral et du mésencéphale, et que plus tard

son effet se propageait aux terminaisons sérotoninergiques. Ainsi, la déplétion en 5-HT induite par la MSO au niveau des noyaux du raphé peut entraîner une action dépressive sur le métabolisme oxydatif du glucose dans différentes régions du cerveau du rat, ce processus, contrôlé et modulé par certains sous-types de récepteurs 5-HT<sub>1</sub>, serait directement responsable de la diminution de la température interne qui fait immédiatement suite à l'administration de la MSO.

ROLE DU NOYAU DORSAL DU RAPHE

## 1 - Introduction

---

Les neurones des noyaux du raphé ont des projections extensives vers à peu près toutes les parties du névraxe (Steinbusch, 1984). Ces projections diffuses et le faible pourcentage de leurs varicosités qui forment des contacts synaptiques impliquent que la 5-HT peut diffuser vers des récepteurs éloignés qui pourraient être localisés aussi bien sur des cellules gliales que sur des neurones (Descarries et coll., 1975; Lidov et coll., 1980; Sano, Veda, 1988; Seal, Pentreath, 1985). Ainsi, il peut être plus convenable d'envisager la 5-HT comme un neuromodulateur (Beaudet, Descarries; 1978). La libération non-synaptique de 5-HT est donc en faveur d'une libération paracrine de ce neurotransmetteur par la majorité des terminaisons axoniques sérotoninergiques et peut être par les dendrites dans le noyau dorsal du raphé. Sellinger et Dietz (1981) avait proposé que la MSO affectait en premier lieu les corps cellulaires sérotoninergiques, localisés dans le tronc cérébral et le mésencéphale, et que plus tard son effet se propageait aux terminaisons sérotoninergiques. Il est donc important de réaliser des infusions de MSO au niveau de la région du noyau dorsal du raphé afin de confirmer le rôle éventuellement joué par la 5-HT dans les mécanismes d'induction de l'hypothermie corporelle déclenchée par la MSO. Ceci est illustrée par les figures 23 et 24.

## 2 - Résultats expérimentaux

---

La MSO est infusée à la dose de 25 $\mu$ g dans un volume de 0,5 $\mu$ l.

Les résultats sont illustrés par la figure 25.

La MSO infusée dans le noyau dorsal du raphé provoque une hypothermie importante atteignant  $-2,9^{\circ}\text{C}$  ( $p < 0,01$ ), 5 heures après l'infusion. La baisse de la température rectale commence une heure après l'infusion.

L'animal présente toujours un fort déséquilibre avec absence des réflexes de redressement.

Abréviations selon l'atlas de Paxinos, Watson (1982)

Aq : aqueduc

CG : substance grise centrale (périaqueducale)

CGD : substance grise dorsale

CGM : substance grise médiane

DR : noyau dorsal du raphé

me5 : tractus mésencéphalique du nerf trijumeau

Me5 : noyau du tractus mésencéphalique du nerf trijumeau

mlf : faisceau longitudinal médian

MnR : noyau médian du raphé



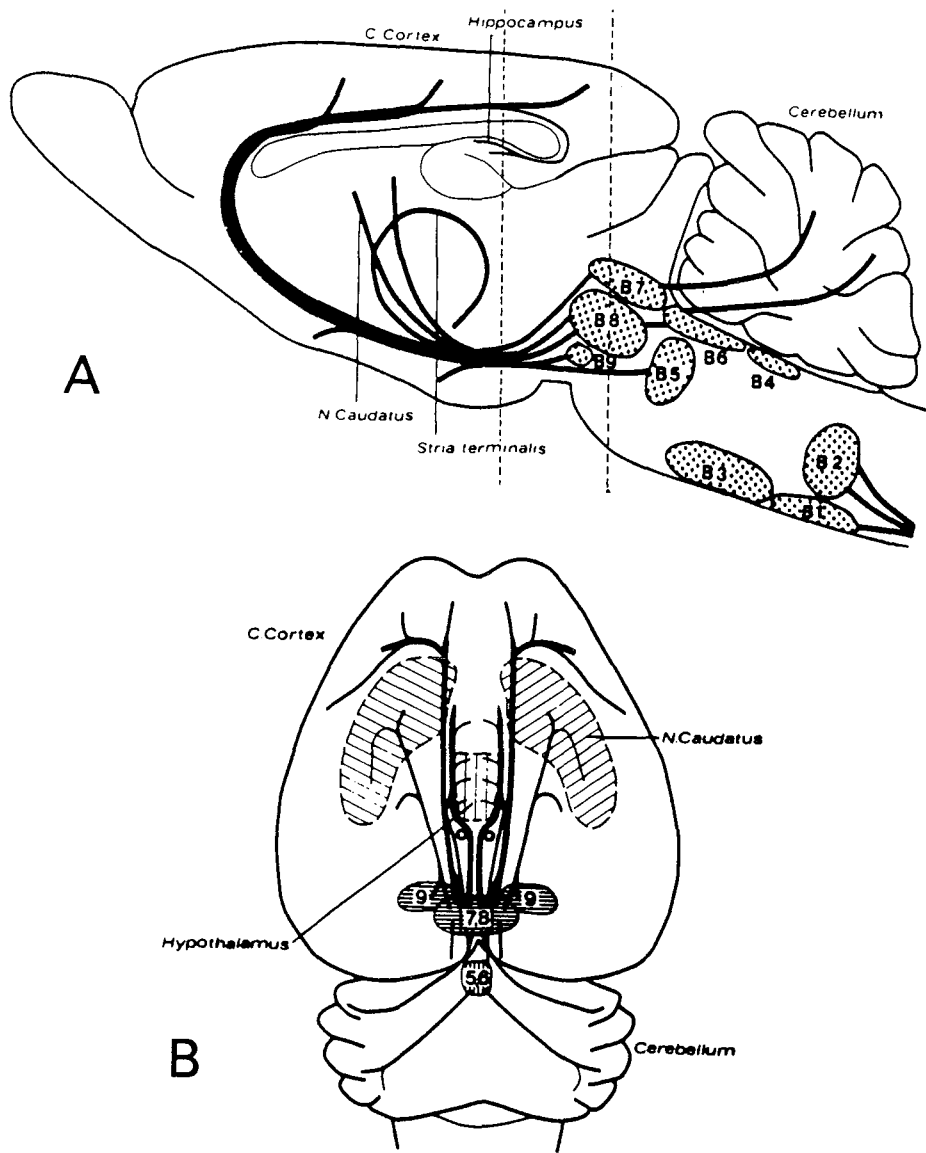


Figure 23- A Représentation schématique des groupes cellulaires sérotonergiques centraux et de leurs projections en coupe sagittale dans le cerveau du Rat. B7 et B8 sont les noyaux dorsal et médian du raphé, respectivement.

B Projection horizontale des voies sérotonergiques ascendantes.

(d'après Fuxe K., Johnsson G., 1974, Adv. Biochem. Psychopharmacol., 10, 1-12).

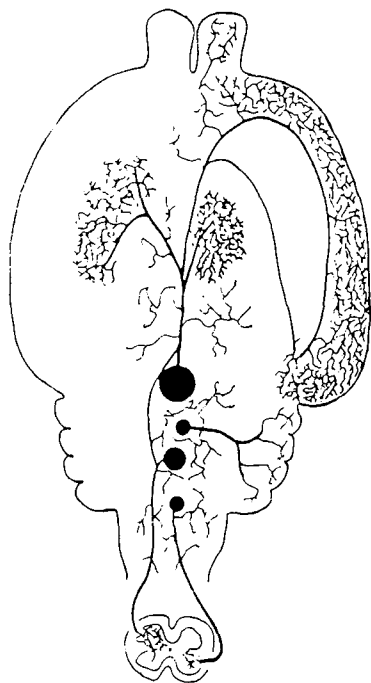


Figure 24- Représentation schématique des neurones 5-HT dans le système nerveux central. Un petit nombre de corps cellulaires sont situés principalement dans le raphé; ils innervent diffusément le cerveau et la moelle épinière. Dans l'ensemble, les neurones 5-HT du raphé antérieur et postérieur donnent naissance aux projections ascendantes et descendantes, respectivement.

(d'après Maeda T. et coll., 1989, Arch.Histol.Cytol., 52 (S), 113-120).

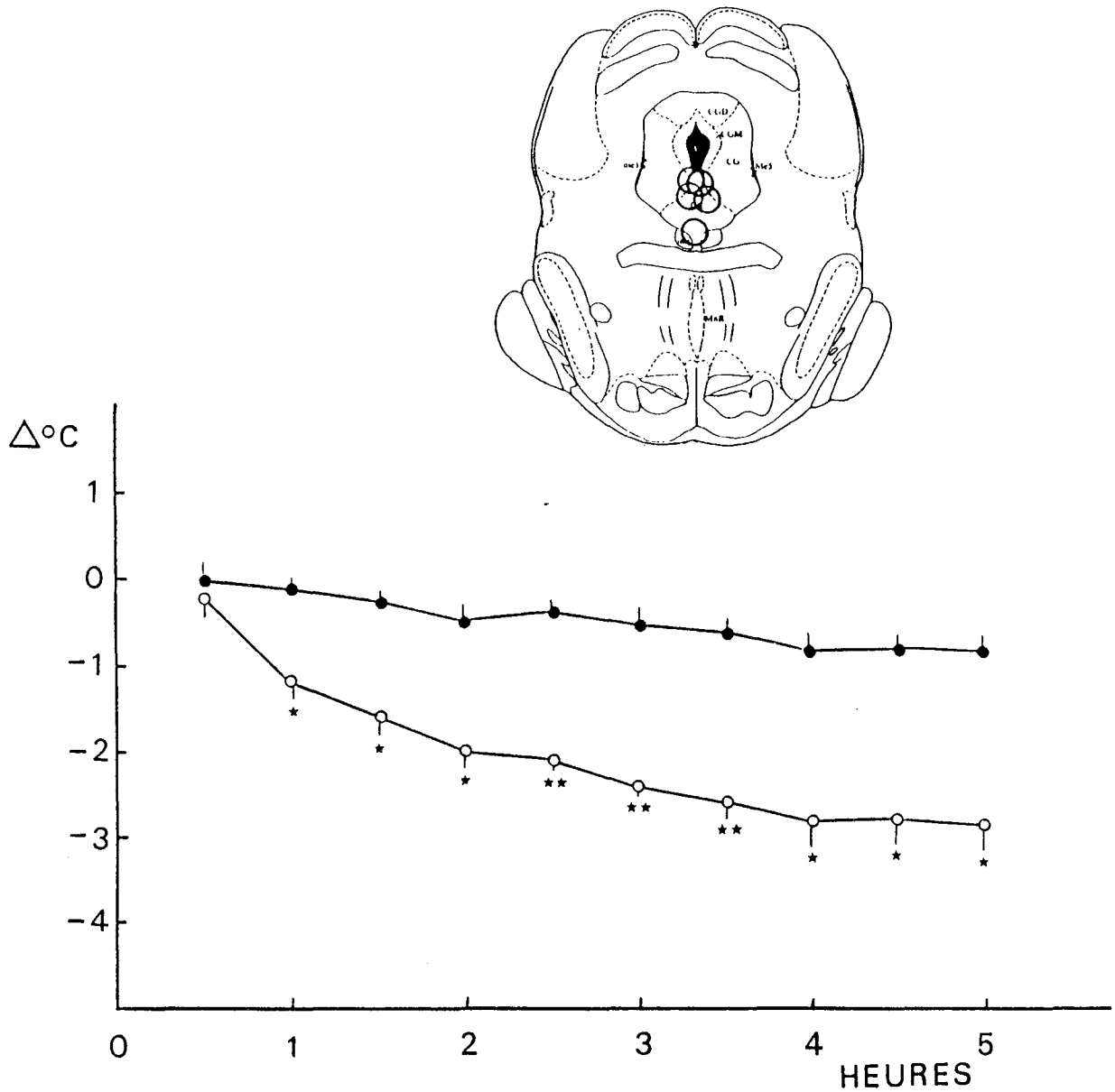


Figure 25 - Variation de la température rectale ( $\Delta^{\circ}\text{C}$ ) à la suite de l'infusion de MSO dans le noyau dorsal du raphé du Rat, à la température ambiante de  $24^{\circ}\text{C}$ .  $\circ$  : MSO (25  $\mu\text{g}$  par rat) (n=5);  $\bullet$  : témoins (n=5). Durée en heures. \*  $p < 0,05$ , \*\*  $p < 0,01$ , pour les différences significatives avec les témoins.

Les microinfusions ont été réalisées aux sites indiqués dans la coupe transversale du mésencéphale du Rat (atlas de Paxinos, Watson, 1982).

### -Etude du rôle de la sérotonine

La MSO est infusée à la dose de 25 $\mu$ g dans un volume de 0,5 $\mu$ l.

Le traitement au préalable des rats soumis à l'action de la MSO, par le (+)pindolol se traduit par la suppression de l'hypothermie rectale résultant de l'action de la MSO seule, à 2h la baisse de la température rectale est de -1,5°C ( $p < 0,05$  par comparaison avec la MSO seule) et à 5h, elle n'est que de -1,2°C ( $p < 0,01$  par comparaison avec la MSO seule) (figure 26). Du point de vue comportemental, les animaux se montrent très actifs et dans la plupart des cas, ils sont déséquilibrés, avec absence des réflexes de redressement.

Le prétraitement par le (-)propranolol, supprime la baisse de la température rectale observée avec la MSO seule, (figure 27). Du point de vue comportemental, les rats sont plus ou moins déséquilibrés, mais ils retrouvent rapidement les réflexes posturaux.

Le traitement au préalable par la ketanserin n'empêche pas l'hypothermie due à la MSO seule (figure 28). Du point de vue comportemental, l'animal est très déséquilibré, il peut subir des convulsions généralisées.

En conclusion, les antagonistes non sélectifs des récepteurs 5-HT<sub>1</sub>, le (+)pindolol et le (-)propranolol, suppriment l'hypothermie rectale induite par la MSO infusée dans le noyau dorsal du raphé, par contre, l'antagoniste sélectif des récepteurs 5-HT<sub>2</sub>, la ketanserin n'a aucune action sur l'hypothermie rectale induite dans les mêmes conditions d'expérience.

### 3 - Conclusion

Les neurones sérotoninergiques possèdent la machinerie biochimique pour la synthèse et le stockage de la 5-HT; la stimulation des noyaux du raphé mésencéphalique provoque la libération de 5-HT dans des régions post-synaptiques (Aghajanian et coll., 1987). En outre, les neurones sérotoninergiques offrent un mécanisme autoentretenu intrinsèque modulé au moins par 2 neurotransmetteurs: la noradrénaline, agissant par les  $\alpha_1$ -adrénocepteurs accélère le mécanisme et la 5-HT agissant par les autorécepteurs somatodendritiques ralentit le mécanisme (Aghajanian et coll., 1987). Ces autorécepteurs 5-HT somatodendritiques appartiennent au sous-type 5-HT<sub>1A</sub> (Sotelo et coll., 1990). Nous avons démontré que l'infusion de MSO (25 $\mu$ g) dans le noyau dorsal du raphé du rat est suivie par une hypothermie rectale bien pro-

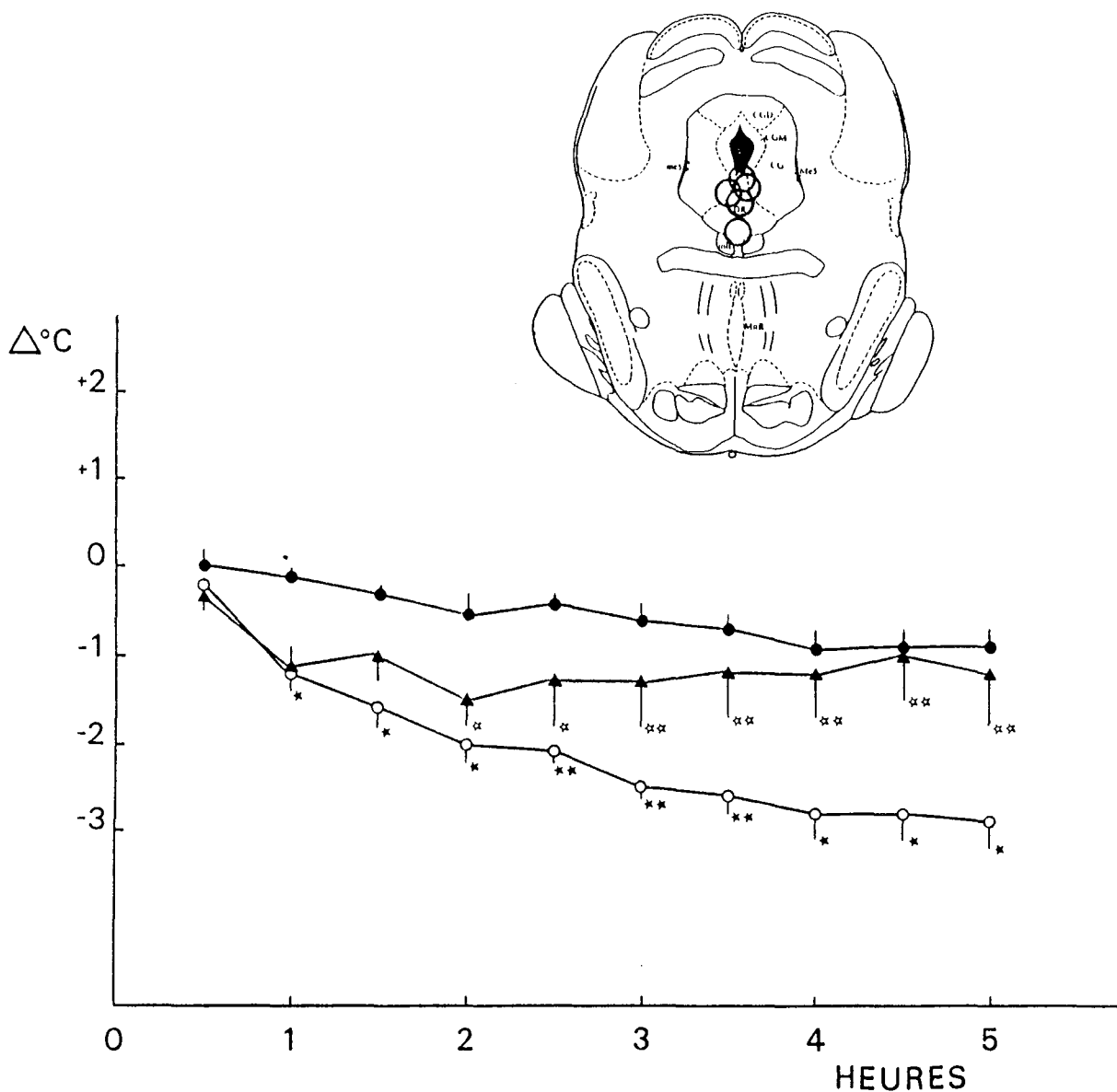


Figure 26 - Variation de la température rectale ( $\Delta^{\circ}\text{C}$ ) à la suite de l'infusion de MSO (25  $\mu\text{g}$  par rat) dans le noyau dorsal du raphé du Rat, à la température ambiante de  $24^{\circ}\text{C}$ . ▲: ( $\pm$ ) pindolol (3mg/kg, s.c.) 30 mn avant la MSO (n=5); ●: témoins (n=5); ○: MSO (25  $\mu\text{g}$  par rat) (n=5). Durée en heures. \*  $p < 0,05$ , \*\*  $p < 0,01$ , pour les différences significatives avec les témoins ; \*  $p < 0,05$ , \*\*  $p < 0,01$ , pour les différences significatives avec les rats soumis à la MSO seule.

Les microinfusions ont été réalisées aux sites indiqués dans la coupe transversale du mesencéphale du Rat (atlas de Paxinos, Watson, 1982).

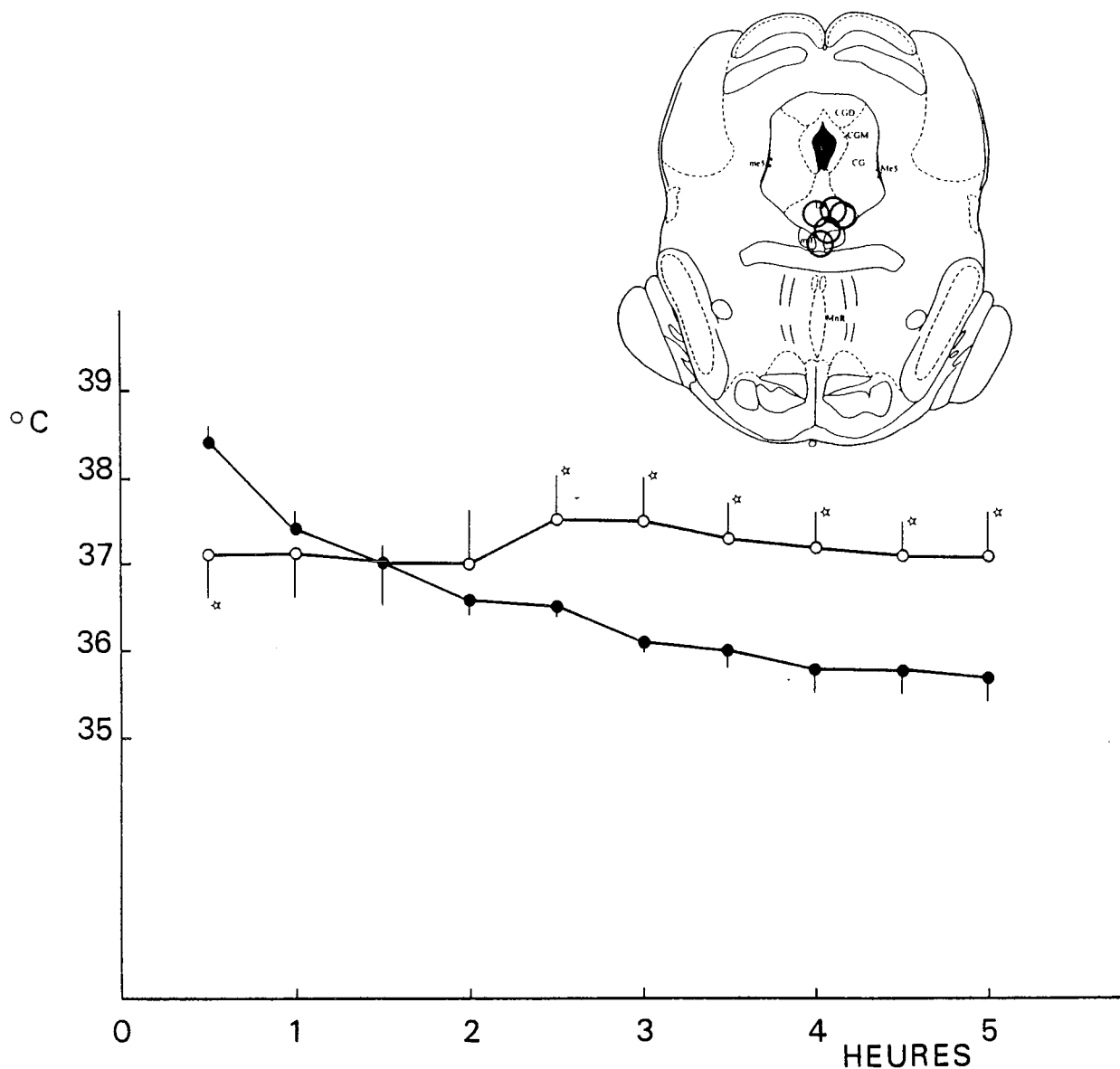


Figure 27- Evolution de la température rectale ( °C) à la suite de l'infusion de MSO (25µg par rat) dans le noyau dorsal du raphé du Rat, à la température ambiante de 24°C. ○ : (-)propranolol (16mg/kg, i.p.) 15mn avant la MSO (n=5); ● : témoins, MSO seule (n=5). Durée en heures. \*  $p < 0,05$ ; pour les différences significatives avec les témoins. Les microinfusions ont été réalisées aux sites indiqués dans la coupe transversale du mésencéphale du Rat (atlas de Paxinos, Watson, 1982).

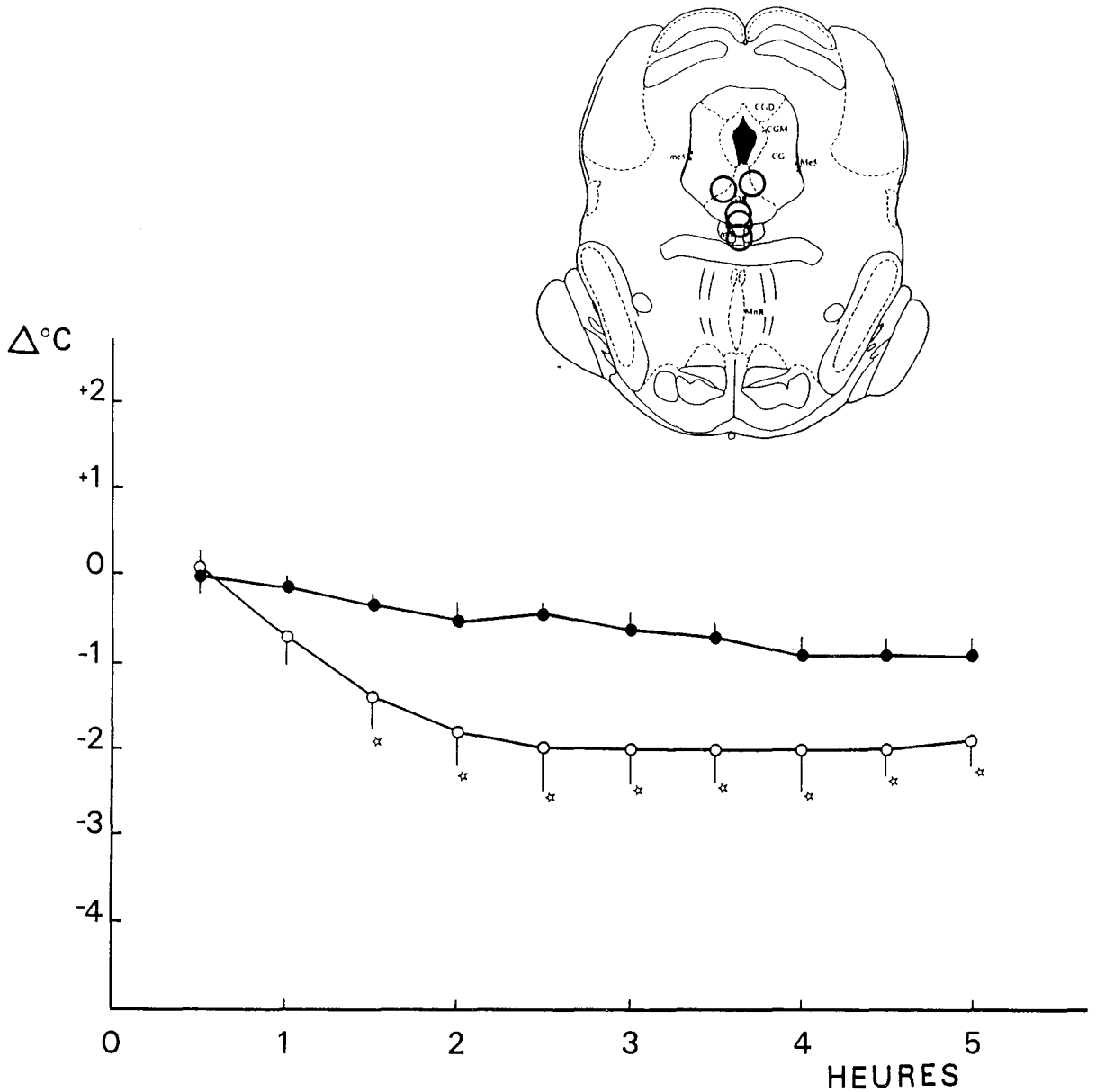


Figure 28- Variation de la température rectale ( $\Delta^{\circ}\text{C}$ ) à la suite de l'infusion de MSO (25 $\mu\text{g}$  par rat) dans le noyau dorsal du raphé du Rat, à la température ambiante de 24 $^{\circ}\text{C}$ . ○: ketanserin (0,5mg/kg, i.p.) 20mn avant la MSO (n=5); ●: témoins (n=5). Durée en heures. \*  $p < 0,01$  pour les différences significatives avec les témoins.

Les microinfusions ont été réalisées aux sites indiqués dans la coupe transversale du mésencéphale du Rat (atlas de Paxinos, Watson, 1982).

gressive et de longue durée. Cette hypothermie est atténuée significativement par le prétraitement par le pindolol, et abolie significativement par injection préalable de (-)propranolol. Par contre, le prétraitement par la Ketanserin n'affecte aucune caractéristique de l'hypothermie induite par la MSO dans ces mêmes conditions expérimentales.

On a montré que des injections cérébrales de 8-OH-DPAT (2,5µg) dans le noyau dorsal du raphé produisent une diminution significative de la température interne chez le rat mâle, ce qui suggère la possibilité d'un rôle spécifique joué par les mécanismes liés aux récepteurs 5-HT<sub>1</sub> dans la thermorégulation (Higgins et coll., 1988). Très récemment, la température interne des rats Wistar mâles a été mesurée après application locale de 5-HT (10µg) ou de 8-OH-DPAT (5µg) dans les noyaux dorsal et médian du raphé. L'application de 5-HT ou de l'agoniste 5-HT<sub>1A</sub>, le 8-OH-DPAT, dans le noyau dorsal du raphé se traduit par une nette diminution de la température corporelle, tandis que les injections dans le noyau médian du raphé n'ont aucune action. Ces résultats démontrent le rôle important joué par le noyau dorsal du raphé dans la thermorégulation chez le rat.

Le fait que l'agoniste 5-HT<sub>1A</sub>, le 8-OH-DPAT produise une hypothermie, et l'observation que l'administration de l'antagoniste 5-HT<sub>1</sub> le (-)pindolol bloque à la fois l'hypothermie induite par la 5-HT ou par le 8-OH-DPAT, montrent l'implication des récepteurs 5-HT<sub>1A</sub> du noyau dorsal du raphé dans la thermorégulation chez le rat (Hillegaart, 1981). Nous sommes ainsi en droit de rapprocher ces résultats de ceux que nous avons obtenus à la suite de l'infusion de MSO dans le noyau dorsal du raphé.

Notre technique expérimentale a été convenablement appliquée dans toutes les expériences que nous avons faites, en particulier chaque micro-infusion réalisée à l'aide d'une aiguille de calibre G33 a été localisée avec précision. La sécrétion de 5-HT causée par l'augmentation de la concentration en ammoniac dans les compartiments extra et intracellulaires de l'aire du noyau dorsal du raphé s'est traduite par une occupation progressivement croissante des récepteurs 5-HT<sub>1A</sub> par l'indoleamine.

On sait que les injections de 5-HT dans le noyau dorsal du raphé produisent une diminution extensive de la synthèse de 5-HT dans le cerveau



antérieur alors que cette diminution ne se produit pas à la suite des injections de 5-HT dans le noyau médian du raphé (Hillegaart et coll., 1980). Il est cependant impossible de répondre à la question de savoir si la liaison de la 5-HT aux sites  $5\text{-HT}_{1A}$  conduisant à l'hypothermie interne s'effectue au niveau de récepteurs présynaptiques (autorécepteurs) ou de récepteurs postsynaptiques.

INTERACTION EVENTUELLE ENTRE LES SYSTEMES CATECHOLAMINERGIQUES ET SEROTO-  
NINERGIQUES DANS L'INDUCTION DE L'HYPOTHERMIE PAR LA MSO

## 1 - Introduction

Il existerait une interrelation entre les catécholamines et la sérotonine dans le cerveau du rat. Ainsi, lorsque les neurones du locus coeruleus sont activés, la libération à la fois de 5-HT et de NA augmente dans le cortex cérébral; par contre, les neurones du noyau médian du raphé (NMR) ne sont pas affectés par l'activité du locus coeruleus. Ces effets sont dûs à des connexions anatomiques existant entre le locus coeruleus et le NDR, leur innervation réciproque fait que la NA facilite l'activité sérotoninergique et la stimulation du NDR inhibe l'activité du locus coeruleus (Petersen, 1989; Pujol, 1979).

Les terminaisons des axones sérotoninergiques dans le cerveau du rat possèdent à la fois des autorécepteurs 5-HT et des adrénorécepteurs  $\alpha_2$ . La phentolamine bloque les récepteurs  $\alpha_2$ , elle bloque aussi les autorécepteurs 5-HT. Ce serait le blocage des autorécepteurs sérotoninergiques par la phentolamine qui provoquerait l'augmentation de la libération de la sérotonine (Limberger et coll., 1989).

Dans le noyau dorsal du raphé adulte, ont été mis en évidence des récepteurs 5-HT<sub>1A</sub> (Sotele et coll., 1990) et des récepteurs  $\alpha_1$  adrénergiques sur les cellules sérotoninergiques de ce noyau (Smith, Gallager, 1989).

## 2 - Administration de molécules

Le betaxolol (Synthelabo Recherche, Paris) (1,5mg/kg, s.c.).

Le ICI 118.551, chlorhydrate (Imperial Chemical Industries PLC, Macclesfield) (1,13-2,26mg/kg, i.p.).

La prazosin, chlorhydrate (Sigma) (1,6-3,3mg/kg, i.p.).

La yohimbine, chlorhydrate (Sigma) (0,6-2,2mg/kg, i.p.).

La phentolamine, methane-sulfonate (Ciba-Geigy) (7mg/kg, i.p.).

Le sulpiride (Sigma) (5-10mg/kg, s.c.).

Ces molécules sont dissoutes dans NaCl à 0,9% et injectées respectivement 30, 15, et 30mn avant l'administration de MSO.

### 3 - Résultats expérimentaux

#### a- Injection intrapéritonéale de MSO

Le prétraitement par la phentolamine (7mg/kg, i.p.) maintient l'hypothermie due à la MSO seule: l'abaissement de la température interne à 4h est de  $-2,7^{\circ}\text{C}$  avec  $p < 0,001$  comparativement aux rats témoins. Les rats sont ataxiques, peu sensibles au toucher et présentent une hypertonie des membres postérieurs.

Le prétraitement par la prazosin (1,6 - 3,3mg/kg, i.p.) provoque une hypothermie plus forte que celle due à la MSO seule, à la dose de 1,6mg/kg, l'abaissement thermique à 5h est de  $-3,0^{\pm}0,2^{\circ}\text{C}$  avec  $p < 0,001$  comparativement au témoin et avec  $p < 0,01$  comparativement à la MSO (figure 29). Les animaux sont déséquilibrés et sensibles au toucher, ils ont des convulsions.

La yohimbine doit être utilisée à des doses thermoneutres, c'est à dire entre 0,5 et 2mg/kg, i.p. (Zacny, 1982). Le rat prétraité par la yohimbine (1 à 2mg/kg, i.p.) maintient une hypothermie égale (dose de 1mg/kg) ou plus forte (dose de 2mg/kg) que celle due à la MSO seule: l'abaissement thermique à 4h est de  $-2,3^{\pm}0,3^{\circ}\text{C}$  avec  $p < 0,01$  par rapport aux témoins à la dose de 2mg/kg (figure 29). Les rats sont ataxiques, les membres sont en extension, ils sont sensibles au toucher et parfois ils subissent des convulsions.

Le traitement préalable par le bétaxolol (1,5 à 4mg/kg, s.c.) freine fortement l'hypothermie due à la MSO seule, à la dose de 1,5mg/kg. Par contre, à la dose de 2,5mg/kg ou de 4mg/kg, l'hypothermie est aussi forte qu'en présence de MSO seule (figure 29). Les rats sont très déséquilibrés, ils présentent un des symptômes du syndrome 5-HT, la "flat body posture", quelquefois des convulsions généralisées s'observent à la dose de 1,5mg/kg.

Le prétraitement par ICI 118.551 (1,13 à 2,26mg/kg, i.p.) augmente l'hypothermie due à la MSO seule: l'abaissement à 5h est de  $-3,1^{\pm}0,2^{\circ}\text{C}$  avec  $p < 0,001$  comparativement au témoin, à la dose de 2,26mg/kg (figure 29).

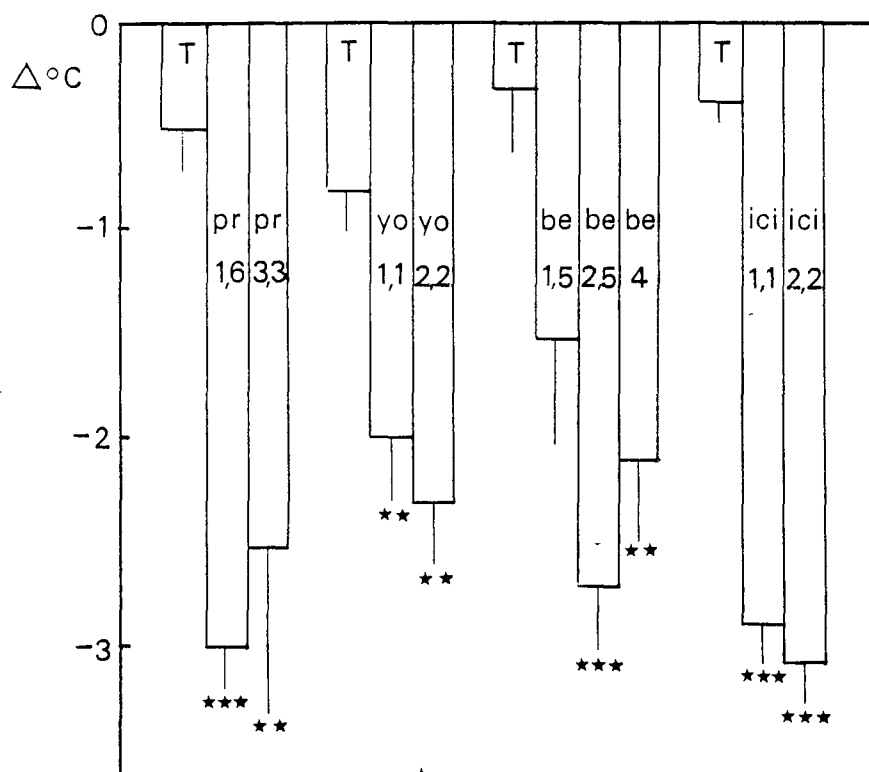


Figure 29- Amplitude maximum de l'hypothermie rectale ( $\Delta^{\circ}\text{C}$ ) à la suite de l'injection intrapéritonéale de MSO (150mg/kg) au rat, à une température ambiante de 24°C, après traitement par des antagonistes des  $\alpha_1$ ,  $\alpha_2$ ,  $\beta_1$  et  $\beta_2$  adrénoccepteurs.

Prazosin (1,6 et 3,3mg/kg, i.p.) (colonnes pr 1,6 et 3,3) (n=4), 30mn avant la MSO.

Yohimbine (1,1 et 2,2mg/kg, i.p.) (colonnes yo 1,1 et 2,2) (n=4), 30mn avant la MSO.

Betaxolol (1,5 ; 2,5 et 4mg/kg, s.c.) (colonnes be 1,5; 2,5; 4) (n=4), 30mn avant la MSO.

ICI 118.551 (1,13 et 2,26mg/kg, i.p.) (colonnes ICI 1,1 et 2,2) (n=4), 15 mn avant la MSO.

\*\*p < 0,01, \*\*\*p < 0,001, pour les différences significatives avec les témoins (colonnes T) respectifs.

Les rats sont déséquilibrés, ils présentent la "flat body posture", quelquefois des convulsions généralisées sont observées aux deux doses de ICI 118.551 utilisées.

L'hypothermie induite, chez les rongeurs, par les agonistes dopaminergiques (apomorphine, pergolide) semble impliquer la stimulation des récepteurs dopaminergiques type  $D_2$  (Moore, Axton, 1990; Ögren, Fuxe, 1988), puisque le sulpiride, antagoniste sélectif des récepteurs  $D_2$  inhibe cette hypothermie (Ögren, Fuxe, 1988).

Le traitement au préalable par le sulpiride (5 à 10mg/kg, s.c.) maintient en apparence l'hypothermie due à la MSO seule. Dans ce cas, le témoin sulpiride baisse également, ce qui du point de vue statistique supprime presque totalement la baisse due à la MSO seule. La baisse de la température à 4h est de  $-2,3 \pm 0,1^\circ\text{C}$  avec  $p < 0,01$  par rapport aux rats témoins à la dose de sulpiride de 5mg/kg (figure 30). Les rats sont ataxiques.

#### b-Injection dans le III<sup>e</sup> ventricule

Le prétraitement des rats soumis à la MSO (60µg/10µl par animal) par les antagonistes des récepteurs adrénergiques sous types  $\alpha_1$  (prazosin 1,6 mg/kg, i.p.),  $\alpha_2$  (Yohimbine 2,2mg/kg, i.p.),  $\beta_1$  (betaxolol 2,5mg/kg, s.c.) et  $\beta_2$  (ICI 118.551 1,13mg/kg, i.p.) n'a pas modifié significativement ni le développement, ni l'amplitude de l'hypothermie corporelle induite par la MSO seule (figure 31). Le comportement des animaux ainsi prétraités est sensiblement le même avec un syndrome d'ataxie associé à la "flat body posture" et même la "queue de Straub" et les membres postérieurs en abduction dans le cas du prétraitement par ICI 118.551. Il est à préciser que le traitement au préalable par la yohimbine s'est traduit par la mort de tous les animaux, sensiblement 4h après l'injection intraventriculaire de la MSO.

Le prétraitement par l'antagoniste des récepteurs dopaminergiques  $D_2$ , le sulpiride (10mg/kg, s.c.) ne modifie pas significativement l'hypothermie induite par la MSO seule. Cependant, les rats exhibent un syndrome d'ataxie, associé à la "queue de Straub", de l'opisthotonos et même des convulsions toniques-cloniques généralisées.

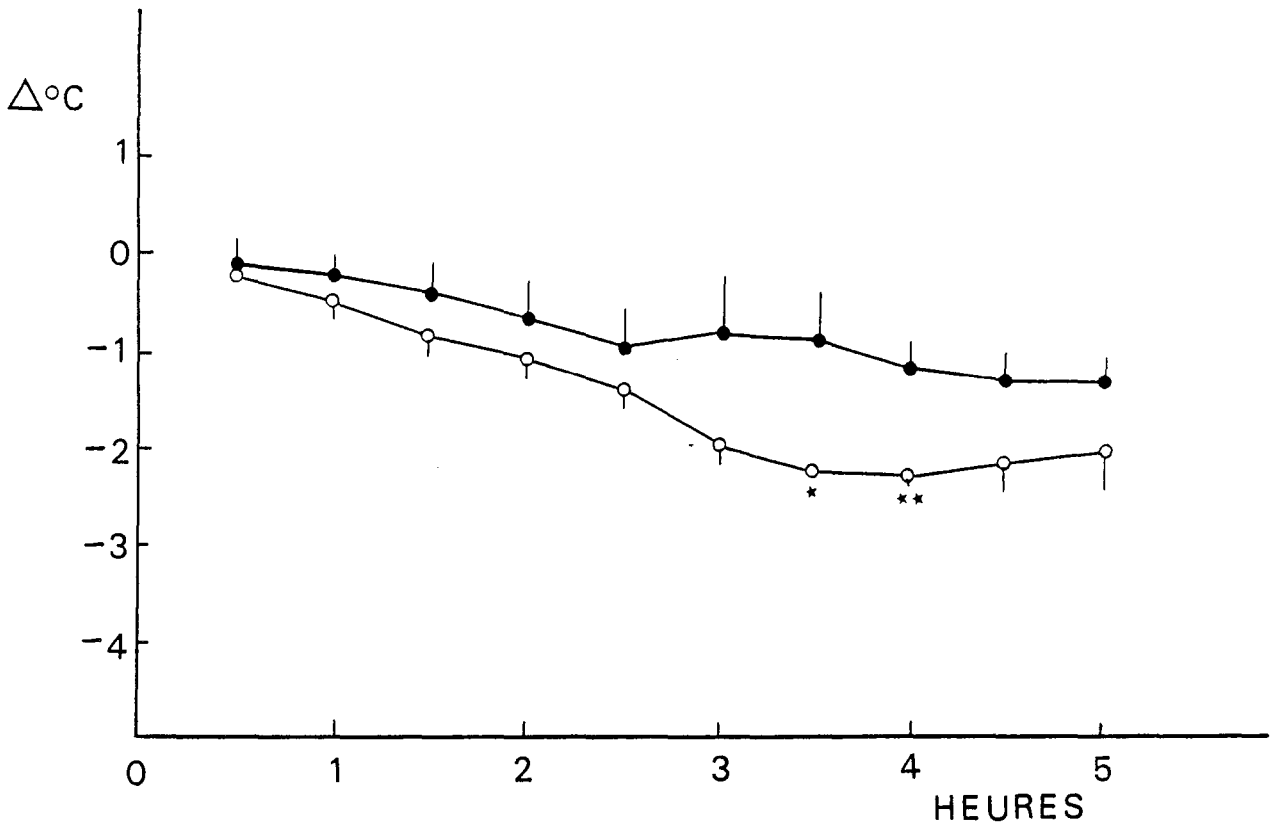


Figure 30- Variation de la température rectale ( $\Delta^{\circ}\text{C}$ ) à la suite de l'injection intrapéritonéale de MSO (150mg/kg) au rat , à la température ambiante de  $24^{\circ}\text{C}$ . ○: Sulpiride (5mg/kg, s.c.) 30mn avant la MSO, (n=4); ●: témoins (n=4). Durée en heures. ★  $p < 0,05$ , ★★  $p < 0,01$ , pour les différences significatives avec les témoins.

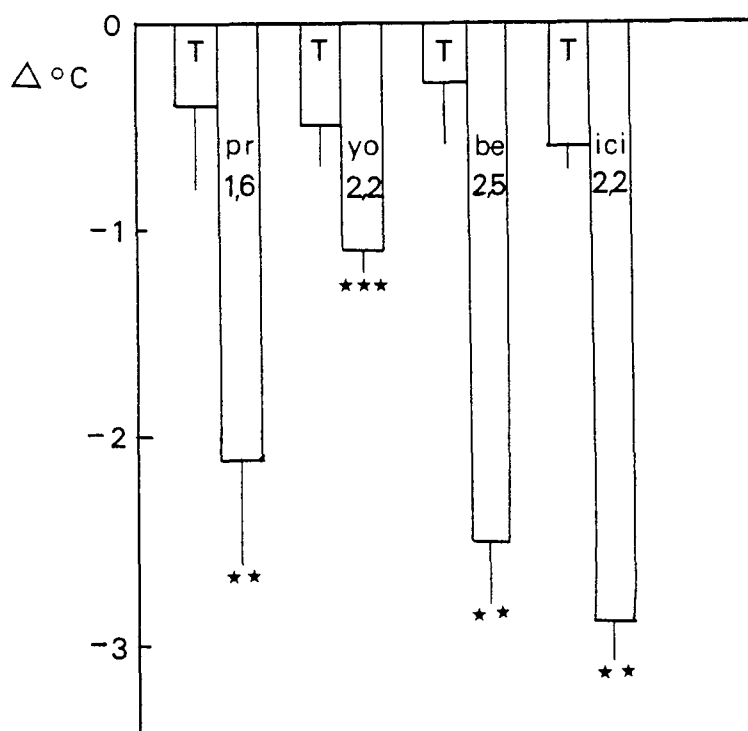


Figure 31- Amplitude maximum de l'hypothermie rectale ( $\Delta^{\circ}\text{C}$ ) à la suite de l'injection intracérébroventriculaire (III<sup>e</sup> ventricule) de MSO (60ug par rat) au rat, à une température ambiante de 24°C, après traitement par des antagonistes des  $\alpha_1$ ,  $\alpha_2$ ,  $\beta_1$  et  $\beta_2$  adrénoccepteurs.

Prazosin (1,6mg/kg, i.p.) (colonne pr 1,6) (n=4).

Yohimbine (2,2mg/kg, i.p.) (colonne yo 2,2) (n=3).

Betaxolol (2,5mg/kg, s.c.) (n=4) (colonne be 2,5).

ICI 118.551 (2,26mg/kg, i.p.) (colonne ICI 2,2) (n=3).

\*\* $p < 0,01$ ; \*\*\* $p < 0,001$ , pour les différences significatives avec les témoins (colonnes T) respectifs.

I.i.p. de prazosin, de yohimbine 30mn avant la MSO.

I.s.c. de betaxolol 30mn avant la MSO.

I.i.p. de ICI 118.551 15mn avant la MSO.



#### 4 - Conclusion

Il existe des connexions neuroanatomiques entre les systèmes sérotoninergiques et noradrénergiques dans le système nerveux central du rat. Plusieurs études ont montré que le locus coeruleus et le noyau dorsal du raphé sont innervés réciproquement: la NA libérée par la stimulation du locus coeruleus facilite l'activité sérotoninergique, par contre la libération de 5-HT par la stimulation du noyau dorsal du raphé inhibe l'activité du locus coeruleus (Petersen et coll., 1989). En outre, une diminution de la concentration en 5-HT endogène se traduit par la perte du contrôle par rétroaction négative de la libération de NA (Reader et coll., 1986). On a montré récemment que des agonistes 5-HT inhibent d'environ 50% les potentiels synaptiques dépolarisants enregistrés dans le locus coeruleus du rat *in vitro*, ces réponses étant obtenues par la médiation des récepteurs sous-types  $5\text{-HT}_{1A}$  et  $5\text{-HT}_{1B}$ , ce qui suggère que l'influx sérotoninergique peut être un important modulateur de la fonction du locus coeruleus (Bobker, Williams, 1989).

Des antagonistes des  $\alpha$ -adrénocepteurs diminuent la décharge électrique des neurones sérotoninergiques lorsqu'ils sont appliqués par microiontophorèse dans le noyau dorsal du raphé; en outre, la NA, également appliquée par microiontophorèse, restaure la décharge électrique des neurones sérotoninergiques au cours du blocage compétitif des  $\alpha$ -adrénocepteurs, ce qui démontre que ces derniers sont de la catégorie  $\alpha_1$ . Ceci suggère que les terminaisons noradrénergiques, présentes dans le noyau dorsal du raphé, sont les intermédiaires d'une influence noradrénergique active toniquement de laquelle dépend la décharge électrique des neurones sérotoninergiques (Aghajanian et coll., 1987). L'existence de telles voies de modulation pourrait expliquer l'action potentialisatrice de la prazosin, antagoniste sélectif des  $\alpha_1$ -adrénocepteurs situés postsynaptiquement, sur l'action hypothermique de la MSO quand celle-ci est administrée par la voie intrapéritonéale bien que par la voie du III<sup>e</sup> ventricule il n'y ait pas d'effet. Il paraît important de tenir compte du rôle éventuellement joué par l'inhibition des  $\alpha_1$ -adrénocepteurs périphériques et de l'existence de divers degrés d'affinité de la prazosin pour les récepteurs de cette catégorie (Bylund, U'prichard, 1983; Exton, 1982).

Les  $\alpha_2$ -adrénocepteurs dans le système nerveux central du rat sont localisés pré-et postsynaptiquement (Bylund, U'prichard, 1983) et ils peuvent être différenciés au moins en deux sous-types,  $\alpha_{2A}$  et  $\alpha_{2B}$  (Bylund, 1988). De récentes études ont montré que des agonistes sélectifs des  $\alpha_2$ -adrénocepteurs, dont la clonidine, exercent une action thermogénique chez la souris prétraitée par la réserpine, cette action se faisant par l'intermédiaire de l'activation des  $\alpha_2$ -adrénocepteurs postsynaptiques (Bill et coll., 1989). Par contre, de nombreuses investigations antérieures ont montré que la clonidine induit une diminution de la température corporelle chez le rat normal par action sur les  $\alpha_2$ -adrénocepteurs, puisque la yohimbine, antagoniste sélectif de ces derniers, réduit de 80% cette hypothermie qui résulterait d'une diminution de la libération de NA dans le système nerveux central: la clonidine agirait donc au niveau des  $\alpha_2$ -adrénocepteurs présynaptiques (Zacny, 1982). Nos résultats montrent que le prétraitement des rats par la yohimbine, à des doses non-hypothermisantes, ne modifie pas significativement la baisse de la température interne enregistrée après injection intrapéritonéale de la MSO, par contre cette hypothermie est réduite de près de 50% lorsque la MSO est administrée par la voie intracérébro-ventriculaire, cette hypothermie plus réduite étant généralement suivie de la mort de l'animal. De tels résultats sont difficiles à interpréter, cependant il est important de préciser que la yohimbine offre une affinité relativement élevée pour les sites 5-HT<sub>1A</sub> égale à celle du (-)propranolol (Hoyer, 1988).

Nous avons précédemment démontré le rôle d'inhibiteurs de l'hypothermie induite par la MSO joué par le pindolol et le (-)propranolol, ces deux molécules étant également des antagonistes non sélectifs des  $\beta$ -adrénocepteurs, le propranolol ayant une action plus efficace que le pindolol au niveau des  $\beta$ -adrénocepteurs des tissus périphériques (Kortelainen et coll., 1990). Il était donc important de vérifier si le prétraitement des rats soumis à l'action de la MSO par des antagonistes sélectifs des  $\beta_1$ -et  $\beta_2$ -adrénocepteurs, respectivement le betaxolol et le dérivé ICI 118.551 avait une action sur l'hypothermie interne ainsi induite. Aucun de ces deux antagonistes n'a eu d'influence manifeste sur l'abaissement de la température rectale faisant suite à l'administration de la MSO, quelle que soit la

voie utilisée. Ces derniers résultats apporteraient ainsi une confirmation de l'intervention des récepteurs 5-HT<sub>1</sub>, vraisemblablement des sous-types 5-HT<sub>1A</sub>, étant donné que le pindolol et le propranolol ont été montrés comme offrant une affinité élevée pour ces récepteurs (Hoyer, 1988).

Rappelons qu'une concentration en ammoniaque de 0,1 à 10mM provoque la libération d'amines, notamment la 5-HT mais également la dopamine (DA), à partir des synaptosomes isolés du cerveau du rat (Erecinska et coll., 1987), cette libération de DA est quantitativement plus importante que celle de 5-HT pour une même concentration en ammoniaque. On peut donc supposer que lors du traitement du rat par la MSO il se produit une augmentation de la concentration en DA dans le milieu extracellulaire, cette catécholamine pouvant induire une hypothermie corporelle: on sait que la DA semble jouer un rôle important dans la régulation centrale de la température corporelle du mammifère (Clark, Lipton, 1985), le site probable de l'action de la DA se localiserait dans l'aire PO-HA (Colboc, Costentin, 1980). L'hypothermie induite chez la souris par les agonistes DA a comme médiateur les récepteurs DA catégorie D<sub>2</sub>, le sulpiride antagoniste sélectif de ces derniers atténuant significativement cette hypothermie (Meller et coll., 1989). L'absence d'effet significatif sur l'abaissement de la température rectale chez les rats soumis à l'action de la MSO prétraités par le sulpiride (5 à 10mg/kg, i.p.) est en faveur de la non participation de la DA dans les mécanismes d'induction de cette hypothermie interne.

INTERVENTION DES SYSTEMES GABAERGIQUES DANS L'INDUCTION DE L'HYPOTHERMIE

---

PAR LA MSO

On dispose de preuves anatomiques et électrophysiologiques de l'existence d'un impact direct des voies gabaergiques sur les neurones du raphé dorsal qui sont à l'origine des afférences sérotoninergiques. Ainsi, le GABA exercerait un contrôle inhibiteur (non-tonique) sur les neurones sérotoninergiques du système nerveux central qui se ferait par l'intermédiaire de récepteurs GABA localisés dans les noyaux du raphé (Nishikawa, Scatton, 1985). D'autre part, il a été suggéré que l'inhibition de la libération de 5-HT par le GABA exogène dans le cerveau du rat se ferait via des récepteurs GABA<sub>B</sub> qui pourraient être localisés présynaptiquement (Schlicker et coll., 1984).

Le GABA peut-il éventuellement intervenir dans l'action de la MSO sur la température corporelle et sur le comportement moteur qui lui est associé ?

## 1 - Introduction

Dans le cerveau, les récepteurs de l'acide  $\gamma$ -aminobutyrique (GABA) ont été classés en récepteurs GABA<sub>A</sub> et GABA<sub>B</sub>. Le récepteur GABA<sub>A</sub> est lié au complexe récepteur benzodiazépine - ionophore Cl<sup>-</sup> et il a pour antagoniste sélectif la bicuculline (Krogsgaard-Larsen, 1981). Le récepteur GABA<sub>B</sub> présynaptique module la libération des monoamines dont celle de la 5-HT (Fonnum, 1987) et a pour antagoniste compétitif le 2-OH-saclofen (Kerr et coll., 1988). Le  $\gamma$ -vinylGABA (GVG) est un inhibiteur irréversible de la GABA transaminase, enzyme de dégradation du GABA (Lippert et coll., 1977), d'où il permet une potentialisation de l'action du GABA. L'acide ( $\pm$ )nipécotique est l'un des plus puissants et des plus sélectifs inhibiteurs du prélèvement de GABA dans le cortex cérébral du rat (Krogsgaard-Larsen, 1980), mais étant un composé fortement polaire, il ne pénètre pas aisément à travers la barrière sang-cerveau (Lodge et coll., 1978), l'acide nipécotique permet de prolonger la durée des potentiels postsynaptiques inhibiteurs provoqués par le GABA (Dalkara, 1986).

## 2 - Administration de molécules

Le  $\gamma$ -vinyl GABA (Merrell International Research Center, Strasbourg) (30ug par rat), dissous dans 10ul de NaCl à 0,9%, est injecté dans le ventricule latéral 24 heures avant l'administration de MSO.

Le (+)acide nipécotique (Sigma) (20ug par rat), dissous dans 10ul de NaCl à 0,9% est injecté dans le ventricule latéral simultanément avec la MSO.

Le 2-hydroxy-saclofen (Tocris Neuramin, Buckhurst Hill) (40-80ug par rat) dissous dans 10ul de NaCl à 0,9% est injecté dans le III<sup>e</sup> ventricule et simultanément avec la MSO.

## 3 - Résultats expérimentaux

### a - Injection de la MSO dans le ventricule latéral

Le prétraitement des rats par le GVG (30ug par rat) freine l'hypothermie induite par la MSO seule (figure 32), l'amplitude de la baisse est de  $-0,8^{\circ}\text{C}$  ( $p < 0,05$ ) à 1h30, par contre, elle est de  $-2,3^{\circ}\text{C}$  ( $p < 0,001$ ) à 3h avec la MSO seule. Du point de vue comportemental, le rat offre un syndrome ataxique prédominant avec pédalage des pattes postérieures.

L'acide nipécotique bloque le reprélèvement du GABA par les neurones et les cellules gliales; ce composé (20ug par rat) injecté simultanément avec la MSO accélère l'apparition de l'hypothermie due à l'action de la MSO seule et le retour à la normothermie se fait bien plus rapidement. La baisse est de  $-2,4^{\circ}\text{C}$  ( $p < 0,01$ ) à 2h30. Ainsi le blocage du prélèvement du GABA se traduit par une accélération de la chronologie de l'action hypothermisante de la MSO, sans augmentation de l'amplitude et par un retour à la normothermie bien plus rapide. Du point de vue comportemental, les rats manifestent un syndrome d'ataxie suivi de convulsions assez violentes.

### 2-Injection de MSO dans le III<sup>e</sup> ventricule

L'action de l'antagoniste du récepteur GABA<sub>B</sub>, le 2-OH-saclofen a été étudiée en l'injectant aux doses de 40ug et de 80ug simultanément avec la MSO (60ug par rat). En présence du 2-OH-saclofen (40ug par rat), la MSO provoque une hypothermie à peu-près identique à celle observée avec la MSO seule, par contre à la dose de 80ug, l'antagoniste semble légèrement freiner l'hypothermie induite par la MSO seule. L'amplitude de la baisse est

de  $-2,2^{\circ}\text{C}$  dans le premier cas et de  $-1,7^{\circ}\text{C}$  dans le deuxième cas. Les animaux exhibent une ataxie, avec une hypertonie des membres; chez certains rats se déclenchent de violentes convulsions toniques-cloniques généralisées.

### 3-Infusion de MSO dans le noyau du raphé dorsal

L'acide nipécotique (6 $\mu\text{g}$ ) injecté simultanément avec la MSO (25 $\mu\text{g}/0,5\mu\text{l}$ ) provoque une suppression totale de l'hypothermie due à la MSO seule ( $p < 0,05$ , pour la période de 1h à 5h,  $p < 0,01$ , pour la période de 2h30 à 5h, comparativement avec la MSO seule). Les animaux présentent un fort déséquilibre et de l'hyperactivité motrice (figure 33).

Le prétraitement par le GVG (10 $\mu\text{g}/0,5\mu\text{l}$ ) 24h avant l'infusion de MSO (25 $\mu\text{g}/0,5\mu\text{l}$ ) provoque aussi une suppression totale de l'hypothermie due à la MSO seule ( $p < 0,01$ , pour la période de 0,30 à 5h, comparativement à la MSO seule). Les animaux sont très déséquilibrés (figure 34).

Le 2-OH-saclofen (13,3ng par rat) injecté simultanément avec la MSO (25 $\mu\text{g}/0,5\mu\text{l}$ ) provoque également une suppression totale de l'hypothermie due à la MSO seule ( $p < 0,05$ , pour la période de 3h à 5h,  $p < 0,01$ , pour la période de 4h à 5h comparativement avec la MSO seule). Du point de vue comportemental, l'animal présente un fort déséquilibre et une hyperactivité motrice (figure 35).

La bicuculline méthiodide (25ng par rat) injectée simultanément avec la MSO (25 $\mu\text{g}/0,5\mu\text{l}$ ), ne modifie pas l'hypothermie due à l'action de la MSO seule, la baisse de la température rectale étant de  $-2,0^{\circ} \pm 0,4^{\circ}\text{C}$  ( $p < 0,05$  par rapport aux rats témoins). Les animaux sont très déséquilibrés.

Ainsi, l'accumulation du GABA par l'action de GVG ou de l'acide nipécotique, au niveau du noyau dorsal du raphé, semble bloquer l'hypothermie induite par la MSO. D'autre part, le 2-OH-saclofen, antagoniste du récepteur  $\text{GABA}_B$  bloque cette hypothermie alors que la bicuculline, antagoniste spécifique du récepteur  $\text{GABA}_A$  n'a aucune action, ce qui suggère une intervention des récepteurs  $\text{GABA}_B$  dans le mécanisme de l'action hypothermisan- te de la MSO.

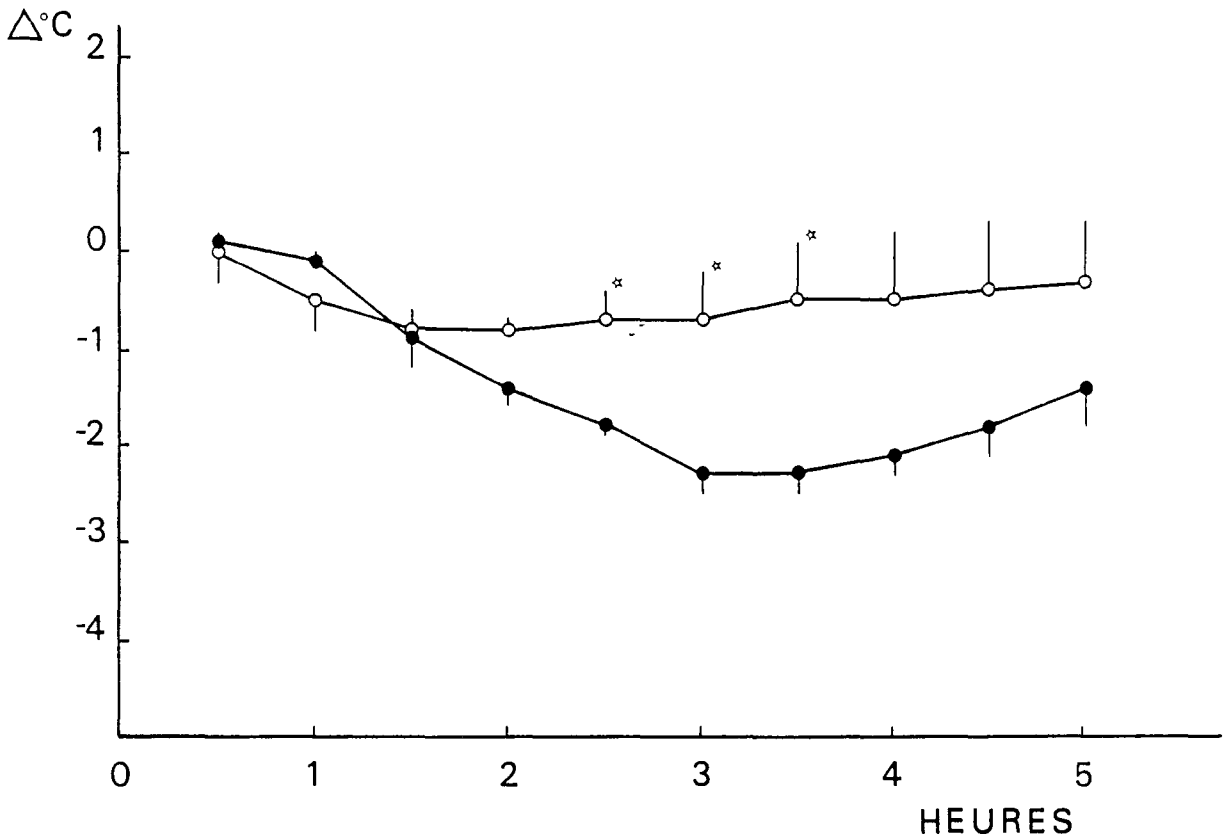


Figure 32- Variation de la température rectale ( $\Delta^{\circ}\text{C}$ ) à la suite d'une injection intracérébroventriculaire (ventricule latéral) de MSO (75 $\mu\text{g}$  par rat) au rat, à la température ambiante de 24 $^{\circ}\text{C}$ . ○ : GVG (30 $\mu\text{g}$  par rat) injecté dans le ventricule latéral 24h avant la MSO (n=5); ● : témoins MSO seule (n=5). Durée en heures. \*  $p < 0,05$ , pour les différences significatives avec les témoins.



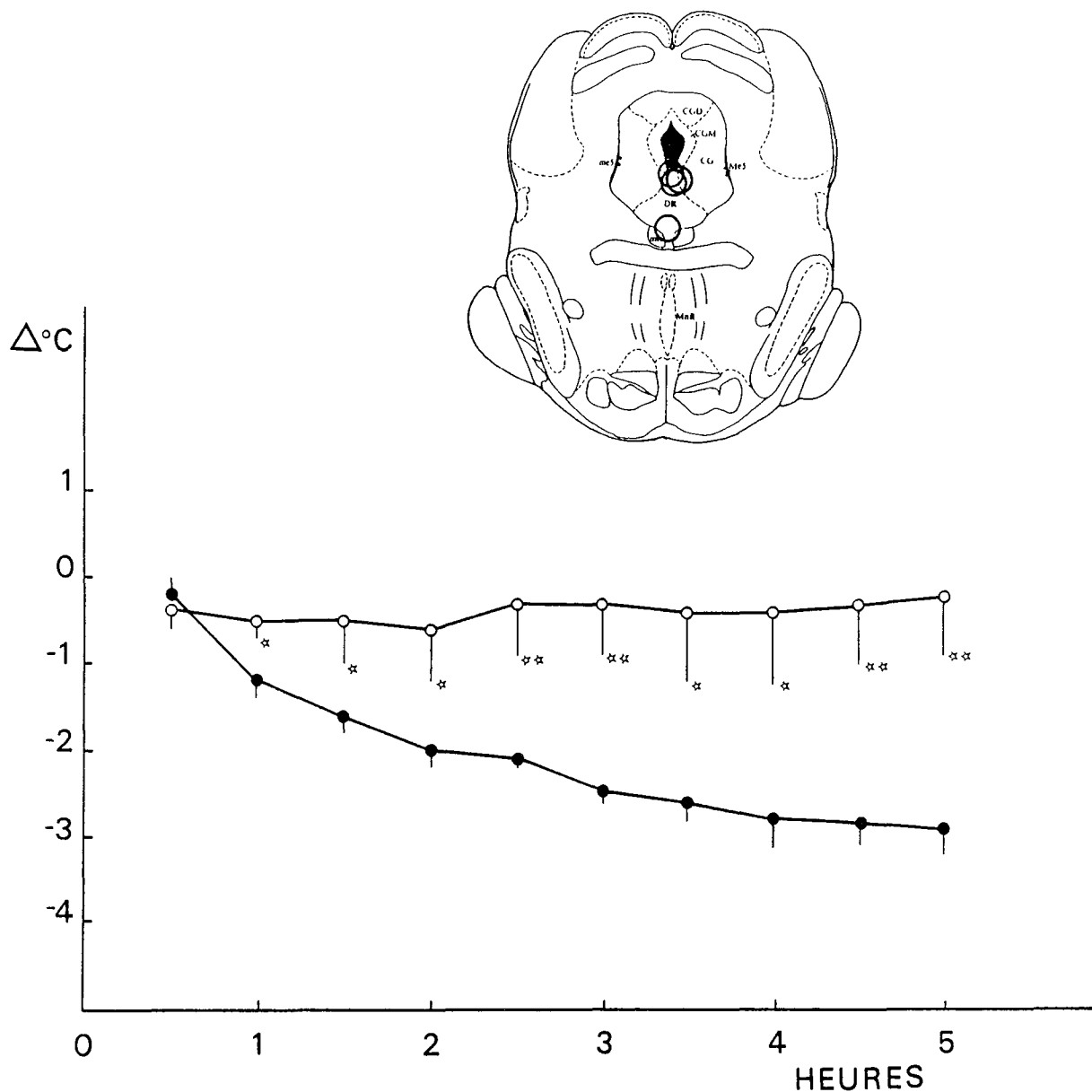


Figure 33- Variation de la température rectale ( $\Delta^{\circ}\text{C}$ ) à la suite de l'infusion de MSO (25 $\mu\text{g}$  par rat) dans le noyau dorsal du raphé du Rat, à la température ambiante de 24 $^{\circ}\text{C}$ . ○ : ( $\pm$ )acide nipécotique (6 $\mu\text{g}$  par rat) plus MSO (25 $\mu\text{g}$  par rat) (n=5); ● : témoins MSO seule (n=5). Durée en heures. \*  $p < 0,05$ ; \*\*  $p < 0,01$ , pour les différences significatives avec les témoins.

Les microinfusions ont été réalisées aux sites indiqués dans la coupe transversale du mésencéphale du Rat (atlas de Paxinos, Watson, 1982).

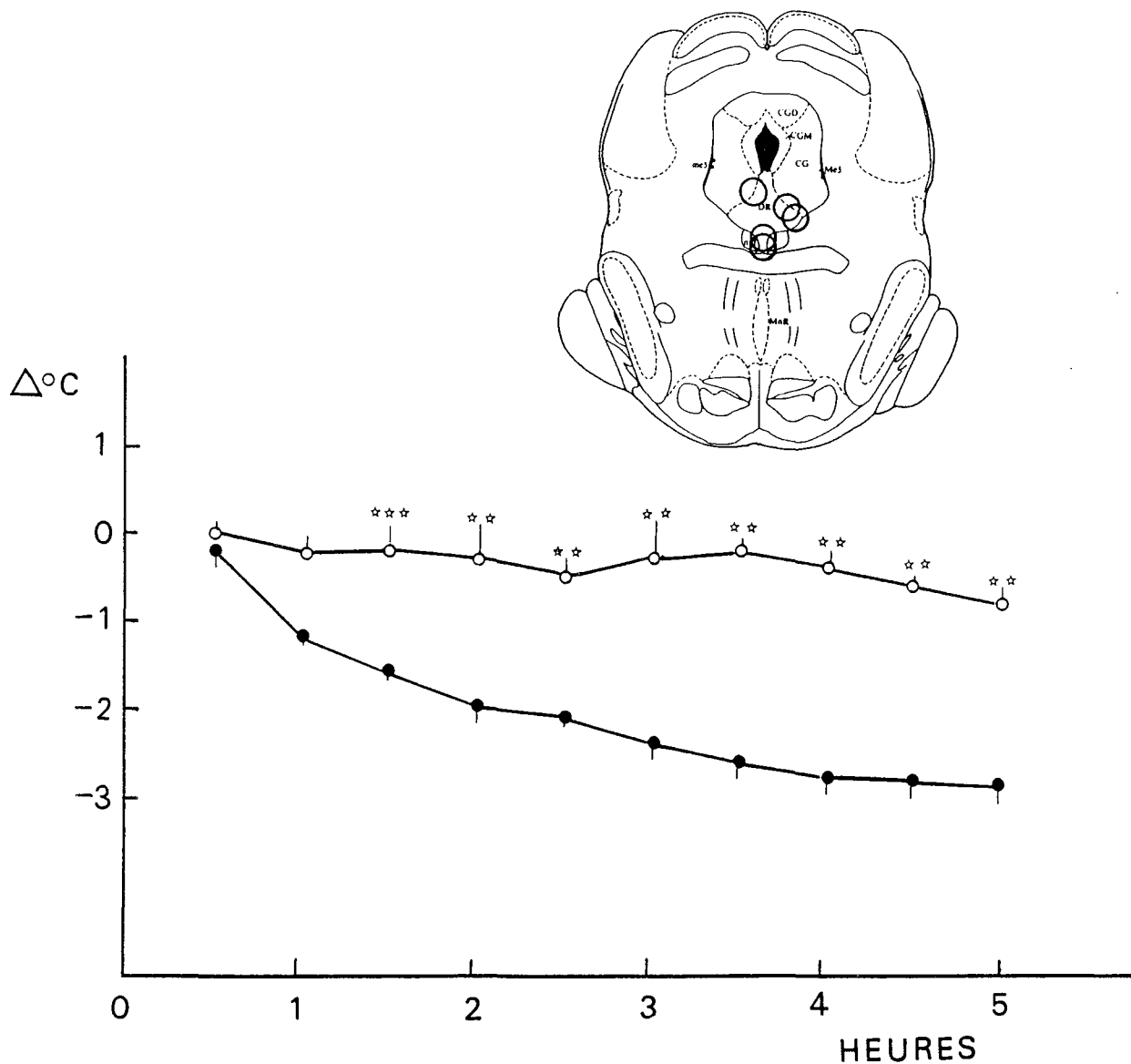


Figure 34- Variation de la température rectale ( $\Delta^{\circ}\text{C}$ ) à la suite de l'infusion de MSO (25 $\mu\text{g}$  par rat) dans le noyau dorsal du raphé du Rat , à la température ambiante de 24 $^{\circ}\text{C}$ . ○ : GVG (10 $\mu\text{g}$  par rat) infusé dans le noyau dorsal du raphé 24h avant (n=5); ● : témoins MSO (25 $\mu\text{g}$  par rat) (n=5). Durée en heures. \*\*  $p < 0,01$ , \*\*\*  $p < 0,001$ , pour les différences significatives avec les témoins.

Les microinfusions ont été réalisées aux sites indiqués dans la coupe transversale du mésencéphale du Rat (atlas de Paxinos, Watson, 1982).

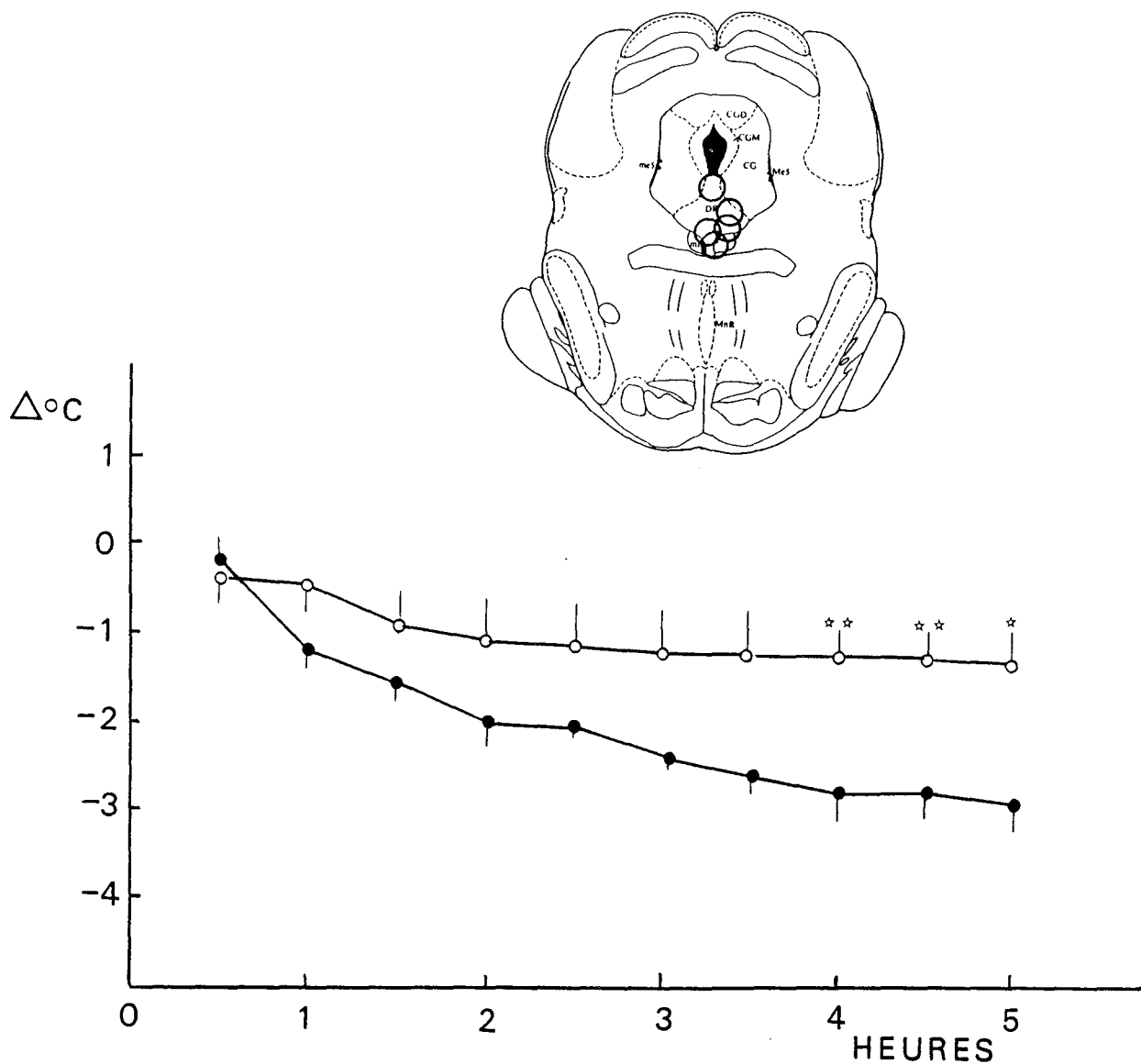


Figure 35- Variation de la température rectale ( $\Delta^{\circ}\text{C}$ ) à la suite de l'infusion de MSO ( $25\mu\text{g}$  par rat) dans le noyau dorsal du raphé du Rat, à la température ambiante de  $24^{\circ}\text{C}$ . ○: 2-OH-saclofen ( $13,28\text{ng}$  par rat) plus MSO ( $25\mu\text{g}$  par rat) ( $n=5$ ). Durée en heures. \*  $p < 0,05$ , \*\*  $p < 0,01$ , pour les différences significatives avec les témoins (MSO seule) ●.

Les microinfusions ont été réalisées aux sites indiqués dans la coupe transversale du mésencéphale du Rat (atlas de Paxinos, Watson, 1982).

#### 4 - Conclusion

---

La présence d'ammoniaque peut affecter l'utilisation de la glutamine comme précurseur des neurotransmetteurs glutamate, GABA et aspartate (Rabe, 1981). La glutamine est un important précurseur de la synthèse du GABA mais il ne peut pas être le seul étant donné qu'il n'est pas possible de déprimer complètement l'accumulation du GABA induite par le  $\gamma$ -vinyl GABA (GVG) un inhibiteur spécifique de la GABA transaminase. L'augmentation de la concentration en GABA après traitement par le GVG a été utilisée extensivement pour l'estimation du degré de "turnover" du GABA dans le tissu nerveux. D'après nos résultats, l'accumulation de GABA à la suite du prétraitement par le GVG, supprime l'hypothermie induite par la MSO. Le GABA exercerait un contrôle inhibiteur sur les neurones sérotoninergiques centraux, celui-ci se ferait par l'intermédiaire des récepteurs GABA localisés dans les noyaux du raphé (Nishikawa, Scatton, 1985). Ces récepteurs sont des récepteurs type GABA<sub>B</sub> que l'on peut envisager comme étant localisés présynaptiquement (Schlicker et coll., 1984). Il existe des récepteurs GABA<sub>B</sub> sur les somas des neurones sérotoninergiques du noyau dorsal du raphé. Ils exercent un contrôle inhibiteur sur les fibres nerveuses sérotoninergiques (Nishikawa, Scatton, 1985). Dans nos expériences, par blocage des récepteurs GABA<sub>B</sub> par leur antagoniste le plus sélectif, le 2-OH-saclofen, nous supprimons l'hypothermie déclenchée par la MSO infusée dans le noyau dorsal du raphé. Par contre, si nous bloquons les récepteurs GABA<sub>A</sub> par leur antagoniste sélectif la bicuculline, nous ne supprimons pas l'hypothermie due à la MSO seule. On a récemment montré que l'agoniste sélectif du récepteur GABA<sub>B</sub> le (+)baclofen, administré par voie intrapéritonéale à la souris, induit l'hypothermie interne (Gray et coll., 1987).

Dans le noyau dorsal du raphé une diminution en GABA disponible semblerait contribuer à l'action hypothermique de la MSO étant donné que la baisse de la température rectale du rat est freinée en présence d'acide nipécotique ou de GVG.

DISCUSSION

Tableaux récapitulatifs des résultats des expériences

ETUDE DE L'HYPOTHERMIE INDUITE PAR LA METHIONINE SULFOXIMINE

---

<u>MSO</u>	<u>CONDITIONS</u>	<u>TEMPERATURE RECTALE</u>	<u>COMPORTEMENTS</u>
150mg/kg <sub>s</sub>	I.I.P. T. ext. +24°C	HYPOTHERMIE de 2,2°C à la 4 <sup>ème</sup> heure	Ataxie Convulsions
75ug	I.I.V.L. T. ext. +24°C	HYPOTHERMIE de 2,3°C à la 3 <sup>ème</sup> heure	Ataxie Convulsions
60ug	I.I.V. III <sup>è</sup> V. T. ext. +24°C	HYPOTHERMIE de 2,6°C à la 2 <sup>ème</sup> heure	Ataxie Convulsions
25ug	PO-HA T. ext. +24°C	HYPERTHERMIE de 2°C à la 4 <sup>ème</sup> heure	
150mg/kg	I.I.P. + L-Méthionine T. ext. +24°C	HYPOTHERMIE de 2,7°C à la 5 <sup>ème</sup> heure	
75ug	I.I.V.L. T. ext. +24°C 1h. à +36°C	PAS D'HYPOTHERMIE	Ataxie Convulsions
75ug	I.I.V.L. T. ext. +24°C 1h. à +11°C	Forte HYPOTHERMIE - 6,1°C à 1h30	Ataxie Convulsions

ETUDE DU ROLE JOUE PAR LA SEROTONINE DANS LE MECANISME D'INDUCTION DE  
L'HYPOTHERMIE PAR LA MSO

MSO injectée à la dose de 150mg/kg par voie I.P.

MSO injectée à la dose de 60ug par voie I.V. (III<sup>ème</sup>V.).

<u>PRETRAITEMENT</u>	<u>CONDITIONS</u>	<u>TEMPERATURE RECTALE</u>	<u>COMPORTEMENTS</u>
	<u>MSO I.I.P.</u>		
PCPA 300mg/kg	I.I.P.	HYPOTHERMIE de 3,2°C	Ataxie
48heures avant	T. ext. +24°C	à 4h30	Convulsions
PCA 6mg/kg (x2)	I.I.P.	HYPOTHERMIE de 2,3°C	Inertie
7jours avant	T. ext. +24°C	à la 4 <sup>ème</sup> heure	Hypertonie des 4 membres
FF 40mg/kg	S.C.P.	HYPOTHERMIE de 2,9°C	Inertie
24heures avant	T.ext. +24°C	à 4h30	
	<u>MSO I.I.V. ( III<sup>ème</sup>V.)</u>		
PCPA 300mg/kg	I.I.P.	HYPOTHERMIE de 2,3°C	Pas de "righting reflex", convulsions
48heures avant		à 1h30	
FF 40mg/kg	S.C.P.	HYPOTHERMIE de 2,3°C	"flat body posture"
24heures avant	T. ext. +24°C	à la 2 <sup>ème</sup> heure	
	<u>MSO I.I.P.</u>		
5-HTP 100mg/kg	I.I.P.	HYPOTHERMIE de 2,6°C	Déséquilibre
	T.ext. +24°C	à la 5 <sup>ème</sup> heure	
5HTP 200mg/kg	I.I.P.	Pas d'HYPOTHERMIE	Ataxie
	T.ext. +24°C		
Carbidopa +	I.I.P.	Pas d'HYPOTHERMIE	Ataxie
5-HTP 100mg/kg	T.ext. +24°C		



Suite de la page 100

Carbidopa + 5-HTP 50mg/kg	I.I.P. T.ext +24°C	HYPOTHERMIE de 1,3°C à 4h30	Ataxie
		<u>MSO I.I.V. (III<sup>e</sup>V.)</u>	
5-HTP 200mg/kg	I.I.P. T. ext. +24°C	Pas d'HYPOTHERMIE	Déséquilibre QQ. Convulsions
		<u>MSO I.I.P.</u>	
<u>5-HT<sub>1</sub></u> ( <sup>+</sup> )Pindolol			
1,5mg/kg	I.S.C.	HYPOTHERMIE de 1,8°C(3h)	Inertie
3mg/kg	T. ext.+24°C	HYPOTHERMIE de 1°C (4h)	" et qq.convulsions
6mg/kg		HYPOTHERMIE de 2,6°C à 3h30	Ataxie
(-) Propranolol			
16mg/kg	I.I.P.	HYPOTHERMIE de 3,8°C	Ataxie
25mg/kg	T. ext.+24°C	HYPOTHERMIE de 2,8°C à 5h.	Hypertonie des 4 membres
		<u>MSO I.I.V. (III<sup>e</sup>V.)</u>	
( <sup>+</sup> )Pindolol	I.S.C.		
3mg/kg	T. ext.+24°C	HYPOTHERMIE de 1,1°C	Perte d'équilibre
(-) Propranolol	I.I.P.		Ataxie
16mg/kg	T.ext. +24°C	HYPOTHERMIE de 1,7°C	Convulsions v.
		<u>MSO I.I.P.</u>	
<u>5-HT<sub>2</sub></u> Ketanserin	I.I.P.		
0,7mg/kg	T.ext.24°C	HYPOTHERMIE de 2,5°C	Ataxie
1,4mg/kg		HYPOTHERMIE de 2,2°C	
		<u>MSO I.I.V. (III<sup>e</sup>)</u>	
Ketanserin	I.I.P.		
1,4 mg/kg	T.ext. +24°C	HYPOTHERMIE de 2,8°C à 2h.	Déséquilibre

ROLE DU NOYAU DORSAL DU RAPHE

MSO infusée à la dose de 25ug, dans le noyau dorsal du raphé, t.ext.+24°C

HYPOTHERMIE de 2,9°C à la 5<sup>ème</sup> heure, rat déséquilibré.

<u>PRETRAITEMENT</u>	<u>CONDITIONS</u>	<u>TEMPERATURE RECTALE</u>	<u>COMPORTEMENTS</u>
<u>5-HT<sub>1</sub></u>			
( <sup>+</sup> )Pindolol 3mg/kg	I.S.C. T.ext.+24°C	HYPOTHERMIE freinée (1,5°C à 2h)	Déséquilibre
(-)P̄opranolol 16mg/kg	I.I.P. T.ext.+24°C	Pas d'HYPOTHERMIE	Peu de déséquilibre
<u>5-HT<sub>2</sub></u>			
Ketanserin 0,5mg/kg	I.I.P. T.ext.+24°C	HYPOTHERMIE de 2°C à 2h30	Déséquilibre Convulsions

INTERACTION EVENTUELLE ENTRE LES SYSTEMES CATECHOLAMINERGIQUES ET SEROTO-  
NINERGIQUES DANS L'INDUCTION DE L'HYPOTHERMIE PAR LA MSO

MSO injectée à la dose de 150mg/kg par voie I.P.

MSO injectée à la dose de 60ug par voie I.V. (III<sup>e</sup>v.).

<u>PRETRAITEMENT</u>	<u>CONDITIONS</u>	<u>TEMPERATURE RECTALE</u>	<u>COMPORTEMENTS</u>
(antagonistes)	<u>MSO I.I.P.</u>		
Phentolamine 7mg/kg	I.I.P. T.ext.+24°C	HYPOTHERMIE de 2,7°C à la 4 <sup>ème</sup> heure	Ataxie
Prazosin ( $\alpha_1$ ) 1,6mg/kg 3,3mg/kg	I.I.P. T.ext.+24°C	HYPOTHERMIE de 3°C HYPOTHERMIE de 2,5°C à 5h ou 4h	Déséquilibre convulsions
Yohimbine ( $\alpha_2$ ) 0,5mg/kg 2mg/kg	I.I.P. T.ext.+24°C	HYPOTHERMIE de 2°C HYPOTHERMIE de 2,3°C à la 4 <sup>ème</sup> heure	Ataxie Convulsions
Betaxolol ( $\beta_1$ ) 1,5mg/kg 3mg/kg 4mg/kg	I.S.C. T.ext.+24°C	HYPOTHERMIE freinée HYPOTHERMIE de 2,7°C HYPOTHERMIE de 2,1°C à la 5 <sup>ème</sup> heure	Déséquilibre important Qq.convulsions "flat body posture"
ICI 111.551 ( $\beta_2$ ) 1,13mg/kg 2,26mg/kg	I.I.P. T.ext.+24°C	HYPOTHERMIE de 2,9°C HYPOTHERMIE de 3,1°C à la 5 <sup>ème</sup> heure	Déséquilibre "flat body posture" Qq.convulsions

Suite de la page 103

MSO I.I.V. (III<sup>ème</sup> V.)

Prazosin ( $\alpha'_1$ ) 1,6mg/kg	I.I.P. T.ext.+24°C	HYPOTHERMIE de 2,1°C à la 2 <sup>ème</sup> heure	Ataxie "flat body posture"
Yohimbine ( $\alpha'_2$ ) 2,2mg/kg	I.I.P. T.ext.+24°C	HYPOTHERMIE de 3°C à 1h30	Ataxie "flat body posture"
Betaxolol ( $\beta_1$ ) 2,5mg/kg	I.S.C. T.ext.+24°C	HYPOTHERMIE de 2,5°C à la 2 <sup>ème</sup> heure	Ataxie "flat body posture"
ICI 118.551 ( $\beta_2$ ) 2,26mg/kg	I.I.P. T.ext.+24°C	HYPOTHERMIE de 2,9°C à la 3 <sup>ème</sup>	Ataxie "flat body posture"

INTERVENTION DES SYSTEMES GABAERGIQUES DANS L'INDUCTION DE L'HYPOTHERMIE

PAR LA MSO

MOLECULES                      CONDITIONS                      TEMPERATURE RECTALE                      COMPORTEMENTS

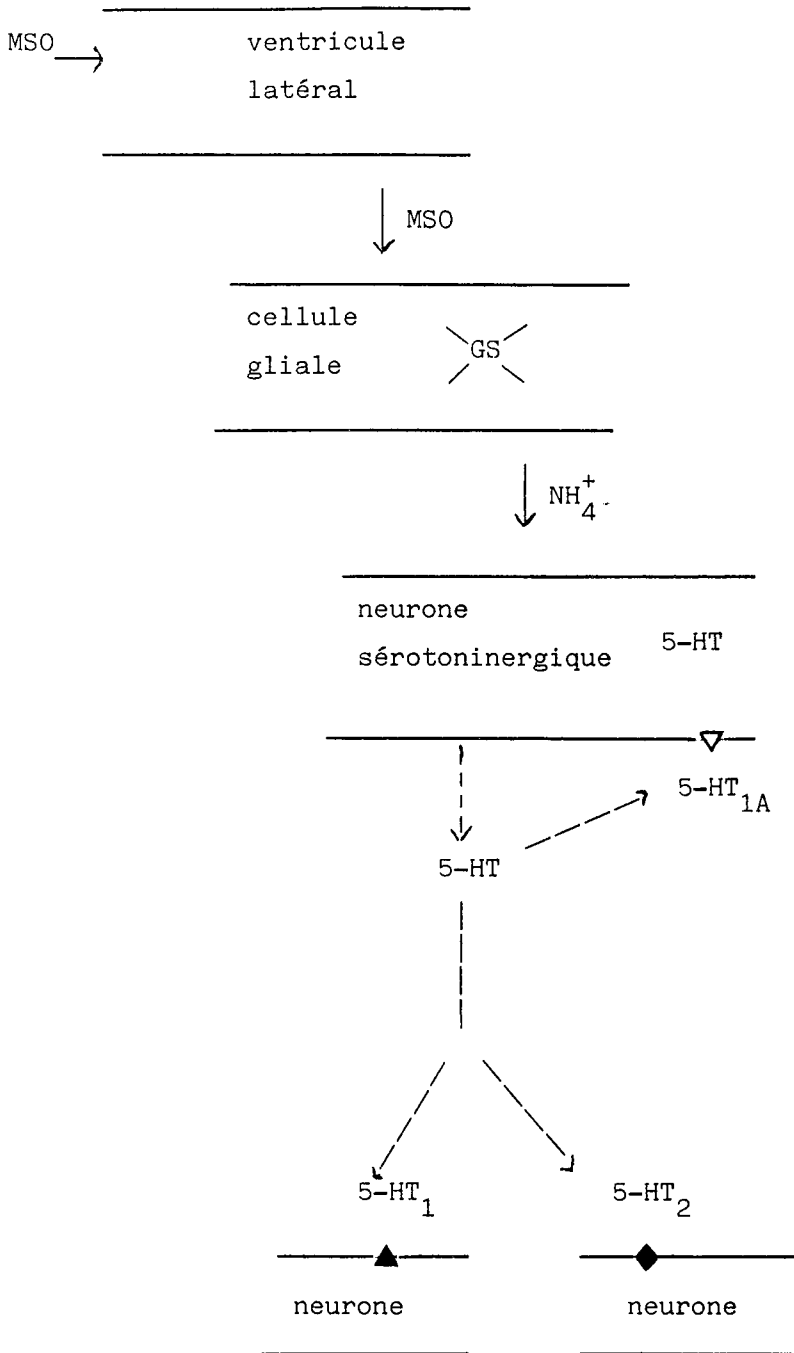
Infusion dans le noyau dorsal du raphé

MSO 25ug	I.N.D.R.		
Acide nipécotique 25ug	T. ext.+24°C	Pas d'HYPOTHERMIE	Déséquilibre important
GVG 24h.avant	I.N.D.R.		Déséquilibre
MSO 25ug	T.ext.+24°C	Pas d'HYPOTHERMIE	important
MSO 25ug			
2-OHsaclufen 13,3ng	I.N.D.R. T.ext.+24°C	Pas d'HYPOTHERMIE	Déséquilibre important
MSO 25ug			
Bicuculline 25ng	I.N.D.R. T.ext.+24°C	HYPOTHERMIE de 2°C à la 4 <sup>ème</sup> heure	Déséquilibre important

Les résultats de nos recherches démontrent que la MSO peut être considérée comme étant une molécule à action rapidement hypothermique, mais une relation causale directe ne semble pas être établie entre l'hypothermie induite par la MSO et le syndrome progressif d'ataxie qu'elle déclenche, puisque les rats soumis à un environnement chaud exhibent ce syndrome. Nous avons montré que l'injection de la MSO dans le III<sup>e</sup> ventricule induisait une chute de la température rectale avec un minimum à 2 heures suivi par un retour à la normothermie, associé au développement rapide de l'ataxie et des convulsions épisodiques à environ 4 heures. Ainsi, il apparaîtrait que des structures cellulaires dans l'hypothalamus au voisinage des parois des ventricules peuvent être affectées métaboliquement par la MSO. Des études antérieures chez la souris ont montré qu'après l'administration systémique de la MSO, les concentrations cérébrales en phosphocréatine et en ATP ne varient pas, mais celles en glucose et en glycogène s'élèvent (Berel et coll., 1977; Folbergrova et coll., 1969) corrélativement avec une augmentation de 55% de la glycémie (Nehlig, Gayet, résultats non publiés). D'autre part, la MSO déprime l'oxydation du glucose, l'oxydation d'autres substrats (acétate, phénylalanine, proline) considérés comme précurseurs du "petit compartiment glutamate" (astrocytes, terminaisons nerveuses) peut être accrue (Cooper et coll., 1983; Cooper et coll., 1979; Van den Berg, Van den Velden, 1970). Puisque la MSO inhibe lentement et irréversiblement la glutamate-aspartate transaminase (Cooper et coll., 1976) avec le blocage subséquent de la navette malate-aspartate dans les mitochondries cérébrales (Minn, Gayet, 1977), le transfert d'énergie à partir du métabolisme oxydatif de ces substrats doit être sévèrement affecté. Il existe de nombreuses preuves qu'une atteinte, induite expérimentalement, de l'utilisation du glucose dans le cerveau se traduit par une hyperglycémie, induisant ainsi une hypoglycémie "fonctionnelle" à laquelle est exposé le milieu intracellulaire (Mc Candless, Abel, 1985), suivie par une chute de la température corporelle (Robinson et coll., 1972). Nos expériences ont montré qu'une infusion unilatérale de MSO dans sept sites de l'aire PO-HA induit une hyperthermie rectale rapide, tandis que la même infusion dans dix sites de la

région mammillaire n'est suivie d'aucun effet sur la température rectale. En outre, dans ces deux séries d'expériences, le comportement des rats n'est pas affecté.

Rappelons que Sellinger et Dietz (1981) ont suggéré que la MSO affecte en premier lieu les corps cellulaires sérotoninergiques, localisés dans les régions du tronc cérébral et du mésencéphale, et plus tard son effet se propage aux terminaisons sérotoninergiques. En relation avec cette suggestion il nous apparaît important de souligner deux de nos résultats expérimentaux: tout d'abord, le fait que le minimum de la température rectale est atteint dès la période de 2,0-2,30 heures qui suit l'injection de la MSO dans le III<sup>e</sup> ventricule, ensuite, le fait que le prétraitement par la PCPA, la PCA et la FFA n'altérerait pas le métabolisme de la 5-HT dans les corps cellulaires des noyaux du raphé et ainsi n'entre pas en compétition avec la MSO à ce niveau d'où ne modifie pas la chronologie de l'hypothermie induite par cette molécule. La déplétion en 5-HT induite par la MSO, par l'intermédiaire probable de l'augmentation de la concentration en ammoniacque au niveau des noyaux du raphé, peut mettre en route un effet dépressif progressif sur le métabolisme oxydatif du glucose dans différentes régions du cerveau du rat. On a suggéré que les neurones sérotoninergiques, par libération de 5-HT, stimulent les cellules astrogliales via des récepteurs spécifiques pour promouvoir la glycogénolyse et pour ravitailler en glucose les neurones en activité (Hösli, Hösli, 1988; Seal, Pentreath, 1985). La diminution de la concentration en 5-HT extracellulaire ralentirait la glycogénolyse des cellules astrogliales perturbant ainsi la disponibilité du glucose pour le métabolisme énergétique des neurones; ce mécanisme, associé à l'effet dépressif sur le métabolisme oxydatif du glucose serait directement responsable de la diminution de la température corporelle à la suite de l'administration de la MSO au rat. Ces phénomènes seraient contrôlés et modulés par des récepteurs 5-HT<sub>1</sub>, peut être les sous-types 5-HT<sub>1A</sub> et 5-HT<sub>1B</sub>, ce dernier sous-type étant spécifique au rat (Radja et coll., 1991).



Représentation très schématique de l'action de la MSO sur les neurones sérotoninergiques.



RESUME

## 1 - INTRODUCTION

L'injection systémique de L-méthionine-d,l-sulfoximine (MSO), chez le rat, entraîne une encéphalopathie lentement progressive caractérisée par un désordre du mouvement (ataxie) suivi quelques heures plus tard de convulsions toniques et cloniques. Ce modèle est utilisé pour la recherche des mécanismes métaboliques liés aux convulsions.

La MSO perturberait les mécanismes de la thermorégulation que nous pouvons résumer ainsi. Les mammifères ont une température interne maintenue au voisinage d'une température fixe appelée "set-point". L'intégration des informations nécessaires se fait dans l'hypothalamus. Le taux en glucose sanguin contrôle la fonction thermorégulatrice dans les corps mammillaires où le mécanisme du "set-point" paraît être situé et résulter d'un équilibre entre les concentrations des ions  $\text{Na}^+$  et  $\text{Ca}^+$ . Les neurotransmetteurs principalement mis en cause paraissent être la sérotonine (5-HT) et l'acide  $\gamma$ -aminobutyrique (GABA).

Le but du travail que nous présentons est d'étudier les modalités de la variation de la température interne du rat sous l'action de la MSO, et de tenter de tirer des conclusions en ce qui concerne les voies neuronales dans le système nerveux central qui peuvent être impliquées dans cette variation.

Les expériences ont été faites sur des rats mâles immobiles appartenant à la race wistar. La température interne a été mesurée par une sonde thermique introduite dans le rectum et reliée à un téléthermomètre. Ce téléthermomètre est lui-même relié à un enregistreur potentiométrique.

Les injections de MSO ont été réalisées par voie intrapéritonéale (i. p.) ou intracérébroventriculaire (i.v.l. ou III<sup>e</sup>v.) ou intracérébrale (i. c.). Dans les deux derniers cas, il a fallu implanter dans le cerveau du rat une canule guide selon les coordonnées stéréotaxiques et vérifier histologiquement la localisation de l'implantation.

## 2 - ETUDE DE L'HYPOTHERMIE INDUITE PAR LA MSO

La MSO administrée par voie i.p. induit une hypothermie transitoire. A la dose de 150mg/kg et à la température ambiante de 24°C, la baisse est de 2,3°C, accompagnée d'un syndrome d'ataxie suivi de convulsions.

La température cutanée, enregistrée à la base de la queue du rat, après une injection intrapéritonéale de MSO ne varie pas.

Les centres thermorégulateurs siégeant dans le système nerveux central (aire préoptique-hypothalamique antérieure (PO-HA), hypothalamus postérieur, corps mammillaires), nous avons injecté la MSO dans le ventricule latéral, le III<sup>e</sup> ventricule, PO-HA, les corps mammillaires et certaines structures cérébrales (système limbique) pouvant jouer un rôle dans le déclenchement des convulsions. La MSO injectée dans les ventricules provoque une hypothermie de l'ordre de 2,5°C. Cette hypothermie s'accompagne toujours d'une ataxie suivie plus ou moins par des convulsions lors du retour à la normothermie. La MSO ne provoque aucune perturbation apparente au niveau de la température interne et du comportement lorsqu'elle est infusée dans les structures cérébrales étudiées, sauf dans l'aire PO-HA (hypothermie de +2°C).

La température ambiante influence l'action de la MSO. Surtout, lors d'une i.i.v.l. de MSO, une température ambiante élevée protège le rat d'une hypothermie importante due à l'action de la MSO. Donc, les mécanismes associés à l'induction de l'hypothermie siègent dans le système nerveux central.

## 3 - ROLE DE LA SEROTONINE

La sérotonine joue un rôle important dans la thermorégulation. Si nous

produisons une déplétion cérébrale en 5-HT, par prétraitement par la parachlorophénylalanine (PCPA), la parachloroamphétamine (PCA) ou la fenfluramine (FFA), la MSO étant injectée par voie i.p. ou i.v. (III<sup>è</sup>v.), nous enregistrons une hypothermie importante. Les rats sont ataxiques et présentent souvent des convulsions cloniques violentes. Si nous augmentons la concentration cérébrale en 5-HT, par prétraitement par le 5-hydroxytryptophane (5-HTP) seul ou associé à la carbidopa, la MSO étant administrée par voie i.p. ou i.v. (III<sup>è</sup>v.), nous enregistrons une suppression de l'hypothermie pour une dose de 200mg/kg de 5-HTP seul ou de 100mg/kg associé à la carbidopa. Les animaux sont ataxiques, 7 rats sur 9 meurent après traitement par le 5-HTP (MSO, i.p.) ou présentent des convulsions après traitement par le 5-HTP associé à la carbidopa (2 rats sur 8).

En présence de (+)pindolol associé à la MSO, administrée par voie i.p. ou par voie i.v. (v.l.), nous enregistrons une suppression ou une diminution de l'hypothermie due à la MSO seule (MSO, i.p., sauf pour une dose de pindolol de 6mg/kg), ou une hypothermie plus faible qu'avec la MSO seule (MSO III<sup>è</sup>v.). Les rats présentent une forte ataxie et dans certains cas des convulsions toniques-cloniques sévères (6 rats sur 12), à la suite d'une i.p., i.v.l. de MSO. En présence de (-)propranolol associé à la MSO, administrée par voie i.p. ou par voie i.v. (l. et III<sup>è</sup>v.), nous enregistrons une hypothermie importante (MSO, i.p.; i.v.l.) ou une hypothermie supérieure à celle due à la MSO seule (III<sup>è</sup>v.). Les rats sont ataxiques et présentent dans certains cas de fortes convulsions toniques-cloniques (v.l. et III<sup>è</sup>v. surtout). En présence de ketanserin associé à la MSO administrée par voie i.p. ou i.v. (III<sup>è</sup>v.), nous enregistrons une hypothermie importante. Les animaux présentent l'état de "flat body posture" (MSO, i.p.) suivi de violentes convulsions (MSO, III<sup>è</sup>v.).

#### 4 - ROLE DU NOYAU DORSAL DU RAPHE

Les somas des neurones sérotoninergiques sont localisés dans le noyau dorsal du raphé et ils envoient des fibres sérotoninergiques vers l'hypothalamus. Nous avons infusé de la MSO dans le noyau dorsal du raphé. Nous notons une hypothermie importante. Les rats présentent toujours un fort déséquilibre avec absence des réflexes de redressement. La MSO est infusée dans le noyau dorsal du raphé, en présence de (+)pindolol ou de (-)propranolol, nous n'enregistrons aucune hypothermie. Les rats sont déséquilibrés.

## 5 - ROLE DES CATECHOLAMINES

Il existe une interférence neurofonctionnelle entre les catécholamines et la sérotonine. En présence d'antagonistes des récepteurs catécholaminergiques : phentolamine, prazosin, yohimbine, betaxolol, ICI 118.551 et sulpiride, la MSO injectée par voie i.p. ou par voie III<sup>e</sup>v., induit une hypothermie rectale toujours aussi importante. Les rats sont déséquilibrés et subissent assez souvent des convulsions (MSO, i.p.) et même une neurotoxicité conduisant à la mort dans le cas de la yohimbine (MSO, III<sup>e</sup>v.).

## 6 - ROLE DU GABA

Il existe une influence directe GABAergique sur les cellules du noyau dorsal du raphé (NDR). La MSO infusée dans le NDR, associée à l'acide nicotinique ou au 2-hydroxysaclofen ou après traitement avec le  $\gamma$ -vinylGABA, ne provoque aucune hypothermie et les animaux sont surtout déséquilibrés. La MSO infusée dans le NDR, associée à la bicuculline, induit une hypothermie et les rats sont déséquilibrés.

## 7 - DISCUSSION

Lorsque la MSO est injectée par voie i.p. et plus particulièrement par voie i.v., l'augmentation progressive de la concentration en ammoniacque dans le tissu cérébral induit une sécrétion de 5-HT à partir des structures cellulaires du tronc cérébral et du mésencéphale riches en neurones sérotoninergiques, il s'ensuivrait un ralentissement du métabolisme de la 5-HT à ces niveaux qui se propagerait ensuite aux terminaisons axoniques 5-HT diffuses dans presque toutes les régions du système nerveux central. Le résultat en serait un effet dépressif sur le métabolisme oxydatif du glucose des différentes régions du cerveau du rat, ces phénomènes contrôlés et modulés par certains récepteurs 5-HT, vraisemblablement 5-HT<sub>1</sub> seraient responsables de la baisse de la température.

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

---

- Aghajanian G.K., Kuhar M.J., Roth R. (1973). Serotonin-containing neuronal perikarya and terminals: differential effects of p-chlorophenylalanine. Brain Res., 54, 84-101.
- Aghajanian G.K., Sprouse J.S., Rasmussen K., (1987). Physiology of the midbrain serotonin system. In Psychopharmacology, the third generation of progress. Meltzer H.Y. and associate editors, (Raven Press, New York) p. 141-150.
- Albe-Fessard D., Stutinsky F., Libouban S. (1971). Atlas stéréotaxique du diencéphale du Rat blanc. Paris, Ed. du C.N.R.S.
- Alexander G.J., Kopeloff L.M., Alexander R.B. (1988). Low serotonin turnover in cerebral hemispheres of rats primed with p-chlorophenylalanine. Biog.Amines, 5 (1), 17-24.
- Anderson G.M., Teff K.L., Young S.N. (1987). Serotonin in cisternal fluid of the rat: measurement and use as an index of functionally active serotonin. Life Sci., 40, 2253-2260.
- Bartholini G., Constantinidis J., Tissot R., Pletscher A. (1971). Formation of monoamines from various amino acids in the brain after inhibition of extracerebral decarboxylase. Biochem. Pharmacol., 20, 1243-1247.
- Beaudet A., Descarries L. (1978). The monoamine innervation of the rat cerebral cortex: synaptic and nonsynaptic axon terminals. Neuroscience, 3, 851-860.
- Bedard P., Pycock C.J., (1977). "Wet dog" shake behaviour in the rat: a possible quantitative model of central 5-hydroxytryptamine activity. Neuropharmacology, 16, 663-670.
- Bentley H.R., Mc Dermott E.E., Whitehead J.K. (1950). Action of nitrogen trichloride on proteins. A synthesis of the toxic factor from methionine. Nature, 165, 735.
- Berel A., Lehr P.R., Gayet J. Inhibition by metyrapone of convulsions and of accumulation of brain glucose and glycogen in mice induced by methionine sulfoximine (MSO). Sixth Int.Meeting of the I.S.N., Copenhagen, 21-26 aug. 1977, Abstract n°211.
- Bill D.J., Hughes I.E., Stephens R.J. (1989). The thermogenic actions of  $\alpha_2$ -adrenoceptor agonists in reserpinized mice are mediated via a central postsynaptic  $\alpha_2$ -adrenoceptor mechanism. Br.J.Pharmacol., 96, 133-143.

- Bleier R. (1971). The relations of ependyme to neurons and capillaries in the hypothalamus: a Golgi-Cox study. J. Comp. Neur., 142, 439-464.
- Bleier R., Cohn P., Siggelkow I.R. (1980). A cytoarchitectonic atlas of the hypothalamus and hypothalamic third ventricle of the rat. In Handbook of the hypothalamus, volume 1. Anatomy of the hypothalamus. Morgane P.J., Panksepp J. eds. (Dekker, New York), p. 137.
- Blier P., Serrano A., Scatton B. (1990). Differential responsiveness of the rat dorsal and median raphe 5-HT system to 5-HT<sub>1</sub> receptor agonists and p-chloroamphetamine. Synapse, 5 (2), 120-133.
- Bligh J. (1979). The central neurology of mammalian thermoregulation. Neuroscience, 4, 1213-1236
- Blizard D.A., Balkoski V. (1982). Tryptophan availability, central serotonergic function and methionine sulphoximine induced convulsions. Neuropharmacol, 21, 27-30.
- Bobker D.H., Williams J.T. (1989). Serotonin agonists inhibit synaptic potentials in the rat locus coeruleus in vitro via 5-hydroxytryptamine 1A ou 5-hydroxytryptamine 1B receptors. J. Pharmacol. Exp. Ther., 250-(1), 37-43.
- Bogdanski D.F., Weissback J., Udenfriends S. (1958). Pharmacological studies with the serotonin precursor, 5-hydroxytryptophan. J. Pharmacol. Exp. Ther., 122, 182-194.
- Borbely A., Huston J.P., Waser P.G. (1973). Physiological and behavioral effects of parachlorophenylalanine in the rat. Psychopharmacologia, 31, 131-142.
- Boulant J.A. (1980). Hypothalamic control of thermoregulation (Neurophysiological Basis). In Behavioral studies of the hypothalamus. Morgan P.J., Panksepp J. eds (Dekker, Basel) p.1-82.
- Bylund D. B. (1988). Subtypes of  $\alpha_2$ -adrenoceptors: pharmacological and molecular biological evidence converge. Trends Pharmacol. Sci., 9, 356-361.
- Bylund D.B., U'prichard D.C. (1983). Characterization of  $\alpha_1$  and  $\alpha_2$ -adrenergic receptors. Int. Rev. Neurobiol., 24, 343-431.
- Cabanac M. (1979). Le comportement thermorégulateur. J. Physiol. (Paris) 75, 115-178.
- Cambier J., Masson M., Dehen H. (1983). Abrégé de neurologie. Masson (4<sup>e</sup> édition, Paris). p. 161.
- Campbell P.N., Work T.S., Mellandy E. (1950). Isolation of a crystalline toxic factor from aigenized wheat flour. Nature, 165, 345-346.



- Carlson L.D. (1973). Central and peripheral mechanisms in temperature regulation. Pharmacology of thermoregulation. Schönbaum E., Lomax P., Eds, (Karger, Basel), p. 7-21.
- Carter R.B., Leander J.D. (1980). Evidence for a peripheral effect of serotonin or metabolites in 5-hydroxytryptophan-induced hypothermia. Neuropharmacology, 19, 777-784.
- Chaput Y., Lesieur P., Demontigny C. (1990). Effects of short-term serotonin depletion on the efficacy of serotonin neurotransmission. Electrophysiological studies in the rat central nervous system. Synapse, 6 (4), 328-337.
- Clark W.G., Lipton J.M. (1985). Changes in body temperature after administration of amino acids, peptides, dopamine, neuroleptics and related agents: II. Neurosci.Biobehav.Rev. 9, 299-371.
- Colboc O., Costentin J. (1980). Evidence for the thermoregulatory dopaminergic receptors located in the preopticus medialis nucleus in the rat hypothalamus. J.Pharm.Pharmacol., 32, 624-629.
- Colpaert F.C., Koek W., Lategan A. (1989). L-5-hydroxytryptan-induced flat body posture in the rat: antagonism by ritanserin and potentiation after 5,7-dihydroxytryptamine. Eur.J.Pharmacol., 169 (1), 175-178.
- Cooper A.J.L., Stephani R.A., Meister A. (1976). Enzymatic reactions of methionine sulfoximine. Conversion to the corresponding  $\alpha$ -imino,  $\alpha$ -ketoacids and  $\alpha$ -ketobutyrate and methane sulfinimide. J.Biol. Chem., 251, 6674-6682.
- Cooper A.J.L., Mc Donald J.M., Gelbard A.S., Gledhill R.F., Duffy Th.E. (1979). The metabolic fate of  $^{13}\text{N}$ -labeled ammonia in rat brain. J.Biological Chemistry, 254 (12), 4982-4992.
- Cooper A.J.L., Vergara F., Duffy T.E. (1983). Cerebral glutamine synthetase. In Glutamine, glutamate and GABA in the central nervous system. Hertz L., Kvamme E., Mc Geer E.G., Schousboe A. (Alan Liss, New York) p. 77-93.
- Cooper A.J.L., Plum F. (1987). Biochemistry and physiology of brain ammonia. Physiol. Rev., 67, 440-519.
- Dalkara T. (1986). Nipecotic acid, an uptake blocker, prevents fading of the  $\gamma$ -aminobutyric acid effect. Brain Res., 366, 314-319.
- De Feudis F.V. (1984). Involvement of GABA and other inhibitory amino acids in thermoregulation. Gen. Pharmacol., 15, 445-447.
- Descarries L., Beaudet A., Watkins K.C. (1975). Serotonin nerve terminals

- in adult rat neocortex. Brain Res., 100, 563-588.
- Descarries L., Watkins K.C., Garcia S., Beaudet A. (1982). The serotonin neurons in nucleus raphe dorsalis of adult rat: a light and electron microscope radioautographic study. J.Comp.Neurol., 207, 239-254.
- De Simoni M.G., Sokola A., Fodritto F., Dal Toso G., Algeri S. (1987). Functional meaning of tryptophan-induced increase of 5-HT metabolism as clarified by in vivo voltammetry. Brain Res., 441, 89-94.
- Erecinska H. (1987). The neurotransmitter amino acid transport systems. Biochem.Pharmacol., 36, 3547-3555.
- Exton J.H. (1982). Molecular mechanisms involved in  $\alpha$ -adrenergic responses. Trends Pharmacol.Sci., 3, 111-115.
- Folbergrova J., Passonneau J.V., Lowry O.H., Schulz D.W. (1969). Glycogen, ammonia and related metabolites in the brain during seizures evoked by methionine sulphoximine. J. Neurochem., 16, 191-203.
- Fonnum F. (1987). Biochemistry, anatomy and pharmacology of GABA neurons. In Psychopharmacology, the third generation of progress. Meltzer H.Y., ed.(Raven Press, New York) p. 173-182.
- Fuller R.W., Hines C.W., Mills J. (1965). Lowering of brain serotonin level by chloroamphetamines. Biochem.Pharmacol., 14, 483-488.
- Fuller R.W. (1988). The pharmacology and therapeutic potential of serotonin receptor agonists and antagonists. In Adv Drug Res., 17, Testa B., ed.(Academic Press, London) p. 349-380.
- Fuller R.W., Snoddy H.D., Robertson D.W. (1988). Mechanisms of effects of d-fenfluramine on brain serotonin metabolism in rats: uptake inhibition versus release. Pharmacol.Biochem.Behav., 30, 715-721.
- Garattini S., Mennini T., Samanin R. (1987). From fenfluramine racemate to D-fenfluramine. Specificity and potency of the effects on the serotonergic system and food intake. Ann.N.Y.Acad.Sci., 499, 156-166.
- Ghittoni N.E., Ohlsson W.G., Sellinger O.Z. (1970). The effect of methionine on the regional and intracellular disposition of (<sup>3</sup>H)methionine sulphoximine in rat brain. J.Neurochem., 17, 1057-1068.
- Glennon R.A. (1987). Central serotonin receptors as targets for drug research. J.Med.Chemistry, 30, 1-12.
- Goodwin G.M., De Souza R.J., Green A.R. (1985). The pharmacology of the hypothermic response in mice to 8-hydroxy-2 (di-n-propylamino)tetralin (8-OH-DPAT). A model of presynaptic 5-HT<sub>1</sub> function. Neuropharmacology,

24, 1187-1194.

Goodwin G.M., De Souza R.J., Green A.R., Heal D.J. (1987). The pharmacology of the behavioural and hypothermic responses of rats to 8-hydroxy-2-(di-n-propylamino)tetralin (8-OH-DPAT). Psychopharmacol., 91, 506-511.

Gottschlich K.W., Werner J. (1985). Effects of medial midbrain lesions on thermoresponsive neurons in the thalamus of the rat. Exp.Brain Res., 57, 355-361.

Gray J.A., Goodwin G.M., Heal D.J., Green A.R. Hypothermia induced by baclofen, a possible index of GABA<sub>B</sub> receptor function in mice, is enhanced by antidepressant drugs and ECS. Brit.J.Pharmacol., 92, 863-870.

Green A.R. (1984). 5-HT-mediated behaviour. Animal studies. Neuropharmacology, 23, 1521-1528.

Gudelsky G.A., Koenig J.I., Meltzer H.Y. (1986). Thermoregulatory responses to serotonin (5-HT)receptor stimulation in the rat. Neuropharmacol., 25, 1307-1313.

Gudelsky G.A., Koenig J.I., Meltzer H.Y. (1986). Thermoregulatory responses to serotonin (5-HT)receptor stimulation in the rat. Evidence for opposing roles of 5-HT<sub>2</sub> and 5-HT<sub>1A</sub> receptors. Neuropharmacology, 25, 1307-1313.

Gutierrez J.A., Norenberg M.D. (1977). Ultrastructural study of methionine sulfoximine-induced Alzheimer type II astrocytosis. Amer.J.Pathol., 86, 285-300.

Hamon M., Golzan H., El Mestikawy S., Emerit M.B., Cossery J.M., Lutz O. (1988). Biochemical properties of central serotonin receptors. In Neuronal Serotonin. Osborne N.N., Hamon M. (John Wiley, Sons, Chichester). p. 393-422.

Hardebo J.E., Emson P.C., Falck B., Owman Ch., Rosengren E. (1980). Enzymes related to monoamine transmitter metabolism in brain microvessels. J.Neurochem., 35 (6), 1388-1393.

Hardy J.D. (1973). Posterior hypothalamus and the regulation of body temperature. Fed.Proc., 32, 1564-1571.

Henning M., Rubenson A. (1971). Effects of 5-hydroxytryptophan on arterial blood pressure, body temperature and tissue monoamines in the rat. Acta Pharmacologica, 29, 145-154.

Hertz L., Murthy Ch.R.K., Lai J.C.K., Fitzpatrick S.M., Cooper A.J.L. (19-

- 87). Some metabolic effects of ammonia on astrocytes and neurons in primary cultures. Neurochem.Pathol., 6, 97-129.
- Hevor T., Gayet J. (1981). Stimulation of fructose 1,6 biphosphatase activity and synthesis in the cerebral cortex of rats submitted to the convulsant méthionine sulfoximine. J.Neurochem., 36, 949-958.
- Hevor T.K., Delorme P., Gayet J. (1985). Glycogen content and fructose-1, 6-biphosphatase activity in methionine sulfoximine epileptogenic mouse brain and liver after protein synthesis inhibition. Neuropathol.Appl. Neurobiol., 11, 129-139.
- Higgins G.A., Bradbury A.J., Jones B.J., Oakley N.R. (1988). Behavioural and biochemical consequences following activation of 5-HT<sub>1</sub>-like and GABA receptors in the dorsal raphe nucleus of the rat. Neuropharmacology, 27 (10), 993-1001.
- Hillegaart V., Hjorth S., Ahlenius S. (1990). Effects of 5-HT and 8-OHDPAT on forebrain monoamine synthesis after local application into the median and dorsal raphe nuclei of the rat. J.Neural Transm.Gen.Section, 81 ( 2),131-145.
- Hillegaart V., (1991). Effects of local application of 5-HT and 8-OH-DPAT into the dorsal and median raphe nuclei on core temperature in the rat. Psychopharmacology, 103 (3), 291-296.
- Hindfelt B. (1975). L-methionine-DL-sulfoximine (MSO) and ammonia distribution between extra and intracellular compartments of the rat brain. Neurol.Sci., 25, 499-506.
- Hjorth S. (1985). Hypothermia in the rat induced by the potent serotonergic agent 8-OH-DPAT. J.Neural Transmission, 61, 131-135.
- Hjorth S., Carlsson A. (1985). (-)pindolol stereospecifically inhibits rat brain serotonin (5-HT)synthesis. Neuropharmacology, 24, 1143-1146.
- Hjorth S. Carlsson A. (1986). Is pindolol a mixed agonist-antagonist at central serotonin (5-HT)receptors? Eur.J.Pharmacol., 129, 131-138.
- Hjorth S., Magnusson T.(1988). The 5-HT<sub>1A</sub> receptor agonist,8-OH-DPAT preferentially activates cell body 5-HT autoreceptors in rat brain in vivo. Naunyn-Schmied.Arch.Pharmacol., 338 (5), 463-471.
- Horton R.W., Meldrum B.S., Bachelard H.S. (1973). Enzymic and cerebral metabolic effects of 2-Deoxy-D-Glucose. J.Neurochemistry, 21, 507-520.
- Hösli L., Hösli E. (1988). Electrophysiologic and autoradiographic evidence for receptors for biogenic amines on astrocytes in explant cultures

- of rat CNS. In Glial Cell Receptors. Kimelberg H.K., Ed. (Raven Press, New York) p. 77-93.
- Hoyer D. (1988). Functional correlates of serotonin 5-HT<sub>1</sub> recognition sites. J.Receptor Res., 8 (1-4), 59-81.
- Hutson P.H., Donohoe T.P., Curzon G. (1987). Hypothermia induced by the putative 5-HT<sub>1A</sub> agonists LY 165163 and 8-OH-DPAT is not prevented by 5-HT depletion. Europ.J.Pharmacol., 143, 221-228.
- Jacobs B.L. (1976). An animal behavior model for studying central serotonergic synapses. Life Sci., 19, 777-786.
- Jequier E., Lovenberg W., Sjoerdsma A. (1967). Tryptophan hydroxylase inhibition: the mechanism by which p-chlorophenyl-alanine depletes rat brain serotonin. Mol. Pharmacol., 3, 274-278.
- Jones D.L., Veale W.L., Cooper K.E. (1978). Perfusion of the posterior hypothalamus of cats with various ions and saccharides: effects on body temperature. Can.J.Physiol.Pharmacol., 56, 571-577.
- Kerr D.I.B., Ong J., Johnson G.A.R., Abbenante J., Prager R.H. (1988). 2-hydroxysaclofen: an improved antagonist at central and peripheral GABA<sub>B</sub> receptors. Neurosci.Lett., 92, 92-96.
- Kleven M.S., Pwoskin L.P., Sparber S.B. (1983). Pharmacological evidence for the existence of multiple functional pools of brain serotonin: analysis of brain perfusate from conscious rats. J.Neurochem., 41, 1143-1149.
- Kleven M.S., Seiden L.S. (1989). D-, L- and DL-fenfluramine cause long-lasting depletions of serotonin in rat brain. Brain Res., 505(2), 351-353.
- Knapp S., Mandell A.J. (1976): Coincidence of blockade of synaptosomal 5-hydroxytryptamine uptake and decrease in tryptophan hydroxylase activity: effects of fenfluramine. J.Pharmacol.Exp.Ther., 198, 123-132.
- Koe B. K., Weissman A. (1966). P-chlorophenylalanine: a specific depletor of brain serotonin. J.Pharmacol.and Exp.Ther., 154, 499-516.
- Koenig J. I., Meltzer H. Y., Gudelsky G.A. (1988). 5-hydroxytryptamine<sub>1A</sub> receptor-mediated effects of buspirone, gepirone and ipsapirone. Pharmacol.Biochem.Behav., 29 (4), 711-715.
- Kortelainen M. L., Huttunen P., Lapinlampi T. (1990). Influence of two Beta-adrenoceptor antagonists, propranolol and pindolol, on cold adaptation in the rat. Brit.J.Pharmacol., 99(4), 673-678.

- Krogsgaard-Larsen P. (1980). Inhibitors of the GABA uptake systems. Mol. Cell. Biochem., 31, 105-121.
- Krogsgaard-Larsen P. (1981).  $\gamma$ -aminobutyric acid agonists, antagonists, and uptake inhibitors. Design and therapeutic aspects. J. Med. Chem., 24, 1377-1383.
- Kuhn D.M., Wolf W.A., Youdim M.B.H. (1985). 5-hydroxytryptamine release in vivo from a cytoplasmic pool: studies on the 5-HT behavioural syndrome in reserpinized rats. Br. J. Pharmacol., 84, 121-129.
- Lee T.F., Mora F., Myers R.D. (1985). Dopamine and thermoregulation an evaluation with specific reference to dopaminergic pathways. Neurosci. Biobehav. Rev., 9, 589-598.
- Lesch K.P., Mayer S., Disselkamp-Tietz J., Hoh A., Schoellhammer G., Schulte H.M. (1990). Subsensitivity of the 5-hydroxytryptamine<sub>1A</sub> (5-HT<sub>1A</sub>) receptor mediated hypothermic response to ipsapirone: in unipolar depression. Life Sci., 46(18), 1271-1277.
- Lidov H.G.W., Grzanna R., Molliver M.E. (1980). The serotonin innervation of the cerebral cortex in the rat-an immunohistochemical analysis. Neuroscience, 5(2), 207-227.
- Limberger N., Fischer M.R.G., Wichmann T., Starke K. (1989). Phentolamine blocks presynaptic serotonin autoreceptors in rabbit and rat brain cortex. Naunyn-Schmied. Arch. Pharmacol., 340 (1), 52-61.
- Lin M.T., Chow C.F., Chern Y.F., Wu K.M. (1978). Elevating serotonin levels in brain with 5-hydroxytryptophan produces hypothermia in rats. Pflügers Arch., 377, 245-249.
- Lippert B., Metcalf B.W., Jung M.J., Casara P. (1977). 4-aminohex-5-enoic acid, a selective catalytic inhibitor of 4-aminobutyric aminotransferase in mammalian brain. Eur. J. Biochem., 74, 441-445.
- Lodge D., Curtis D.R., Johnson G.A.R. (1978). Does uptake limit the action of GABA agonists in vivo? Experiments with muscimol, isoguvacine and THIP in cat spinal cord. J. Neurochem., 31, 1525-1528.
- Lodin Z., Hartman J., Faltin J., Malanowski J. (1968). Cytological analysis of the effect of methionine-sulphoximine on cell dimensions and dry mass concentration of cells in the nervous system in vivo. Physiologia Bohemoslovaca, 17, 417-429.
- Lomax P. (1966). Measurement of core temperature in the rat. Nature, 210, 854-855.

- Lorens S. A. (1978). Some behavioral effects of serotonin depletion depend on method: a comparison of 5,7-dihydroxytryptamine, p-chlorophenylalanylamine, p-chloroamphetamine and electrolytic raphe lesions. Ann.N.Y.Acad. Sci., 305, 532-555.
- Löscher W., Pagliusi S.R., Müller F. (1984). L-5-hydroxytryptophan. Correlation between anticonvulsant effect and increases in levels of 5-hydroxyindoles in plasma and brain. Neuropharmacology, 23, 1041-1048.
- Maeda T., Nagai T., Imai H., Arai R., Sakumoto T., Sakai K., Kitahama K., Jouvret M. (1984). Histochemistry of the magnocellular neurons in the posterior hypothalamus, with special reference to MAO activity and ability of 5-HTP uptake and decarboxylation. Acta Histochem.Cytochem., 17, 169-183.
- Mamounas L.A., Molliver M.E. (1988). Evidence for dual serotonergic projections to neocortex. Axons from the dorsal and median raphe nuclei are differentially vulnerable to the neurotoxin p-chloroamphetamine (PCA). Exp.Neurol., 102 (1); 23-36.
- Maruki C., Spatz M., Ueki Y., Nagatsu I., Bembry J. (1984). Cerebrovascular endothelial cell culture: metabolism and synthesis of 5-hydroxytryptamine. J.Neurochem., 43, 316-319.
- McCandless D.W., Abel M.S. (1985). Hypoglycemia and cerebral energy metabolism. In Cerebral energy metabolism and metabolic encephalopathy. McCandless D. W., (Plenum Press, New York) p. 27-41.
- Meibach R.C. (1984). Serotonergic receptors. In Handbook of chemical neuroanatomy. Vol.3: classical transmitters and transmitter receptors in the CNS.Part.II. Björklund A., Hökfelt T., Kuhar M.J. (Elsevier, Amsterdam) p. 304-324.
- Meister A. (1978). Relation between ataxia and defects of the  $\gamma$ -glutamyl cycle. Adv.Neurol.vol. 21. Kark R.A.P., Rosenberg R.N., Schut L.J. Eds (Raven Press, New York).p. 299-302.
- Meller E., Hizami R., Kreuter L. (1989). Hypothermia in mice: D<sub>2</sub> dopamine receptor mediation and absence of spare receptors. Pharmacol.Biochem. Behav., 32 (1), 141-145.
- Middlemiss D.N., Neill J., Tricklebank D.N. (1985). Subtypes of the 5-HT receptor involved in hypothermia and forepaw treading. Br.J.Pharmacol., 85, 251 -252 .

- Miller F.P., Cox R.H.J., Snodgrass W.R., Maickel R.P. (1970). Comparative effects of p-chlorophenylalanine, p-chloroamphetamine and p-chloro-N-methyl-amphetamine on rat brain norepinephrine, serotonin and 5-hydroxyindole-3-acetic acid. Biochem.Pharmacol., 19, 435-442.
- Minn A., Gayet J. (1977); Kinetic study of glutamate transport in rat brain mitochondria. J. Neurochem., 29, 873-881.
- Molliver D.C., Molliver M.E.. Anatomic evidence for a neurotoxic effect of (+) fenfluramine upon serotonergic projections in the rat. Brain Res., 511 (1), 165-168.(1990).
- Moore N.A., Axton M.S. (1990). The role of multiple dopamine receptors in apomorphine and N-n propylnorapomorphine induced climbing and hypothermia. Eur.J.Pharmacol., 178 (2), 195-201.
- Myers R.D. (1975b). An integrative model of monoamine and ionic mechanisms in the hypothalamic control of body temperature. In Temperature regulation and drug action. Lomax J., Schönbaum E., Jacob J. Eds (Karger, Basel) p. 32-42.
- Myers R.D., Simpson C.W., Higgins D.; Nattermann R.A., Rice J.C., Redgrave P., Metcalf G. (1976b). Hypothalamic Na<sup>+</sup> and Ca<sup>2+</sup> ions and temperature set-point: new mechanisms of action of a central or peripheral thermal challenge and intrahypothalamic 5-HT, NE, PGE<sub>1</sub> and pyrogen. Brain Res.Bull., 1, 301-327.
- Myers R.D. (1977). Chronic methods intraventricular infusion, cerebrospinal fluid sampling and push-pull perfusion. In Methods in psychobiology, vol. 3. Myers R.D. Ed. (Academic Press, New York)p 281-315.
- Myers R.D. (1978b). Hypothalamic mechanisms underlying physiological set-points. In current studies of hypothalamic function, vol.2, Lederis K. and Veale W.L.Eds (Karger,Basel).p.17-28.
- Myers R.D. (1980). Hypothalamic control of thermoregulation (Neurochemical mechanisms). In Behavioral studies of the hypothalamus. Morgan P.J., Panksepp J. Eds. (Dekker,Basel) p.83-210.
- Myers R.D. (1981). Alcohol's effect on body temperature: hypothermia, hyperthermia or poikilothermia? Brain Res., 7,209-220.
- Myers R.D., Ruwe W.D. (1982). Is alcohol induced poikilothermia mediated by 5-HT and catecholamine receptors or by ionic set-point mechanism in the brain ? Pharmacol.Biochem.Behavior , 16, 321-327.



- Nishikawa T., Scatton B. (1985). Inhibitory influence of GABA on central serotonergic transmission. Raphe nuclei as the neuroanatomical site of the GABAergic inhibition of cerebral serotonergic neurons. Brain Res., 331, 91-103.
- Norenberg M.D. (1979). The distribution of glutamine synthetase in the rat central nervous system. J.Histochem.Cytochem., 27, 757-762.
- Norenberg M.D. (1983). Immunohistochemistry of glutamine synthetase. In Glutamine, glutamate and GABA in the central nervous system. Hertz L., Kvamme E., Mc Geer E. and Schousboe A. Eds (Alan Liss, New York) p.95-111.
- Ogren S.O., Fuxe K. (1988). Apomorphine and pergolide induce hypothermia by stimulation of dopamine D<sub>2</sub>-receptors. Acta Physiol.Scand., 133 (1), 91-95.
- Paxinos G., Watson C. (1982). The rat brain in stereotaxic coordinates. Vol. 1, Academic Press, New York.
- Pazos A., Palacios J.M. (1985). Quantitative autoradiographic mapping of serotonin receptors in the rat brain. I. Serotonin-1 receptors. Brain Res., 346, 205-230.
- Pazos A., Cortés R., Palacios J.M. (1985). Quantitative autoradiographic mapping of serotonin receptors in the rat brain II. Serotonin-2 receptors. Brain Res., 346, 231-249.
- Peroutka S.J., Snyder S.H. (1979). Multiple serotonin receptors: differential binding of (3H)5-hydroxytryptamine, (3H)lysergic acid diethylamide and (3H)spiroperidol. Mol.Pharmacol., 16, 687-689.
- Peroutka S.J. (1987). Serotonin receptors. In Psychopharmacology, the third generation of progress. Meltzer H.Y. Ed. (Raven Press, New York) p.303-311.
- Peroutka S.J. (1988). Functional correlates of central 5-HT binding sites. In Neuronal serotonin. Osborne N.N., Hamon M. Eds (JohnWiley and son ltd, Chichester).p 423-447.
- Petersen S.L., Hartman R.D., Barraclough C.A. (1989). An analysis of serotonin secretion in hypothalamic regions based on 5-hydroxytryptophan accumulation or push-pull perfusion. Effects of mesencephalic raphe or locus coeruleus stimulation and correlated changes in plasma luteinizing hormone. Brain Res., 495, 9-19.

- Phelps G.G. (1975). An ultrastructural study of methionin sulfoximine-induced glycogen accumulation in astrocytes of the mouse cerebral cortex. J.Neurocytol., 4, 479-520.
- Poole S., Stephenson J.D. (1977). Body temperature regulation and thermo-neutrality in rats. J.Exp.Physiol., 62, 143-149.
- Porter C.C., Watson L.S., Titus D.C., Totard J.A., Byer S.S. (1962). Inhibition of DOPA decarboxylase by the hydrazino analogue of  $\alpha$ -methyl-dopa. Biochem.Pharmacol., 11, 1067-1077.
- Pujol J.F. (1979). Interactions between serotonin and noradrenalin containing neurons: link between the raphe system and the locus coeruleus. In Adv.Pharmacol.Ther., 2.Neurotransmitters. Simon P. Ed. (Pergamon, Oxford) p.121-129.
- Raabe W.A. (1981). Ammonia and disinhibition in cat motor cortex by ammonium acetate, monofluoro-acetate and insulin-induced hypoglycemia. Brain Res., 210, 311-322.
- Raabe W.A., Onstad G.R. (1982). Ammonia and methionine sulfoximine intoxication. Brain Res., 242, 291-298.
- Radja F., Laporte A.M., Daval G., Verge D., Gozlan H., Hamon M. (1991). Autoradiography of serotonin receptor subtypes in the central nervous system. Neurochem.Int., 18 (1), 1-15.
- Reader T.A., Brière R., Grondin L., Ferron A. (1986). Effects of p-chlorophenylalanine on cortical monoamines and on the activity of noradrenergic neurons. Neurochem.Res., 11, 1025-1035.
- Ricaurte G., Bryan G., Strauss L., Seiden L., Schuster C. (1985). Hallucinogenic amphetamine selectively destroys brain serotonin nerve terminals. Science, 229, 986-988.
- Robinson S.M., Mager M., Freinkel N. (1972). Interrelationship of central nervous system glucopenia and heat production in mice. In The pharmacology of thermoregulation. Schoenbaum E., Lomax P. Eds (Basel Karger) p. 112-123.
- Rothstein J.D., Tabakoff B. (1984). Alteration of striatal glutamate release after glutamine synthesis inhibition. J.Neurochem., 43, 1438-1446.
- Samuels S. Fish I. Freedman L.S. (1978). Effect of  $\gamma$ -glutamyl cycle inhibitors on brain amino acid transport and utilization. Neurochem.

- Res., 3, 619-631.
- Sanders-Bush E. Steranka L.R. (1978). Immediate and long-term effects of p-chloroamphetamine on brain amines. Ann.NY.Acad.Sci., 305, 208-221.
- Sano Y. Ueda S. (1988). Characteristic structures of serotonin neuron system. An immunohistochemical study. Histochemistry, 88 (3-6), 497-500.
- Sakamoto T. Sakai K. Jouvét M. Kimura H. Maeda T. (1984). 5-HT immunoreactive hypothalamic neurons in rat and cat after 5-HTP administration. Brain Res.Bull., 12, 721-733.
- Sarkissian C.F., Wurtman R.J., Morse A.N., Gleason R; (1990). Effects of fluoxetine or d-fenfluramine on serotonin release from and levels in rat frontal cortex. Brain Res., 529 (1-2), 294-301.
- Schatz R.A., Harris R., Sellinger O.Z. (1976). The effect of methionine on the uptake, distribution and of binding of the convulsant methionine sulfoximine in the rat. Neurochem.Res., 1, 53-63.
- Schatz R.A., Vunnam CH. R., Sellinger O.Z. (1977). S-adenosyl-L-Homocysteine in brain. Regional concentration, catabolism and the effects of methionine sulfoximine. Neurochemical.Res., 2, 27-38.
- Schlicker E. Classen K. Göthert M. (1984). GABA<sub>B</sub> receptor-mediated inhibition of serotonin release in the rat brain. Naunyn-Schmiedeberg's Arch. Pharmacol., 326, 99-105.
- Seal L.H., Pentreath V.W.(1985). Modulation of glial glycogen metabolism by 5-hydroxytryptamine in leech segmental ganglia. Neurochem.Int., 7,, 1037-1045.
- Sellinger O.Z., Azcurra J.H. Ohlsson W.G. (1968). Methionine sulfoximine seizures. VIII. The dissociation of the convulsant and glutamine synthetase inhibitory effects. J.Pharm.Exp.Ther., 164, 212-221.
- Sellinger O.Z. Dietz D.D. (1981). The metabolism of 5-hydroxytryptamine in the methionine sulfoximine epileptogenic rat brain. J. Pharmacol. Exp.Ther., 216, 77-82.
- Sharp T. Hjorth L.I.B.S. Bramwell S.R. Grahame-Smith D.G. (1990). Further investigation of the in vivo pharmacological properties of the putative 5-HT<sub>1A</sub> antagonist, BMY 7378. Eur.J.Pharmacol., 176 (3), 331-340.
- Shiraishi T. Mager M. (1980). 2-deoxy-D-glucose-induced hypothermia: thermoregulatory pathways in rats. Am.J.Physiol., 239, 270-276.

- Smith D.A. Gallager D.W. (1989). Electrophysiological and biochemical characterization of the development of  $\alpha_1$ -adrenergic and 5-HT<sub>1</sub> receptors associated with dorsal raphe neurons. Develop. Brain Res., 46 (2), 173-186.
- Sotelo c. Cholley B. Elmentikawy S. Gozlan H. Hamon M. (1990). Direct immunohistochemical evidence of the existence of 5-HT<sub>1A</sub> autoreceptors on serotonergic neurons in the midbrain raphe nuclei. Eur. J. Neurosci., 2 (12), 1144-1154.
- Steinbusch H.W.M. (1984). Serotonin-immunoreactive neurons and their projections in the CNS. In Handbook of chemical neuroanatomy, vol.3: classical transmitters and transmitter receptors in the CNS, Part. II. Björklund A., Hökfelt T., Kuhar M.J. Eds (Elsevier, Amsterdam) p. 68-124.
- Steranka L.R. Sanders-Bush E. (1979). Long-term effects of fenfluramine on central serotonergic mechanisms. Neuropharmacology, 18, 895-903.
- Swanson R.A., Yu A.C.H., Chan P.H., Sharp R., (1990). Glutamate increases glycogen content and reduces glucose utilisation in primary astrocyte cultures. Journal of Neurochemistry, 54, 490-496.
- Tricklebank M.D. Forler C. Fozard J. R. (1985). The involvement of subtypes of the 5-HT<sub>1</sub> receptor and of catecholaminergic systems in the behavioural response to 8-hydroxy-2-(di-n-propylamino) tetralin in the rat. Eur. J. Pharmacol., 106, 271-282.
- Trulson M.E. Jacobs B.L. (1975). Raphe neurons: depression of activity by L-5-hydroxytryptophan. Brain Res., 97, 350-355.
- Trulson M.E. Jacobs B.L. (1976). Behavioural evidence for the rapid release of CNS serotonin by PCA and fenfluramine. Eur. J. Pharmacol., 36, 149-154.
- Van Den Berg C.J. Van Den Velden J; (1970). The effect of methionine sulphoximine on the incorporation of labelled glucose, acetate, phenylalanine and proline into glutamate and related aminoacids in the brains of mice. J. Neurochem., 17, 985-991.
- Wada J.A. Ikeda H. (1966). The susceptibility to auditory stimuli of animals treated with methionine sulfoximine. Exp. Neurol., 15, 157-165.
- Wada J.A. Ikeda H. Berry K. (1967). Reversible behavioral and electrographic manifestations induced by methionine sulfoximine. Neurology, 17,, 854-868.
- Warsh J.J. Stancer H.C. (1976). Brain and peripheral metabolism of 5-hy-

- droxytryptophan-<sup>14</sup>C following peripheral decarboxylase inhibition. J. Pharmacol. Exp. Ther., 197, 545-555.
- Werner J. Bienek A. (1985). The significance of nucleus raphe dorsalis and centralis for thermoafferent signal transmission to the preoptic area of the rat. Exp. Brain Res., 59, 543-547.
- Wozniak K.M. Aulakh G.S. Hill J.L. Murphy D.L. (1988). The effect of-8-OH-DPAT on temperature in the rat and its modification by chronic antidepressant treatments. Pharmacol. Biochem. and Behavior, 30, 451-456.
- Yamada J. Sugimoto Y. Wakita H. Horisaka K. (1988). The involvement of serotonergic and dopaminergic systems in hypothermia induced in mice by intracerebroventricular injection of serotonin. Jap. J. Pharmacol., 48 (1), 145-148.
- Yamamoto T. Iwasaki Y. Sato Y. Yamamoto H. Konno H. (1989). Astrocytic pathology of methionine sulfoximine-induced encephalopathy. Acta Neuropathol. 77, 357-368.
- Yoshida M. Shirouzu M. Tanaka M. Semba K. Fibiger H.C. (1989). Dopaminergic neurons in the nucleus raphe dorsalis innervate the prefrontal cortex in the rat. A combined retrograde tracing and immunohistochemical study using anti-dopamine serum. Brain Res., 496 (1-2), 373-376.
- Zacny E. (1982). The role of  $\alpha_2$ -adrenoceptors on the hypothermic effect of clonidine in the rat. J. Pharm. pharmacol., 34, 455-456.

PUBLICATIONS

# Study of the Hypothermia Induced by Methionine Sulfoximine in the Rat

MADELEINE GINEFRI-GAYET AND JACQUES GAYET

*Laboratoire de Physiologie Générale, Faculté des Sciences, Université de Nancy 1  
B.P.239, 54506 Vandoeuvre-lès-Nancy Cedex, France*

Received 10 February 1988

GINEFRI-GAYET, M. AND J. GAYET. *Study of the hypothermia induced by methionine sulfoximine in the rat.* PHARMACOL BIOCHEM BEHAV 31(4) 797-802, 1988.—L-Methionine sulfoximine (MSO) intraperitoneally injected at subconvulsive and convulsive doses induced a rectal hypothermia in the restrained rat maintained at an ambient temperature of 23°C; this hypothermia developed during the preconvulsive period, and it was not suppressed by simultaneous injection of L-methionine which antagonized the behavioral effects of ammonia elevated contents in the central nervous system. The development of rectal hypothermia was faster when the injection of MSO was made into the lateral cerebral ventricle and particularly into the third ventricle. MSO-induced hypothermia seemed to be a poikilothermia-like state in the cold environment with retention of a normal regulation in the heat environment. Infusion of MSO into the anterior hypothalamic/preoptic (AH/PO) area induced a rapid rectal hyperthermia, but infused into the mammillary region MSO had no effect on rectal temperature. It is suggested that rectal hypothermia induced by MSO may be directly related to a depressive effect on glucose oxidative metabolism in cell structures, maybe astroglial cells, located in the vicinity of the ventricle or the capillary walls.

Methionine sulfoximine	Rectal hypothermia	Preconvulsive period	Intracellular ammonia
Glucose metabolism	Astrocytes		

THE molecule of L-methionine-D,L-sulfoximine (MSO) induces seizures which are of particular interest to the neurologist and the neurophysiologist because of their resemblance to human epilepsy and their ready reproducibility in various species of experimental animals (37). Since these seizures occur only after a long latency, and seem to involve generalized changes in transmitter levels or metabolism (4, 8, 27, 29), it appears that no single brain region or pathway is uniquely involved (32). In rat and mouse, tonic and clonic convulsions appeared only after a 3- to 6-hour period, depending on the dose of MSO intraperitoneally injected; during this preconvulsive latency period the animals exhibited an increasing syndrome of ataxia, associated with an inability to respond to external nociceptive stimuli (12, 14, 31, 35). In the freely moving rat at a room temperature of 20°C the rectal temperature first dropped about 2°C below control values and reached the low between the 5th and 7th hour following administration of MSO, 100 mg/kg IP, and between the 3rd and 4th hour following 200 mg/kg. Subsequently, there was a gradual rise to a rectal normothermia or a mild hyperthermia, and it was during this rise that the rats developed episodic behavioral manifestations: an episodic running behavior and/or generalized convulsions (35). The transient hypothermia occurring immediately before the onset of sodic running behavior was considered to be a poikilothermia-like condition rather than true hypothermia. The temperature of MSO-treated rats submitted to a severe cold

challenge progressively lowered, while it progressively rose when the rats were kept in a heat environment. These data indicated an unstable state, but not a complete loss, of the regulating mechanism for the maintenance of body temperature (35). Studies involving genetically nonsensitive rats treated by MSO revealed that this molecule is an "audiogenic agent" in that it produced reversible audiogenic susceptibility which closely followed the initial transient rectal hypothermia of animals (34). Moreover, the treatment of genetically audiogenic sensitive rats with MSO made them temporarily insensitive to audiogenic stimulation, corresponding with the period of transient hypothermia (36). Chronologically, the reduction of audiogenic susceptibility is coincident with the hypothermia induced by MSO and its development occurs during the recovery stage of the transient hypothermia.

It is tempting to investigate the possible relationship between MSO-induced hypothermia and reduced seizure susceptibility. Does this early transient drop in body temperature create in particular structures of the central nervous system neurochemical and neurophysiological conditions suited for induction of spontaneous or physically- or chemically-induced seizures? For this purpose, it is necessary to study the possibility that the induction of hypothermia by MSO may be mediated at least in part by an action on the central nervous system. In the present report, we confirm that MSO intraperitoneally injected to the restrained rat in-

duced a deep rectal hypothermia for several hours; its rate was accelerated after an intracerebroventricular injection of the molecule, particularly into the third ventricle; it appeared to be a poikilothermia-like state against cold with retention of a normal regulation against heat. We suggest that this drop in body temperature probably originated from an impairment of energy metabolism at the level of cerebral structures, maybe astroglia, in the vicinity of ventricle and capillary walls.

#### METHOD

##### Animals

Male Wistar and Sprague-Dawley rats weighing between 225 and 300 g were used throughout the experiments; they were housed individually in Plexiglas cages in a temperature-controlled environment of  $23 \pm 1.0^\circ\text{C}$ , with a 12-hr dark/light cycle and with free access to granular feed and water. All experiments began between 09:00 and 11:00 hr.

##### Measurement of Rectal and Skin Temperatures

The rat was placed in a well-ventilated Harvard universal acrylic restrainer. Rectal temperature was monitored with a lubricated temperature probe (Yellow Springs Instrument Co., Yellow Springs, OH, model 402) inserted 6 cm into the rectum, with a tele-thermometer (Yellow Springs Instrument Co., model 43) connected to a potentiometric recorder (Servotrace, model PE-10). The probe was secured in place by taping it lightly to the base of the tail. For measurement of skin temperature the probe (Yellow Springs Instrument Co., model 421) was placed at the surface of the shaved skin at the base of the tail and was secured in place by taping it.

##### Environmental Temperature

Experimental environmental temperature was controlled throughout the testing period. Heated environment ( $36 \pm 0.5^\circ\text{C}$ ) was maintained in a thermostated, ventilated, and lighted incubator. Cold environment ( $11 \pm 1.0^\circ\text{C}$ ) was achieved in a thermostated, ventilated, and lighted cold box.

##### Intraperitoneal Injection

L-Methionine-d,l-sulfoximine (MSO) (Sigma, St. Louis, MO) (50–150 mg/kg body weight) dissolved in 1.0 ml per 200 g body weight of sterile 0.9% NaCl was injected intraperitoneally; control animals received the same volume of sterile 0.9% NaCl. In some experiments, MSO (150 mg/kg) was administered jointly with L-methionine (Sigma) (700 mg/kg) in a total volume of 1.0 ml per 200 g body weight of sterile 0.9% NaCl.

##### Intracerebroventricular Injections

One week prior to the experiment, the rat was placed in a David Kopf model 900 stereotaxic apparatus, under Equithesin (3 ml/kg IP) anesthesia. A unilateral 26-gauge guide cannula cut to a length of 11.0 or 13.0 mm from stainless steel tubing (Hamilton) was implanted, perpendicularly to the surface of the skull, with the tip resting 1.0 mm above one lateral ventricle or the third ventricle, respectively. The coordinates (1) for the lateral ventricle were (in mm): A=7.0, L=1.4, H=8.5 and for the third ventricle were (in mm): A=6.1, L=0.0, H=3.5; the cannula was held in place by dental cement and stainless steel anchor screws inserted into the calvarium (18). A stainless steel stylet cut to a length of

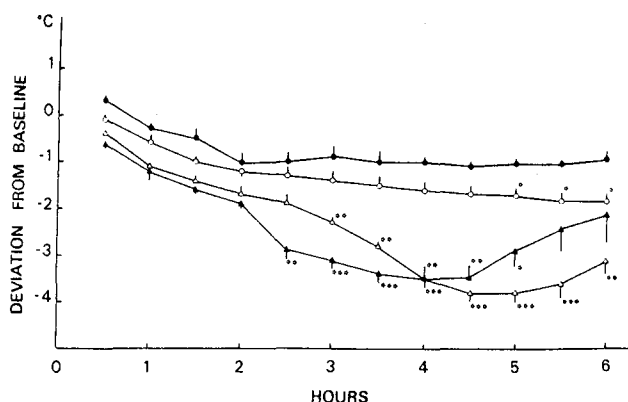


FIG. 1. Changes in rectal temperature by an intraperitoneal injection of varying doses of MSO to restrained rats, at an ambient temperature of  $23^\circ\text{C}$ . ●: saline controls (n=5); ○: 50 mg/kg of MSO (n=9); △: 100 mg/kg of MSO (n=10); ▲: 150 mg/kg of MSO (n=10). Time in hours. \* $p < 0.05$ , \*\* $p < 0.01$  and \*\*\* $p < 0.001$ , for significant differences compared with saline controls.

11.0 or 13 mm was placed into the guide cannula and left until the experiment began. MSO (50–75  $\mu\text{g}$  per rat), dissolved in sterile 0.9% NaCl or sterile artificial cerebrospinal fluid (20), was injected in a volume of 10  $\mu\text{l}$  over a period of 2 min, through a 33-gauge injector needle cut to a length of 12 or 14 mm from stainless steel tubing (Hamilton), connected with a length of polyethylene tubing (internal diameter 0.30 mm) to a 50  $\mu\text{l}$ -capacity Hamilton microsyringe driven by a Braun variable speed infusion pump. The injector needle extended 1.0 mm beyond the tip of the guide cannula. The injector needle was kept in place for 1 min on completion of the injection, before being slowly withdrawn. Immediately following removal of the needle the stylet was inserted into the guide cannula. After each experiment, 10  $\mu\text{l}$  of a 1% bromophenol blue solution in bidistilled water were injected into the lateral or the third ventricle under Equithesin (4 ml/kg IP) anesthesia, then the rat was perfused intracardially with buffered formalin and the brain was cut longitudinally in order to verify the coloration of all the ventricle cavities (18).

##### Intracerebral Infusions

Surgical procedure was the same as for intracerebroventricular injection. An indwelling 26-gauge guide cannula was implanted unilaterally 1.0 mm above a site in the anterior hypothalamic/preoptic area (AH/PO area) using the following coordinates (1) (in mm): A=7.3, L=0.4, H=3.0, and in the mammillary region using the following coordinates (22) (in mm): A=5.2, L=0.5, H=16, the interaural line being the reference point. MSO (25  $\mu\text{g}$  per rat) dissolved in sterile 0.9% NaCl solution was infused in a volume of 0.5  $\mu\text{l}$  over a period of 3 min through a 33-gauge injector needle using a 5  $\mu\text{l}$ -capacity Hamilton microsyringe, as described for intracerebroventricular injection. The injection needle extended 1.0 mm beyond the tip of the guide cannula, and it was kept in place for further 10 min, before being slowly withdrawn. After each experiment, 0.5  $\mu\text{l}$  of a 1% bromophenol blue solution in bidistilled water was infused in the AH/PO area and the mammillary region of the rats under Equithesin



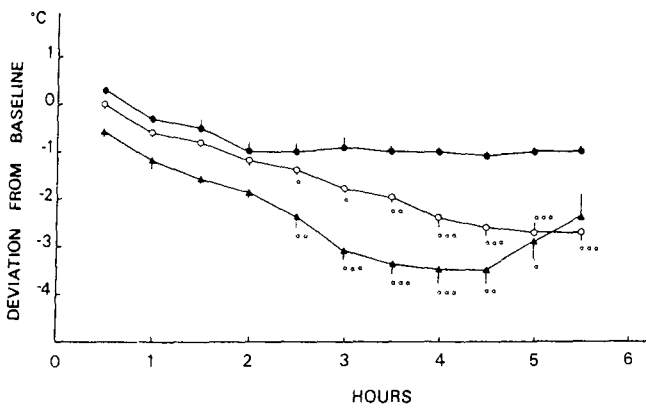


FIG. 2. Changes in rectal temperature produced by an intraperitoneal injection to restrained rats of either MSO (▲: 150 mg/kg of MSO) ( $n=4$ ) or MSO together with L-methionine (○: 150 mg/kg of MSO plus 700 mg/kg of L-methionine) ( $N=4$ ), at an ambient temperature of 23°C. ●: saline controls ( $n=5$ ). Time in hours. \* $p<0.05$ , \*\* $p<0.01$  and \*\*\* $p<0.001$ , for significant differences compared with saline controls.

anesthesia (4 ml/kg IP), then they were perfused intracardially with buffered formalin, and the brain was sliced in cryostat in order to verify the stereotaxic placement of the microinfusion site (18).

#### Statistical Analysis

In the statistical treatment of the values obtained the level of significance was set to 0.05 and calculated by Student's  $t$ -test.

### RESULTS

Mean rectal temperature of normal restrained rats was  $38.4\pm 0.4^\circ\text{C}$  at an ambient temperature of  $23\pm 1.0^\circ\text{C}$ , and it was considered as a baseline in our experiments.

#### Hypothermia Induced by an Intraperitoneal Injection of MSO

MSO (50–150 mg/kg) was intraperitoneally injected to restrained rats kept at an ambient temperature of  $23\pm 1.0^\circ\text{C}$  (Fig. 1). At a subconvulsive dose of 50 mg/kg, a moderate rectal hypothermia developed with a minimum of  $3.75\pm 0.2^\circ\text{C}$  ( $p<0.05$ ) between the 4th and 6th hour following injection of MSO. At a dose of 100 mg/kg, MSO induced a deep and transient hypothermia with a nadir of  $3.80\pm 0.2^\circ\text{C}$  ( $p<0.001$ ) at about 4.30 hours; this hypothermia was associated with the development of a syndrome of ataxia which extended up to the period of rectal normothermia. At a dose of 150 mg/kg, rectal temperature dropped more rapidly since it reached a decrease of  $2.9\pm 0.2^\circ\text{C}$  ( $p<0.01$ ) at 2.30 hours and a minimum of  $3.5\pm 0.2^\circ\text{C}$  ( $p<0.001$ ) at 4 hours; the subsequent rise of rectal temperature coincided with the beginning of episodic tonic and clonic seizures. A series of experiments performed in the same experimental conditions showed that skin temperature of the MSO-treated rats did not vary significantly relative to saline controls. The administration of MSO (150 mg/kg IP) together with L-methionine (700 mg/kg IP) was followed by a progressive rectal

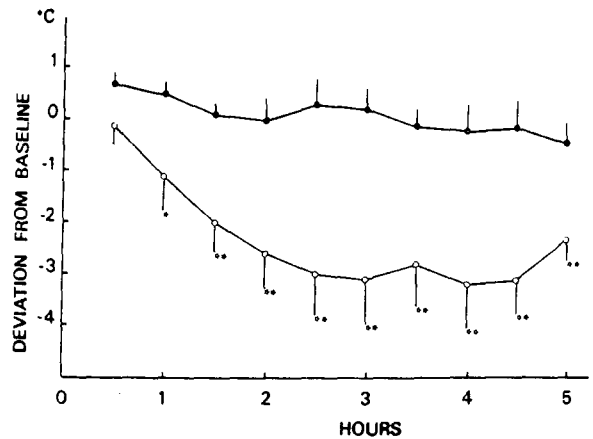


FIG. 3. Changes in rectal temperature produced by an injection of MSO into a lateral cerebral ventricle of restrained rats, at an ambient temperature of 23°C. ●: saline controls ( $n=5$ ); ○: 50  $\mu\text{g}$  of MSO per rat ( $n=4$ ). Time in hours. \* $p<0.05$  and \*\* $p<0.01$ , for significant differences compared with saline controls.

hypothermia reaching a minimum of  $2.7\pm 0.2^\circ\text{C}$  ( $p<0.01$ ) at 5 hours; this drop in the rectal temperature was never followed by any syndrome of ataxia or episodic behavioral manifestation (Fig. 2).

#### Hypothermia Induced by an Intracerebroventricular Injection of MSO

MSO was injected unilaterally into the cerebral lateral ventricle using doses ranging from 50 to 75  $\mu\text{g}$  per restrained rat. Figure 3 illustrates a series of experiments performed at a dose of 50  $\mu\text{g}$  of MSO at an ambient temperature of  $23\pm 1.0^\circ\text{C}$ . The rectal hypothermia developed rapidly reaching  $2.0\pm 0.6^\circ\text{C}$  ( $p<0.01$ ) at 1.30 hours and a minimum of about  $3.0\pm 0.8^\circ\text{C}$  ( $p<0.01$ ) between 2.30 and 4.30 hours. The rat exhibited a syndrome of ataxia and tonic and clonic seizures appeared as soon as the 5th hour following MSO injection. As for its systemic injection, intracerebroventricular administration of MSO was followed by a rectal hypothermia which was not dose-dependent within the range of 50 to 75  $\mu\text{g}$  MSO per rat.

In the same experimental conditions, MSO (50 to 75  $\mu\text{g}$  per rat) was injected in the third ventricle. Figure 4 illustrates a series of experiments performed at a dose of 60  $\mu\text{g}$  of MSO at an ambient temperature of  $23\pm 1.0^\circ\text{C}$ . Rectal temperature decreased rapidly the minimum of  $2.6\pm 0.3^\circ\text{C}$  ( $p<0.01$ ) being reached 2 hours after the injection, followed by very rapid return to rectal normothermia 4 hours later. The rats showed a rapid development of the syndrome of ataxia appearing approximately at 30 minutes, with episodic seizures appearing as soon as 4 hours. About 8 hours later a righting reflex was restored without episodic tonic and clonic seizures. Injected at a dose of 75  $\mu\text{g}$  per rat, MSO appeared to be lethal for a high percentage of animals.

#### Influence of a Warm or Cold Ambient Temperature

Two sets of experiments were performed with restrained rats submitted to an unilateral intracerebroventricular injection of MSO (75  $\mu\text{g}$  per rat into a lateral ventricle). The

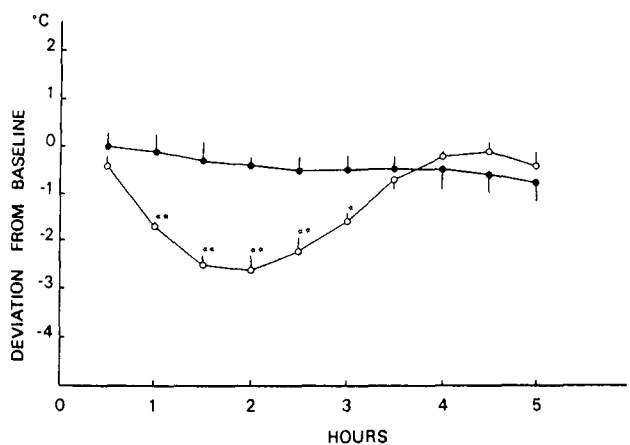


FIG. 4. Changes in rectal temperature produced by an injection of MSO into the third ventricle of restrained rats, at an ambient temperature of 23°C. ●: saline controls (n=4); ○: 60 μg of MSO per rat (n=5). Time in hours. \* $p < 0.01$  and \*\* $p < 0.001$ , for significant differences compared with saline controls.

animals were exposed for one hour to either a warm ( $36 \pm 0.5^\circ\text{C}$ ) or cold ( $11 \pm 1.0^\circ\text{C}$ ) ambient temperature half an hour after the injection of MSO. The exposure to warm air had no significant influence on the rectal temperature in the MSO-submitted rats comparatively to the saline controls since at 1.30 hours the rise of temperature reached  $1.0 \pm 0.15^\circ\text{C}$  (NS) for the former and  $0.7 \pm 0.2^\circ\text{C}$  for the latter (Fig. 5). When ambient temperature was reinstated to 23°C a rapid return to normothermia occurred in MSO-treated rats, and all the animals exhibited a severe syndrome of ataxia with episodic seizures (Fig. 5). On the other hand, the exposure to cold air had dramatically enhanced the development of rectal hypothermia in the MSO-treated rats comparatively to the saline controls: at 1.30 hours the drop of temperature reached  $6.1 \pm 0.6^\circ\text{C}$  ( $p < 0.01$ ) for the former and  $3.25 \pm 0.3^\circ\text{C}$  for the latter (Fig. 6). When ambient temperature was reinstated to 23°C a significant but progressively less severe rectal hypothermia was recorded in MSO-treated rats, with loss of righting reflex but without manifestation of episodic convulsions (Fig. 6).

#### Infusion of MSO Into AH/PO Area and Mammillary Region

MSO (25 μg in 0.5 μl per restrained rat) was unilaterally infused at a rate of 0.5 μl/3 min into seven sites in the AH/PO area at an ambient temperature of  $23 \pm 1.0^\circ\text{C}$ . About 1.30 hours after the infusion a rectal hyperthermia developed rapidly reaching a plateau of  $2.0 \pm 0.2^\circ\text{C}$  ( $p < 0.001$ ) at 4 hours, without any syndrome of ataxia or episodic seizure (Fig. 7). The same experiments were made with MSO (25 μg in 0.5 μl per restrained rat) unilaterally infused into ten sites in the mammillary region with no significant changes in rectal temperature (data not shown).

#### DISCUSSION

In the rat, when intraperitoneally administered (at a dose of 150–170 mg/kg), the molecule of MSO is rapidly taken up by liver and kidney and crosses the blood-brain barrier: in the central nervous system the peak uptake of [ $^3\text{H}$ ] MSO was

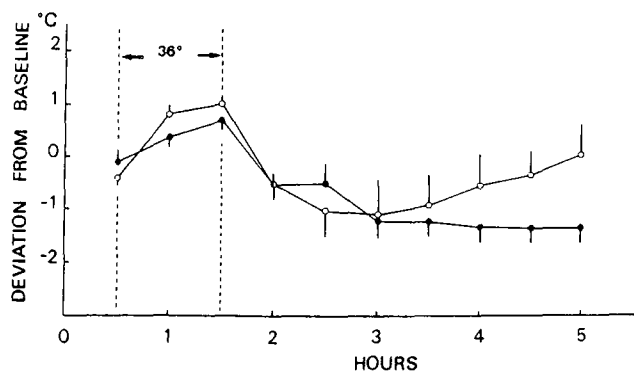


FIG. 5. Changes in rectal temperature produced by an injection of MSO into a lateral cerebral ventricle of restrained rats, at an ambient temperature of 23°C. Ambient temperature was raised to 36°C, 30 min after the injection, for an interval of 60 min denoted by vertical dash lines. ●: saline controls (n=5); ○: 75 μg of MSO per rat (n=5). Time in hours. No statistically significant differences were observed compared to saline controls.

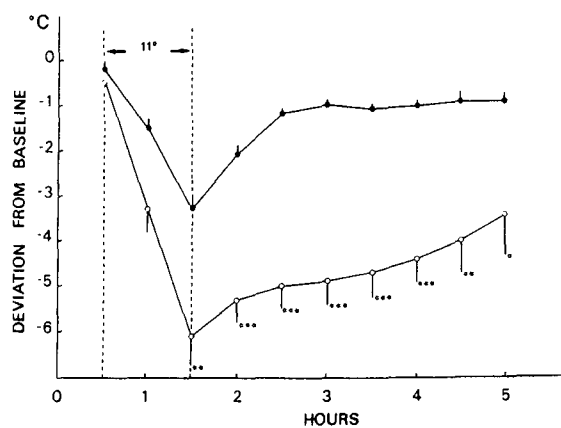


FIG. 6. Changes in rectal temperature produced by an injection of MSO into a lateral cerebral ventricle of restrained rats, at an ambient temperature of 23°C. Ambient temperature was lowered to 11°C, 30 min after the injection, for an interval of 60 min denoted by vertical dash lines. ●: saline controls (n=6); ○: 75 μg of MSO per rat (n=6). Time in hours. \* $p < 0.05$ , \*\* $p < 0.01$  and \*\*\* $p < 0.001$ , for significant differences compared with saline controls.

at 2 hours and amounted to about 1% of the administered dose (10); then, at 6 hours the molecule was rapidly and uniformly distributed without any preferential accumulation (28) and it bound to protein, especially to the active site of glutamine synthetase (16), particularly in gray matter astrocytes in all areas of the brain (21). The irreversible inhibition of the activity of glutamine synthetase (16) leads to a rise of ammonia contents in extra- and intracellular compartments of the brain: in the arterial blood and the cerebrospinal fluid the values approached 0.3 mmol/kg wet weight and in the brain it was close to 0.9 mmol/kg wet weight, at 1.30 hours (7,13). In the same experimental conditions, in the restrained rat, MSO induced a deep rectal hypothermia at the ambient temperature of 23°C, thus confirming the results previously

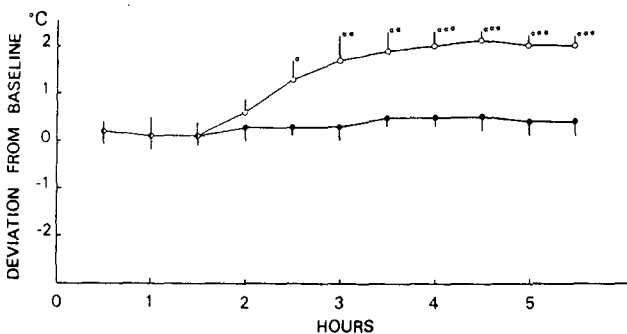


FIG. 7. Changes in rectal temperature produced by an unilateral infusion of MSO into the anterior hypothalamic/preoptic (AH/PO) area of restrained rats, at an ambient temperature of 23°C. ●: saline controls (n=7); ○: 25 µg of MSO per rat (n=5). Time in hours.  $p < 0.05$ ,  $**p < 0.01$  and  $***p < 0.001$ , for significant differences compared with saline controls.

obtained in the freely-moving rat (35). The thermolytic action of MSO did not seem to be strictly dose-dependent, though the minimum of rectal temperature reached 1.75°C at a dose of 50 mg/kg and 3.80°C at a dose of 100 mg/kg, but at a dose of 150 mg/kg the level of hypothermia did not lower, only its rate of development accelerated (Fig. 1). It was always during the decrease of rectal temperature that the rat progressively lost its capacity to carry out a righting reflex and for respond to external nociceptive stimuli leading to a development of ataxia; episodic tonic and clonic seizures did not begin before rectal temperature reached a value close to normothermia. The MSO-induced hypothermia did not involve a peripheral mechanism since, in the same experimental conditions, skin temperature recorded at the surface of the base of the tail did not change significantly (data not shown). Unilateral injection of MSO into the lateral ventricle, at a dose of 50–75 µg per animal, induced a decrease of rectal temperature reaching the same value as that induced by systemic administration of the molecule (Fig. 3).

We have shown that MSO (150 mg/kg, IP), administered jointly with L-methionine (700 mg/kg), suppressed the development of the syndrome of ataxia together with the subsequent episodic seizures observed following administration of MSO alone, but it had only little influence on the rate of development of rectal hypothermia (Fig. 2). It had been previously found that glutamine synthetase activity was uniformly decreased in all brain regions (approximately 10% of control value) when MSO was given intraperitoneally, but when MSO was administered IP together with IP L-methionine, glutamine synthetase activity was below 20% of control values (30); on the other hand, it appeared that a high percentage of the total [<sup>3</sup>H] MSO was found in the hippocampus, the cerebellum and the hypothalamus of animals receiving [<sup>3</sup>H] MSO + methionine than in those receiving [<sup>3</sup>H] MSO only. Conversely, a lower percentage was found in the cortex of rats receiving [<sup>3</sup>H] MSO + methionine than is present in those receiving [<sup>3</sup>H] MSO only (28). In conclusion, it would seem that MSO-induced rectal hypothermia is dependent on the stage of inhibition of glutamine synthetase activity in gray matter astrocytes, in particular, areas

of the brain leading to a rise of ammonia content confined to these areas. Previous results had revealed an apparent absence of a direct causal relationship between the MSO-elicited glutamine synthetase inhibition and the MSO-elicited seizures (30).

Our present results prove that MSO-induced rectal hypothermia was a poikilothermia-like state in the cold environment without impairment of thermoregulation in the heat environment. At a laboratory room temperature of 23°C the restrained rat faced a cold challenge (19,23) resulting in a decline in rectal temperature. Therefore, MSO can be considered as a hypothermic molecule, but a direct causal relationship cannot be stated between the MSO-induced hypothermia and the MSO-elicited progressive syndrome of ataxia associated with the impediment to respond to external nociceptive stimuli, since the rats submitted to a warm ambient temperature exhibited this behavior. The MSO-induced hypothermia was a state resembling the development of poikilothermia following lesion of the posterior hypothalamic area (11). We have shown that injection of MSO into the third ventricle induced a drop in rectal hypothermia with a minimum at 2 hours followed by a return to normothermia, associated with a rapid development of ataxia with episodic seizures at about 4 hours (Fig. 4). Thus, it would seem that cells in the hypothalamus in the vicinity of the ventricle walls may be metabolically affected by MSO. Previous studies in mice had shown that after a systemic administration of MSO, cerebral levels of phosphocreatine and ATP did not change, but those of glucose and glycogen rose [2, 3, 9] correlatively with a 55% increase of glycemia (Nehlig and Gayet, unpublished results). On the other hand, MSO depressed glucose oxidation, the oxidation of other compounds (acetate, phenylalanine and proline) considered as precursors of the small glutamate compartment (astrocytes, nerve endings) might be increased (6, 7, 33). Since MSO slowly and irreversibly inhibited glutamate-aspartate transaminase (5) with subsequent blockade of the malate-aspartate shuttle in brain mitochondria (17), the transfer of energy from the oxidative metabolism of these substrates would be severely affected. It was proven that a defect experimentally-induced in glucose utilization in the brain led to a hyperglycemia, inducing a "functional" hypoglycemia to which intracellular milieu was exposed (15), followed by a drop in the body temperature (24). Our experiments have shown that a unilateral infusion of MSO into seven sites in the AH/PO area induced a rapid rectal hyperthermia, whereas the same infusion into ten sites in the mammillary region was not followed by any effect in the rectal temperature. Furthermore, in the two series of experiments, the behavior of the rats was not affected.

We may conclude that the hypothermic effect of MSO may be directly related to the depression of glucose oxidative metabolism associated with the inhibition of glutamine synthetase and glutamate-aspartate transaminase activities in cell structures belonging to the small glutamate compartment of the brain, maybe astroglial cells, and probably located at sites of blood-brain and cerebrospinal fluid-brain junctions.

#### ACKNOWLEDGEMENT

The study was supported by grants from the Foundation pour la Recherche Médicale.

## REFERENCES

- Albe-Fessard, D.; Stutinsky, F.; Libouban, S. Atlas stéréotaxique du diencephale du rat blanc. Paris: C.N.R.S.; 1971.
- Bérel, A.; Lehr, P. R.; Gayet, J. Inhibition by metyrapone of convulsions and storage of brain glycogen in mice induced by methionine sulfoximine (MSO). *Brain Res.* 128:193-196; 1977.
- Bérel, A.; Lehr, P. R.; Gayet, J. Inhibition by metyrapone of convulsions and of accumulation of brain glucose and glycogen in mice induced by methionine sulfoximine (MSO). 6th Int. Meeting of the I.S.N. Copenhagen, 1977. Abstract No. 211.
- Blizard, D. A.; Balkoski, V. Tryptophan availability, central serotonergic function and methionine sulphoximine-induced convulsions. *Neuropharmacology* 21:27-30; 1982.
- Cooper, A. J. L.; Stephani, R. A.; Meister, A. Enzymatic reactions of methionine sulfoximine. Conversion to the corresponding  $\alpha$ -imino and  $\alpha$ -ketoacids and to  $\alpha$ -ketobutyrate and methane sulfinimide. *J. Biol. Chem.* 251:6674-6682; 1976.
- Cooper, A. J. L.; Vergara, F.; Duffy, T. E. Cerebral glutamine synthetase. In: Hertz, L.; Kvamme, E.; McGeer, E. G.; Schousboe, A., eds. *Glutamine, glutamate, and GABA in the central nervous system*. New York: Alan Liss; 1983:77-93.
- Cooper, A. J. L.; McDonald, J. M.; Gelbard, A. S.; Gledhill, R. F.; Duffy, T. E. The metabolic fate of  $^{13}\text{N}$ -labeled ammonia in rat brain. *J. Biol. Chem.* 254:4982-4992; 1979.
- Engelsen, B.; Fonnum, F. The effect of methionine sulfoximine, an inhibitor of glutamine synthetase, on the levels of amino acids in the intact and decorticated rat neostriatum. *Brain Res.* 338:165-168; 1985.
- Folbergrova, J.; Passonneau, J. V.; Lowry, O. H.; Schulz, D. W. Glycogen, ammonia and related metabolites in the brain during seizures evoked by methionine sulphoximine. *J. Neurochem.* 16:191-203; 1969.
- Ghittoni, N. E.; Ohlsson, W. G.; Sellinger, O. Z. The effect of methionine and the regional and intracellular disposition of  $^3\text{H}$  methionine sulphoximine in rat brain. *J. Neurochem.* 17:1057-1068; 1970.
- Hardy, J. D. Posterior hypothalamus and the regulation of body temperature. *Fed. Proc.* 32:1564-1571; 1973.
- Hevor, T. K.; Gayet, J. Cyclic nucleotides in the brain of mice and rats submitted to the convulsant, methionine sulfoximine. *Biochem. Pharmacol.* 28:3507-3512; 1979.
- Hindfelt, B. L-Methionine DL-sulphoximine (MSO) and ammonia distribution between extra and intracellular compartments of the rat brain. *J. Neurol. Sci.* 25:499-506; 1975.
- Lamar, C.; Sellinger, O. Z. The inhibition in vivo of cerebral glutamine synthetase and glutamine transferase by the convulsant methionine sulfoximine. *Biochem. Pharmacol.* 14:489-506; 1965.
- McCandless, D. W.; Abel, M. S. Hypoglycemia and cerebral energy metabolism. In: McCandless, D. W., ed. *Cerebral energy metabolism and metabolic encephalopathy*. New York: Plenum Press; 1985:27-41.
- Meister, A. Inhibition of glutamine synthetase and  $\gamma$ -glutamyl-cysteine synthetase by methionine sulfoximine and related compounds. In: Seiler, N.; Jung, M. J.; Koch-Weser, J., eds. *Enzyme-activated irreversible inhibitors*. Amsterdam: Elsevier/North-Holland; 1978:187-210.
- Minn, A.; Gayet, J. Kinetic study of glutamate transport in rat brain mitochondria. *J. Neurochem.* 29:873-881; 1977.
- Myers, R. D. Chronic methods: intraventricular infusion, cerebrospinal fluid sampling, and push-pull perfusion. In: Myers, R. D., ed. *Methods in psychobiology*. vol. 3. New York: Academic Press; 1977:281-315.
- Myers, R. D. Alcohol's effect on body temperature: Hypothermia, hyperthermia or poikilothermia? *Brain Res. Bull.* 7:209-220; 1981.
- Myers, R. D.; Ruwe, W. D. Is alcohol induced poikilothermia mediated by 5-HT and catecholamine receptors or by ionic set-point mechanisms in the brain? *Pharmacol. Biochem. Behav.* 16:321-327; 1982.
- Norenberg, M. D. Immunochemistry of glutamine synthetase. In: Hertz, L.; Kvamme, E.; McGeer, E. G.; Schousboe, A., eds. *Glutamine, glutamate, and GABA in the central nervous system*. New York: Alan Liss; 1983:95-111.
- Paxinos, G.; Watson, C. *The rat brain in stereotaxic coordinates*. New York: Academic Press; 1982.
- Poole, S.; Stephenson, J. D. Body temperature regulation and thermoneutrality in rats. *Q. J. Exp. Physiol.* 62:143-149; 1977.
- Robinson, S. M.; Mager, M.; Freinkel, N. Interrelationship between nervous system glucopenia and heat production in mice. In: Schoenbaum, E.; Lomax, P., eds. *The pharmacology of thermoregulation*. Basel: Karger; 1972:112-123.
- Rothstein, J. D.; Tabakoff, B. Effects on the convulsant methionine sulfoximine on striatal dopamine metabolism. *J. Neurochem.* 39:452-457; 1982.
- Rothstein, J. D.; Tabakoff, B. Alteration of striatal glutamate release after glutamine synthesis inhibition. *J. Neurochem.* 43:1438-1446; 1984.
- Rothstein, J. D.; Tabakoff, B. Glial and neuronal glutamate transport following glutamine synthetase inhibition. *Biochem. Pharmacol.* 34:73-79; 1985.
- Schatz, R. A.; Harris, R.; Sellinger, O. Z. The effect of methionine on the uptake, distribution and binding of the convulsant methionine sulfoximine in the rat. *Neurochem. Res.* 1:53-63; 1976.
- Sellinger, O. Z.; Dietz, D. D. The metabolism of 5-hydroxytryptamine in the methionine sulfoximine epileptogenic rat brain. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 216:77-82; 1981.
- Sellinger, O. Z.; Azcurra, J. M.; Ohlsson, W. G. Methionine sulfoximine seizures. VIII. The dissociation of the convulsant and glutamine synthetase inhibitory effects. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 164:212-222; 1968.
- Stone, W. E. Systemic chemical convulsants and metabolic derangements. In: Purpura, D. P.; Penry, J. K.; Tower, D.; Woodbury, D. M.; Walter, R., eds. *Experimental models of epilepsy*. New York: Raven Press; 1972:407-432.
- Toussi, H. R.; Schatz, R. A.; Waszczak, B. L. Suppression of methionine sulfoximine seizures by intranigral  $\gamma$ -vinyl GABA injection. *Eur. J. Pharmacol.* 137:261-264; 1987.
- Van den Berg, C. J.; Van den Velden, J. The effect of methionine sulphoximine on the incorporation of labelled glucose, acetate, phenylalanine and proline into glutamate and related amino acids in the brain of mice. *J. Neurochem.* 17:985-991; 1970.
- Wada, J. A.; Ikeda, H. The susceptibility to auditory stimuli of animals treated with methionine sulfoximine. *Exp. Neurol.* 15:157-165; 1966.
- Wada, J. A.; Ikeda, H.; Berry, K. Reversible behavioral electrographic manifestations induced by methionine sulfoximine. *Neurology* 17:854-868; 1967.
- Wada, J. A.; Asakura, T.; Ikeda, H. Transient reduction of audiogenic susceptibility by methionine sulfoximine in genetically sensitive rats. *Exp. Neurol.* 19:346-349; 1967.
- Wolfe, L. S.; Elliott, K. A. C. Chemical studies in relation to convulsive conditions. In: Elliott, K. A. C.; Page, I. H.; Quastel, J. H., eds. *Neurochemistry*. Springfield: CC Thomas; 1962:694-727.



Manuscript PBB 7651

PHARMACOLOGY BIOCHEMISTRY AND BEHAVIOR

POSSIBLE LINK BETWEEN BRAIN SEROTONIN METABOLISM AND METHIONINE  
SULFOXIMINE - INDUCED HYPOTHERMIA AND ASSOCIATED BEHAVIOR IN THE  
RAT

MADELEINE GINEFRI - GAYET AND JACQUES GAYET \*

Laboratoire de Physiologie générale , Faculté des Sciences ,  
Université de Nancy 1 , B.P. 239 , 54506 Vandoeuvre - lès -  
Nancy Cedex , France

Running head : SEROTONIN AND METHIONINE SULFOXIMINE - INDUCED  
HYPOTHERMIA

\* To whom correspondence should be addressed .

#### ACKNOWLEDGEMENTS

The study was supported by grants from the Fondation pour la Recherche Médicale . We thank Merck Sharp and Dohme and Institut de Recherches Internationales Servier for their generous gift of carbidopa and d-fenfluramine , respectively . Thanks are due to Mr M. Mercier for illustration of the manuscript .

## ABSTRACT

GINEFRI-GAYET, M. AND J. GAYET . Possible link between brain serotonin metabolism and methionine sulfoximine - induced hypothermia and associated behavior in the rat . PHARMACOL. BIOCHEM. BEHAV.

L-Methionine-d,l-sulfoximine (MSO) intraperitoneally or intracerebroventricularly (third ventricle) injected at convulsant doses induced a hypothermia , primarily associated with a syndrome of ataxia , in the restrained rat maintained at an ambient temperature of 23 °C . Depletion of brain serotonin ( 5-HT ) by pretreatment with p-chlorophenylalanine (PCPA) , p-chloroamphetamine (PCA) and d-fenfluramine (FFA) , did not significantly modify the characteristics of MSO-induced hypothermia but it accelerated the time-course of abnormal motor behavior . Enhancement of 5-HT synthesis in MSO-submitted rats pretreated with 5-hydroxytryptophan (5-HTP) (200 mg/kg, IP) alone or 5-HTP (100 mg/kg, IP) preassociated with carbidopa (10 mg/kg, IP) suppressed significantly hypothermia , but it did not greatly modify motor disturbances. It is concluded that endogenous 5-HT released from neuronal elements in the brainstem and the midbrain regions following increase of ammonia contents , due to inhibition of glutamine synthetase by MSO , would rapidly link to some 5-HT receptor subtype(s) at the level of the dorsal raphe nucleus (DRN), these processes would be responsible for the decrease of body temperature .

KEY WORDS : Methionine sulfoximine - Hypothermia - Motor behavior - Serotonin metabolism - p-Chlorophenylalanine - p-Chloroamphetamine - d-Fenfluramine - 5-Hydroxytryptophan



The convulsant molecule L-methionine-d,l-sulfoximine (MSO) intraperitoneally or intracerebroventricularly administered induced a decrease of body temperature in the restrained rat kept at an ambient temperature of 23°C ; this hypothermia appeared to be a poikilothermia - like state in the cold environment with retention of a normal regulation in the warm environment ( 21 ). It has been suggested that this effect of MSO on body temperature was mediated within the central nervous system , and that it might be directly related to a depressive action on glucose oxidative metabolism in cerebral cell structures , maybe astroglial cells , probably located in the vicinity of the ventricle or capillary walls ( 21 ). The MSO - induced hypothermia developed during the 3 - to 6 - hour latency period preceding that of an episodic running behavior and/or generalized seizures ( 21 ; 66 ). Probably , this relatively long preconvulsive period would be associated with the building up of the neurocytochemical processes , involving potentially some particular neurotransmitters or neuromodulators , related to or directly responsible for the subsequent seizures . A study was previously made on the effects of MSO on the regional rate of serotonin ( 5-HT ) turnover in the rat brain : the findings reflected a complex , temporal pattern of regional MSO action ( 59 ). Over a 10 - to 40 - min experimental period the findings suggested a slowdown of the 5-HT turnover in the brainstem , the midbrain and the striatum , but not in the cerebral cortex ; over a 5 - hour experimental

period MSO - effect suggested a decreased rate of 5-HT turnover in the cerebral cortex , the brainstem and the striatum , and over a 12 - hour experimental period MSO - effect suggested an increased rate of 5-HT turnover in the midbrain and the hypothalamus ( 59 ). In C57BL/6J mice , pretreated with a convulsant dose of MSO , brain 5-HT and plasma and brain tryptophan concentrations decreased 4 and 8 hours after administration of the drug , brain 5-hydroxyindoleacetic acid ( 5-HIAA ) levels were not significantly altered , suggesting an impairment in 5-HT synthesis resulting from a restriction of tryptophan availability ( 9 ). As pointed out , the approximately 20 % decrease in whole brain 5-HT seen 8 hours after the convulsant dose was small in magnitude , but if selectively applied to a functionally relevant pool it could have a major impact on the effects of 5-HT neurons ( 9 ). Recent experiments confirmed that MSO , at a convulsant dose , induced a mean 50 % decrease of 5-HT concentration in seven areas of the rat brain 8 hours after its administration , i.e. during the period of episodic seizures ; in the same experimental conditions there were no obvious changes in tryptophan and 5-HIAA levels in any area examined ( 23 ) . Treatment of rats with a high dose of 5-hydroxytryptophan ( 5-HTP ) , the immediate precursor of 5-HT , alone or jointly with an inhibitor of peripheral 5-HTP decarboxylase , retarded MSO-induced seizures onset , and prevented significantly seizures as well as decrease in brain 5-HT content ( 23 ; 59 ). In considering all these data , it appears that MSO must exert its action on the rate of 5-HT synthesis .

The progressive and relatively long-lasting hypothermia , following systemic administration of a convulsant dose of MSO to the rat , may be rela-

ted to an impairment of 5-HT metabolism in the central nervous system , since evidence was provided favouring a pivotal role for this indoleamine in the diencephalon's control system for body temperature ( 36 ; 42 ; 48 ).

The present experiments were designed to determine if a relationship could exist between the slowdown of the rate of 5-HT turnover in the central nervous system and the decrease of body temperature , in the rat submitted to the action of a convulsant dose of MSO , the molecule being systemically and intracerebroventricularly administered . The effects of a reduction in the level of 5-HT were studied , either by an acute pretreatment with a high dose of p-chlorophenylalanine ( PCPA ) , an inhibitor of the rate - limiting step in the 5-HT synthesis ( 4 ; 11 ; 30 ; 34 ; 38 ) , or by pretreatment with the two amphetamine derivatives , p-chloroamphetamine ( PCA ) and d-fenfluramine ( FFA ) , which induced release of 5-HT followed by persistent decreases in forebrain levels of 5-HT chemical markers reflecting degeneration of 5-HT axon terminals in many regions of the forebrain ( 18 ; 41 ; 46 ; 52 ; 55 ) . Conversely , a 5-HTP loading was performed by administration of the immediate precursor of 5-HT alone or jointly by pretreatment with carbidopa , an inhibitor of peripheral 5-HTP decarboxylase , inducing an increase of 5-HT content in the central nervous system ( 5 ; 7 ; 10 ; 39 ; 40 ; 54 ; 64 ) .

## METHOD

### Animals

Male Wistar (Allingthorn Farm) rats were purchased from the breeder

CERJ , Le Genest-St.Isle . Animals weighing between 225 and 325 g were used throughout the experiments ; they were housed individually in Plexi-glass cages in a temperature - controlled environment of  $23 \pm 1.0$  °C , with a 12 - hour light : 12 - hour dark cycle ( lights on 07.00 - 19.00 hours ) and with free access to food ( Extralabo , Ste Colombe , M25.C diet ) and water . All experiments began between 09.00 and 11.00 hours.

#### Measurement of Body Temperature

The rat was placed in a well - ventilated Harvard universal acrylic restrainer . Rectal temperature was monitored using a lubricated temperature probe ( Yellow Springs Instrument C°, Yellow Springs , OH , model 402 ) inserted 6 cm into the rectum , with a telethermometer ( Yellow Springs Instrument C° , model 43 ) connected to a potentiometric recorder ( Sefram , Paris , Servotrace model PE - 10 ) . The probe was secured in place by taping it lightly to the base of the tail . A control measurement ( 0 time ) was taken immediately after administration of MSO and rectal temperature was recorded continuously thereafter from 30 min to 5 hours later.

#### Intraperitoneal Injection of MSO

L-Methionine-d,l-sulfoximine ( MSO ) ( Sigma , St. Louis , MO ) ( 100 - 200 mg/kg body weight ), dissolved in 1.0 ml of sterile 0.9 % NaCl solution per 200 g body weight , was injected intraperitoneally ; control animals received the same volume of sterile 0.9 % NaCl solution .

#### Intracerebroventricular Injection of MSO

One week prior to the experiment , the rat was placed in a David Kopf model 900 stereotaxic apparatus , under Equithesin ( 3 ml / kg , IP )

anesthesia . A 26 - gauge guide cannula cut to a length of 13.0 mm from stainless steel tubing ( Hamilton ) was implanted , perpendicularly to the surface of the skull , with the tip resting 1.0 mm above the third ventricle. The coordinates ( 3 ) were ( in mm ) : A = 6.1 , L = 0.0 , H = 3.5 ; the cannula was held in place by dental cement and stainless steel anchor screws inserted into the calvarium ( 47 ) . A stainless steel stylet cut to a length of 13.0 mm was placed into the guide cannula and left until the experiment began .

MSO ( 50 - 75  $\mu$ g per rat ) , dissolved in sterile 0.9 % NaCl solution or artificial cerebrospinal fluid ( 49 ) , was injected in a volume of 10  $\mu$ l over a period of 2.30 min , through a 33-gauge injector needle cut to a length of 14.0 mm from stainless steel tubing ( Hamilton ) , connected with a length of polyethylene tubing ( internal diameter 0.30 mm ) to a 50  $\mu$ l-capacity Hamilton microsyringe driven by a variable speed infusion pump ( Braun , Melsungen , model Perfusor I ) , as previously described ( 21 ) .

At the conclusion of each experiment , the location of the site of injection was verified with the method of Myers ( 47 ) , using a 1 % bromophenol blue solution in bidistilled water : were regarded as valid those preparations in which the dye was visible in all the cerebroventricular cavities.

#### Behavioral Observations

At the end of the 5 - hr record of rectal temperature the rat was immediately and carefully taken out of the restrainer , it was placed in a Plexiglass box and its behavior was observed in the same environmental conditions .

### Drug Treatment

DL - p - chlorophenylalanine methyl ester hydrochloride ( PCPA ) ( Sigma ) , dissolved in 0.9 % NaCl solution , was intraperitoneally injected at a dose of 300 mg / kg and in a volume of 1.0 ml per 200 g body weight , 48 hours before administration of MSO or of 0.9 % NaCl solution for control rats.

The procedure described by Mamounas and Molliver ( 41 ) was used for pretreatment with DL - p - chloroamphetamine hydrochloride ( PCA ) (Sigma ). Immediately prior to PCA treatment , animals were placed in a cold ( 12 ± 1.0 °C ), ventilated and lighted box ; they were housed one rat per Plexiglass cage . Rats were administered two intraperitoneal injections ( 24 hours apart ; 11.00 hr am each day ) of PCA ( 6 mg / kg , dissolved in 0.9 % NaCl solution and injected in a volume of 1.0 ml / 200 g body weight ). Twenty - four hours after the second injection , animals were replaced in the normal ambient temperature of 23 °C and MSO or 0.9 % NaCl solution was administered five days later .

D - Fenfluramine hydrochloride ( FFA ) ( Institut de Recherches Internationales Servier , Neuilly ) , dissolved in 0.9 % NaCl solution , was subcutaneously injected at a dose of 40 mg / kg and in a volume of 1.0 / 200 g body weight , 24 hours before administration of MSO or 0.9 % NaCl solution for control rats ( 33 ) .

5 - Hydroxy - L - tryptophan ( 5-HTP ) ( Sigma ) , freshly dissolved in warmed 0.9 % NaCl solution , was intraperitoneally injected at doses of 50 - 200 mg / kg and in a volume of 1.0 ml / 200 g body weight , 15 min before administration of MSO or of 0.9 % NaCl solution for control rats. Carbidopa ( Merck Sharp and Dohme , Rahway , N.J. ) , dissolved by means of equimolar amount of HCl diluted in 0.9 % NaCl solution , was intraperito -

neally injected at a dose of 10 mg / kg and in a volume of 0.5 ml / 200 g body weight , 30 min prior to administration of 5-HTP .

## RESULTS

Mean rectal temperature of normal restrained rats was  $38.0 \pm 0.4$  °C at an ambient temperature of  $23 \pm 1.0$  °C and in the light phase ; an intraperitoneal injection of 0.9 % NaCl solution ( 1.0 ml per 200 g body weight ) or an injection of artificial cerebrospinal fluid into the third ventricle ( 10  $\mu$ l per rat ) did not exert any significant effect on the rectal temperature . An intraperitoneal dose of 100 - 200 mg / kg of MSO or an intracerebroventricular dose of 60  $\mu$ g per rat of the drug induced a significant decrease in rectal temperature of  $2.2 \pm 0.3$  to  $2.8 \pm 0.4$  °C or  $2.6 \pm 0.3$  °C , respectively ( Tables 1 and 2 ) . The nadir of the decrease in rectal temperature was reached during the course of the 4.00 - 5.00 - hr period or of the 2.00 - 2.30 - hr period following MSO administration , respectively. This hypothermia was associated with the development of a marked syndrome of ataxia with the loss of righting reflexes , an impairment of postural adjustment and hindlimb abduction.

### Effects of Depletion of 5-HT on MSO - induced Hypothermia and Associated Behavior

As stated in the introductory part , the MSO - submitted rats were pretreated with each of the three 5-HT depleting molecules , namely : PCPA , PCA and FFA .

Pretreatment with a unique high dose of PCPA ( 300 mg / kg , IP ) was followed by a slight non significant (  $p > 0.05$  ) increase of the MSO -induced

hypothermia ( Fig. 1 A ; Tables 1 and 2 ) . The rats rapidly developed a syndrome of ataxia which was associated with hindlimb extension and abduction and eventually with tonic - clonic generalized seizures.

Results obtained with MSO - submitted rats pretreated either with PCA ( two intraperitoneal injections of 6 mg / kg ) or with FFA ( 40 mg / kg, SC ) resembled those obtained with PCPA - pretreated animals . MSO - induced decrease of rectal temperature was not statistically different from that recorded in rats receiving MSO alone ( Fig. 1B and 1C ; Tables 1 and 2 ). The animals thus pretreated with PCA and FFA , then observed unrestrained 5 hours after administration of MSO , exhibited a syndrome of ataxia associated with a flat body posture and an early starting of tonic - clonic generalized seizures , particularly in FFA - pretreated rats then submitted to an injection of MSO into the third ventricle .

Rectal temperature of control rats pretreated with PCPA , PCA or FFA , recorded for 5 hours , did not significantly vary ( Fig. 1 ) and behavior of all the animals appeared apparently normal.

#### Effects of 5-HTP Loading on MSO-induced Hypothermia and Associated Behavior

MSO - submitted rats were pretreated with an intraperitoneal injection of 5-HTP alone . At a dose of 100 mg / kg of 5-HTP , the decrease of rectal temperature induced by intraperitoneally injected MSO did not significantly differ from that recorded in rats receiving MSO alone ( Fig. 2 ; Tables 1 ), but all the animals exhibited some inertia without muscle hypertonia or clonus . Pretreatment with 5-HTP at a dose of 200 mg /kg ( IP ) suppressed MSO - induced hypothermia and even a non - significant transient slight hyperthermia developed ( Fig. 2 ; Tables 1 and 2 ) ; the rats showed a syndrome of inertia , with blockade of righting reflexes associated with abnormal hind-



limb extension and flexion but without any manifestation of muscle hyper-tonia, As previously described in rats pretreated with 5-HTP alone ( 13 ) , rats receiving MSO in the third ventricle exhibited a marked flat body posture . Control animals pretreated with 5-HTP ( 100 and 200 mg / kg , IP ) showed non significant decrease of body temperature ( Fig. 2 ) and their motor behavior was apparently normal.

In a second series of experiments , MSO - submitted rats were pretreated with 5-HTP preassociated with carbidopa . In rats pretreated with 5-HTP ( 50 mg / kg , IP ) preassociated with carbidopa ( 10 mg / kg , IP ) and subsequently submitted to MSO ( 150 mg / kg , IP ) , recorded rectal hypothermia was approximately 50 % lower than that recorded in control rats ( Fig. 3A ; Table 1 ) ; in these experimental conditions , all the animals exhibited some inertia together with a flat body posture . Pretreatment with 5-HTP ( 100 mg / kg , IP ) preassociated with carbidopa ( 10 mg / kg , IP ) not only suppressed hypothermia induced by intraperitoneally injected MSO but also caused a non significant transient slight hyperthermia ( Fig. 3B ; Table 1 ) . The rectal temperature of control rats was not significantly different from that of MSO - submitted rats , except during the course of the 4.00 - 5.00 - hr period ( Fig 3B ) and their motor behavior appeared apparently normal.

#### DISCUSSION

MSO administered at a convulsant dose induced a time - dependent , regional perturbation of 5-HT metabolism in the rodent brain ( 9 ; 23 ; 59 ) . The effect of MSO on the biosynthesis of (  $^{14}$  C ) 5-HT from intra-arterially administered (  $^{14}$  C ) 5-HTP was examined in rats pretreated with the

peripheral 5-HTP decarboxylase inhibitor Ro 4-4602 : the findings led to the experimental evidence supporting a relatively early , although transient , effect of MSO on the cell body - rich brainstem and midbrain regions ( 58 ). Thus , throughout the preconvulsant 5 - hr period , and as early as the first 10 to 40 min , MSO would affect 5-HT perikarya located in the brainstem and the midbrain and later its effect would propagate to the 5-HT axon terminals ( 59 ) . The perikarya of most 5-HT neurons are located within the midline raphe nuclei of the brainstem and project directly to most areas of the brain and spinal cord ( 61 ) . Ascending projections primarily originate in two major nuclei , the dorsal raphe nucleus ( DRN ) and the median raphe nucleus ( MRN ) . The DRN projects preferentially to the dorsal forebrain , including areas involved in motor functions , whereas the MRN mainly projects to more limbic areas in the ventral part of the forebrain ( 61 ) .

At the present time , no explanation has been provided concerning the neurocytochemical mechanism(s) of the effect of MSO on the 5-HT neuron systems during the long - lasting preconvulsant period . It has been demonstrated that MSO had no effect on the activity of 5-HTP decarboxylase ( 59 ) . The irreversible inhibition of the activity of glutamine synthetase by MSO ( 44 ) led to a marked rise of ammonia levels in extra - and intracellular compartments of the rodent brain : in the arterial blood and the cerebrospinal fluid the values approached 0.3 mmol / kg wet weight and in the brain it was close to 1.0 mmol / kg wet weight , at 1.30 hours ( 15 ; 17 ; 26 ) . It was found that a concentration of ammonia from 0.1 to 10 mM stimulated the secretion of amines , in particular 5-HT , from rat brain synaptosomes in a dose - dependent manner : ammonia induced an alkalinization of the intra-synaptic storage vesicles which caused an extrusion of amines into the cytoplasm and their subsequent leakage into the medium through reversal of the plasma

membrane transporters ( 16 ) . Thus , the progressive increase of ammonia content in the brain , up to 4 to 5 hours following systemic administration of MSO , would be quantitatively adequate to induce a leakage of indoleamine from 5-HT neurons , maybe facilitated by increased fluidity of the plasma membrane due to MSO - induced phospholipid methylation ( 58 ; 60 ) . The early effect of MSO on 5-HT metabolism in perikarya - rich brainstem region might be explained by the greater vulnerability of this brain region to elevated ammonia levels ( 14 ; 53 ) . Extracellular 5-HT , as displaying a high affinity (  $K_i = 1 - 10$  nM ) for 5-HT<sub>1</sub> receptors ( 22 ) , would link to 5-HT<sub>1</sub> - like somatodendritic autoreceptors on 5-HT neurons leading to dendrodendritic inhibition within the raphe nuclei ( 2 ) ; correlatively , the suppression of firing and arrest of impulse flow thereby would decrease 5-HT synthesis in cell bodies and then in the axon terminals with suppression of 5-HT release at this level ( 27 ) .

During the first series of our experiments the effects of a reduction in the brain 5-HT levels were studied by acute pretreatment with PCPA , PCA and FFA . PCPA caused an inhibition of 5-HT synthesis , mostly in the forebrain but less in the raphe nuclei ( 1 ) , together with a peripheral and central 5-HT depletion ( 4 ; 12 ; 34 ; 38 ) . PCA and FFA induced 5-HT release from the synaptic extravesicular compartment ( 19 ; 20 ; 35 ; 56 ; 65 ) linked in the forebrain to a selective loss of 5-HT axon terminals from the DRN but not from the MRN ( 8 ; 41 ; 46 ) , thus leading to long - lasting reductions in cerebral 5-HT levels ( 18 ; 31 ; 52 ; 55 ; 62 ) . There appeared differences in the rate of 5-HT depletion between discrete regions in the rat brain following treatment with PCPA , PCA and FFA ( 45 ; 62 ) , but any of these molecules would alter 5-HT metabolism in the perikarya of DRN and MRN ( 1 ; 41 ; 46 ) indicating that they had a restricted neurotoxic

effect upon specific structural compartments of 5-HT neurons . We have found that the pretreatment of MSO - submitted rats with these 5-HT depletors either lightly potentiated or did not alter hypothermia ; however , the motor troubles appeared early , in particular hindlimb abduction and flat body posture , symptoms of the 5-HT syndrome ( 29 ) , in addition to the syndrome of ataxia and troubles of postural adjustment . As cytochemically shown ( 37 ; 63 ) , the syndrome of ataxia originated from a cerebellar disturbance due to elevation of ammonia levels in MSO - submitted rats . On the other hand , owing to the selective effect of ammonia on energy metabolism in the cells of the reticular formation of the brainstem ( 43 ) , impairment of static postural functions , as was observed after MSO administration , might be mediated via deranged functions of the neurons of the reticular formation located in the brainstem and the midbrain . We had previously shown that the administration of MSO jointly with L - methionine , in a molar ratio of 1 : 5 , abolished the motor disturbances induced by MSO alone , but it had only little influence on the rate of development of hypothermia ( 21 ) . It has been found that methionine decreased the amount of MSO bound to cerebral structures and to the spinal cord , this protective effect of methionine became apparent as early as one hour postadministration and lasted throughout the entire preconvulsant period ( 57 ) .

If central 5-HT neuronal structures would control or modulate MSO - induced hypothermia it appears necessary to examine the effects of 5-HTP loading . As previously found ( 39 ) , pretreatment of rats with a high dose of 5-HTP ( 100 mg / kg , IP ) alone resulted in an increase of the rate of 5-HT turnover in the plasma and the brain . In these experimental conditions , MSO - induced hypothermia was not affected . Pretreatment of MSO - submitted rats with a higher dose of 5-HTP ( 200 mg / kg , IP ) not only suppressed hypothermia but

also rapidly induced either normothermia ( with MSO injected in the third ventricle ) or mild hyperthermia ( with intraperitoneally injected MSO ) , though control rats developed a mild hypothermia . It has been found that the turnover of cerebral 5-HT appeared to increase as a function of the dose of 5-HTP injected ( 67 ) , thus it would appear that the suppression of MSO - induced hypothermia would be related to an increase in the rate of the cerebral 5-HT turnover . Pretreatment with 5-HTP preassociated with carbidopa attenuated by about 50 % ( with 5-HTP at a dose of 50 mg / kg , IP ) or suppressed ( with 5-HTP at a dose of 100 mg / kg , IP ) MSO -induced hypothermia . It has been suggested that carbidopa exerted its predominant effect during distribution of 5-HTP ; increased distribution of 5-HTP into the brain following pretreatment with carbidopa was not only the consequence of peripheral 5-HTP decarboxylase inhibition ( 51 ; 67 ) but also resulted from inhibition of 5-HTP decarboxylase in the cerebrovascular endothelium ( 6 ) and even partly in the brain parenchyma ( 39 ) . However , 5-HTP loading could result in production of 5-HT which would be topographically and / or functionally distinct from endogenous 5-HT in the **absence** of exogenous precursor ( 32 ) . Furthermore , some pharmacologic effects of 5-HTP reflect an interference with central catecholaminergic transmission ; a portion of exogenously administered 5-HTP may enter cerebral catecholamine - containing neuronal terminals , undergo decarboxylation to 5-HT , and then displace the endogenous catecholamine from vesicular stores ( 50 ) .

As recently stated ( 25 ) , systemic administration of drugs acting on 5-HT systems does not provide information on the specific brain regions involved in 5-HT - dependent functions like thermoregulation in the rat , furthermore , peripheral factors may be a contributing element ( 28 ) . Injection of MSO into the third ventricle , allowing the drug to effect a

more direct interaction not only with thermoregulatory centers in the hypothalamus but also with midbrain and brainstem neuronal structures , led to a rapid decrease of body temperature reaching its minimum during the course of the 2.00 - 2.30 hr period following administration of MSO . Pretreatment of rats with PCPA and FFA did not modify neither the time - course nor the magnitude of the developing MSO - induced hypothermia in these experimental conditions .

It has been shown that intracerebroventricular injection of 5-HT in mice elicited hypothermia , which was not affected by the depletion of 5-HT by PCPA ; in addition , the 5-HT<sub>1A</sub> receptor antagonist pindolol inhibited the hypothermia induced by 5-HT , although the 5-HT<sub>2</sub> receptor antagonist ketanserin did not affect it ( 68 ) . On the other hand , the microinjection of 5-HT or the 5-HT<sub>1A</sub> agonist 8-hydroxy-2-(di-n-propylamino)tetralin ( 8 - OH - DPAT ) into the DRN of the rat produced a marked decrease in core temperature , whereas microinjections into the MRN had no effect ; furthermore , administration of the 5-HT<sub>1A</sub> antagonist (-)-pindolol suppressed the 5-HT as well as the 8 - OH - DPAT - induced hypothermia ( 25 ) . Thus , we may suggest that endogenous 5-HT released from neuronal elements in the brainstem and midbrain regions following elevation of ammonia contents , due to inhibition of glutamine synthetase activity by MSO , as explained above , would rapidly link to some 5-HT receptor subtype(s) at the level of DRN eliciting a decrease in body temperature . A significant drop in rat core temperature was recorded as early as the first 15 min following microinjection of 5-HT into the DRN ( 25 ) . Extracellular free 5-HT would link also to 5-HT receptors located on neuronal elements in the other brainstem raphe nuclei maybe eliciting some particular motor responses : microinjection of 5-HT into the DRN produced a marked suppression of locomotor activity and rearing , and no or a slight

increase in these variables were noted after MRN injection , 5-HT<sub>1</sub> - like receptors seeming mediate these responses ( 24 ) .

REFERENCES

- 1 . Aghajanian, G.K.; Kuhar, M.J.; Roth, R. Serotonin-containing neuronal perikarya and terminals : differential effects of p-chlorophenylalanine. *Brain Res.* 54 : 85-101 ; 1973.
- 2 . Aghajanian, G.K.; Sprouse, J.S.; Rasmussen, K. Physiology of the mid-brain serotonin system. In: Meltzer, H.Y. ed. *Psychopharmacology . The Third Generation of Progress.* New York : Raven Press ; 1987: 141-149.
- 3 . Albe-Fessard, D.; Stutinsky, F.; Libouban, S. *Atlas Stéréotaxique du Diencephale du Rat Blanc.* Paris : C.N.R.S.; 1971.
- 4 . Alexander, G.J.; Kopeloff, L.M.; Alexander, R.B. Low serotonin turnover in cerebral hemispheres of rats primed with p-chlorophenylalanine. *Biog. Amines* 5 : 17-24 ; 1988 .
- 5 . Anderson, G.M.; Teff, K.L.; Young, S.N. Serotonin in cisternal fluid of the rat : measurement and use as an index of functionally active serotonin. *Life Sci.* 40 : 2253-2260; 1987.
- 6 . Bartholini, G.; Constantinidis, J.; Tissot, R.; Pletscher, A. Formation of monoamines from various aminoacids in the brain after inhibition of extracellular decarboxylase. *Biochem. Pharmacol.* 20 : 1243-1247; 1971.
- 7 . Bedard, P.; Pycock, C.J. "Wet dog" shake behaviour in the rat : a possible quantitative model of central 5-hydroxytryptamine activity . *Neuropharmacology* 16 : 663-670 ; 1977.
- 8 . Blier, P.; Serrano, A.; Scatton, B. Differential responsiveness of the rat dorsal and median raphe 5-HT system to 5-HT<sub>1</sub> receptor agonists and p-chloroamphetamine. *Synapse* 5 : 120-133 ; 1990.
- 9 . Blizard, D.A.; Balkoski, V. Tryptophan availability, central serotoner-



- gic function and methionine sulfoximine-induced convulsions. *Neuropharmacology* 21 : 27-30 ; 1982.
- 10 . Bogdanski, D.F.; Weissback, J.; Udenfriend, S. Pharmacological studies with the serotonin precursor , 5-hydroxytryptophan. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 122 : 182-194 ; 1958 .
- 11 . Borbély, A.A.; Huston, J.P.; Wasez, P.G. Physiological and behavioral effects of parachlorophenylalanine in the rat . *Psychopharmacologia* 31 : 131-142 ; 1973 .
- 12 . Chaput, Y.; Lesieur, P.; De Montigny, C. Effects of short-term serotonin depletion on the efficacy of serotonin neurotransmission. *Electrophysiological studies in the rat central nervous system. Synapse* 6: 328-337 ; 1990.
- 13 . Colpaert, F.C.; Koek, W.; Lategan, A. L-5-hydroxytryptophan-induced flat body posture in the rat : antagonism by ritanserin and potentiation after 5,7-dihydroxytryptamine . *Eur. J. Pharmacol.* 169 : 175-178 ; 1989 .
- 14 . Cooper, A.J.L.; Vergara, F.; Duffy, T.E. Cerebral glutamine synthetase In : Hertz, L.; McGeer, E.G.; Schousboe, A. eds. *Glutamine, Glutamate, and GABA in the Central Nervous System.* New York : Alan Liss ; 1983: 77-93 .
- 15 . Cooper, A.J.L.; Mc Donald, J.M.; Gelbard, A.S.; Gledhill, R.F.; Duffy, T.E. The metabolic fate of <sup>13</sup>N-labeled ammonia in rat brain . *J. Biol. Chem.* 254 : 4982-4992 ; 1979.
- 16 . Erecińska, M.; Pastuszko, A.; Wilson, D.F.; Nelson, D. Ammonia-induced release of neurotransmitters from rat brain synaptosomes : differences between the effects on amines and amino acids . *J. Neurochem.* 49 : 1258-1265 ; 1987 .

- 17 . Folbergrova, J.; Passonneau, J.V.; Lowry, O.H.; Schulz, D.W. Glycogen , ammonia and related metabolites in the brain during seizures evoked by methionine sulphoximine . J. Neurochem. 16 : 191-203 ; 1969.
- 18 . Fuller, R.W.; Hines, C.W.; Mills, J. Lowering of brain serotonin level by chloramphetamines. Biochem. Pharmacol. 14 : 483-488 ; 1965 .
- 19 . Fuller, R.W.; Snoddy, H.D.; Robertson, D.W. Mechanisms of effects of d-fenfluramine on brain serotonin metabolism in rats : uptake inhibition versus release . Pharmacol. Biochem. Behav. 30 : 715-721; 1988.
- 20 . Garattini S.; Mennini, T.; Samanin, R. From fenfluramine racemate to D-fenfluramine . Specificity and potency of the effects on the serotonin-ergic system and food intake . Ann. N.Y. Acad. Sci. 499 : 156-166 ; 1987 .
- 21 . Ginefri - Gayet, M.; Gayet, J. Study of the hypothermia induced by methionine sulfoximine in the rat . Pharmacol. Biochem. Behav. 31 : 797-802 ; 1988 .
- 22 . Glennon, R.A. Central serotonin receptors as targets for drug research; J. Med. Chem. 30 : 1-12 ; 1987 .
- 23 . Hevor, T.K.; Delorme, P. Possible involvement of indoleamines in the glycolytic effect of the convulsant methionine sulfoximine in the rat brain. Experientia 46 : 710-713 ; 1990 .
- 24 . Hillegaart, V. Effects of local application of 5-HT and 8-OH-DPAT into the dorsal and median raphe nuclei on motor activity in the rat . Physiol. Behav. 48 : 143-148 ; 1990 .
- 25 . Hillegaart, V. Effects of local application of 5-HT and 8-OH-DPAT into the dorsal and median raphe nuclei on core temperature in the rat. Psychopharmacology 103 : 291-296 ; 1991 .

- 26 . Hindfelt, B. L-Methionine DL-sulphoximine (MSO) and ammonia distribution between extra and intracellular compartments of the rat brain .  
J. Neurol. Sci. 25 : 499-506 ; 1975 .
- 27 . Hjorth, S.; Magnusson, T. The 5-HT<sub>1A</sub> receptor agonist , 8-OH-DPAT preferentially activates cell body 5-HT autoreceptors in rat brain in vivo . Naunyn - Schmied. Arch. Pharmacol. 338 : 463-471 ; 1988 .
- 28 . Jacob, J.J.; Girault, J.-M.T. 5-Hydroxytryptamine. In : Lomax, P.; Schönbaum, E. eds. Body Temperature. Regulation , Drug Effects , and Therapeutic Implications. New York : Marcel Dekker Inc. ; 1979 : 183-230 .
- 29 . Jacobs, B.L. An animal behavior model for studying central serotonergic synapses. Life Sci. 19 : 777-786 ; 1976 .
- 30 . Jequier, E.; Lovenberg, W.; Sjoerdsma, A. Tryptophan hydroxylase inhibition : the mechanism by which p-chlorophenylalanine depletes rat brain serotonin . Mol. Pharmacol. 3 : 274-278 ; 1967 .
- 31 . Kleven, M.S.; Seiden, L.S. D-, L- and DL-fenfluramine cause long-lasting depletions of serotonin in rat brain . Brain Res. 505 : 351-353; 1989 .
- 32 . Kleven, M.S.; Dwoskin, L.P.; Sparber, S.B. Pharmacological evidence for the existence of multiple functional pools of brain serotonin : analysis of brain perfusate from conscious rats . J. Neurochem. 41 : 1143-1149 ; 1983 .
- 33 . Knapp, S.; Mandell, A.J. Coincidence of blockade of synaptosomal 5-hydroxytryptamine uptake and decrease in tryptophan hydroxylase activity : effects of fenfluramine . J. Pharmacol. Exp. Ther. 198 : 123-132 ; 1976 .
- 34 . Koe, B.K.; Weissman, A. p-Chlorophenyl alanine : a specific depletor of

- brain serotonin . J. Pharmacol. Exp. Ther. 154 : 499-516 ; 1966 .
- 35 . Kuhn, D.M.; Wolf, W.A.; Youdim, M.B.H. 5-Hydroxytryptamine release in vivo from a cytoplasmic pool : studies on the 5-HT behavioral syndrome in reserpinized rats . Br. J. Pharmacol. 84 : 121-129 ; 1985 .
- 36 . Lin, M.-T. Hypothalamic mechanisms of thermoregulation in the rat : neurochemical aspects . In, Hales, J.R.S., ed. Thermal Physiology. New York : Raven Press ; 1984 : 113-118 .
- 37 . Lodin, Z.; Hartman, J.; Faltin, J.; Malanowski, J. Cytological analysis of the effect of methionine sulphoximine on cell dimensions and dry mass concentration of cells in the nervous system in vivo . Physiol. Bohemoslov. 17 : 417-429 ; 1968 .
- 38 . Lorens, S.A. Some behavioral effects of serotonin depletion depend on method : a comparison of 5,7-dihydroxytryptamine , p-chlorophenyl-alanine, p-chloroamphetamine and electrolytic raphe lesions . Ann. N.Y. Acad. Sci. 305 : 532-555 ; 1978 .
- 39 . Löscher, W.; Pagliusi, S.R.; Müller, F. L-5-hydroxytryptophan . Correlation between anticonvulsant effect and increases in levels of 5-hydroxyindoles in plasma and brain . Neuropharmacology 23 : 1041-1048 ; 1984 .
- 40 . Maeda, T.; Nagai, T.; Imai, H.; Arai, R.; Sakumoto, T.; Sakai, K.; Kitahama, K.; Jouvét, M. Histochemistry of the magnocellular neurons in the posterior hypothalamus , with special reference to MAO activity and ability of 5-HTP uptake and decarboxylation . Acta Histochem. Cytochem. 17 : 169-183 ; 1984 .
- 41 . Mamounas, L.A.; Molliver, M.E. Evidence for dual serotonergic projections to neocortex : axons from the dorsal and median raphe nuclei are dif-

- ferentially vulnerable to the neurotoxin p-chloroamphetamine (PCA)  
Exp. Neurol. 102 : 23-36 ; 1988 .
- 42 . Matsumura, K.; Nakayama, T.; Ishikawa, Y. Effects of median raphe electrical stimulation on the preoptic thermosensitive neurons in rats .  
In, Hales, J.R.S. ed. Thermal Physiology. New York : Raven Press ;  
1984 : 87-90 .
- 43 . McCandless, D.W.; Schenker, S. Effect of acute ammonia intoxication on energy stores in the cerebral reticular activating system . Exp. Brain Res. 44 : 325-330 ; 1981 .
- 44 . Meister, A. Inhibition of glutamine synthetase and  $\gamma$ -glutamylcysteine synthetase by methionine sulfoximine and related compounds . In, Seiler, N.; Jung, M.J.; Koch-Weser, J., eds. Enzyme-Activated Irreversible Inhibitors. Amsterdam : Elsevier/North-Holland ; 1978 : 187-210 .
- 45 . Miller, F.P.; Cox, R.H.J.; Snodgrass, W.R.; Maickel, R.P. Comparative effects of p-chloroamphetamine and p-chloro-N-methylamphetamine on rat brain norepinephrine , serotonin and 5-hydroxyindole-3-acetic acid .  
Biochem. Pharmacol. 19 : 435-442 ; 1970 .
- 46 . Molliver, D.C.; Molliver, M.E. Anatomic evidence for a neurotoxic effect of (+)-fenfluramine upon serotonergic projections in the rat. Brain Res. 511 : 165-168 ; 1990 .
- 47 . Myers, R.D. Chronic methods : intraventricular infusion , cerebrospinal fluid sampling , and push - pull perfusion . In, Myers, R.D., ed. Methods in Psychobiology , vol.3 . New York : Academic Press ; 1977 : 281-315 .
- 48 . Myers, R.D. Serotonin and thermoregulation : old and new views . J. Physiol., Paris 77 : 505-513 ; 1981 .

- 49 . Myers, R.D.; Ruwe, W.D. Is alcohol induced poikilothermia mediated by 5-HT and catecholamine receptors or by ionic set - point mechanism in the brain ? Pharmacol. Biochem. Behav. 16 : 321-327 ; 1982 .
- 50 . Ng L.K.Y.; Chase, T.N.; Colburn, R.W.; Kopin, I.J. Release of 3H - dopamine by L-5-hydroxytryptophan . Brain Res. 45 : 499-505 ; 1972 .
- 51 . Porter, C.C.; Watson, L.S.; Titus, D.C.; Totard, J.A.; Byer, S.S. Inhibition of DOPA decarboxylase by the hydrazino analogue of  $\alpha$ -methyl-dopa. Biochem. Pharmacol. 11 : 1067-1077 ; 1962 .
- 52 . Ricaurte, G.; Bryan, G.; Strauss, L.; Seiden, L.; Schuster, C. Hallucinogenic amphetamine selectively destroys brain serotonin nerve terminals. Science 229 : 986-988 ; 1985.
- 53 . Sadasivudu, B.; Rao, T.I. Studies on functional and metabolic role of urea cycle intermediates in brain. J. Neurochem. 27 : 785-794 ; 1976 .
- 54 . Sakumoto, T.; Sakai, K.; Jouvett, M.; Kimura, H.; Maeda, T. 5-HT immunoreactive hypothalamic neurons in rat and cat after 5-HTP administration. Brain Res. Bull. 12 : 721-733 ; 1984 .
- 55 . Sanders-Bush, E.; Steranka, L.R. Immediate and long-term effects of p-chloroamphetamine on brain amines . Ann. N.Y. Acad. Sci. 305 : 208-221 ; 1978 .
- 56 . Sarkissian, C.F.; Wurtman, R.J.; Morse, A.N.; Gleason, R. Effects of fluoxetine or d-fenfluramine on serotonin release from , and levels in, rat frontal cortex . Brain Res. 529 : 294-301 ; 1990 .
- 57 . Schatz, R.A.; Harris, R.; Sellinger, O.Z. The effect of methionine on the uptake , distribution and binding of the convulsant methionine sulfoximine in the rat . Neurochem. Res. 1 : 53-63 ; 1976 .
- 58 . Schatz, R.A.; Wilens, T.E.; Tatter, S.B.; Gregor, P.; Sellinger, O.Z.

- Possible role of increased brain methylation in methionine sulfoximine epileptogenesis : effects of administration of adenosine and homocysteine thiolactone . *J. Neurosci. Res.* 10 : 437-447 ; 1983 .
- 59 . Sellinger, O.Z.; Dietz, D.D. The metabolism of 5-hydroxytryptamine in the methionine sulfoximine epileptogenic rat brain . *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 216 : 77-82 ; 1981 .
- 60 . Sellinger, O.Z.; Schatz, R.A.; Porta, R.; Wilens, T.E. Brain methylation and epileptogenesis : the case of methionine sulfoximine. *Ann. Neurol.* 16 : S115-S120 ; 1984 .
- 61 . Steinbusch, H.W.M. Serotonin - immunoreactive neurons and their projections in the CNS . In, Björklund, A.; Hökfelt, T.; Kuhar, M.J., eds. In, *Handbook of Chemical Neuroanatomy* , vol.3 : Classical Transmitters and Transmitter Receptors in the CNS , Part II. Amsterdam : Elsevier ; 1984 : 68-124 .
- 62 . Steranka, L.R.; Sanders-Bush, E. Long-term effects of fenfluramine on central serotonergic mechanisms. *Neuropharmacology* 18 : 895-903 ; 1979.
- 63 . Szegedy, L. Enzyme histochemical studies in the rat hippocampus , cerebellar cortex and brainstem motor nuclei during methionine sulfoximine convulsions. *Cell. Mol. Biol.* 23 : 43-53 ; 1978 .
- 64 . Trulson, M.E.; Jacobs, B.L. Raphe neurons : depression of activity by L-5-hydroxytryptophan . *Brain Res.* 97 : 350-355 ; 1975 .
- 65 . Trulson, M.E.; Jacobs, B.L. Behavioural evidence for the rapid release of CNS serotonin by PCA and fenfluramine . *Eur. J. Pharmacol.* 36 : 149-154 ; 1976 .
- 66 . Wada, J.A.; Ikeda, H.; Berry, K. Reversible behavioral and electrographic manifestations induced by methionine sulfoximine . *Neurology* 17 : 854-

868 ; 1967 .

- 67 . Warsh, J.J.; Stancer, H.C. Brain and peripheral metabolism of 5-hydroxy-tryptophan- 14C following peripheral decarboxylase inhibition. J. Pharmacol. Exp. Ther. 197 : 545-555 ; 1976 .
- 68 . Yamada, J.; Sugimoto, Y.; Wakita, H.; Horisaka, K. The involvement of serotonergic systems in hypothermia induced in mice by intracerebro-ventricular injection of serotonin . Jpn. J. Pharmacol. 48 : 145-1148 ; 1988 .



CHANGE IN RECTAL TEMPERATURE PRODUCED BY AN INTRAPERITONEAL INJECTION TO RESTRAINED RATS OF L-METHIONINE-d,l-SULFOXIMINE AFTER PRETREATMENT WITH SEROTONIN DEPLETORS (p-CHLOROPHENYLALANINE , p-CHLOROAMPHETAMINE AND D-FENFLURAMINE) AND AFTER PRETREATMENT WITH 5-HYDROXY-L-TRYPTOPHAN (ALONE OR TOGETHER WITH CARBIDOPA)

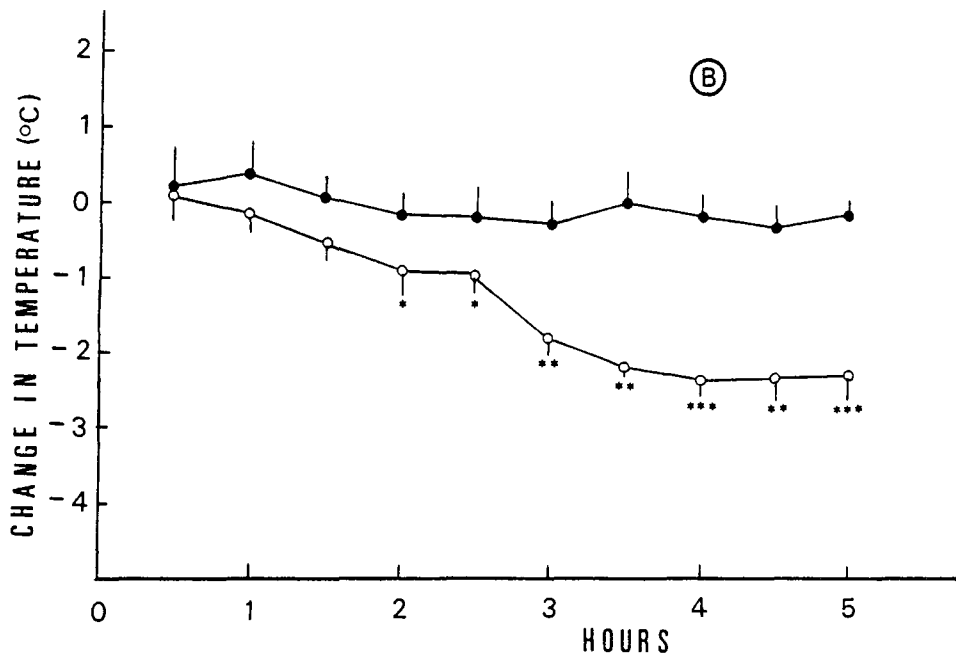
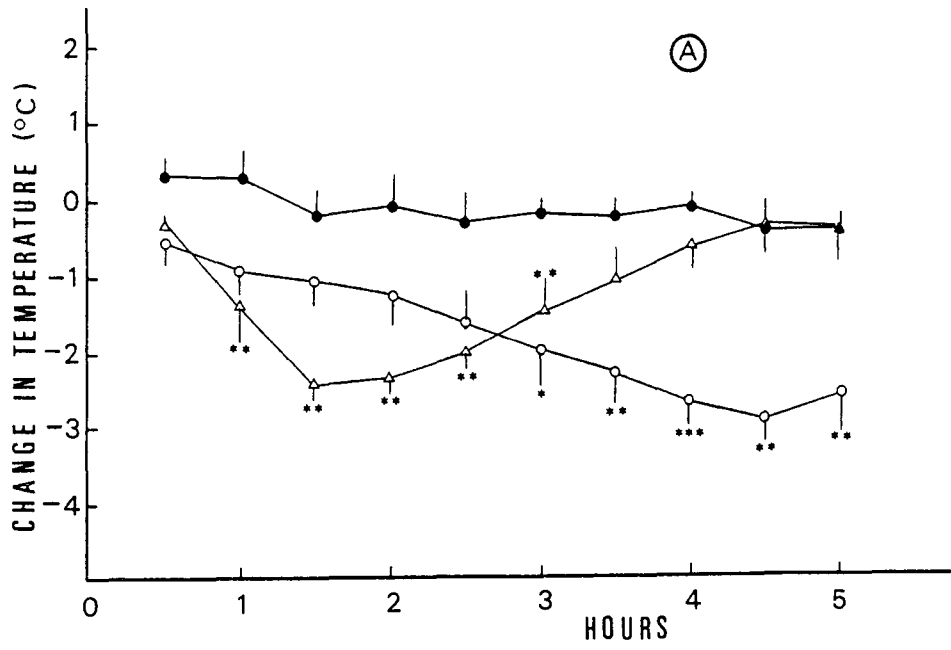
Pretreatment	MSO ( mg / kg )	Change in rectal temperature	Number of rats per group
	100	- 2.8 $\pm$ 0.4 **	4
	150	- 2.2 $\pm$ 0.3 **	7
	200	- 2.4 $\pm$ 0.2 ***	4
PCPA (300 mg/kg, IP)	150	- 3.2 $\pm$ 0.3 **	4
PCA (2 x 6 mg/kg, IP)	150	- 2.3 $\pm$ 0.3 **	4
FFA (40 mg/kg, SC)	150	- 2.9 $\pm$ 0.3 **	4
5-HTP (100 mg/kg, IP)	150	- 2.6 $\pm$ 0.4 **	5
5-HTP (200 mg/kg, IP)	150	- 0.4 $\pm$ 0.2	4
Carbidopa (10 mg/kg, IP) + 5-HTP (50 mg/kg, IP)	150	- 1.3 $\pm$ 0.1 ***	4
Carbidopa (10 mg/kg, IP) + 5-HTP (100 mg/kg, IP)	150	- 0.7 $\pm$ 0.3 *	4

Values are mean maximum change in rectal temperature  $\pm$  SEM compared with corresponding saline controls for each group of rats . \*  $p < 0.05$  , \*\*  $p < 0.01$  and \*\*\*  $p < 0.001$  , for significant differences compared with corresponding saline controls (evaluated by Student's t test).

CHANGE IN RECTAL TEMPERATURE PRODUCED BY AN INJECTION OF L-METHIONINE-d,1-SULFOXIMINE INTO THE THIRD VENTRICLE OF RESTRAINED RATS AFTER PRETREATMENT WITH SEROTONIN DEPLETORS (p-CHLOROPHENYL-ALANINE AND D-FENFLURAMINE) AND AFTER PRETREATMENT WITH 5-HYDROXY-L-TRYPTOPHAN

Pretreatment	MSO ( $\mu\text{g}$ per rat )	Change in rectal temperature	Number of rats per group
	60	- 2.6 $\pm$ 0.3 ***	5
PCPA (300 mg/kg, IP)	60	- 2.4 $\pm$ 0.2 **	3
FFA ( 40 mg/kg, SC)	60	- 2.3 $\pm$ 0.1 **	4
5-HTP (200 mg/kg, IP)	60	+ 0.8 $\pm$ 0.1 **	5

Values are mean maximum change in rectal temperature  $\pm$  SEM compared with corresponding saline controls for each group of rats . \*\*  $p < 0.01$  and \*\*\*  $p < 0.001$  , for significant differences compared with corresponding saline controls (evaluated by Student's  $t$  test).



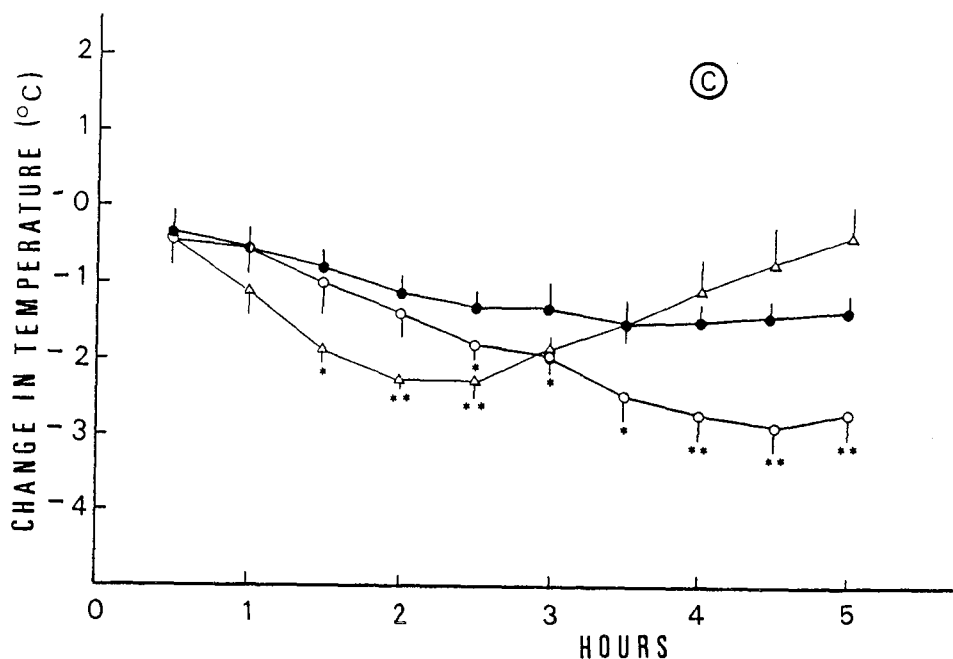


FIGURE 1

Change in rectal temperature following administration of MSO to restrained rats at an ambient temperature of  $23 \pm 1.0$  °C.

A . Pretreatment with PCPA ( 300 mg/kg , IP ). ○ : MSO ( 150 mg/kg , IP ) ( n = 4 ) ; △ : MSO ( 60 µg per rat in the third ventricle ) ( n = 3 ) ; ● : saline controls ( n = 4 ) .

B . Pretreatment with PCA ( 2 x 6 mg/kg , IP ) . ○ : MSO ( 150 mg/kg , IP ) ( n = 4 ) ; ● : saline controls ( n = 4 ) .

C . Pretreatment with FFA ( 40 mg/kg , SC ) . ○ : MSO ( 150 mg/kg , IP ) ( n = 4 ) ; △ : MSO ( 60 µg per rat in the third ventricle ) ( n = 4 ) ; ● : saline controls ( n = 4 ) .

Time in hours . \*  $p < 0.05$  , \*\*  $p < 0.01$  , \*\*\*  $p < 0.001$  , for significant differences compared with saline controls ( evaluated by Student's  $t$  test ) .

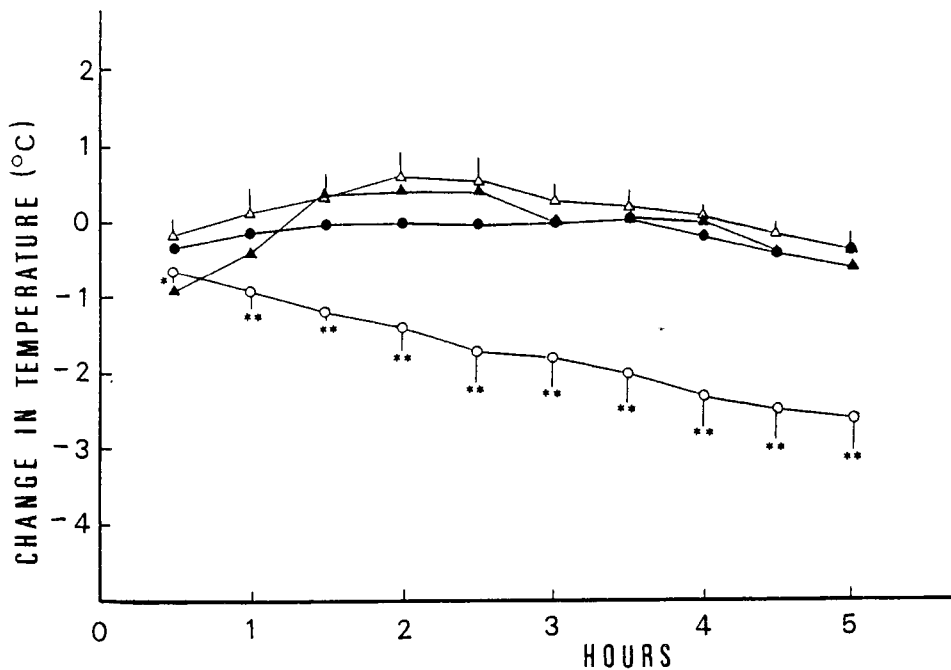


FIGURE 2

Change in rectal temperature following administration of MSO to restrained rats at an ambient temperature of  $23 \pm 1.0$  °C. Pretreatment with 5-HTP ( 100 mg/kg , IP ) : ○ : MSO ( 150 mg/kg , IP ) ( n = 4 ) ; ● : saline controls ( n = 4 ) . Pretreatment with 5-HTP ( 200 mg/kg , IP ) : △ : MSO ( 150 mg/kg , IP ) ( n = 4 ) ; ▲ : saline controls ( n = 4 ) . Time in hours . SEM for saline controls are not represented . \*  $p < 0.05$  and \*\*  $p < 0.01$  , for significant differences compared with saline controls ( evaluated by Student's  $t$  test ).

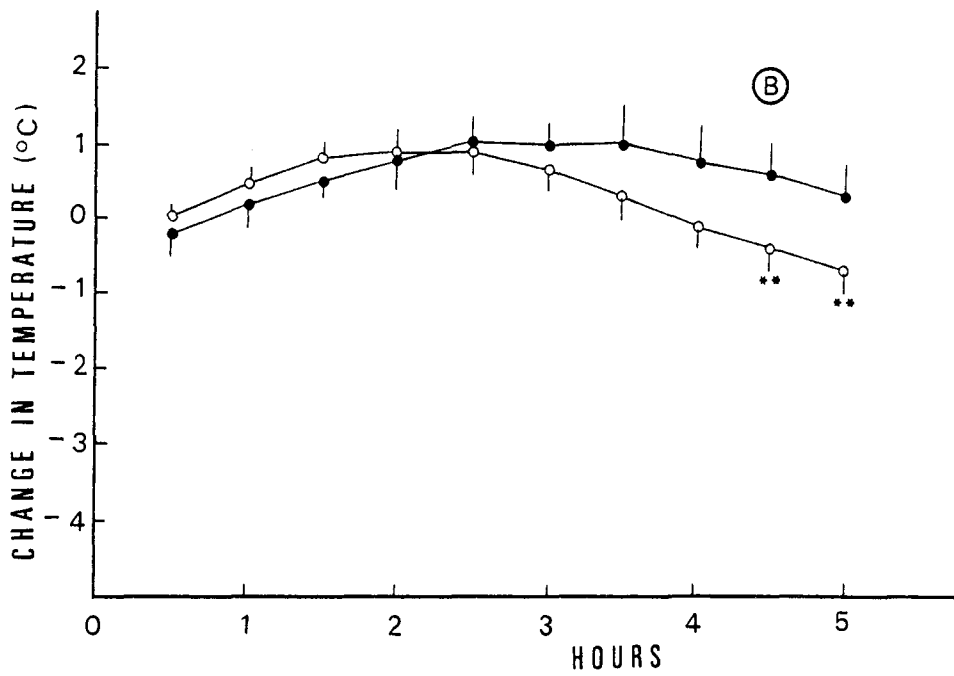
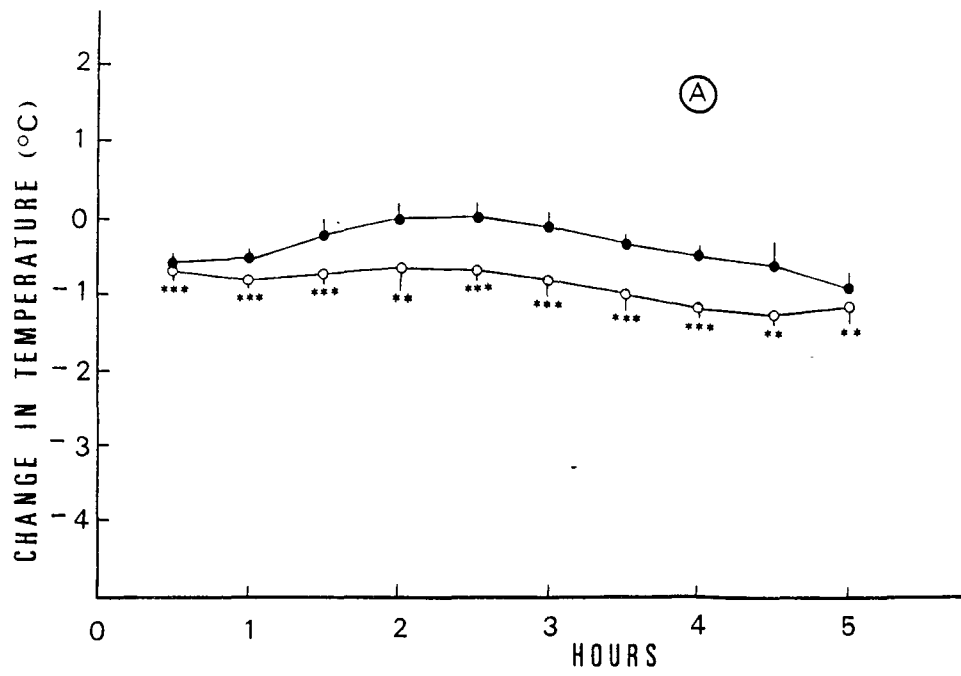


FIGURE 3

Change in rectal temperature following administration of MSO to restrained rats at an ambient temperature of  $23 \pm 1.0$  °C .

A . Pretreatment with 5-HTP ( 50 mg/kg , IP ) preassociated with carbidopa ( 10 mg/kg , IP ) . ○ : MSO ( 150 mg/kg , IP ) ( n = 4 ) ; ● : saline controls ( n = 4 ) .

B . Pretreatment with 5-HTP ( 100 mg/kg , IP ) preassociated with carbidopa ( 10 mg/kg , IP ) . ○ : MSO ( 150 mg/kg , IP ) ( n = 4 ) ; ● : saline controls ( n = 4 ) .

Time in hours . \*\*  $p < 0.01$  and \*\*\*  $p < 0.001$  , for significant differences compared with saline controls ( evaluated by Student's t test ) .





Manuscript N° 7686

EUROPEAN JOURNAL OF PHARMACOLOGY

INVOLVEMENT OF SEROTONIN RECEPTORS IN METHIONINE SULFOXIMINE - INDUCED  
HYPOTHERMIA IN THE RAT

Madeleine GINEFRI - GAYET and Jacques GAYET \*

Laboratoire de Physiologie générale , Faculté des Sciences ,  
Université de Nancy 1 , B.P. 239 , 54506 Vandoeuvre - lès- Nancy  
Cedex , France

\* To whom all correspondence should be addressed

#### ACKNOWLEDGEMENTS

The study was supported by grants from the Fondation pour la Recherche Médicale . We thank Janssen Pharmaceutica , Synthelabo Recherche, and Imperial Chemical Industries PLC for their generous gift of ketanserin , betaxolol and ICI 118,551 , respectively. Thanks are due to Mr M. Mercier for illustration of the manuscript .

## ABSTRACT

L-Methionine-d,l-sulfoximine (MSO) intraperitoneally (i.p.) or intracerebroventricularly (i.c.v.) (third ventricle) injected at a convulsant dose, induced a centrally mediated body hypothermia in the restrained rat maintained at an ambient temperature of 23 °C. Pretreatment with (+)-pindolol (1.5 - 3.0 mg/kg s.c.) significantly attenuated or even suppressed MSO-induced hypothermia, but at a dose of 6 mg/kg s.c., hypothermia developed without any modification of its characteristics. Pretreatment with (-)-propranolol (16 - 25 mg/kg i.p.) potentiated MSO-induced hypothermia, but pretreatment of MSO-submitted rats with ketanserin (0.7 - 4.0 mg/kg i.p.) did not significantly modify hypothermia. Selective antagonists having a high affinity for  $\alpha$  - and  $\beta$  -adrenoceptors were used and their effects on MSO-induced hypothermia compared with those of pindolol and propranolol. Potentiation of hypothermia was recorded in rats pretreated with prazosin (1.6 mg/kg i.p.) then submitted to i.p. injection of MSO and in animals pretreated with yohimbine (2.2 mg/kg i.p.) then submitted to i.p. and i.c.v. injection of MSO. Pretreatment with betaxolol (1.5 mg/kg s.c.) attenuated hypothermia following i.p. injection of MSO, and potentiation of hypothermia was recorded in rats pretreated with ICI 118,551 (1.13 - 2.26 mg/kg i.p.) then submitted to i.p. and i.c.v. injection of MSO. These findings would be in favour of a control exerted by 5-HT<sub>1</sub>-like receptors in the central development of MSO-induced hypothermia, this control would be modulated presumably by adrenoceptors.

KEY WORDS

Methionine sulfoximine - Hypothermia - Pindolol - Propranolol -

Ketanserin - Adrenoceptor antagonists .

## 1 . INTRODUCTION

Decrease of body temperature following administration of the convulsant L - methionine - d,l - sulfoximine ( MSO ) to the rat ( Ginefri - Gayet and Gayet, 1988 ; Wada et al., 1967 ) seems to be linked to brain serotonin ( 5-HT ) metabolism . Depletion of brain 5-HT by pretreatment with p-chlorophenylalanine , p-chloroamphetamine and d-fenfluramine , did not significantly modify the time-course or the magnitude of MSO-induced hypothermia ; on the other hand , enhancement of 5-HT synthesis in MSO - submitted rats by pretreatment with 5-hydroxytryptophan ( 5-HTP ) preassociated with the peripheral 5-HTP decarboxylase inhibitor carbidopa , suppressed significantly hypothermia ( Ginefri-Gayet and Gayet, 1991 ). The effect of MSO on the biosynthesis of (  $^{14}\text{C}$  )5-HT from intra-arterially administered (  $^{14}\text{C}$  )5-HTP was examined in rats pretreated with the peripheral 5-HTP decarboxylase inhibitor Ro 4-4602 : throughout the preconvulsant 5 - 6 h period , during which hypothermia develops , and as early as the first 10 to 40 min , MSO would affect 5-HT perikarya located in the brainstem and the midbrain and later its effect would propagate to the 5-HT axon terminals ( Sellinger and Dietz , 1981 ).

We had suggested ( Ginefri-Gayet and Gayet , 1991 ) that increase of ammonia contents in the brainstem and midbrain regions , due to inhibition of astrocytic glutamine synthetase activity by MSO ( Meister , 1978 ; Norenberg , 1983 ), would release endogenous 5-HT from neuronal structures ( Erecinska et al., 1987 ) , extracellular 5-HT would rapidly bind to some

5-HT receptor subtype(s) at the level of the raphe nuclei , these processes would be responsible for the decrease of body temperature . In favour of this suggestion are the recent data proving a specific role for dorsal raphe nucleus ( DRN ) serotonergic projections in rat thermoregulatory mechanisms and a specific role for 5-HT<sub>1A</sub> receptors in these mechanisms ( Hillegaart , 1991 ) .

The present experiments were designed to determine if a relationship could exist between activation of some 5-HT receptor subtype(s) in the central nervous system and the decrease of body temperature , in the rat submitted to the action of a convulsant dose of MSO , the molecule being intraperitoneally ( i.p. ) or intracerebroventricularly ( i.c.v. ) ( third ventricle ) administered . For this purpose , the effects of pindolol and propranolol , antagonists with a high affinity for 5-HT<sub>1</sub> - like receptors , and of ketanserin , antagonist with a high affinity for 5-HT<sub>2</sub> receptors ( Glennon , 1987 ; Hamon et al. , 1988 ; Hoyer , 1988 ; Peroutka , 1988 ) will be studied. Selective antagonists with high affinity for  $\alpha$  - and  $\beta$  - adrenoceptor subtypes will be used and their effects on MSO - induced hypothermia will be compared with those of pindolol and propranolol .

## 2 . MATERIALS AND METHODS

### 2.1. Animals

Male Wistar ( Allingthor Farm ) rats were purchased from the breeder , CERJ , Le Genest - St.Isle . Animals weighing between 225 and 325 g were used throughout the experiments ; they were housed individually in Plexiglass

cages in a temperature - controlled environment of  $23 \pm 1.0$  °C , with a 12 - h light : 12 - h dark cycle ( lights on 07.00 - 19.00 h ) and with free access to food ( Extralabo , Ste. Colombe , M25.C diet ) and water . All experiments began between 09.00 and 11.00 h .

## 2.2. Measurement of body temperature

The rat was placed in a well-ventilated Harvard - type universal acrylic restrainer . Rectal temperature was monitored using a lubricated temperature probe ( Yellow Springs Instrument Co , Yellow Springs , OH , model 402 ) inserted 6 cm into the rectum , with a telethermometer ( Yellow Springs Instrument Co , model 43 ) connected to a potentiometric recorder ( Sefram , Paris , Servotrace model PE - 10 ) . The probe was secured in place by taping it lightly to the base of the tail . A control measurement ( 0 time ) was taken immediately after administration of MSO and rectal temperature was recorded continuously thereafter from 30 min to 5 h later .

## 2.3. Intraperitoneal injection of MSO

L-Methionine-d,l,-sulfoximine ( MSO ) ( Sigma , St. Louis , MO ) ( 150 mg/kg body weight ) , dissolved in 1.0 ml of sterile 0.9 % NaCl solution per 200 g body weight , was injected intraperitoneally ; control animals received the same volume of sterile 0.9 % NaCl solution .

## 2.4. Intracerebroventricular injection of MSO

One week prior to the experiment , the rat was placed in a David Kopf

model 900 stereotaxic apparatus , under Equithesin ( 3 ml/kg i.p. ) anaesthesia . A 26 - gauge guide cannula cut to a length of 13.0 mm from stainless steel tubing ( Hamilton ) was implanted , perpendicularly to the surface of the skull , with the tip resting 1.0 mm above the third ventricle . The coordinates ( Albe-Fessard et al., 1971 ) were ( in mm ) : A = 6.1 , L = 0.0 , H = 3.5 ; the cannula was in held in place by dental cement and stainless steel anchor screws inserted into the calvarium ( Myers , 1977 ) . A stainless steel stylet cut to a length of 13.0 mm was placed into the guide cannula and left until the experiment began .

MSO ( 60  $\mu$ g per rat ) dissolved in sterile 0.9 % NaCl solution or artificial cerebrospinal fluid ( Myers and Ruwe , 1982 ) , was injected in a volume of 10  $\mu$ l over a period of 2.30 min , through a 33-gauge injector needle cut to a length of 14.0 mm from stainless steel tubing ( Hamilton ) , connected with a length of polyethylene tubing ( internal diameter 0.30mm ) to a 50  $\mu$ l - capacity Hamilton microsyringe driven by a variable speed infusion pump ( Braun , Melsungen , model Perfusor I ) , as previously described ( Ginefri-Gayet and Gayet , 1988 ) .

At the conclusion of each experiment , the location of the site of injection was verified with the method described by Myers ( 1977 ) , using a 1 % bromophenol blue solution in bidistilled water : were regarded as valid those preparations in which the dye was visible in all the cerebroventricular cavities .

## 2.5. Behavioural observations

At the end of the 5 h - period record of rectal temperature the rat was



immediately and carefully taken out of the restrainer ,it was placed in a Plexiglass box and its behaviour was observed in the same environmental conditions .

## 2.6. Drug treatment

(<sup>+</sup>)-Pindolol ( Sigma ) ( 1.5 - 6.0 mg/kg ) , dissolved by means of equimolar amount of HCl diluted in 0.9 % NaCl solution , was injected subcutaneously ( s.c. ) one hour before administration of MSO . (-)-Propranolol hydrochloride ( Sigma ) ( 16.0 - 25.0 mg/kg i.p. ) , ketanserin tartrate ( Janssen Pharmaceutica , Beerse ) ( 0.7 - 1.4 mg/kg i.p. ) , betaxolol ( Synthelabo Recherche , Paris ) ( 1.5 - 4.0 mg/kg s.c. ) , ICI 118,551 hydrochloride ( Imperial Chemical Industries PLC , Macclesfield ) ( 1.13 - 2.26 mg/kg i.p. ) , prazosin hydrochloride ( Sigma ) ( 1.6 - 3.3 mg/kg i.p. ) and yohimbine hydrochloride ( Sigma ) ( 1.1 - 2.2 mg/kg i.p. ) were dissolved in 0.9 % NaCl solution and administered 20 , 20 , 30 , 15 , 30 and 30 min before administration of MSO , respectively .

## 2.7. Statistical analysis

The data were expressed as means  $\pm$  S.E. with the number of animals given within parentheses ; they were statistically analysed by one-way analysis of variance and , in case of significance (  $P < 0.05$  ) , the F - test was followed by paired Student's t - test to compare the experimental groups with their controls . Level of significance was set to 0.05 .

### 3. RESULTS

Mean rectal temperature of normal restrained rats was  $38 \pm 0.4$  °C ( n = 64 ) at an ambient temperature of  $23.0 \pm 1.0$  °C and in the light phase : it was considered as a base line in our experiments . An i.p. injection of 0.9 % NaCl solution ( 1.0 ml per 200 g body weight ) or an injection of artificial cerebrospinal fluid into the third ventricle ( 10  $\mu$ l per rat ) did not exert any significant effect on the rectal temperature . An i.p. dose of 150 mg/kg of MSO or an i.c.v. dose of 60  $\mu$ g per rat of the molecule induced a significant decrease in rectal temperature of  $2.2 \pm 0.3$  °C (  $P < 0.01$  ) ( n = 8 ) or  $2.6 \pm 0.3$  °C (  $P < 0.001$  ) ( n = 5 ) , respectively . The nadir of the decrease of rectal temperature was reached during the course of the 4.00 - 5.00 - h period or of the 2.00 - 2.30 - h period following administration of MSO , respectively ( fig. 1 ) . This hypothermia was associated with the development of a marked syndrome of ataxia with the loss of righting reflexes , an impairment of postural adjustment and hindlimb abduction .

#### 3.1. Effects of pindolol

Pretreatment of MSO-submitted rats with ( $\pm$ )-pindolol ( 1.5 mg/kg s.c. ) attenuated hypothermia after i.p. injection of MSO (  $F_{(1.60)} = 2.85$  ,  $P < 0.01$  ) ( n = 4 ) and after i.c.v. injection of MSO (  $F_{(1.60)} = 14.25$  ,  $P < 0.05$  ) ( n = 4 ) . Pretreatment with ( $\pm$ )-pindolol ( 3 mg/kg s.c. ) suppressed hypothermia either after i.p. (  $F_{(1.60)} = 14.28$  ,  $P < 0.001$  ) ( n = 4 ) or after i.c.v. administration (  $F_{(1.50)} = 2.22$  ,  $P < 0.001$  ) ( n = 6 ) of MSO ( fig. 3

and fig. 4 ) . The animals suffered a syndrome of ataxia , with forepaw trea-  
ding , no postural adjustment , hindlimb myoclonus , and , for those recei-  
ving i.c.v. injection of MSO , a rotational behaviour .

Administered at a dose of 6 mg/kg s.c. , (+)-pindolol lightly increased  
hypothermia following i.p. injection of MSO (  $F_{(1.60)} = 2.85$  ,  $P < 0.01$  )  
(  $n = 4$  ) ( fig. 3 ) .

### 3.2. Effects of propranolol

Pretreatment with (-)-propranolol potentiated MSO-induced hypothermia ,  
with an increase of its time-course . At a dose of 16 mg/kg i.p. maximum  
change in temperature reached  $- 3.8 \pm 0.7$  °C (  $F_{(1.50)} = 8.57$  ,  $P < 0.01$  )  
(  $n = 5$  ) following i.p. injection of MSO ( fig. 5 ) and  $- 3.0 \pm 0.2$  °C  
(  $F_{(1.64)} = 2.22$  , NS ) (  $n = 4$  ) following i.c.v. injection of MSO ( fig. 6 ) .  
With (-)-propranolol administered at a dose of 25 mg/kg i.p. , maximum  
change in temperature reached  $- 2.8 \pm 0.1$  °C (  $F_{(1.60)} = 1.0$  , NS ) (  $n =$   
4 ) after i.p. injection of MSO ( fig. 5 ) . All the MSO-submitted rats thus  
pretreated exhibited a syndrome of ataxia , with hindlimb myoclonus or even  
with tonic-clonic seizures followed by opisthotonos .

### 3.3. Effects of ketanserin

Following pretreatment with ketanserin ( 0.7 and 1.4 mg/kg i.p. )  
MSO-induced hypothermia was not significantly different from that recorded  
following administration of MSO alone . Thus , at a dose of 1.4 mg/kg i.p.  
of ketanserin maximum change in temperature was  $- 2.2 \pm 0.4$  °C (  $F_{(1.64)} =$

5.71 , NS ) ( n = 4 ) after i.p. injection of MSO and it was  $- 2.8 \pm 0.2 \text{ }^{\circ}\text{C}$  with an increase of time-course of hypothermia (  $F_{(1.64)} = 4.28$  ,  $P < 0.05$  ) ( n = 4 ) after i.c.v. injection of MSO . The behaviour of all ketanserin - pretreated rats receiving systemically MSO was the same as that observed after administration of MSO alone ; however , for the majority of the animals receiving MSO into the third ventricle the behaviour was characterized by tonic - clonic seizures followed by opisthotonos .

#### 3.4. Effects of $\alpha$ -adrenoceptor antagonists

Pretreatment with prazosin ( 1.6 mg/kg i.p. ) caused a greater decrease of rectal temperature than that recorded following i.p. injection of MSO alone : the maximum change in temperature reached  $- 3.0 \pm 0.2 \text{ }^{\circ}\text{C}$  (  $F_{(1.60)} = 2.85$  ,  $P < 0.01$  ) ( n = 4 ) ( fig. 7 ) ; but attenuation of hypothermia was observed following i.c.v. injection of MSO (  $F_{(1.64)} = 12.22$  ,  $P < 0.001$  ) ( n = 4 ) ( fig. 8 ) . Pretreatment with prazosin at a dose of 3.3 mg/kg i.p. lightly increased hypothermia following i.p. injection of MSO (  $F_{(1.60)} = 12.85$  ,  $P < 0.05$  ) ( n = 4 ) ( fig. 7 ) . In these three series of experiments the animals exhibited a syndrome of ataxia with a flat body posture .

Yohimbine was administered at thermoneutral doses ( Zacny , 1982 ) . Rats pretreated with yohimbine at a dose of 1.1 mg/kg i.p. showed a maximum change in temperature of  $- 2.0 \pm 0.3 \text{ }^{\circ}\text{C}$  (  $F_{(1.60)} = 2.85$  , NS ) ( n = 4 ) and at a dose of 2.2 mg/kg i.p. they showed a maximum change in temperature of  $- 3.3 \pm 0.3 \text{ }^{\circ}\text{C}$  (  $F_{(1.60)} = 4.28$  ,  $P < 0.001$  ) ( n = 4 ) , after i.p. injection of MSO ( fig. 7 ) . The animals did not exhibit any postural adjustment , but hindlimb abduction and even clonic seizures appeared . When MSO

was subsequently injected into the third ventricle of rats pretreated with yohimbine at a dose of 2.2 mg/kg i.p., a rapid hypothermia developed with a maximum change in temperature of  $- 3.0 \pm 0.2 \text{ }^{\circ}\text{C}$  ( $F_{(1.64)} = 2.22$ , NS) ( $n = 3$ ) (fig. 8); all the animals died during the course of the 4.00 - 5.00 - h period following administration of MSO.

### 3.5. Effects of $\beta$ -adrenoceptor antagonists

Pretreatment with betaxolol at a dose of 1.5 mg/kg s.c. attenuated hypothermia induced by i.p. injection of MSO: the maximum change in temperature was  $- 1.5 \pm 0.5 \text{ }^{\circ}\text{C}$  ( $F_{(1.60)} = 5.71$ ,  $P < 0.05$ ) ( $n = 4$ ) (fig. 7); at a dose of 2.5 mg/kg s.c. betaxolol did not alter hypothermia following i.p. injection of MSO: the maximum change in temperature was  $- 2.7 \pm 0.3 \text{ }^{\circ}\text{C}$  ( $F_{(1.60)} = 1.43$ , NS) ( $n = 4$ ) (fig. 7). No alteration of hypothermia following i.p. injection of MSO was recorded after pretreatment with betaxolol at a dose of 4.0 mg/kg s.c.: maximum change in temperature was  $- 2.1 \pm 0.4 \text{ }^{\circ}\text{C}$  ( $F_{(1.60)} = 4.28$ , NS) ( $n = 4$ ) (fig. 7). In these three series of experiments, the animals exhibited a lack of bodily balance with a flat body posture. The hypothermia developed in rats pretreated with betaxolol (2.5 mg/kg s.c.) then submitted to i.c.v. injection of MSO showed the same characteristics as that following administration of MSO alone: the maximum change in temperature was  $- 2.5 \pm 0.3 \text{ }^{\circ}\text{C}$  ( $F_{(1.64)} = 1.88$ , NS) ( $n = 4$ ) (fig. 8).

Pretreatment with ICI 118,551 potentiated hypothermia induced by i.p. injection of MSO: at a dose of 1.13 mg/kg i.p., the maximum change in temperature was  $- 2.9 \pm 0.2 \text{ }^{\circ}\text{C}$  ( $F_{(1.60)} = 1.43$ , NS) ( $n = 4$ ) and at a

dose of 2.26 mg/kg i.p. it was  $-3.1 \pm 0.2$  °C (  $F_{(1,60)} = 2.85$  ,  $P < 0.05$  ) (  $n = 4$  ) ( fig. 7 ) . The animals did not show any postural adjustment together with a flat body posture . Pretreatment with ICI 118,551 at a dose of 2.26 mg/kg i.p. potentiated hypothermia induced by i.c.v. administration of MSO , the maximum change in temperature was  $-2.9 \pm 0.2$  °C (  $F_{(1,78)} = 4.66$  ,  $P < 0.01$  ) (  $n = 3$  ) ( fig. 8 ) and the rats exhibited a syndrome of ataxia , a flat body posture , and even the sign of Straub tail .

#### 4 . DISCUSSION

MSO i.p. administered ( at a dose of 150 mg/kg ) to the rat is rapidly taken up by liver and kidney and crosses the blood-brain barrier : in the central nervous system , 6 h after its administration , the molecule is uniformly distributed without any preferential accumulation ( Schatz et al., 1976 ) and it binds to protein , especially to the active site of glutamine synthetase ( Meister , 1978 ) , particularly in gray matter astrocytes in all areas of the brain ( Norenberg , 1983 ) . The irreversible inhibition of glutamine synthetase ( Meister , 1978 ) leads to a rise in ammonia levels in extra- and intracellular compartments of the brain ( Cooper et al., 1979 ; Hindfelt , 1975 ) . During this 5 - to 6 - h preconvulsant period MSO induces an increase of synthesis of phosphatidylmonomethyl-ethanolamine , a normal constituent of the brain ( Schatz et al., 1983 ; Sellinger et al., 1984 ) , reflecting increased membrane fluidity ( Hirata and Axelrod , 1978 ) .

Are these neurochemical events directly or indirectly related to the decrease in body temperature following MSO administration and which develops

during the preconvulsant period ? We had previously found that this hypothermia is centrally mediated ( Ginefri-Gayet and Gayet , 1988 ) and seems to be linked to brain 5-HT metabolism ( Ginefri-Gayet and Gayet , 1991 ).

The functional and behavioural responses to 5-HT observed are often of relatively low onset and long duration , suggesting metabotropic actions . The variability in action and in response to pharmacological manipulations suggested the existence of multiple types of 5-HT receptors , particularly in the central nervous system ( Glennon , 1987 ; Hamon et al., 1988 ; Hoyer , 1988 ; Peroutka , 1987 and 1988 ) . We have found that pretreatment of rats with (+)-pindolol at doses of 1.5 and 3.0 mg/kg s.c. attenuated or suppressed hypothermia induced by MSO administered i.p. or i.c.v. to the animals . Pindolol is a non selective antagonist of  $\beta$  - adrenoceptors having a high affinity for the 5-HT<sub>1A</sub> binding site ( Hoyer , 1988 ) . It was noteworthy that rats pretreated with (+)-pindolol at a dose of 6 mg/kg s.c. did not show any modification of the characteristics of MSO-induced hypothermia ; this last result seemed to be in accordance with the possible mixed agonist - antagonist properties of pindolol at central 5-HT receptors ( Hjorth and Carlsson , 1986 ) . Pretreatment of rats with (-)-propranolol ( 16 and 25 mg/kg i.p. ) led to rather complex results when they were subsequently submitted to MSO : hypothermia was enhanced if MSO was injected i.p., moreover , its magnitude and time-course were increased if MSO was administered i.c.v. (-)-Propranolol is a non selective antagonist for  $\beta$  - adrenoceptors and its affinity for the 5-HT<sub>1A</sub> site is nearly one order of magnitude lower than that of (-)-pindolol ( Hoyer , 1988 ) ; propranolol would appear not to be a good antagonist of the 5-HT<sub>1A</sub> autoreceptor ( Sharp et al., 1990 ). Furthermore , (-)-propranolol would be a relatively weak antagonist of 5-HT

itself , suggesting that endogenous 5-HT may exert some effects on the neurons in the DRN in addition to those mediated by 5-HT<sub>1A</sub> receptors ( Sprouse and Aghajanian , 1986 ). On the other hand , it was previously suggested that the hypothermic mode of action of (-)-propranolol may be explained by a blockade of central dopaminergic neurons ( Yehuda et al., 1981 ), and recently it has been shown that , in brain membrane preparations isolated from propranolol injected rats , an increased methylation of chloroform extractable products occurred , which is presumably site - dependent ( Benistant et al., 1990 ) . Administration of ketanserin ( 0.7 and 1.4 mg/kg i.p. ) 20 min prior to i.p. and i.c.v. injection of MSO did not greatly modified the magnitude of hypothermia thus induced , but its time-course was longer after i.c.v. injection of MSO . Ketanserin is an antagonist with a high affinity for the 5-HT<sub>2</sub> binding sites ( Hoyer , 1988 ) .

It has been proposed that activation of the 5-HT<sub>1A</sub> receptor subtypes would result in a hypothermic response , whereas activation of 5-HT<sub>2</sub> receptors would result in a hyperthermic response ( Gudelsky et al., 1986 ; Hjorth , 1985 ) . Thus , 5-HT<sub>1A</sub> agonists such as 8-hydroxy-2-(di-n-propyl-amino)tetralin ( 8-OH-DPAT ) or the anxiolytic molecule buspirone induced a core hypothermia in the rat by activation of the 5-HT<sub>1A</sub> receptors ( Koenig et al. , 1988 ) . Pharmacological studies were generally performed using artificial ligands for 5-HT receptors , but concerning the hypothermic effect of MSO the ligand would be 5-HT only . It is well known that 5-HT shows a high affinity for 5-HT<sub>1</sub> receptors :  $K_i = 2.2 \text{ nM}$  for the 5-HT<sub>1A</sub> subtype ; on the other hand , its affinity for 5-HT<sub>2</sub> receptors is very low :  $K_i = 2,700 \text{ nM}$  ( Peroutka , 1987 ) . It has been found that i.c.v. injection of 5-HT in mice induced hypothermia , which was inhibited by pindolol but not



by ketanserin ( Yamada et al., 1988 ). On the other hand , the microinjection of 5-HT or 8-OH-DPAT into the DRN of the rat rapidly elicited a core hypothermia which was suppressed by (-)-pindolol ( Hillegaart , 1991 ).

Noradrenergic terminals in the DRN appear to mediate a tonically active noradrenalin influence from which is subordinated the firing of 5-HT neurons ( Aghajanian et al., 1987 ), these effects would be mediated by  $\alpha_1$ -adrenoceptors ( (<sup>3</sup>H)prazosin binding sites ) located on these 5-HT neurons ( Smith and Gallager , 1989 ). Such modulation pathways would explain the enhancing effect of prazosin ( 1.6 mg/kg i.p. ) on hypothermia following i.p. administration of MSO , prazosin being a selective antagonist with a high affinity for postsynaptic  $\alpha_1$ -adrenoceptors . However , we must consider the role played by prazosin as an antagonist of peripheral  $\alpha_1$ -adrenoceptors and as a ligand having different degrees of affinity for the  $\alpha$ -adrenoceptors ( Bylund and U'prichard , 1983 ; Exton , 1982 ) .

Pretreatment of rats with yohimbine ( 1.1 and 2.2 mg/kg i.p. ), a selective antagonist with a high affinity for  $\alpha_2$ -adrenoceptors , administered at non hypothermic doses ( Zacny , 1982 ) , significantly modified the characteristics of hypothermia elicited by subsequent i.p. and i.c.v. administration of MSO , increasing the magnitude of the decrease of body temperature . Such experimental data are difficult to explain ; however , it is interesting to draw attention to the relatively high affinity of yohimbine for 5-HT<sub>1A</sub> sites (  $pK_D = 6.86$  ) nearly equal to that of (-)-propranolol (  $pK_D = 6.81$  ) for these same sites ( Hoyer , 1988 ).  $\alpha_2$ -Adrenoceptors have been found on 5-HT neurons and they have been reported to modulate 5-HT release ( Ellison and Campbell , 1986 ) .

Pindolol and propranolol are non selective antagonists with respect to

$\beta$ -adrenoceptor subtypes and show a high affinity to 5-HT<sub>1A</sub> and 5-HT<sub>1B</sub> receptors ( Hoyer , 1988 ) ; on the other hand , it was recently shown that selective  $\beta$ -adrenoceptor antagonists , such as betaxolol and ICI 118,551 , can bind to  $\beta$ -adrenoceptors and 5-HT<sub>1B</sub> receptors ( Tsuchihashi et al., 1990 ) . Results obtained in rats pretreated with the selective  $\beta_1$ -adrenoceptor antagonist betaxolol ( Boudot et al., 1979 ) were rather complex when MSO was subsequently administered i.p. , although the time-course and magnitude of hypothermia were not altered after i.c.v. injection of MSO . Pretreatment with ICI 118,551 , a selective antagonist of  $\beta_2$ -adrenoceptors ( Bilski et al., 1980 ) , which potentiated hypothermia following i.p. and i.c.v. injection of MSO proved that peripheral and central  $\beta_2$ -adrenoceptors would be involved in the decrease of body temperature following administration of MSO to the rat .

We had previously suggested that hypothermia induced by MSO in the rat might be directly related to a depressive effect on the rate of glucose utilization and its oxidative metabolism in cerebral cell structures , maybe astroglial cells , located at sites of blood-brain and cerebrospinal fluid-brain junctions ( Ginefri-Gayet and Gayet , 1988 ) . After a systemic administration of MSO , cerebral levels of glucose and glycogen rise ( Bérel et al., 1977 a, b ; Folbergrova et al., 1969 ; Hevor et al., 1985 ) correlatively with a hyperglycemia ( Nehlig and Gayet , unpublished results ) , thus eliciting a decrease in body temperature ( Robinson et al., 1972 ) .

Systemic administration of drugs acting on central 5-HT systems does not provide information on the specific 5-HT neuronal pathways implicated in such alterations of brain metabolism . Our present results are in favour of a control exerted by 5-HT<sub>1</sub> - like receptors in the neurochemical events responsible for the development of MSO-induced hypothermia , this control would be

modulated by  $\alpha$  - and  $\beta$  -adrenoceptors . Subbarao and Hertz (1991) have proposed that if astrocytes are the major target , for noradrenergic stimulation of brain metabolism , the stimulation can , however , be expected secondarily to affect also neurons , and thus brain output .  $\alpha_2$ -adrenoceptor antagonists , such as yohimbine , produced a generalized depression in brain glucose utilization ( Savaki et al., 1982 ) , however , hypothermia following administration of the 5-HT<sub>1A</sub> receptor agonist 8-OH-DPAT to mice was attenuated by the  $\alpha_2$ -adrenoceptor antagonist atipemazole , which occupies both central and peripheral receptors ( Durcan et al., 1991 ) .

REFERENCES

- Aghajanian, G.K., J.S. Sprouse and K. Rasmussen , 1987. Physiology of the midbrain serotonin system, in : Psychopharmacology. The Third Generation of Progress, ed. H.Y. Meltzer ( Raven Press , New York ) p. 141.
- Albe-Fessard, D., F. Stutinsky and S. Libouban , 1971 . Atlas Stéréotaxique du Diencéphale du Rat Blanc , ( Editions du C.N.R.S., Paris ) .
- Benistant, C., C. Rey and P. Fonlupt , 1990 . Increased methylation of chloroform extractable products in brain membrane preparations after propranolol injection to the rat . Gen. Pharmacol. 21 , 23 .
- Bérel, A., P.R. Lehr and J. Gayet , 1977a . Inhibition by metyrapone of convulsions and storage of brain glycogen in mice induced by methionine sulfoximine (MSO). Brain Res. 128 , 193 .
- Bérel, A., P.R. Lehr and J. Gayet , 1977b . Inhibition by metyrapone of convulsions and of accumulation of brain glucose and glycogen in mice induced by methionine sulfoximine (MSO) . Sixth Int. Meeting of the I.S.N., ( Copenhagen ) Abstract N° 211 .
- Bilski, A., S. Dorries, J.D. Fitzgerald, R. Jessup, H. Tucker and J. Wale, 1980. ICI 118,551 , a potent  $\beta_2$  adrenoceptor antagonist . Brit. J. Pharmacol. 69 , 292P .
- Boudot, J.P., I. Caverro, S. Fenard, F. Lefevre-Borg, P. Manoury and A.G. Roach, 1979. Preliminary studies on SL 75212 , a new potent cardioselective  $\beta$  -adrenoceptor antagonist . Brit. J. Pharmacol. 66 , 445P .
- Bylund, D.B. and D.C. U'prichard , 1983 . Characterization of  $\alpha_1$ - and  $\alpha_2$ -adrenergic receptors . Int. Rev. Neurobiol. 24 , 343 .
- Cooper, A.J.L., J.M. McDonald , A.S. Gelbard , R.F. Gledhill and T.E. Duffy , 1979 . The metabolic fate of  $^{13}\text{N}$  - labeled ammonia in rat brain. J. Biol.

Chem. 254 , 4982 .

Durcan, M.J., K.M. Wozniak and M. Linnoila , 1991 . Modulation <sup>of</sup> the hypothermic hyperglycaemic effects of 8-OH-DPAT by  $\alpha_2$ -adrenoceptor antagonists . Brit. J. Pharmacol. 102 , 222 .

Ellison, D.W. and I.C. Campbell , 1986 . Studies on the role of  $\alpha_2$ -adrenoceptors in the control of synaptosomal (<sup>3</sup>H)-5-hydroxytryptamine release : effects of antidepressant drugs . J. Neurochem. 46 , 218 .

Erecinska, M., A. Pastuszko, D.F. Wilson and D. Nelson , 1987 . Ammonia - induced release of neurotransmitters from rat brain synaptosomes : differences between the effects on amines and amino acids . J. Neurochem. 49 , 1258 .

Exton, J.H. , 1982 . Molecular mechanisms involved in  $\alpha$ -adrenergic responses. Trends Pharmacol. Sci. 3 , 111 .

Folbergrova, J., J.V. Passonneau, O.H. Lowry and D.W. Schulz , 1969 . Glycogen, ammonia and related metabolites in the brain during seizures evoked by methionine sulphoximine . J. Neurochem. 16 , 191 .

Ginefri-Gayet, M. and J. Gayet , 1988 . Study of the hypothermia induced by methionine sulfoximine in the rat . Pharmacol. Biochem. Behav. 31 , 797 .

Ginefri-Gayet, M. and J. Gayet , 1991 . Possible link between brain serotonin metabolism and methionine sulfoximine-induced hypothermia and associated behavior in the rat . Pharmacol. Biochem. Behav. , submitted for publication.

Glennon, R.A. , 1987 . Central serotonin receptors as targets for drug research . J. Med. Chem. 30 , 1 .

Gudelsky, G.A., J.I. Koenig and H.Y. Meltzer , 1986 . Thermoregulatory responses to serotonin ( 5-HT ) receptor stimulation in the rat . Evidence for

- opposing roles of 5-HT<sub>2</sub> and 5-HT<sub>1A</sub> receptors . *Neuropharmacology* , 25 , 1307 .
- Hamon, M., H. Gozlan, S. Elmeistikawy , M.B. Emerit , J.M. Cossery and O. Lutz, 1988. Biochemical properties of central serotonin receptors , in : *Neuronal Serotonin* , eds. N.N. Osborne and M. Hamon ( John Wiley and Sons, Chichester ) p. 393 .
- Hevor, T.K., P. Delorme and J.Gayet , 1985 . Glycogen content and fructose-1,6-bisphosphatase activity in methionine sulfoximine epileptogenic mouse brain and liver after protein synthesis inhibition . *Neuropathol. Appl. Neurobiol.* 11 , 129 .
- Hillegaart, V. , 1991 . Effects of local application of 5-HT and 8-OH-DPAT into the dorsal and median raphe nuclei on core temperature in the rat . *Psychopharmacology* 103 , 291 .
- Hindfelt, B. , 1975. L-Methionine DL-sulphoximine (MSO) and ammonia distribution between extra and intracellular compartments of the rat brain. *J. Neurol. Sci.* 25 , 499 .
- Hirata, F. and J. Axelrod , 1978 . Enzymatic methylation of phosphatidylethanolamine increases erythrocyte membrane fluidity . *Nature* 275 , 219 .
- Hjorth, S., 1985 . Hypothermia in the rat induced by the potent serotonergic agent 8-OH-DPAT . *J. Neural Transm.* 61 , 131 .
- Hjorth, S. and A. Carlsson , 1986 . Is pindolol a mixed agonist-antagonist at central serotonin ( 5-HT ) receptors ? *Eur. J. Pharmacol.* 129 , 131 .
- Hoyer , D., 1988 . Functional correlates of serotonin 5-HT<sub>1</sub> recognition sites . *J. Receptor Res.* 8 , 59 .
- Koenig, J.I., H.Y. Meltzer and G.A. Gudelsky , 1988 . 5-Hydroxytryptamine<sub>1A</sub> receptor-mediated effects of buspirone , gepirone and ipsapirone .

Pharmacol. Biochem. Behav. 29 , 711 .

Meister, A., 1978 . Inhibition of glutamine synthetase and  $\gamma$ -glutamylcysteine synthetase by methionine sulfoximine and related compounds, in: Enzyme-Activated Irreversible Inhibitors , eds. N. Seiler, M.J. Jung and J. Koch-Weser ( Elsevier/North-Holland , Amsterdam ) p. 187 .

Myers, R.D., 1977 . Chronic methods : intraventricular infusion , cerebrospinal fluid sampling , and push-pull perfusion , in: Methods in Psychobiology , vol. 3 , ed. R.D. Myers ( Academic Press , New York ) p. 281 .

Myers, R.D. and W.D. Ruwe , 1982 . Is alcohol induced poikilothermia mediated by 5-HT and catecholamine receptors or by ionic set-point mechanism in the brain? Pharmacol. Biochem. Behav. 16 , 321 .

Norenberg, M.D., 1983 . Immunochemistry of glutamine synthetase , in : Glutamine , Glutamate, and GABA in the Central Nervous System, eds L. Hertz , E. Kvamme, E.G. McGeer and A. Schousboe ( Alan Liss , New York ) p. 95 .

Peroutka, S.J., 1987 . Serotonin receptors , in : Psychopharmacology . The Third Generation of Progress , ed. H.Y. Meltzer ( Raven Press , New York ) p. 303 .

Peroutka, S.J., 1988 . Functional correlates of central 5-HT binding sites, in : Neuronal Serotonin , eds. N.N. Osborne and M. Hamon ( John Wiley and Sons , Chichester ) p. 423 .

Robinson, S.M., M. Mager and N. Freinkel, 1972 . Interrelationship of central nervous system glucopenia and heat production in mice , in : The Pharmacology of Thermoregulation , eds. E. Schoenbaum and P. Lomax ( Karger , Basel ) p.112 .

Savaki, H.E., M.Kadekaro , J. McCulloch and L. Sokoloff , 1982 . The central noradrenergic system in the rat . Metabolic mapping with alpha-adrenergic

- blocking agents . Brain Res. 234 , 65 .
- Schatz, R.A., R. Harris and O.Z. Sellinger , 1976 . The effect of methionine on the uptake , distribution and binding of the convulsant methionine sulfoximine in the rat . Neurochem. Res. 1 , 53 .
- Schatz, R.A., T.E. Wilens, S.B. Tatter, P. Gregor and O.Z. Sellinger , 1983 . Possible role of increased brain methylation in methionine sulfoximine epileptogenesis : effects of administration of adenosine and homocysteine thiolactone . J. Neurosci. Res. 10 , 437 .
- Sellinger, O.Z. and D.D. Dietz , 1981 . The metabolism of 5-hydroxytryptamine in the methionine sulfoximine epileptogenic rat brain . J. Pharmacol. Exp. Ther. 216 , 77 .
- Sellinger, O.Z., R.A. Schatz , R. Porta and T.E. Wilens , 1984 . Brain methylation and epileptogenesis : the case of methionine sulfoximine . Ann. Neurol. 16 (suppl.), S 115 .
- Sharp, T., L.I.B.S. Hjorth, S.R. Bramwell and D.G. Grahame-Smith , 1990 . Further investigation of the in vivo pharmacological properties of the putative 5-HT<sub>1A</sub> antagonist , BMY 7378 . Eur. J. Pharmacol. 176 , 331 .
- Smith, D.A. and D.W. Gallager, 1989 . Electrophysiological and biochemical characterization of the development of  $\alpha_1$ -adrenergic and 5-HT<sub>1</sub> receptors associated with dorsal raphe neurons . Develop. Brain Res. 46 , 173 .
- Sprouse, J.S. and G.K. Aghajanian , 1986 . (-)-Propranolol blocks the inhibition of serotonergic dorsal raphé cell firing by 5-HT<sub>1A</sub> selective agonists. Eur. J. Pharmacol. 128 , 295 .
- Subbarao, K.V. and L. Hertz, 1991 . Stimulation of energy metabolism by  $\alpha$ -adrenergic agonists in primary cultures of astrocytes. J. Neurosci. Res. 28 , 399 .



- Tsuchihashi, H., Y. Nakashima, J. Kinami and T. Nagatomo , 1990 . Characteri-  
of  $^{125}\text{I}$ -iodocyanopindolol binding to  $\beta$ -adrenergic and serotonin - 1B  
receptors of rat brain : selectivity of  $\beta$ -adrenergic agents . Jpn. J.  
Pharmacol. 52 , 195 .
- Wada, J.A., H. Ikeda and K. Berry , 1967 . Reversible behavioral and electro-  
graphic manifestations induced by methionine sulfoximine . Neurology 17 ,  
854 .
- Yamada, J., Y. Sugimoto, H. Wakita and K. Horisaka , 1988 . The involvement  
of serotonergic and dopaminergic systems in hypothermia induced in mice by  
intracerebroventricular injection of serotonin . Jpn. J. Pharmacol. 48 ,  
145 .
- Yehuda, B.-U., S. Yehuda and R.L. Caraso , 1981 . Physiological evidence  
( hypothermia ) for central effects of beta-blocker agents . Int. J. Neurosci.  
14 , 41 .
- Zacny, E. , 1982 . The role of  $\alpha_2$ -adrenoceptors on the hypothermic effect  
of clonidine in the rat . J. Pharm. Pharmacol. 34 , 455 .

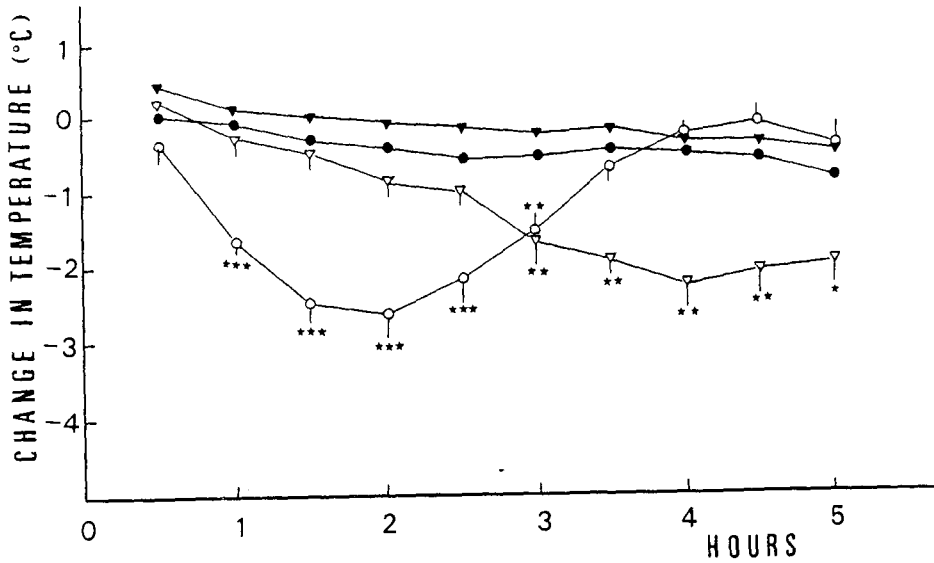


Figure 1 . Changes in rectal temperature following administration of MSO to restrained rats , at an ambient temperature of 23 °C . Time in hours . ▽ : i.p. injection of MSO ( 150 mg/kg ) ( n = 8 ) ; ▼ : saline controls ( n = 5 ) ; ○ : injection of MSO ( 60 µg per rat ) into the third ventricle ( n = 5 ) ; ● : saline controls ( n = 4 ) .

★ P < 0.05 , ★★ P < 0.01 and ★★★ P < 0.001 for significant differences compared with saline controls ( Student's t - test ) .

For the sake of clarity S.E.M. for means of saline controls are not represented .

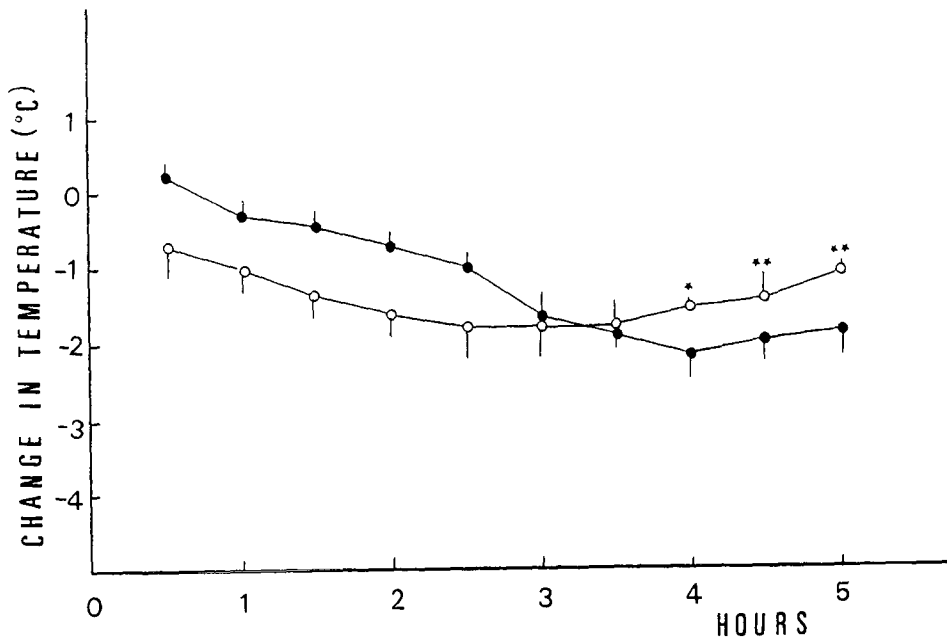


Figure 2 . Changes in rectal temperature following i.p. injection of MSO ( 150 mg/kg ) to restrained rats , at an ambient temperature of 23 °C . Time in hours . ○ : pretreatment with (±)-pindolol ( 1.5 mg/kg s.c. ) 60 min before administration of MSO ( n = 4 ) ; ● : MSO ( 150 mg/kg i.p. ) . ★ P < 0.05 and ★★ P < 0.01 for significant differences compared with rats submitted to MSO alone ( analysis of variance followed by paired Student's t - test ) .

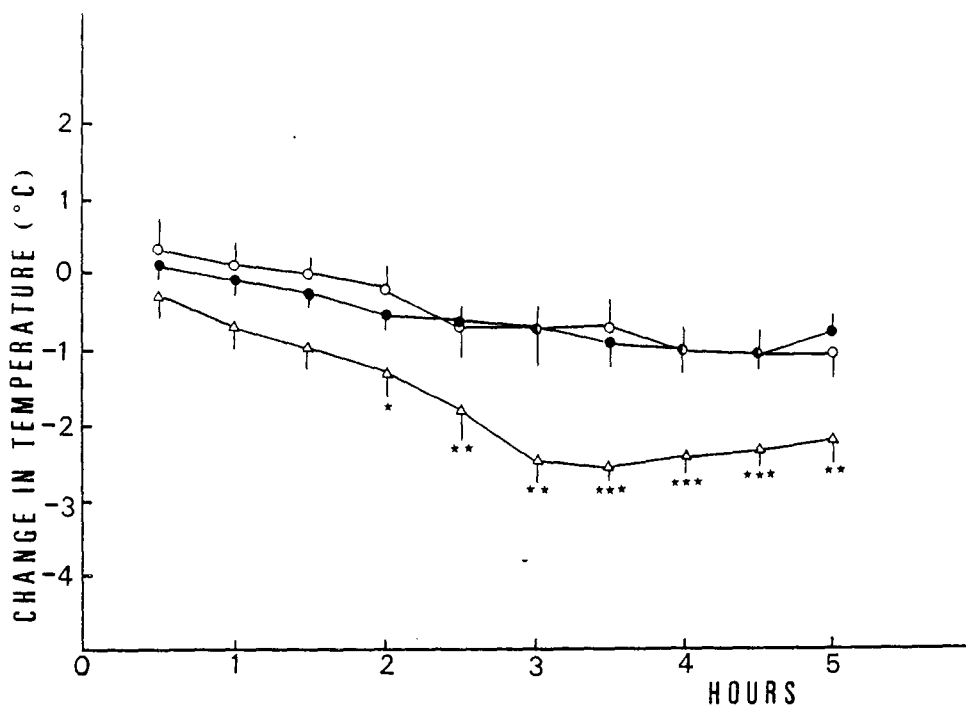


Figure 3 . Changes in rectal temperature following i.p. injection of MSO ( 150 mg/kg ) to restrained rats , at an ambient temperature of 23 °C . Time in hours . ○ : pretreatment with (+)-pindolol ( 3 mg/kg s.c. ) 60 min before administration of MSO ( n = 4 ) ; △ : pretreatment with (+)-pindolol ( 6 mg/kg s.c.) 60 min before administration of MSO ( n = 4 ) ; ● : pretreatment with (+)-pindolol ( 3 mg/kg s.c. ) of saline controls ( n = 4 ) . ★ P < 0.05 , ★★ P < 0.01 and★★★★ P < 0.001 , for significant differences compared with saline controls ( Student's t - test ).

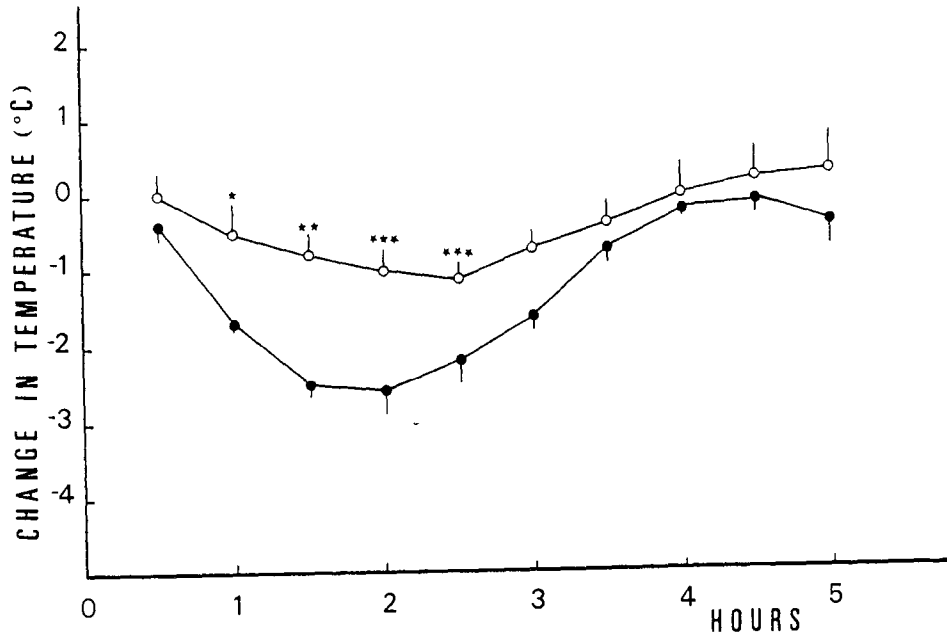


Figure 4 . Changes in rectal temperature following injection of MSO ( 60  $\mu$ g per rat ) into the third ventricle of restrained rats , at an ambient temperature of 23  $^{\circ}$ C . Time in hours .  $\bigcirc$  : pretreatment with (+)-pindolol ( 3 mg/kg s.c.) 60 min before administration of MSO ( n = 6 );  $\bullet$  : injection of MSO ( 60  $\mu$ g per rat ) into the third ventricle ( n = 5 ) .  $\star$  P < 0.05 ,  $\star\star$  P < 0.01 and  $\star\star\star$  P < 0.001 for significant differences compared with rats submitted to MSO alone ( analysis of variance followed by paired Student's t - test ) .

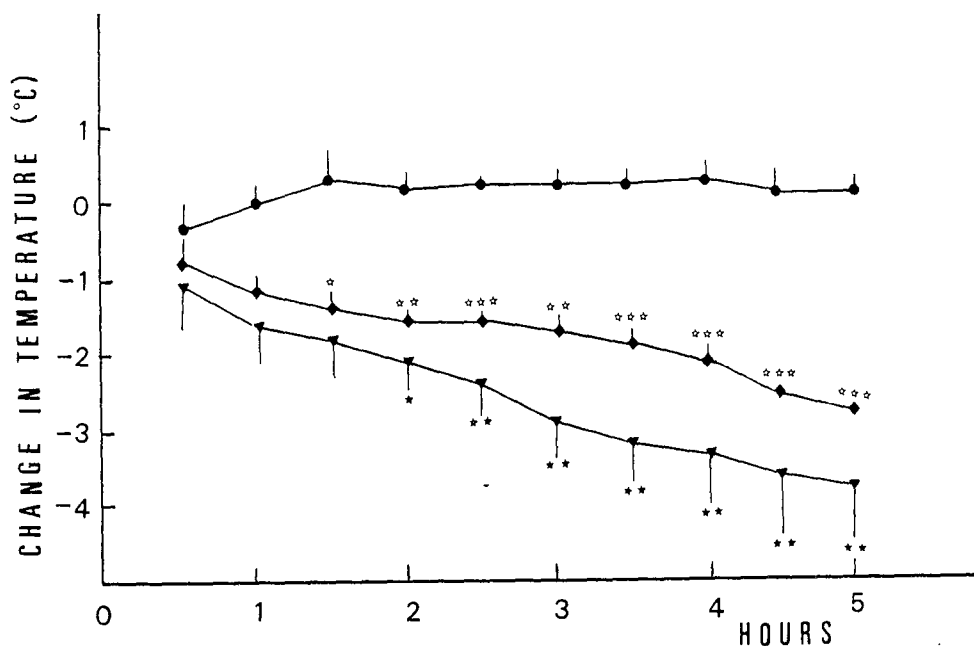


Figure 5 . Changes in rectal temperature following i.p. injection of MSO ( 150 mg/kg ) to restrained rats , at an ambient temperature of 23 °C . Time in hours . ▼ : pretreatment with (-)-propranolol ( 16 mg/kg i.p.) 20 min before administration of MSO ( n = 4 ) ; ◆ : pretreatment with (-)-propranolol ( 25 mg/kg i.p. ) 20 min before administration of MSO ( n = 4 ) ; ● : pretreatment with (-)-propranolol ( 16 mg/kg i.p. ) of saline controls ( n = 3 ) . ★ and ☆ P < 0.05 , ★★ and ☆☆ P < 0.01 and ☆☆☆ P < 0.001 , for significant differences compared with saline controls ( Student's t - test ) .

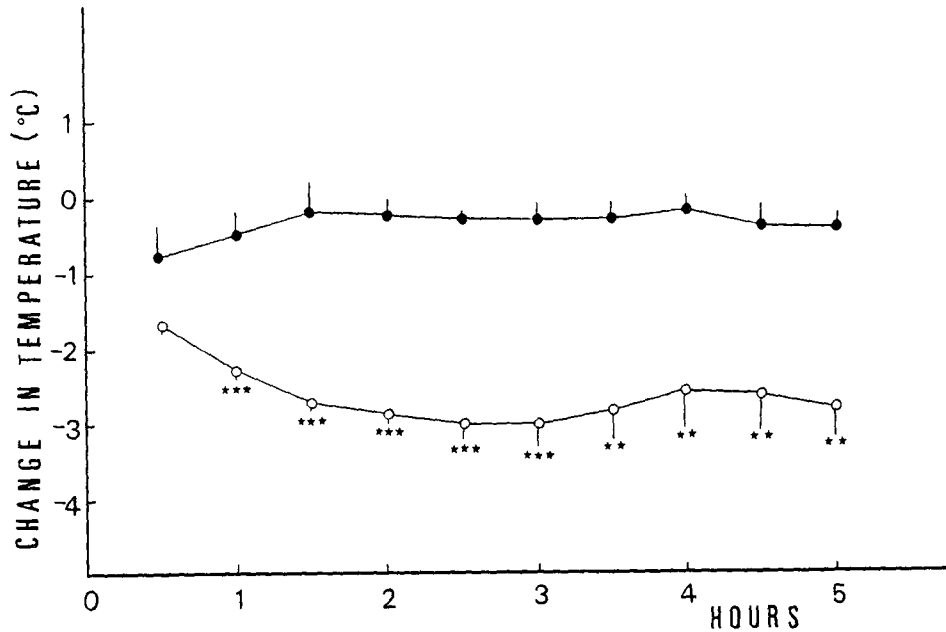


Figure 6 . Changes in rectal temperature induced by an injection of MSO (60 µg per rat ) into the third ventricle of restrained rats , at an ambient temperature of 23 °C . Time in hours . ○ : pretreatment with (-)-propranolol ( 16 mg/kg i.p. ) 20 min before administration of MSO ( n = 4 ) ; ● : pretreatment with (-)-propranolol ( 16 mg/kg i.p. ) of saline controls ( n = 3 ) . ★★ P < 0.01 and ★★★ P < 0.001 , for significant differences compared with saline controls ( Student's t - test ).

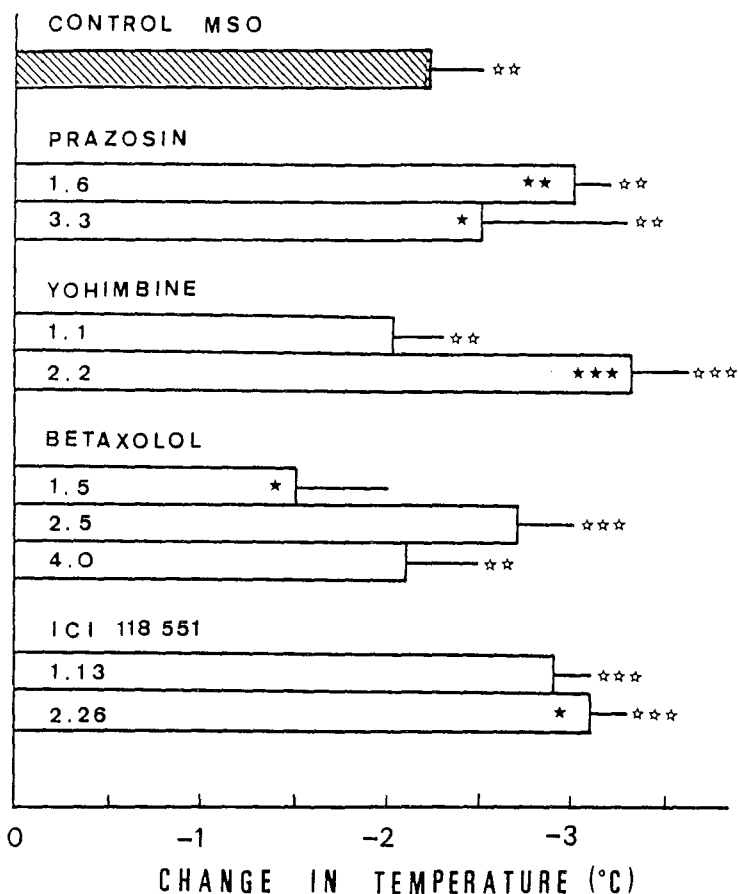


Figure 7 . Maximum change in rectal temperature induced by an i.p. injection of MSO ( 150 mg/kg ) to restrained rats , at an ambient temperature of 23 °C . Pretreatments with prazosin ( 1.6 and 3.3 mg/kg i.p. ) ( n = 4 ) , with yohimbine ( 1.1 and 2.2 mg/kg i.p. ) ( n = 4 ) , with betaxolol ( 1.5 , 2.5 and 4.0 mg/kg s.c. ) ( n = 4 ) and with ICI 118,551 ( 1.13 and 2.26 mg/kg i.p. ) ( n = 4 ) , 30 , 30 , 30 and 15 min , respectively , before administration of MSO ( 150 mg/kg i.p. ) . ★ P < 0.05 , ★★ P < 0.01 and ★★★ P < 0.001 , for significant differences compared with rats submitted to MSO alone ( control MSO ) ( n = 8 ) ( analysis of variance followed by paired Student's t - test ) . ☆☆ P < 0.01 and☆☆☆ P < 0.001 , for significant differences compared with saline controls ( n = 4 , for each adrenoceptor antagonist pretreated group ) ( Student's t - test ) .



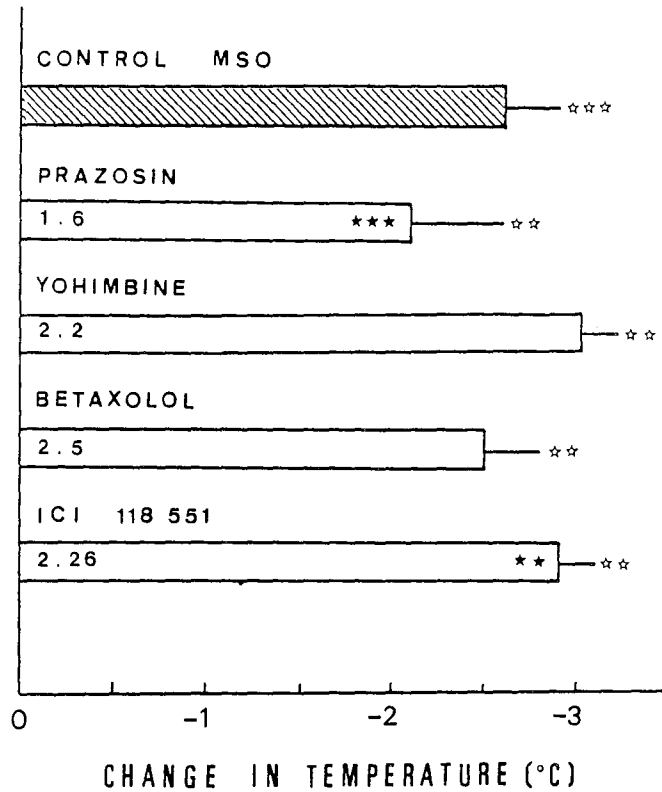


Figure 8 . Maximum change in rectal temperature induced by an injection of MSO ( 60 µg per rat ) into the third ventricle of restrained rats , at an ambient temperature of 23 °C . Pretreatments with prazosin ( 1.6 mg/kg i.p. ) ( n = 4 ), with yohimbine ( 2.2 mg/kg i.p. ) ( n = 4 ), with betaxolol ( 2.5 mg/kg s.c. ) ( n = 4 ) and with ICI 118,551 ( 2.26 mg/kg i.p. ) ( n = 4 ) , 30 , 30 , 30 and 15 min , respectively , before administration of MSO ( 60 µg per rat ) into the third ventricle .

★★ P < 0.01 and ★★★ P < 0.001 , for significant differences compared with rats submitted to MSO alone ( control MSO ) ( n = 5 ) ( analysis of variance followed by paired Student's t - test ) . ☆☆ P < 0.01 and ☆☆☆ P < 0.001 , for significant differences compared to saline controls ( n = 4 , for each adrenoceptor antagonist pretreated group ) ( Student's t - test ) .

# UNIVERSITE DE NANCY I

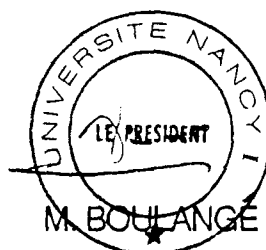
NOM DE L'ETUDIANT : Madame GAYET (née GINEFRI) Madeleine

NATURE DE LA THESE : DOCTORAT DE L'UNIVERSITE DE NANCY I  
en NEURO-PHARMACOLOGIE

VU, APPROUVE ET PERMIS D'IMPRIMER

NANCY, le 16 OCT. 1991. n° 448

LE PRESIDENT DE L'UNIVERSITE DE NANCY I



L'injection systémique de la méthionine sulfoximine (MSO), chez le rat, entraîne une encéphalopathie lentement progressive caractérisée par un désordre du mouvement (ataxie) suivi quelques heures plus tard de convulsions toniques et cloniques. Ce modèle est utilisé pour la recherche des mécanismes métaboliques liés aux convulsions.

Le but du travail que nous présentons est d'étudier les modalités de la variation de la température interne du rat sous l'action de la MSO, et, de tenter de tirer des conclusions en ce qui concerne les voies neuronales dans le système nerveux central qui peuvent être impliquées dans cette variation.

Mots-clés : Méthionine sulfoximine - Hypothermie rectale - Période préconvulsive - Ammoniaque intracellulaire - Métabolisme du glucose - Astrocytes - Comportement moteur  
Métabolisme de la sérotonine - p-Chlorophénylalanine - p-Chloroamphétamine - d-Fenfluramine - 5-Hydroxytryptophane - Pindolol - Propranolol - Noyau dorsal du raphé - Prazosin - Yohimbine - Betaxolol - ICI 118.551 - Métabolisme de l'acide  $\gamma$ -aminobutyrique -  $\gamma$ -vinylGABA - Acide nipécotique - 2-OH-saclofen -

